



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115611983 A

(43) 申请公布日 2023.01.17

---

(21) 申请号 202110795793.0	C12N 15/85 (2006.01)
(22) 申请日 2021.07.14	C12N 5/10 (2006.01)
(71) 申请人 三优生物医药(上海)有限公司	A61K 39/395 (2006.01)
地址 201114 上海市闵行区新骏环路188号	A61K 47/68 (2017.01)
6号楼B-C座3楼	A61K 45/06 (2006.01)
(72) 发明人 闫鑫甜 郎国竣 谭永聪 刘婵娟	A61P 35/00 (2006.01)
孔超 闫闰 刘亚茹 姚天恩	G01N 33/68 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所	G01N 33/574 (2006.01)
11247	
专利代理师 胡志君 黄革生	
(51) Int. Cl.	
C07K 16/28 (2006.01)	
C07K 16/30 (2006.01)	
C07K 16/46 (2006.01)	
C12N 15/13 (2006.01)	

权利要求书2页 说明书25页  
序列表9页 附图5页

---

(54) 发明名称

CLDN18.2结合分子及其用途

(57) 摘要

本发明涉及特异性CLDN18.2结合分子以及含有所述CLDN18.2结合分子的免疫缀合物、组合物。本发明还涉及编码所述CLDN18.2结合分子的核酸及包含其的宿主细胞,以及制备所述CLDN18.2结合分子的方法。此外,本发明涉及这些CLDN18.2结合分子的治疗和诊断用途。特别地,本发明涉及这些CLDN18.2结合分子与其它疗法,例如治疗方式或治疗剂的联合治疗。

1. CLDN18.2结合分子,其包含至少一个特异性结合CLDN18.2的单结构域抗体(sdAb)部分,所述sdAb部分包含三个互补决定区,分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中:

(a) CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列、或SEQ ID NO:1的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体;

(b) CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列、或SEQ ID NO:2的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体;和

(c) CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列、或SEQ ID NO:3的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体,

其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或保守氨基酸取代,优选地,所述sdAb部分是骆驼科动物VHH、部分人源化的或完全人源化的VHH、嵌合的VHH。

2. 根据权利要求1所述的CLDN18.2结合分子,其中所述sdAb部分包含:含有氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:2的CDR2和含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的CDR3。

3. 根据权利要求1或2所述的CLDN18.2结合分子,其中所述sdAb部分包含

(i) SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列;或

(ii) 与SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的CLDN18.2结合分子,其中所述sdAb部分在N端或C端与另外的蛋白结构域连接,例如,与免疫球蛋白的Fc区连接,例如与来自IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区连接;或者,例如,与荧光蛋白连接。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的CLDN18.2结合分子,其具有以下一个或多个特性:

(1) 以高亲和力结合CLDN18.2,例如人CLDN18.2,例如,所述CLDN18.2结合分子与细胞表面CLDN18.2之间结合的 $EC_{50}$ 是约0.1 $\mu$ g/mL至约10 $\mu$ g/mL,优选地,约0.1 $\mu$ g/mL至约1 $\mu$ g/mL;

(2) 特异性结合CLDN18.2,且不结合CLDN18.1;

(3) 通过抗体依赖性细胞毒性和/或补体依赖性细胞毒性作用杀死CLDN18.2-阳性癌症细胞。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的CLDN18.2结合分子,其是双特异性或多特异性抗体,优选地,所述双特异性抗体分子与CLDN18.2分子和第二靶蛋白特异地结合,所述第二靶蛋白例如选自:

(1) 肿瘤特异抗原或肿瘤相关抗原,例如,表皮生长因子受体(EGFR1),HER2/neu,CD20,胰岛素样生长因子受体(IGF-1R),癌胚抗原,前列腺特异性膜抗原(PSMA),Mucin-1,CD30,CD33,CD137,cMet;或血管生成素-2(Ang-2);

(2) 免疫细胞的免疫检查点分子,例如,PD1,CTLA-4,TIM-3,或LAG-3;

(3) 免疫细胞的免疫共刺激分子,例如,OX40,ICOS,TLR2或CD27;

(4) 细胞因子,例如,IL-1,IL-2,IL-7,IL-15或IL-33。

7. 分离的核酸,其编码权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子。

8. 包含权利要求7的核酸的载体,优选地所述载体是表达载体,例如,pcDNA3.3-TOPO载体。

9. 包含权利要求7的核酸或权利要求8的载体的宿主细胞,优选地,所述宿主细胞是原核的或真核的,更优选的选自大肠杆菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞,最优选地,所述宿主细胞是HEK293细胞或CHO细胞。

10. 制备权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子的方法,所述方法包括在适于表达编码权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子的核酸的条件下培养权利要求9的宿主细胞,任选地分离所述CLDN18.2结合分子,任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述CLDN18.2结合分子。

11. 免疫缀合物,其包含权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子和其它物质,例如细胞毒性剂。

12. 药物组合物,其包含权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子或权利要求11的免疫缀合物,以及任选地药用辅料。

13. 药物组合物,其包含权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子或权利要求11的免疫缀合物,以及其它治疗剂,以及任选地药用辅料;优选地,所述其它治疗剂选自化疗剂、其他抗体(例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)、细胞毒性剂。

14. 组合产品,其包含权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子或权利要求11的免疫缀合物,以及一种或多种其它治疗剂,例如化疗剂、细胞毒性剂、其它抗体,例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

15. 在受试者中治疗与CLDN18.2相关的疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子、权利要求11的免疫缀合物、权利要求12或13的药物组合物、或权利要求14的组合产品,其中所述与CLDN18.2相关的疾病是例如表达或过表达CLDN 18.2的癌症,例如,骨癌、血癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、食道癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、性器官和生殖器官癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、膀胱癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、神经外胚层癌症、脊柱轴肿瘤、胶质瘤、脑脊膜瘤和垂体腺瘤,优选地,所述癌症是胃癌、胰腺癌、食道癌、卵巢癌或肺癌。

16. 检测样品中CLDN18.2的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子,用于实施以下步骤:

(a) 将样品与权利要求1至6中任一项的CLDN18.2结合分子接触;和

(b) 检测所述CLDN18.2结合分子和CLDN18.2间的复合物的形成;任选地,所述CLDN18.2结合分子是被可检测地标记的。

## CLDN18.2结合分子及其用途

[0001] 本发明涉及特异性CLDN18.2结合分子以及含有所述CLDN18.2结合分子的免疫缀合物、组合物。此外,本发明涉及编码所述CLDN18.2结合分子的核酸及包含其的宿主细胞,以及制备所述CLDN18.2结合分子的方法。本发明还涉及这些CLDN18.2结合分子的治疗和诊断用途,特别地,本发明还涉及这些CLDN18.2结合分子与其它疗法,例如治疗方式或治疗剂的联合治疗。

### 背景技术

[0002] CLDN18属于Claudins蛋白家族成员,由Shoichiro Tsukita等在1998年发现,其是构成上皮细胞紧密连接的重要分子,决定了上皮细胞的渗透性,也起到阻挡细胞膜表面蛋白和脂质扩散的作用(Gunzel,D.和A.S.Yu(2013).“Claudins and the modulation of tight junction permeability.”*Physiol Rev* 93(2):525-569)。人的CLDN18基因具有两个不同的1号外显子,转录后经过可变剪接最终生成仅在N端具有不同序列的两个蛋白亚型CLDN18.1和CLDN18.2。这两种CLDN18亚型蛋白均由261个氨基酸组成,具有四个跨膜结构域,但是两者分布于不同的组织,CLDN18.1主要表达在肺组织中,CLDN18.2仅表达在分化的胃粘膜上皮细胞上,不表达在胃干细胞上(Sahin,Ugur等人,“Claudin-18splice variant 2is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development.”*ClinicalCancer Research*14.23(2008):7624-7634)。

[0003] CLDN18.2在多种肿瘤组织中高度表达,比如非小细胞肺癌(25%)、胃癌(70%)、胰腺癌(50%)和食道癌(30%),但是在正常组织中几乎没有表达(Kumar,V.等人,(2018)“Emerging Therapies in the Management of Advanced-Stage Gastric Cancer.”*Front Pharmacol* 9:404),由于其在肿瘤细胞和正常组织中的表达差异性,目前已经成为非常有潜力的一个抗肿瘤药物作用靶点。

[0004] 截止目前,以CLDN18.2为靶点的药物中进展最快的是德国Ganymed公司研制的IMAB362,IMAB362是一种特异靶向CLDN18.2的人鼠嵌合IgG1单抗,其与肿瘤细胞上表达的CLDN18.2第1个胞外区结合,通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)来诱导肿瘤细胞死亡。IMAB362在胃癌二期试验中比标准化疗显著延长患者生存期(标准化疗的生存期为8.4个月;而IMAB362治疗的生存期为13.2个月),IMAB362的治疗效果在Claudin18.2高表达患者中的优势更明显。

[0005] 虽然目前已有靶向CLDN18.2靶点的临床在研单克隆抗体药物,但单克隆抗体(150kD)存在分子质量较大,难穿透组织,造成肿瘤区域的有效浓度较低,治疗效果不充分的问题,作为治疗剂,仍有继续开发靶向CLDN18.2靶点的小分子抗体的迫切需要。

[0006] 单结构域抗体(single domain antibody,sdAb)(例如,纳米抗体)是目前最小的抗体分子,其分子量是普通抗体的1/10。单结构域抗体除具备单克隆抗体的抗原反应性外,还拥有一些独特的功能特性,例如,它们通常表现出较高的溶解度、良好的热稳定性、组织渗透性和耐受木瓜蛋白酶等的降解;此外,单结构域抗体可以在酵母、植物和哺乳动物细胞等多种宿主细胞中表达且表达量较高,使得其具有极高的成本优势。因此本领域希望开发

新的亲和力更高的结合CLDN18.2的单结构域抗体(sdAb)。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明人通过锐意研究,开发了一类包含特异性识别CLDN18.2的单结构域抗体(sdAb)部分的CLDN18.2结合分子,其能够

[0009] (1) 以高亲和力结合CLDN18.2,例如人CLDN18.2,例如,所述CLDN18.2结合分子与细胞表面CLDN18.2之间结合的 $EC_{50}$ 是约0.1 $\mu$ g/mL至约10 $\mu$ g/mL,优选地,约0.1 $\mu$ g/mL至约1 $\mu$ g/mL;

[0010] (2) 特异性结合CLDN18.2,且不结合CLDN18.1;和

[0011] (3) 通过抗体依赖性细胞毒性和/或补体依赖性细胞毒性作用杀死CLDN18.2-阳性癌症细胞。

[0012] 因此,在第一方面,本发明提供了CLDN18.2结合分子,其包含至少一个特异性结合CLDN18.2的单结构域抗体(sdAb)部分,所述sdAb部分包含三个互补决定区,分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0013] (a) CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列、或SEQ ID NO:1的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体;

[0014] (b) CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列、或SEQ ID NO:2的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体;和

[0015] (c) CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列、或SEQ ID NO:3的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体,

[0016] 其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或保守氨基酸取代,优选地,所述sdAb部分是骆驼科动物VHH、部分人源化的或完全人源化的VHH、嵌合的VHH。

[0017] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子中的所述sdAb部分包含:含有氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:2的CDR2和含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的CDR3。

[0018] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子中的所述sdAb部分包含

[0019] (i) SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列;或

[0020] (ii) 与SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子还在所述sdAb部分的N端或C端与另外的蛋白结构域连接,例如,与免疫球蛋白的Fc区连接,例如与来自IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区连接;或者,例如,与荧光蛋白连接。

[0022] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子是双特异性或多特异性抗体,优选地,所述双特异性抗体分子与CLDN18.2分子和第二靶蛋白特异地结合,所述第二靶蛋白例如选自:

[0023] (1) 肿瘤特异抗原或肿瘤相关抗原,例如,表皮生长因子受体(EGFR1),HER2/neu,CD20,胰岛素样生长因子受体(IGF-1R),癌胚抗原,前列腺特异性膜抗原(PSMA),Mucin-1,CD30,CD33,CD137,cMet或血管生成素-2(Ang-2);

[0024] (2) 免疫细胞的免疫检查点分子,例如,PD1,CTLA-4,TIM-3或LAG-3;

[0025] (3) 免疫细胞的免疫共刺激分子,例如,OX40,ICOS,TLR2或CD27;

[0026] (4) 细胞因子,例如,IL-1,IL-2,IL-7,IL-15或IL-33。

[0027] 在第二方面,本发明提供了制备本发明的CLDN18.2结合分子的方法,所述方法包括在适于表达编码本发明的CLDN18.2结合分子的核酸的条件下培养导入有编码本发明的CLDN18.2结合分子的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞,分离所述CLDN18.2结合分子,任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述CLDN18.2结合分子。

[0028] 在第三方面,本发明提供了免疫缀合物,其包含本发明的CLDN18.2结合分子和其它物质,例如细胞毒性剂。

[0029] 在第四方面,本发明提供了药物组合物,其包含本发明的CLDN18.2结合分子或免疫缀合物,以及任选地药用辅料。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供了药物组合物,其包含本发明的CLDN18.2结合分子或免疫缀合物和其它治疗剂,以及任选的药用辅料;优选地,所述其它治疗剂选自化疗剂、其他抗体(例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)、细胞毒性剂。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供了组合产品,其包含本发明的CLDN18.2结合分子或免疫缀合物,以及一种或多种其它治疗剂,例如化疗剂、细胞毒性剂、其它抗体,例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0032] 在第五方面,本发明提供了在受试者中治疗与CLDN18.2相关的疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本发明的CLDN18.2结合分子、免疫缀合物、药物组合物、或组合产品。

[0033] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子、免疫缀合物、药物组合物、或组合产品治疗的与CLDN18.2相关的疾病是例如表达或过表达CLDN 18.2的癌症。

[0034] 在第六方面,本发明提供了检测样品中CLDN18.2的试剂盒,所述试剂盒包含本发明的CLDN18.2结合分子,用于实施以下步骤:

[0035] (a) 将样品与本发明的CLDN18.2结合分子接触;和

[0036] (b) 检测所述CLDN18.2结合分子和CLDN18.2间的复合物的形成;任选地,所述CLDN18.2结合分子是被可检测地标记的,

[0037] 由此,判断来自受试者或个体的样品中是否存在升高的CLDN18.2表达水平。

[0038] 附图简述

[0039] 结合以下附图一起阅读时,将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的,图中显示了目前优选的实施方案。然而,应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

[0040] 图1显示了抗CLDN18.2重链抗体的SDS-PAGE图。样品分别为:重链抗体NA3SH1-T4、重链抗体NA3SH1-T4-hVH6、作为对照的重链抗体NA3SH1、参考品IPI(伊匹木单抗(Ipilimumab))。泳道Marker为蛋白质分子量指示物。

[0041] 图2A显示了通过SEC-HPLC检测重链抗体NA3SH1-T4的单体检测图谱。

[0042] 图2B显示了通过SEC-HPLC检测重链抗体NA3SH1-T4-hVH6的单体检测图谱。

[0043] 图2C显示了通过SEC-HPLC检测作为对照的重链抗体NA3SH1的单体检测图谱。

[0044] 图3显示了抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1-T4、NA3SH1-T4-hVH6及对照重链抗体NA3SH1对hCLDN18.2-HKE293细胞的结合曲线,MFI表示平均荧光强度。

[0045] 图4显示了抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1-T4、NA3SH1-T4-hVH6及对照重链抗体

NA3SH1对hCLDN18.2-NUGC4细胞的结合曲线,MFI表示平均荧光强度。

[0046] 图5显示了抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1-T4、NA3SH1-T4-hVH6及对照重链抗体NA3SH1对hCLDN18.2-KATOIII细胞的结合曲线,MFI表示平均荧光强度。

[0047] 图6显示了高浓度下(100 $\mu$ g/mL),抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1-T4、NA3SH1-T4-hVH6及对照重链抗体NA3SH1对hCLDN18.1-HEK293细胞的结合阳性率。

[0048] 图7显示了抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1-T4、NA3SH1-T4-hVH6及对照重链抗体NA3SH1对hCLDN18.2-HEK293细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)。

[0049] 图8显示了抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1-T4、NA3SH1-T4-hVH6及对照重链抗体NA3SH1对hCLDN18.2-KATOIII细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)。

[0050] 图9显示了抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1-T4、NA3SH1-T4-hVH6及对照重链抗体NA3SH1对hCLDN18.2-NUGC4细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)。

[0051] 发明详述

[0052] 除非另外限定,否则本文中所有的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。此外,本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

[0053] I. 定义

[0054] 为了解释本说明书,将使用以下定义,并且只要适当,以单数形式使用的术语也可以包括复数,并且反之亦然。要理解,本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案,并且不意欲是限制性的。

[0055] 术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%的下限和比指定数字数值大5%的上限的范围内的数字数值。

[0056] 如本文所用,术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项。

[0057] 在本文中,当使用术语“包含”或“包括”时,除非另有指明,否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如,当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时,也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

[0058] 术语“Claudins”是一类存在于上皮和内皮紧密连接中的整合素膜蛋白,是紧密连接的重要组成部分,1998年由Shoichiro Tsukita等人发现。该家族有24个成员。人类Claudin 18基因有两个可供选择的1号外显子,因而产生Claudin 18.1(本文中也称为“CLDN18.1”)和Claudin 18.2(本文中也称为“CLDN18.2”)两种蛋白亚型,两者在第1个胞外结构域约50个氨基酸的序列上只有7个氨基酸残基的差异。

[0059] Claudin 18.2在癌组织和正常组织的表达上存在显著差异性,这可能源于Claudin 18.2启动子区域CREB结合位点在正常组织中CpG高度甲基化,而在细胞癌变过程中CpG甲基化水平降低,进而CREB参与激活Claudin18.2的转录。

[0060] 如本文所用的术语“CLDN18.2抗体”、“针对CLDN18.2的抗体”、“特异性结合CLDN18.2的抗体”、“特异性靶向CLDN18.2的抗体”、“特异性识别CLDN18.2的抗体”可互换地使用,意指能够与Claudin蛋白CLDN18.2特异性结合的抗体。特别地,在一些具体实施方案中,意指与人CLDN18.2特异性结合的抗体,特别是与人CLDN18.2特异性结合而不与人

CLDN18.1特异性结合的抗体。

[0061] 术语“抗体”在本文中以最广意义使用,指包含抗原结合位点的蛋白质,涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体、单结构域抗体、完整抗体和抗体片段。优选地,本发明的抗体是单结构域抗体或重链抗体。

[0062] 术语“抗体片段”指与完整抗体不同的分子,其包含完整抗体的一部分且能够结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')<sub>2</sub>;双抗体;线性抗体;单链抗体(例如scFv);单结构域抗体;双价或双特异性抗体或其片段;骆驼科抗体(重链抗体);和由抗体片段形成的双特异性抗体或多特异性抗体。

[0063] 术语“互补决定区”或“CDR区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR主要负责与抗原表位结合,从N-端开始顺序编号依次包括CDR1、CDR2和CDR3。在一个给定的重链可变区氨基酸序列中,各CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体CDR指派系统的任一种或其组合确定,所述指派系统包括例如:基于抗体的三维结构和CDR环的拓扑学的Chothia(Chothia等人,(1989) Nature 342:877-883,A1-Lazikani等人,“Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”,Journal of Molecular Biology,273,927-948(1997)),基于抗体序列可变性的Kabat(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,U.S.Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987)),AbM(University of Bath),Contact(University College London),国际ImmunoGeneTics database(IMG)(<http://imgt.cines.fr/>),以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的North CDR定义。

[0064] 除非另有说明,否则在本发明中,术语“CDR”或“CDR序列”涵盖以上述任一种方式确定的CDR序列。

[0065] CDR也可以基于与参考CDR序列(例如本发明示例的CDR之任一序列)具有相同的AbM编号位置而确定。在一个实施方案中,本发明的单结构域抗体的CDR根据AbM编号方案确定位置。

[0066] 除非另有说明,否则在本发明中,当提及抗体可变区和CDR中的残基位置(包括重链可变区残基)时,是指根据AbM编号系统的编号位置。

[0067] 具有不同特异性(即,针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的CDR。然而,尽管CDR在抗体与抗体之间是不同的,但是CDR内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用Kabat、Chothia、AbM、IMG和Contact方法中的至少两种,可以确定最小重叠区域,从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是CDR的一个子部分。正如本领域技术人员明了,通过抗体的结构和蛋白折叠,可以确定CDR序列其余部分的残基。因此,本发明也考虑本文所给出的任何CDR的变体。例如,在一个CDR的变体中,最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变,而根据Kabat或Chothia或AbM或IMG或Contact定义的其余CDR残基可以被保守氨基酸残基替代。

[0068] 术语“单结构域抗体”通常指这样的抗体,其中单个可变结构域(例如,重链可变结构域(VH)或轻链可变结构域(VL)、衍生自骆驼科重链抗体的重链可变结构域、衍生自鱼类

IgNAR的VH样单结构域(v-NAR)即可赋予抗原结合。即,该单个可变结构域不需要与另一可变结构域相互作用以识别靶抗原。单结构域抗体的实例包括源自骆驼科(美洲驼和骆驼)和软骨鱼(例如护士鲨)的单结构域抗体(WO 2005/035572)。衍生自骆驼科的单结构域抗体在本申请中也称作VHH,其仅由一个重链可变区组成,是从C端到N端仅包含一条链FR4-CDR3-FR3-CDR2-FR2-CDR1-FR1的抗体,也称为“纳米抗体(nanobody)”。单结构域抗体是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。

[0069] 术语“重链抗体(heavy-chain antibody, hcAb)”是指不具有轻链的抗体,从N端到C端可以包含VH-CH2-CH3,或包含VH-CH1-CH2-CH3,或包含VHH-CH2-CH3等;可以构成同型二聚体,例如不具有轻链的重链二聚体抗体。重链抗体中可以包含来自标准抗体的VH或者来自单结构域抗体的VHH。在一个实施方案中,本发明的重链抗体包含单结构域抗体的VHH。

[0070] 如本文所用,术语“多特异性抗体”指具有至少两个抗原结合位点的抗体,所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。多特异性抗体是对至少两个不同抗原表位具有结合特异性的抗体。在一个实施方案中,本文提供了这样的多特异性抗体,其具有针对第一抗原和第二抗原的结合特异性,也称为“双特异性抗体”。

[0071] 术语“效应子功能”指随免疫球蛋白同种型变动的归因于免疫球蛋白Fc区的那些生物学活性。免疫球蛋白效应子功能的例子包括:C1q结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、Fc受体结合作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、下调细胞表面受体(例如B细胞受体)和B细胞活化。

[0072] 术语“抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)”是某些细胞毒性效应细胞(例如天然杀伤(NK)细胞)介导对靶细胞和外来宿主细胞杀伤的主要机制之一。通过抗体的Fc区与表达在例如NK细胞上的Fc受体Fc $\gamma$ RIIIA(即,CD16a)结合后来激活NK细胞发挥ADCC作用。CD16a属于免疫球蛋白超家族跨膜受体成员,根据其N端158位的等位基因多态性差异,CD16a存在158位缬氨酸或苯丙氨酸差异性表达,使得人群中存在CD16a-158V/V(约占15%)、CD16a-158V/F(约占25%)和CD16a-158F/F(约占60%)亚型。

[0073] 术语“补体依赖的细胞毒性作用(CDC)”是指在补体存在下靶细胞的裂解。经典补体途径的激活由补体系统的第一组分(C1q)与结合其同源抗原的抗体(适当的亚类)结合而启动。为了评估补体活化,可以执行CDC测定法,通过例如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996)中所述的方法。

[0074] 术语“嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中(a)将恒定区或其部分改变、替换或交换,从而抗原结合位点与不同的或改变的类别、效应子功能和/或物种的恒定区或赋予嵌合抗体新性能的完全不同的分子(例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物)等连接;或(b)将可变区或其部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。例如,骆驼抗体可以通过将其恒定区更换为来自人免疫球蛋白的恒定区进行修饰。由于更换为人类恒定区,该嵌合抗体可以保留其在识别抗原方面的特异性,同时如与原始骆驼抗体相比,具有在人类中降低的抗原性。

[0075] 术语“人源化抗体”是指包含来自非人CDR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中,人源化抗体中的所有或基本上所有的CDR(例如,CDR)对应

于非人抗体的那些,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

[0076] 术语“人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于下述抗体的氨基酸序列,所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源,其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0077] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C端区域,所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在某些实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外说明,Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,其也被称为EU索引,如在Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0078] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守的构架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。(参见,例如,Kindt等Kuby Immunology,6<sup>th</sup> ed.,W.H.Freeman and Co.91页(2007))。单个VH或VL结构域可以足以给予抗原结合特异性。

[0079] 如本文所用,术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗体与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)、SPR或生物膜层干涉技术或本领域已知的其他常规结合测定法测定。

[0080] 术语“免疫检查点分子”意指免疫系统中存在的一类抑制性信号分子,通过调节外周组织中免疫反应的持续性和强度避免组织损伤,并参与维持对于自身抗原的耐受(Pardoll DM.,The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.Nat Rev Cancer,2012,12(4):252-264)。研究发现,肿瘤细胞能够逃避体内免疫系统而失控增殖的原因之一是利用了免疫检查点分子的抑制性信号通路,由此抑制了T淋巴细胞活性,使得T淋巴细胞不能有效发挥对肿瘤的杀伤效应(Yao S,Zhu Y和Chen L.,Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation.Nat Rev Drug Discov,2013,12(2):130-146)。免疫检查点分子包括但不限于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、PD-L2、LAG-3、TIM-3。

[0081] 术语“共刺激分子”是指T细胞上的与共刺激配体特异性结合从而介导T细胞的共刺激反应(例如但不限于增殖)的相应结合配偶体。共刺激分子是除抗原受体或其配体之外的有助于有效免疫应答的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活NK细胞受体、OX40、CD40、GITR、4-1BB(即CD137)、CD27和CD28。在一些实施方案中,“共刺激分子”是CD28、OX40、GITR、4-1BB(即CD137)和/或CD27。

[0082] 术语“细胞因子”是由一种细胞群释放,作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子、白介素(IL),诸如IL-1,IL-1 $\alpha$ ,IL-2,IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-8,IL-9,IL-11,IL-12,IL-15;肿瘤坏死因子,诸如TNF- $\alpha$ 或

TNF- $\beta$ ;及其它多肽因子,包括 $\gamma$ -干扰素。

[0083] 术语“免疫缀合物”是与一个或多个其他物质(包括但不限于细胞毒性剂或标记)缀合的抗体。

[0084] 术语“半数有效浓度( $EC_{50}$ )”是指在特定的暴露时间后诱导在基线和最大值之间的50%的应答的药物、抗体或毒剂的浓度。在本申请的上下文中, $EC_{50}$ 的单位为“ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ”。

[0085] 术语“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需治疗结果的量。抗体或抗体片段或其缀合物或组合物的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或抗体部分在个体中激发所需反应的能力而变动。治疗有效量也是这样的一个量,其中抗体或抗体片段或其缀合物或组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象,“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率、肿瘤体积等)至少约20%、更优选地至少约40%、甚至更优选地至少约50%、60%或70%和仍更优选地至少约80%或90%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价化合物抑制可度量参数(例如,癌症)的能力。

[0086] 术语“个体”或“受试者”可互换地使用,包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如,牛、羊、猫、犬和马)、灵长类(例如,人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。特别地,个体或受试者是人。

[0087] 术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用,涵盖实体瘤和液体肿瘤。

[0088] 术语“癌症”和“癌性”是指哺乳动物中细胞生长不受调节的生理疾患。

[0089] 术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。

[0090] 术语“分离的CLDN18.2结合分子”是指已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中,将CLDN18.2结合分子纯化至超过95%或99%纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE,等电聚焦(IEF),毛细管电泳)或色谱法(例如,离子交换或反相HPLC、SEC-HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman等,J.Chromatogr.B848:79-87(2007)。

[0091] 术语“尺寸排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC法)”是用于抗体标准和质控的一个重要方法。该方法主要依据分子的尺寸大小或流体动力学半径差异来进行分子的分离。通过SEC-HPLC,抗体可以分离出三种主要形式:高分子量形式(HMMS)、主峰(主要是抗体单体)和低分子量形式(LMMS)。抗体纯度可以计算为色谱图上主峰面积占所有峰面积之和的百分比。通过SEC-HPLC法,可以测量制剂产品中抗体单体的百分数,给出可溶性聚集物和剪切物的含量信息。

[0092] 术语“分离的核酸”是指这样的核酸分子,其已经与其天然环境的组分分离。分离的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。“分离的编码CLDN18.2结合分子的核酸”是指一个或多个核酸分子,其编码CLDN18.2结合分子的链或其片段,包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

[0093] 如下进行序列之间序列同一性的计算。

[0094] 为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数,将所述序列出于最佳比较目的比对(例如,可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中,为比较目的,所比对的参考序列的长度是至少30%、优选地至少40%、更优选地至少50%、60%和甚至更优选地至少70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在这个位置处是相同的。

[0095] 可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在一个优选实施方案中,使用已经集成至GCG软件包的GAP程序中的Needlema和Wunsch((1970) J.Mol.Biol.48:444-453)算法(在<http://www.gcg.com>可获得),使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵和空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在又一个优选的实施方案中,使用GCG软件包中的GAP程序(在<http://www.gcg.com>可获得),使用NWSgapdna.CMP矩阵和空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6,确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分12、空位延伸罚分4和移码空位罚分5的Blossum 62评分矩阵。

[0096] 还可以使用PAM120加权余数表、空位长度罚分12,空位罚分4),利用已经并入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers和W.Miller算法,((1989) CABIOS,4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。

[0097] 额外地或备选地,可以进一步使用本文所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索,以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。

[0098] 术语“转染”是指将核酸引入真核细胞特别是哺乳动物细胞的过程。用于转染的方案和技术包括但不限于脂质转染,化学和物理方法转染如电穿孔。许多转染技术在本领域是公知的,参见例如Graham等人,1973,Virology 52:456;Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual;Davis等人,1986,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier;Chu等人,1981,Gene 13:197。

[0099] 术语“荧光激活细胞分选”或“FACS”是指专门类型的流式细胞术。它提供了根据每个细胞的特定光散射和荧光特征,将生物细胞的异质混合物以每次一个细胞分选到两个或更多个容器中的方法(FlowMetric.“Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting”.2017-11-09)。用于进行FACS的仪器是本领域技术人员已知的并且对于公众是可商购获得的。这种仪器的实例包括Becton Dickinson(Foster City,CA)的FACS Star Plus、FACSscan和FACSsort仪器、来自Coulter Epics Division(Hialeah,FL)的Epics C和来自Cytomation(Colorado Springs,Colorado)的MoFlo。

[0100] 术语“与CLDN18.2相关的疾病”是指由CLDN18.2(如人CLDN18.2)的增加的表达或活性引起、加重或以其它方式与其相关的任何病症。

[0101] 术语“药物组合物”指这样的组合物,其以允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

[0102] 术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不

完全的)、载体(carrier)、赋形剂或稳定剂等。

[0103] 用于本文时,“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体分子用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

[0104] 本文所述的术语“治疗剂”涵盖在治疗肿瘤(例如癌症)中有效的任何物质,包括化疗剂、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂。

[0105] 本文使用的术语“化疗剂”包括在治疗癌症中有用的化学化合物,包括但不限于抗肿瘤剂,例如烷化剂;抗代谢物;抗雌激素;抗雄激素;以及非类固醇抗雄激素等。化疗剂的例子参见W02015/153513或W02016/028672或W02015/138920中所公开的那些。

[0106] 本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。免疫调节剂包括免疫检查点分子的抑制剂和共刺激分子的激活剂。

[0107] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”指抑制或阻止细胞功能和/或造成细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂例子参见W02015/153513、W02016/028672或W02015/138920中所公开的那些。

[0108] 术语“组合产品”是指一种剂量单位形式的固定组合或非固定组合或用于组合施用的部分的试剂盒,其中两种或更多种治疗剂可以独立地在同一时间同时施用或在一定时间间隔内分开施用,尤其是在这些时间间隔允许组合的各治疗剂展示协作,例如,协同效应时。术语“固定组合”是指本发明的CLDN18.2结合分子和组合伴侣(例如其他治疗剂,例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”意指本发明的CLDN18.2结合分子和组合伴侣(例如其他治疗剂,例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)作为分开的实体同时、并行或依次施用于患者,没有特定的时间限制,其中这样的施用提供了患者体内两种治疗剂的治疗有效水平。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如施用三种或更多种治疗剂。在一个优选的实施方案中,药物组合是非固定组合。

[0109] 术语“组合疗法”或“联合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂以治疗如本公开所述的癌症。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者,这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用或分开施用或依次施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。在一些实施方案中,施用还包括以大致相同的时间,或在不同的时间以顺序的方式,使用每种类型的治疗剂。在任一情况下,治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

[0110] 术语“载体(vector)”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其有效相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

[0111] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的后代,而不

考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同,而是可以包含突变。本文中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞,也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

[0112] 术语“受试者/患者样品”指从患者或受试者得到的细胞、组织或体液的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织,像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品;血液或任何血液组分;体液,诸如脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液;来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。肿瘤样品的例子在本文中包括但不限于肿瘤活检、细针吸出物、支气管灌洗液、胸膜液(胸水)、痰液、尿液、手术标本、循环中的肿瘤细胞、血清、血浆、循环中的血浆蛋白质、腹水、衍生自肿瘤或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系,以及保存的肿瘤样品,诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。

[0113] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的用法说明书,其含有关于涉及此类治疗产品应用的适应症,用法,剂量,施用,联合疗法,禁忌症和/或警告的信息。

[0114] II. 本发明的CLDN18.2结合分子

[0115] 本发明的CLDN18.2结合分子包含至少一个特异性结合CLDN18.2而不结合或基本不结合CLDN18.1的的单结构域抗体(sdAb)部分,所述sdAb部分从N端至C端包含三个互补决定区,分别为CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0116] (a) CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列、或SEQ ID NO:1的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体;

[0117] (b) CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列、或SEQ ID NO:2的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体;和

[0118] (c) CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列、或SEQ ID NO:3的氨基酸序列中1个或2个氨基酸变化的变体,

[0119] 其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或保守氨基酸取代。

[0120] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子结合哺乳动物CLDN18.2,例如人CLDN18.2。例如,本发明的CLDN18.2结合分子与人CLDN18.2的胞外结构域1(ECD1)特异性结合。

[0121] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子具有以下一个或多个特性:

[0122] (1) 以高亲和力结合CLDN18.2,例如人CLDN18.2,例如,所述CLDN18.2结合分子与细胞表面CLDN18.2之间结合的 $EC_{50}$ 是约0.1 $\mu$ g/mL至约10 $\mu$ g/mL,优选地,约0.1 $\mu$ g/mL至约1 $\mu$ g/mL;

[0123] (2) 特异性结合CLDN18.2,且不结合CLDN18.1;

[0124] (3) 通过抗体依赖性细胞毒性和/或补体依赖性细胞毒性作用杀死CLDN18.2-阳性癌症细胞。

[0125] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子中的所述sdAb部分包含:含有氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:2的CDR2和含有氨基酸序列SEQ

ID NO:3的CDR3。

[0126] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子中包含至少一个特异性结合CLDN18.2的单结构域抗体(sdAb)部分,所述sdAb部分是VHH。在一些实施方案中,所述VHH包含以下序列或由以下序列组成:

[0127] (i) SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列;

[0128] (ii) 与SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;或者

[0129] (iii) 包含与SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列相比具有1个或多个(优选不超过10个,更优选不超过6、5、4、3、2、1个)的氨基酸变化(优选氨基酸取代,更优选氨基酸保守取代)的氨基酸序列或由其组成,优选地,所述氨基酸变化不发生在CDR区中。

[0130] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子中包含至少一个特异性结合CLDN18.2的单结构域抗体(sdAb)部分,所述sdAb部分是部分人源化的或完全人源化的VHH、嵌合的VHH。与骆驼科动物的VHH相比,本发明的部分人源化的或完全人源化的VHH、嵌合的VHH对人体具有减小的人抗骆驼科抗体反应,提高了抗体应用的安全性;且是亲和力成熟的VHH。

[0131] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子在其sdAb部分的N端或C端与免疫球蛋白的Fc区连接,任选地,通过氨基酸接头连接,例如通过长度介于1与20个氨基酸之间的氨基酸接头连接。在一些实施方案中,所述氨基酸接头中有至少90%为甘氨酸和/或丝氨酸氨基酸。在一些实施方案中,所述Fc区来自IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中,所述Fc区来自IgG1。在一些实施方案中,所述Fc区来自人IgG1。

[0132] 在本发明的一些实施方案中,本文所述的氨基酸变化包括氨基酸的取代、插入或缺失。优选的,本文所述的氨基酸变化为氨基酸取代,优选地保守取代。

[0133] 在优选的实施方案中,本发明所述的氨基酸变化发生在CDR外的区域(例如在FR中)。更优选地,本发明所述的氨基酸变化发生在VHH外的区域。在一些实施方案中,取代为保守性取代。保守取代是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸取代,例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸取代,一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸取代,或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸取代。示例性的取代如下表1所示:

[0134] 表1

	原始残基	示例性取代	优选的取代
[0135]	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val

原始残基	示例性取代	优选的取代
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0137] 在某些实施方案中,本文中所提供的CLDN18.2结合分子经改变以增加或降低其糖基化的程度。对CLDN18.2结合分子的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一个或多个糖基化位点而方便地实现。当CLDN18.2结合分子包含Fc区时,可以改变与Fc区连接的糖类。在一些应用中,除去不想要的糖基化位点的修饰可以是有用的,例如除去岩藻糖模块以提高抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等(2002) JBC277:26733)。在其它应用中,可以进行半乳糖苷化修饰以调节补体依赖性细胞毒性(CDC)。在某些实施方案中,可在本文中所提供CLDN18.2结合分子的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰,以此产生Fc区变体,以便增强例如本发明的CLDN18.2结合分子治疗癌症的有效性。

[0138] 在一些实施方案中,本发明的CLDN18.2结合分子是双特异性或多特异性抗体分子形式。在一个实施方案中,双特异性抗体分子与CLDN18.2和PD-1结合。多特异性抗体分子例如可以是三特异性抗体分子,其包含针对CLDN18.2的第一结合特异性和针对以下一种或多种的分子的第二及第三结合特异性:PD-1、PD-L1、4-1BB、OX40或LAG-3。

[0139] III. 免疫缀合物

[0140] 本发明还涉及与其他物质缀合的CLDN18.2结合分子(“免疫缀合物”)。在一些实施方案中,其它物质是例如治疗剂(如细胞毒性剂)。细胞毒性剂包括任何对细胞有害的药剂。

适合于形成免疫缀合物的细胞毒性剂(例如化疗剂)的例子是本领域中已知的。例如,细胞毒性剂包括但不限于:放射性同位素;生长抑制剂;毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶促活性毒素,包括其片段和/或变体;和已知的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0141] 适合于形成免疫缀合物的细胞毒性剂(例如化疗剂)的例子还参见例如W02015/153513或W02015/138920等。

[0142] 本发明的CLDN18.2结合分子也可以连接至固相支持物,所述支持物特别可用于免疫测定法或靶抗原的纯化。此类固相支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0143] 在一些实施方案中,所述免疫缀合物用于治疗肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤为癌症。

[0144] IV. 本发明的核酸以及包含其的宿主细胞

[0145] 在一方面,本发明提供了编码以上任何CLDN18.2结合分子或其片段或其任一条链的核酸。在一个实施方案中,提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中,载体是表达载体。在一个实施方案中,提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中,宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如CHO细胞或293细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中,宿主细胞是原核的。

[0146] 例如,本发明的核酸包含编码选自SEQ ID NO:4、5、8、9中任一项所示氨基酸序列的核酸,或编码与选自SEQ ID NO:4、5、8、9中任一项所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的核酸。

[0147] 本发明还涵盖与下述核酸在严格性条件下杂交的核酸或与下述核酸相比编码具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的多肽序列的核酸:包含编码选自SEQ ID NO:4、5、8、9中任一项所示氨基酸序列的核酸序列的核酸;或包含编码与选自SEQ ID NO:4、5、8、9中任一项所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的核酸序列的核酸。

[0148] 在一个实施方案中,提供包含所述核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中,载体是表达载体,例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、 $\lambda$ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在一个实施方案中,载体是pcDNA3.3-TOPO载体。

[0149] 一旦已经制备了用于表达的表达载体或DNA序列,则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的,例如,原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质的转染或其他常规技术。在原生质体融合的情况下,将细胞在培养基中培育并且筛选适宜的活性。用于培养所产生的转染细胞和用于回收产生的抗体分子的方法和条件是本领域技术人员已知的并且可以基于本说明书和现有技术已知的方法,根据使用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞变动或优化。

[0150] 另外,可以通过引入允许选择已转染的宿主细胞的一个或多个标记物,选出已经稳定将DNA掺入至其染色体中的细胞。标记物可以例如向营养缺陷型宿主提供原养型、杀生物抗性(例如,抗生素)或重金属(如铜)抗性等。可选择标记基因可以与待表达的DNA序列直接连接或通过共转化引入相同的细胞中。也可能需要额外元件以便最佳合成mRNA。这些元件可以包括剪接信号,以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0151] 在一个实施方案中,提供了包含本发明多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中,提供了包含本发明表达载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体的其它细胞。合适的宿主细胞包括原核微生物,如大肠杆菌。宿主细胞还可以是真核微生物如丝状真菌或酵母,或各种真核细胞,例如昆虫细胞等。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如,可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(HEK293或293F细胞)、293细胞、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(HepG2)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、CHO-S细胞、NS0细胞、骨髓瘤细胞系如Y0、NS0、P3X63和Sp2/0等。适于产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如Yazaki和Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C.Lo编著, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。在一个优选的实施方案中,所述宿主细胞是CHO细胞或HEK293细胞。

[0152] V. 本发明的CLDN18.2结合分子的生产 and 纯化

[0153] 在一个实施方案中,本发明提供了制备CLDN18.2结合分子的方法,其中所述方法包括在适于表达编码所述CLDN18.2结合分子的核酸的条件下培养包含编码所述CLDN18.2结合分子的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞,以及任选地分离所述CLDN18.2结合分子。在某个实施方案中,所述方法还包括从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收CLDN18.2结合分子。

[0154] 为了重组产生本发明的CLDN18.2结合分子,首先分离编码本发明CLDN18.2结合分子的核酸,并将所述核酸插入载体,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序,例如通过使用能够与编码本发明CLDN18.2结合分子的核酸特异性结合的寡核苷酸探针进行。

[0155] 如本文所述制备的本发明的CLDN18.2结合分子可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的CLDN18.2结合分子的纯度,所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

[0156] VI. 本发明的CLDN18.2结合分子的活性测定法

[0157] 可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的CLDN18.2结合分子鉴定、筛选或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。一方面,对本发明的CLDN18.2结合分子测试其抗原结合活性,例如通过已知的方法诸如FACS、ELISA或Western印迹等来进行。可使用本领域已知方法来测定对CLDN18.2的结合,本文中公开了例示性方法。在一些实施方案中,使用FACS测定本发明的CLDN18.2结合分子对细胞表面CLDN18.2(例如人CLDN18.2)的结合。

[0158] 本发明还提供了用于鉴定具有生物学活性的CLDN18.2结合分子的测定法。生物学活性可以包括例如ADCC作用、CDC作用等。

[0159] 供任何上述体外测定法使用的细胞包括天然表达CLDN18.2或经改造而表达CLDN18.2细胞系。所述经改造而表达CLDN18.2细胞系是正常情况下不表达CLDN18.2的、将编码CLDN18.2的DNA转染入细胞之后表达CLDN18.2的细胞系。

[0160] 可以理解的是,能够使用本发明的免疫缀合物替换CLDN18.2结合分子来进行任何

上述测定法。

#### [0161] VII. 药物组合物和药物制剂

[0162] 在一些实施方案中,本发明提供包含本文所述的任何CLDN18.2结合分子或其免疫缀合物的组合物,优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中,所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中,组合物(例如,药物组合物)包含本发明的CLDN18.2结合分子或其免疫缀合物,以及一种或多种其它治疗剂(例如化疗剂、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂,例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)的组合。

[0163] 在一些实施方案中,所述组合物用于治疗肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤为癌症。

[0164] 本发明还包括包含CLDN18.2结合分子或其免疫缀合物的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和/或包含编码CLDN18.2结合分子的多核苷酸的组合物(包括药物组合物或药物制剂)。这些组合物还可以包含合适的药用辅料,如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂,包括缓冲剂。

[0165] 如本文所用,“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。适用于本发明的药用载体可以是无菌液体,如水和油,包括那些石油、动物、植物或合成来源的,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时,水是优选的载体。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。对于赋形剂的使用及其用途,亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第五版,R.C.Rowe,P.J.Seskey和S.C.Owen,Pharmaceutical Press,London,Chicago。若期望的话,所述组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉末、持续释放配制剂等 forms。

[0166] 可以通过将具有所需纯度的本发明的CLDN18.2结合分子与一种或多种任选的药用辅料(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980))混合来制备包含本文所述的CLDN18.2结合分子的药物制剂,优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

[0167] 本发明的药物组合物或制剂还可以包含超过一种活性成分,所述活性成分是被治疗的特定适应症所需的,优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。例如,理想的是还提供其它抗癌活性成分,例如化疗剂、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂,例如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体等。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。

[0168] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有本发明的CLDN18.2结合分子的固体疏水聚合物的半渗透基质,所述基质呈成形物品,例如薄膜或微囊形式。

#### [0169] VIII. 组合产品或试剂盒

[0170] 在一些实施方案中,本发明还提供了组合产品,其包含本发明的CLDN18.2结合分子或其抗原结合片段,或其免疫缀合物,以及一种或多种其它治疗剂(例如化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、小分子药物或免疫调节剂等)。在一些实施方案中,其它抗体例如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0171] 在一些实施方案中,所述组合产品用于治疗肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤为癌症等。

[0172] 在一些方案中,所述组合产品中的两种或多种成分可以依次、分开或同时联合施用给受试者。

[0173] 在一些实施方案中,本发明还提供了包含本发明的CLDN18.2结合分子、药物组合物、免疫缀合物或组合产品的试剂盒,以及任选的指导施用的包装插页。

[0174] 在一些实施方案中,本发明还提供了包含本发明的CLDN18.2结合分子、药物组合物、免疫缀合物、组合产品的药物制品,任选地,所述药物制品还包括指导施用的包装插页。

[0175] IX. 本发明的CLDN18.2结合分子的用途

[0176] 在一个方面,本发明涉及在受试者中治疗与CLDN18.2相关的疾病的方法,该方法包括向对象施用治疗有效量的本文公开的CLDN18.2结合分子或包含其的药物组合物或免疫缀合物或组合产品。

[0177] 在一些实施方案中,本发明涉及在受试者中治疗表达或过表达CLDN 18.2的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文公开的CLDN18.2结合分子或包含其的药物组合物或免疫缀合物或组合产品。在一些实施方案中,所述表达或过表达CLDN 18.2的癌症是例如,骨癌、血癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、食道癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、性器官和生殖器官癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、膀胱癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、神经外胚层癌症、脊柱轴肿瘤、胶质瘤、脑脊膜瘤和垂体腺瘤,优选地,所述癌症是胃癌、胰腺癌、食道癌、卵巢癌或肺癌。

[0178] 受试者可以是哺乳动物,例如,灵长类,优选地,高级灵长类,例如,人类(例如,患有本文所述疾病或具有患有本文所述疾病的风险的患者)。在一个实施方案中,受试者患有本文所述疾病(例如,如本文所述的肿瘤)或具有患有本文所述疾病的风险。在某些实施方案中,受试者接受或已经接受过其它治疗,例如化疗治疗和/或放射疗法。

[0179] 在一些实施方案中,本文所述的癌症,包括但不限于实体瘤、血癌、软组织肿瘤和转移性病灶。

[0180] 在一些实施方案中,本文所述的治疗方法还包括向所述受试者或个体联合施用本文公开的CLDN18.2结合分子或药物组合物或免疫缀合物或组合产品,以及一种或多种其它疗法,例如治疗方式和/或其它治疗剂。

[0181] 在一些实施方案中,治疗方式包括外科手术(例如肿瘤切除术);放射疗法(例如,外粒子束疗法,它涉及其中设计照射区域的三维适形放射疗法)、局部照射(例如,指向预选靶或器官的照射)或聚焦照射)等。聚焦照射可以选自立体定位放射手术、分割立体定位放射手术和强度调节型放射疗法。聚焦照射可以具有选自粒子束(质子)、钴-60(光子)和直线加速器(X射线)的辐射源,例如,如WO 2012/177624中描述。

[0182] 放射疗法可以通过几种方法之一或方法组合施用,所述方法包括而限于外粒子束疗法、内部放射疗法,植入物照射、立体定位放射手术、全身放射疗法、放疗法和永久或短暂间质近距放射疗法。

[0183] 在一些实施方案中,治疗剂选自化疗剂、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如共刺激分子的激活剂或免疫检查点分子的抑制剂)。

[0184] 示例性的其它抗体包括但不限于免疫检查点分子的抑制剂(例如,抗PD-1、抗PD-

L1、抗TIM-3、抗CEACAM或抗LAG-3)；刺激免疫细胞的抗体(例如，激动性GITR抗体或CD137抗体)等。优选地，其他抗体选自抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体。更优选地，所述抗PD-1抗体是百时美施贵宝(BMS)公司的纳武单抗(Nivolumab)、默克(Merck)公司的派姆单抗(Pembrolizumab)；所述抗PD-L1抗体是罗氏(Roche)研发的atezolizumab、德国默克(Merck KGaA)和美国辉瑞(Pfizer)合作开发的avelumab、阿斯利康研发的durvalumab。

[0185] 在一些实施方案中，免疫调节剂是共刺激分子的激活剂或激动剂。在一个实施方案中，共刺激分子的激动剂选自以下分子的激动剂(例如，激动性抗体或其抗原结合片段、或可溶性融合物)：OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3或CD83配体。

[0186] 本发明的组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在同一制剂或分开的制剂中)和分开施用。在分开施用的情况中，可以在施用其他疗法之前、同时和/或之后实施本发明的CLDN18.2结合分子或免疫缀合物等的施用。

[0187] 在一个实施方案中，CLDN18.2结合分子的施用和其他疗法(例如治疗方式或治疗剂)的施用彼此在约一个月内，或约一、两或三周内，或约1,2,3,4,5或6天内发生。

[0188] 本发明的CLDN18.2结合分子(以及包含其的药物组合物或免疫缀合物)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肺内给药和鼻内给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定，可通过任何适合途径，例如通过注射，例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程，包括但不限于单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

[0189] 为了预防或治疗疾病，本发明的CLDN18.2结合分子的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、CLDN18.2结合分子的类型、疾病的严重性和进程、所述CLDN18.2结合分子是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述CLDN18.2结合分子的应答，和主治医师的判断力。所述CLDN18.2结合分子以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。可以由技术人员确定CLDN18.2结合分子的剂量和治疗方案。

[0190] 可以理解的是，能够使用本发明的免疫缀合物或组合物或组合产品替换CLDN18.2结合分子来进行上述的任何预防或治疗。

[0191] X. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0192] 在某些实施方案中，本文中提供的任何CLDN18.2结合分子可以用于检测CLDN18.2在生物样品中的存在。术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA测定法。在某些实施方案中，生物样品是血液、血清或生物来源的其他体液样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中，生物样品来自过度增生性或癌性病灶。

[0193] 在一个实施方案中，提供了用于诊断或检测方法中的CLDN18.2结合分子。在另一个方面中，提供检测CLDN18.2在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中，方法包含检测CLDN18.2蛋白在生物样品中的存在。在某些实施方案中，CLDN18.2是人CLDN18.2。在某些

实施方案中,所述方法包括将生物样品与如本文所述的CLDN18.2结合分子在允许CLDN18.2结合分子与CLDN18.2结合的条件下接触,并检测在CLDN18.2结合分子和CLDN18.2之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在CLDN18.2。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,CLDN18.2结合分子被用于选择适合利用CLDN18.2结合分子治疗的受试者,例如其中CLDN18.2是用于选择所述受试者的生物标志物。

[0194] 在一个实施方案中,可以使用本发明的CLDN18.2结合分子诊断癌症或肿瘤,例如评价(例如,监测)对象中本文所述疾病(例如,过度增生性或癌性疾病)的治疗或进展、其诊断和/或分期。在某些实施方案中,提供标记的CLDN18.2结合分子。标记包括但不限于,被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记),以及被间接检测的部分,如酶或配体,例如,通过酶促反应或分子相互作用。示例性标记包括但不限于,放射性同位素<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H和<sup>131</sup>I,荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,丹酰(dansyl),伞形酮(umbelliferone),萤光素酶(luciferase),例如,萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号4,737,456),荧光素,2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HR),碱性磷酸酶, $\beta$ -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶解酶,糖类氧化酶,例如,葡萄糖氧化酶,半乳糖氧化酶,和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,以及利用过氧化氢氧化染料前体的酶如HR,乳过氧化物酶,或微过氧化物酶(microperoxidase),生物素/亲和素,自旋标记,噬菌体标记,稳定的自由基,等等。

[0195] 在本文中提供的任何发明的一些实施方案中,样品是在用CLDN18.2结合分子治疗之前获得的。在一些实施方案中,样品是在癌症已经转移之后获得的。在一些实施方案中,样品是福尔马林固定、石蜡包膜(FFPE)的。在一些实施方案中,样品是活检(例如芯活检),手术标本(例如来自手术切除的标本),或细针吸出物。

[0196] 在一些实施方案中,在治疗之前,例如,在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测CLDN18.2。

[0197] 在一些实施方案中,提供了一种治疗肿瘤的方法,所述方法包括:对受试者(例如,样品)(例如,包含癌细胞的受试者样品)检验CLDN18.2的存在,因而确定CLDN18.2值,将CLDN18.2值与对照值(例如健康个体的样品中的CLDN18.2的值)比较,并且如果CLDN18.2值大于对照值,则向受试者施用治疗有效量的任选与一种或多种其他疗法组合的CLDN18.2结合分子(例如,本文所述的CLDN18.2结合分子),因而治疗肿瘤。

[0198] 能够理解的是,在本发明各部分中描述的各个实施方案,例如疾病、治疗剂、治疗方式和施用等同样适用于本发明的其他部分的实施方案,或可以与其他部分的实施方案组合。在本发明各部分中描述的适用于CLDN18.2结合分子的性质、用途和方法等实施方案,同样适用于包含CLDN18.2结合分子的组合物、缀合物、组合产品和试剂盒等。

## 实施例

[0199] 以下实施例旨在仅对本发明进行举例说明,因此并不应被视为以任何方式限制本发明。

[0200] 实施例1过表达细胞株的构建与鉴定

[0201] 1.1过表达人CLDN18.2的NUGC4细胞株的构建与鉴定

[0202] 过表达人CLDN18.2的胃癌细胞株NUGC4细胞株(以下简称hCLDN18.2-NUGC4)的构建是采用慢病毒转染的方式,并通过抗体IMAB362(德国Ganymed公司,是一种特异性结合CLDN18.2的抗体)进行鉴定。

[0203] 具体方法如下:取 $5 \times 10^4$ 个状态良好的人胃癌细胞(NUGC4细胞,获自BNCC菌种库,编号BNCC341962),以30:1的感染复数(MOI)加入经包装的含有人CLDN18.2序列(SEQ ID NO:10)的慢病毒(参考CN109485734B实施例3的慢病毒包装方法),充分混匀,然后加入含有 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 聚凝胺(Polybrene,和元生物)的IMDM完全培养基(Gibico,2192731),混合均匀,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%浓度的 $\text{CO}_2$ 的恒温培养箱中孵育20小时;然后,去除培养基,更换新鲜的IMDM完全培养基继续孵育24小时;接下来,以平均0.5个细胞/孔的细胞密度将慢病毒转染后的NUGC4细胞接种至96孔板中,并添加终浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素进行抗性加压筛选,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%浓度 $\text{CO}_2$ 的恒温培养箱中培养2-3周,并挑取克隆,使用抗体IMAB362进行鉴定,最终成功获得过表达人CLDN18.2的NUGC4细胞株,本文中也称为“hCLDN18.2-NUGC4细胞株”。

[0204] 1.2过表达人CLDN18.2的HEK293细胞株的构建与鉴定

[0205] 将全长人CLDN18.2(SEQ ID NO:10)的DNA序列构建至pLVX-puro质粒(Clontech, Cat#632164)上。然后,将所得到的质粒通过电转化至HEK293细胞(ATCC®CRL-1573™)中。通过筛选,参照实施例1.1进行细胞培养、用嘌呤霉素进行抗性加压筛选,并使用抗体IMAB362鉴定克隆,最终成功获得过表达人CLDN18.2的HEK293细胞株,本文中也称为“hCLDN18.2-HEK293细胞株”。

[0206] 1.3 CD16a(F158)-NF-AT-Jurkat细胞株的构建与鉴定

[0207] 首先构建NF-AT-Jurkat细胞株:将包含NFAT应答元件(NFAT-RE)DNA序列的pGL4.30质粒(Promega,目录号:E8481)通过电转仪(Invitrogen,Neon™ Transfection System,MP922947)电转化至Jurkat细胞(ATCC®TIB-152)中。电转化后,使用终浓度为 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素B(源培,S160J7)进行抗性加压筛选,2-3周左右观察细胞株克隆生长情况,并挑取形成克隆的细胞株进行鉴定。鉴定方法如下:取部分克隆转移至96孔白底板中(Corning,3610),进行PMA( $10 \text{ng}/\text{mL}$ )和离子霉素( $1 \text{nM}$ )刺激, $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养6h后加入Bright glo(Vazyme,DD1204-01),在酶标仪(Molecular Devices:Spectramax i3x)读取信号值后评价不同克隆NF- $\kappa\text{B}$ 的表达水平从而获得高表达NF-AT基因的Jurkat细胞系(简称NF-AT-Jurkat细胞株)。

[0208] 取NF-AT-Jurkat细胞株,以20:1的感染复数(MOI)加入经包装的含有CD16a(F158)序列(UniProtKB-P08637,第158位氨基酸为F苯丙氨酸)的慢病毒,添加终浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素进行抗性加压筛选,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%浓度的 $\text{CO}_2$ 的恒温培养箱中培养2-3周,并挑取克隆进行鉴定(鉴定方法参考本申请实施例7),最终成功获得CD16a(F158)-NF-AT-Jurkat细胞株。

[0209] 实施例2抗CLDN18.2纳米抗体的亲和力成熟改造

[0210] 为了提高纳米抗体Nb-NA3S-H1与人CLDN18.2的特异性结合,本实施例对纳米抗体Nb-NA3S-H1进行了亲和力成熟改造。

[0211] 对纳米抗体Nb-NA3S-H1的采用AbM定义三个CDR中的每一CDR进行单位点或者连续两个位点的突变,构建亲和力成熟噬菌体展示文库,利用噬菌体展示技术对亲和力成熟后的分子进行筛选,筛选方法参考W02020238730A1中的实施例3。

[0212] 通过亲和力成熟改造,获得了候选纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4。采用AbM定义CDR的方式,确定了候选纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4的互补决定区序列,所述CDR的氨基酸序列如表2所示。

[0213] 表2亲本抗体Nb-NA3S-H1与亲和力成熟抗体Nb-NA3S-H1-T4的CDR序列

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
[0214] Nb-NA3S-H1-T4	GSIFH <u>I</u> PVMG (SEQ ID NO: 1)	GISR <u>G</u> GGTTN (SEQ ID NO: 2)	LVVSGIGSTLEV (SEQ ID NO: 3)
Nb-NA3S-H1	GSIFN <u>I</u> PVMG (SEQ ID NO: 11)	GIST <u>G</u> GGTTN (SEQ ID NO: 12)	LVVSGIGSTLEV (SEQ ID NO: 3)

[0215] 实施例3亲和力成熟的纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4的人源化改造

[0216] 将纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4的可变区序列和人源抗体胚系基因(Germline)数据库进行比对,找到与纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4同源性比较高的1-3条胚系基因,同时兼顾胚系基因的成药性,选择合适的胚系基因Germline模板进行比对。

[0217] 对纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4进行同源建模,同源建模参考PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)的纳米抗体结构模型。结合纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4的结构模型和非人源位点情况,进行组合回复突变设计,回复突变设计避免引入潜在翻译后修饰位点,最终设计出了人源化程度高达96.67%的候选纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4-hVH6。

[0218] 候选纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4和Nb-NA3S-H1-T4-hVH6的氨基酸序列(重链单域可变区)如表3所示。

[0219] 表3抗CLDN18.2纳米抗体的氨基酸序列

抗体名称	氨基酸序列
[0220] Nb-NA3S-H1-T4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFH <u>I</u> PVMGWYRQAPGKQ RELVAGISRGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYCNVLVVSIGSTLEVWGQGLVTVSS(SEQ ID NO: 4)
Nb-NA3S-H1-T4-hVH6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFH <u>I</u> PVMGWYRQAPGKG LELVAGISRGGTTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCNVLVVSIGSTLEVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 5)

[0221] 实施例4抗CLDN18.2重链抗体的构建

[0222] 将纳米抗体Nb-NA3S-H1、纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4、纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4-hVH6氨基酸序列的C端分别连接到人IgG1 Fc区(氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示)的N端,构建得到抗CLDN18.2重链抗体NA3SH1、NA3SH1-T4和NA3SH1-T4-hVH6。

[0223] 具体而言,通过PCR方法扩增分别获取纳米抗体Nb-NA3S-H1、纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4、纳米抗体Nb-NA3S-H1-T4-hVH6的基因序列、以及hIgG1 Fc区(氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示)基因序列,通过重叠延伸PCR法将各纳米抗体的基因序列与hIgG1 Fc区基因序列连接起来,再通过同源重组方法,分别构建至经过改造的真核表达载体质粒pcDNA3.3-TOPO(Invitrogen,货号:K830001)上,将该连接有各抗CLDN18.2重链抗体的基因序列的表达载体转化到大肠杆菌SS320细胞中,37℃过夜培养。利用无内毒素质粒提取试剂盒(OMEGA, D6950-01)进行质粒提取,得到无内毒素的抗CLDN18.2重链抗体质粒以供真核表达使用。

[0224] 抗CLDN18.2重链抗体对应的氨基酸序列提供于表4中。

[0225] 表4抗CLDN18.2重链抗体的氨基酸序列

重链抗体名称	氨基酸序列
NA3SH1	SEQ ID NO:7
NA3SH1-T4	SEQ ID NO:8
NA3SH1-T4-hVH6	SEQ ID NO:9

[0227] 实施例5抗CLDN18.2重链抗体的表达、纯化及理化性质分析

[0228] 5.1抗CLDN18.2重链抗体的表达和纯化

[0229] 抗CLDN18.2重链抗体的表达采用的是ExpiCHO瞬转表达系统(Thermo Fisher, A29133)。具体方法如下:转染当天,使ExpiCHO细胞密度为 $7 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 个活细胞/mL左右,细胞存活率>98%。用37℃预温的新鲜ExpiCHO表达培养基将细胞调整到终浓度为 $6 \times 10^6$ 个细胞/mL。用4℃预冷的OptiPRO™ SFM稀释目的质粒(向1mL所述培养基中加入1μg实施例4制备的抗CLDN18.2重链抗体质粒),同时,用OptiPRO™ SFM稀释ExpiFectamine™ CHO,再将两者等体积混合并轻轻吹打混匀制备成ExpiFectamine™ CHO/质粒DNA混合液,室温孵育1-5min,缓慢加入到准备好的ExpiCHO细胞悬液中并同时轻轻摇晃,最后置于细胞培养摇床中,在37℃、8%CO<sub>2</sub>条件下培养。在转染后18-22h,向培养液中添加ExpiCHO™ Enhancer和ExpiCHO™ Feed,摇瓶放置于32℃摇床和5%CO<sub>2</sub>条件下继续培养。在转染后的第5天,添加相同体积的ExpiCHO™ Feed,缓慢加入的同时轻轻混匀细胞混悬液。在转染7-15天后,将表达有目的蛋白的细胞培养上清于15000g高速离心10min,得上清用MabSelect SuRe LX(GE, 17547403)进行亲和纯化,然后用100mM乙酸钠(pH3.0)洗脱目的蛋白,接着用1M Tris-HCl中和,最后通过超滤浓缩管(Millipore, UFC901096)将所得蛋白置换至PBS缓冲液中。

[0230] 5.2抗CLDN18.2重链抗体的SDS-PAGE鉴定

[0231] 非还原溶液制备:各重链抗体以及参考品伊匹木单抗(Ipilimumab,也缩写为IPI,通过实施例5.1的类似方法制备获得)1μg加入5×SDS上样缓冲液和40mM碘代乙酰胺,75℃干浴加热10min,冷却到室温后,12000rpm离心5min,取上清。

[0232] 还原溶液制备:各重链抗体以及参考品IPI 2μg加入5×SDS上样缓冲液和5mM DTT,100℃干浴加热10min,冷却到室温后,12000rpm离心5min,取上清。

[0233] 将各上清加入Bis-tris 4-15%梯度胶(购自金斯瑞)中,恒压110V电泳,当考马斯亮蓝迁移到凝胶底部,停止运行,取出凝胶片置考马斯亮蓝染色液中1-2h,弃去染色液,加入脱色液,根据需要更换2-3次脱色液,脱色至凝胶背景透明后保存在去离子水中。脱色后用EPSON V550彩色扫描仪扫描,通过ImageJ按照峰面积归一法计算还原和非还原条带纯度。

[0234] 结果如图1所示:各重链抗体和参考品IPI非还原胶的条带均符合预期大小且纯度都在90%以上。

[0235] 5.3抗CLDN18.2重链抗体的SEC-HPLC单体纯度鉴定

[0236] 材料准备:1、流动相:150mmol/L磷酸缓冲液,pH 7.4;2、样品制备:各抗CLDN18.2重链抗体均用流动相溶液稀释到0.5mg/mL。Agilent HPLC 1100色谱柱(XBridge BEH SEC 3.5μm,7.8mm I.D.×30cm,Waters)流速设为0.8mL/min,进样体积20μL,VWD检测器波长为280nm和214nm。

[0237] 本实施例的抗CLDN18.2重链抗体的尺寸排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC)结果如

下:按照面积归一法计算样品中高分子聚合物、抗CLDN18.2重链抗体单体和低分子物质百分比,结果显示在图2A-2C和表5中。

[0238] 由图2A-2C和表5可见,重链抗体NA3SH1-T4-hVH6的表达量是重链抗体NA3SH1的3倍多,是重链抗体NA3SH1-T4的近2倍;且SEC-HPLC结果显示,重链抗体NA3SH1-T4-hVH6单体的百分数最高,这也意味着产物中的可溶性聚集物和剪切物的含量最低。

[0239] 表5抗CLDN18.2重链抗体的理化数据

重链抗体名称	分子量 (kDa)	等电点	消光系数	SDS-PAGE (%)	瞬转表达量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SEC-HPLC (%)
[0240] NA3SH1-T4	80	8.28	1.37	>90.0	5230.00	97.51
NA3SH1-T4-hVH6	80	8.29	1.41	>90.0	10300.00	97.61
NA3SH1	80	8.03	1.37	>90.0	2910.00	96.91

[0241] 实施例6抗CLDN18.2重链抗体的亲和活性分析

[0242] 6.1抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.2-HEK293细胞的结合能力

[0243] 收集指数生长期的hCLDN18.2-HEK293细胞,300g离心去上清,将细胞用FACS缓冲液(含有1%BSA的PBS)重悬,计数并将细胞悬液密度调整为 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL。随后,将hCLDN18.2-HEK293细胞以每孔100 $\mu\text{L}$ 加入96孔圆底板中,300g离心去上清。向对应孔中加入不同浓度的重链抗体NA3SH1-T4、重链抗体NA3SH1-T4-hVH6、作为对照的重链抗体NA3SH1和作为同型对照的人IgG1同型抗体,将细胞重悬后放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。将孵育后的细胞混合液洗涤3次后加入PE标记的抗人-IgG-Fc流式抗体(Abcam,目录号:98596),重悬后放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min。将孵育后的细胞混合液洗涤3次后加入200 $\mu\text{L}$ 的FACS缓冲液重悬细胞,最后通过流式细胞仪(Beckman,CytoFLEX A00-1-1102)上机检测分析。利用PRISM<sup>TM</sup>(GraphPad Software,San Diego,CA)分析数据,并且计算 $\text{EC}_{50}$ 值。

[0244] FACS结合测定结果如图3所示,重链抗体NA3SH1-T4和NA3SH1-T4-hVH6均表现出显著优于作为对照NA3SH1对CLDN18.2的结合能力,其中,NA3SH1-T4的 $\text{EC}_{50}=0.2736\mu\text{g/mL}$ 、NA3SH1-T4-hVH6的 $\text{EC}_{50}=0.3099\mu\text{g/mL}$ 、NA3SH1的 $\text{EC}_{50}=0.5356\mu\text{g/mL}$ 。

[0245] 6.2抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.2-NUGC4细胞的结合能力

[0246] 收集指数生长期的hCLDN18.2-NUGC4细胞,300g离心去上清,将细胞用FACS缓冲液(含有1%BSA的PBS)重悬,计数并将细胞悬液密度调整为 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL。随后,将hCLDN18.2-NUGC4细胞以每孔100 $\mu\text{L}$ 加入96孔圆底板中,300g离心去上清。向对应孔中加入不同浓度的重链抗体NA3SH1-T4、重链抗体NA3SH1-T4-hVH6、作为对照的重链抗体NA3SH1和作为同型对照的人IgG1同型抗体,将细胞重悬后放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。将孵育后的细胞混合液洗涤3次后加入PE标记的抗人-IgG-Fc流式抗体(Abcam,目录号:98596),重悬后放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min。将孵育后的细胞混合液洗涤3次后加入200 $\mu\text{L}$ 的FACS缓冲液重悬细胞,最后通过流式细胞仪(Beckman,CytoFLEX A00-1-1102)上机检测分析。利用PRISM<sup>TM</sup>(GraphPad Software,San Diego,CA)分析数据,并且计算 $\text{EC}_{50}$ 值。

[0247] FACS结合测定结果如图4所示,重链抗体NA3SH1-T4、重链抗体NA3SH1-T4-hVH6均表现出显著优于作为对照的重链抗体NA3SH1对CLDN18.2的结合能力,其中,NA3SH1-T4的 $\text{EC}_{50}=0.4047\mu\text{g/mL}$ 、NA3SH1-T4-hVH6的 $\text{EC}_{50}=0.8465\mu\text{g/mL}$ 、NA3SH1的 $\text{EC}_{50}=2.147\mu\text{g/mL}$ 。

[0248] 6.3抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.2-KATOIII细胞的结合能力

[0249] hCLDN18.2-KATOIII细胞为自制,制备方法参考CN112480248A的实施例1中人CLDN18.2-KATOIII肿瘤细胞株的构建。

[0250] 采用实施例6.1所述的类似方法,使用hCLDN18.2-KATOIII细胞,测定了抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.2-KATOIII细胞的结合能力。利用PRISM™ (GraphPad Software, San Diego, CA) 分析数据,并且计算EC<sub>50</sub>值。

[0251] FACS结合测定结果如图5所示,重链抗体NA3SH1-T4、重链抗体NA3SH1-T4-hVH6均表现出显著优于作为对照的重链抗体NA3SH1对CLDN18.2的结合能力,其中,NA3SH1-T4的EC<sub>50</sub>=0.3298μg/mL、NA3SH1-T4-hVH6的EC<sub>50</sub>=0.3984μg/mL、NA3SH1的EC<sub>50</sub>=0.6183μg/mL。

[0252] 6.4抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.1-HEK293细胞的结合能力

[0253] 将100μg/mL的重链抗体和目标细胞hCLDN18.1-HEK293(自制,制备方法参考CN112480248A的实施例1的1.3.2)在4℃孵育1h,接着再用上述FACS缓冲液润洗三次,加入PE标记的山羊抗人IgG Fc抗体(Abcam,目录号:ab98596)0.5μg(0.5mg/mL),在4℃孵育30min。其后,经FACS缓冲液润洗三次,并向细胞中加入200μL FACS缓冲液重悬细胞,最后通过流式细胞仪(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)进行检测,记录结合强度和细胞结合阳性率。

[0254] 如图6所示,在100μg/mL高浓度下,重链抗体NA3SH1-T4-hVH6、重链抗体NA3SH1-T4、作为对照的重链抗体NA3SH1与hCLDN18.1-HEK293细胞的结合阳性率非常接近于人IgG1同型抗体与hCLDN18.1-HEK293细胞的结合阳性率,表明了重链抗体NA3SH1-T4和NA3SH1-T4-hVH6都不结合hCLDN18.1蛋白。

[0255] 实施例7抗CLDN18.2重链抗体的ADCC效应

[0256] 抗CLDN18.2重链抗体的Fc端与Jurkat细胞上的CD16a(F158)或者CD16a(V158)结合、VHH端与细胞上的CLDN18.2结合后,会激活Jurkat细胞内部NF-AT蛋白表达,NF-AT与NF-AT应答元件结合会触发其下游的荧光素酶表达,用不同浓度梯度的本发明抗CLDN18.2重链抗体刺激,会得到具有蛋白浓度依赖性的荧光读数曲线,从而评价抗体的ADCC活性。

[0257] 7.1抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.2-HEK293细胞的ADCC效应

[0258] 在96孔细胞培养板中每孔加入50μL密度为4×10<sup>5</sup>个细胞/mL的作为靶细胞的hCLDN18.2-HEK293细胞和4×10<sup>6</sup>个细胞/mL的作为效应细胞的CD16a(F158)-NF-AT-Jurkat细胞,将靶细胞和效应细胞1:1混合后加入到96孔白边底透细胞培养板中,置于37℃培养箱中培养过夜(16-20小时)。分别加入50μL梯度稀释的重链抗体NA3SH1-T4、重链抗体NA3SH1-T4-hVH6、作为对照的重链抗体NA3SH1和作为同型对照的人IgG1同型抗体,37℃培养箱孵育6h。每孔加入50μL Bright-Life(vazyme,货号:DD1204-03),避光孵育10min,检测荧光信号。ADCC检测结果如图7所示。

[0259] 由图7可见,重链抗体NA3SH1-T4-hVH6表现出显著强于作为对照的重链抗体NA3SH1所引起的对hCLDN18.2-HEK293细胞的ADCC杀伤效应;重链抗体NA3SH1-T4表现出与作为对照的重链抗体NA3SH1所引起的对hCLDN18.2-HEK293细胞的ADCC杀伤效应相当。

[0260] 7.2抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.2-KATOIII细胞的ADCC效应

[0261] 在hCLDN18.2-KATOIII细胞上的ADCC效应的检测方法参考实施例7.1。ADCC检测结果如图8所示。

[0262] 由图8可见,与作为对照的重链抗体NA3SH1和与重链抗体NA3SH1-T4比较,重链抗

体NA3SH1-T4-hVH6引起最佳的对hCLDN18.2-KATOIII细胞的ADCC杀伤效应。

[0263] 7.3抗CLDN18.2重链抗体对hCLDN18.2-NUGC4细胞的ADCC效应

[0264] 在hCLDN18.2-NUGC4细胞上的ADCC效应的检测方法参考实施例7.1。ADCC检测结果如图9所示。

[0265] 由图9可见,重链抗体NA3SH1-T4-hVH6表现出显著强于作为对照的重链抗体NA3SH1所引起的对hCLDN18.2-NUGC4细胞的ADCC杀伤效应;重链抗体NA3SH1-T4表现出与作为对照的重链抗体NA3SH1所引起的对hCLDN18.2-NUGC4细胞的ADCC杀伤效应相当。





Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           115                  120  
 <210> 6  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人IgG1 Fc区  
 <400> 6  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 1                  5                  10                  15  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
                   20                  25                  30  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
                   35                  40                  45  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
                   50                  55                  60  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 65                  70                  75                  80  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
                   85                  90                  95  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
                   100                  105                  110  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
                   115                  120                  125  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
                   130                  135                  140  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 145                  150                  155                  160  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
                   165                  170                  175  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
                   180                  185                  190  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
                   195                  200                  205  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
                   210                  215                  220  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225                  230

<210> 7  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 重链抗体NA3SH1  
 <400> 7  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Asn Ile Pro  
                   20                   25                   30  
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
                   50                   55                   60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
                   85                   90                   95  
 Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser Thr Leu Glu Val Trp Gly Gln  
                   100                   105                   110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
                   115                   120                   125  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
                   130                   135                   140  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 145                   150                   155                   160  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
                   165                   170                   175  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
                   180                   185                   190  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
                   195                   200                   205  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
                   210                   215                   220  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 225                   230                   235                   240  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
                   245                   250                   255

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 260 265 270  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 275 280 285  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 290 295 300  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 325 330 335  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 340 345 350  
 <210> 8  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 重链抗体NA3SH1-T4  
 <400> 8  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe His Ile Pro  
 20 25 30  
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95  
 Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser Thr Leu Glu Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 115 120 125  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 130 135 140  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 145 150 155 160

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 165 170 175  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 180 185 190  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 195 200 205  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 210 215 220  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 245 250 255  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 260 265 270  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 275 280 285  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 290 295 300  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 325 330 335  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 340 345 350  
 <210> 9  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 重链抗体NA3SH1-T4-hVH6  
 <400> 9  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe His Ile Pro  
 20 25 30  
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn
				85					90					95	
Val	Leu	Val	Val	Ser	Gly	Ile	Gly	Ser	Thr	Leu	Glu	Val	Trp	Gly	Gln
				100				105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
				115				120				125			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
				130			135				140				
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
145						150					155				160
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
					165				170					175	
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
				180					185				190		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
				195				200					205		
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
					210			215				220			
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
225						230					235				240
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
					245					250					255
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
				260					265					270	
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
					275				280				285		
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
					290				295				300		
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
305						310					315				320
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
					325					330				335	
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
				340					345					350	
<210>	10														
<211>	261														
<212>	PRT														

<213> 人工序列

<220>

<223> hCLDN18.2

<400> 10

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr  
                   20                   25                   30  
 Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly  
                   35                   40                   45  
 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
                   50                   55                   60  
 Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65                   70                   75                   80  
 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val  
                   85                   90                   95  
 Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser  
                   100                   105                   110  
 Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser  
                   115                   120                   125  
 Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
                   130                   135                   140  
 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly  
 145                   150                   155                   160  
 Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe  
                   165                   170                   175  
 Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met  
                   180                   185                   190  
 Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
                   195                   200                   205  
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
                   210                   215                   220  
 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
 225                   230                   235                   240  
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
                   245                   250                   255  
 Lys His Asp Tyr Val  
                   260

<210> 11





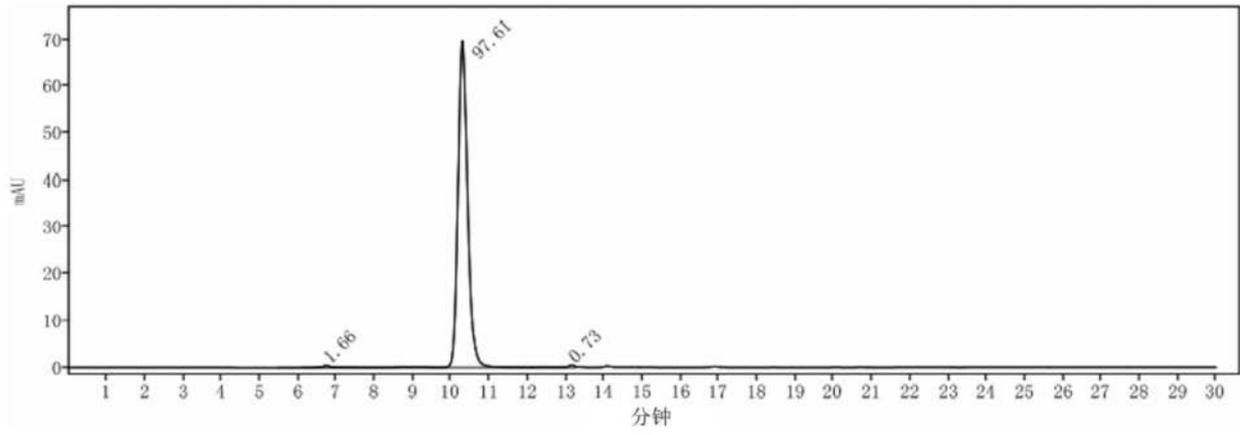


图2B

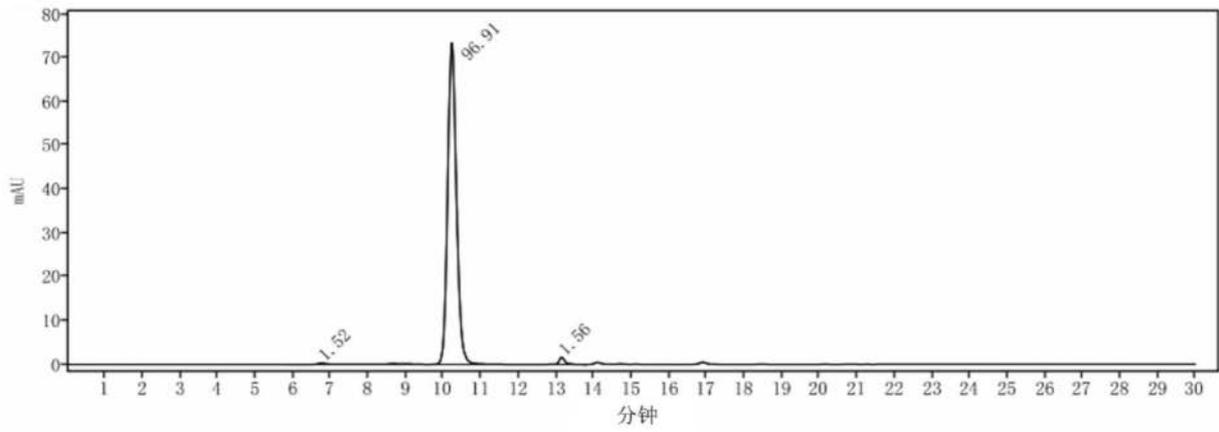


图2C

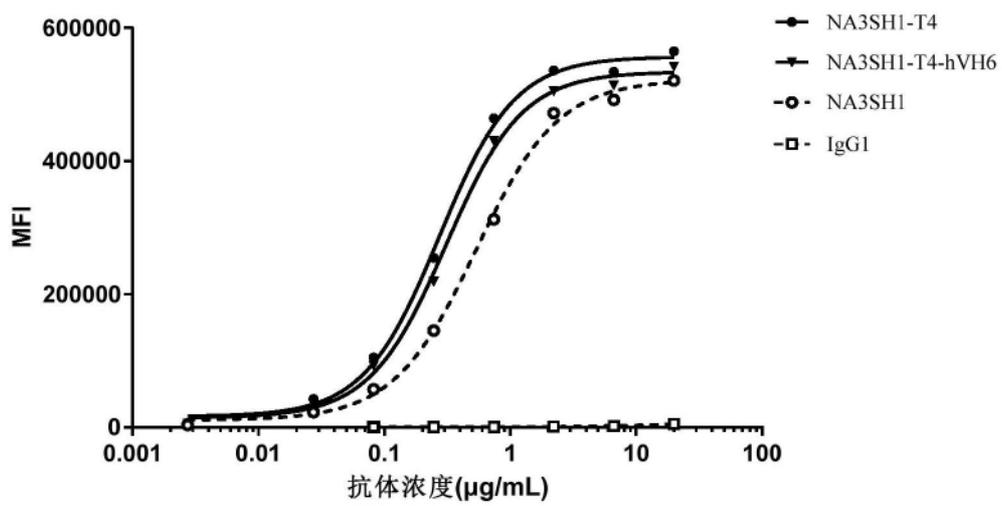


图3

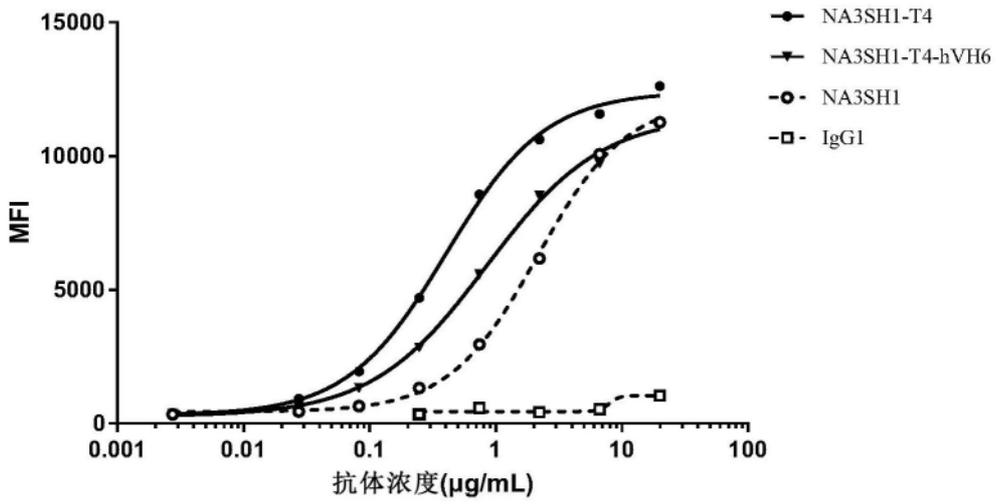


图4

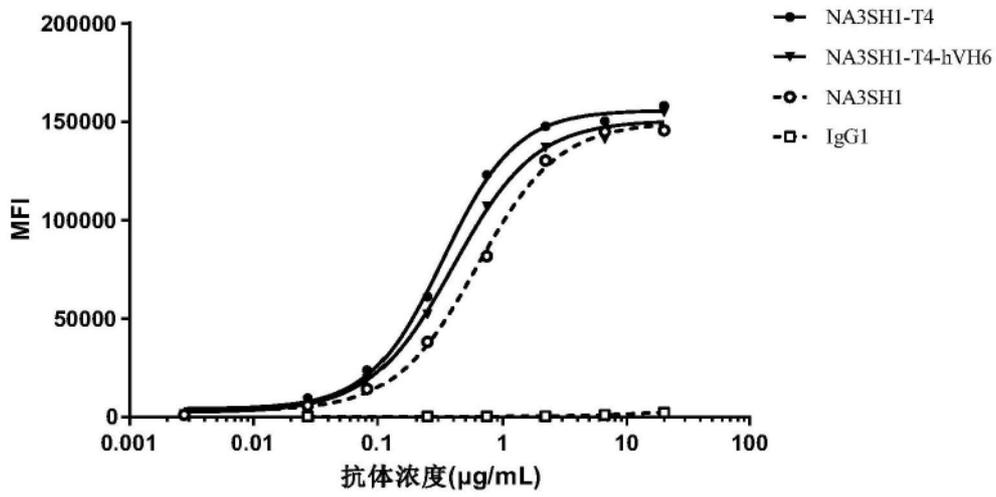


图5

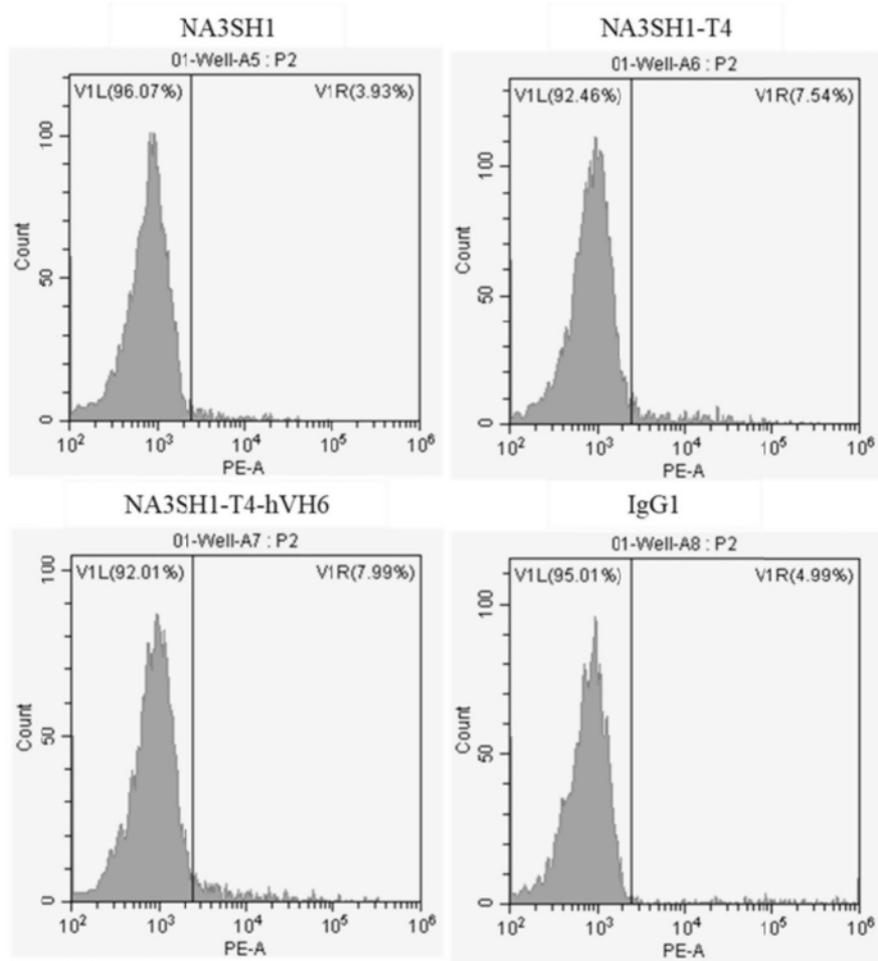


图6

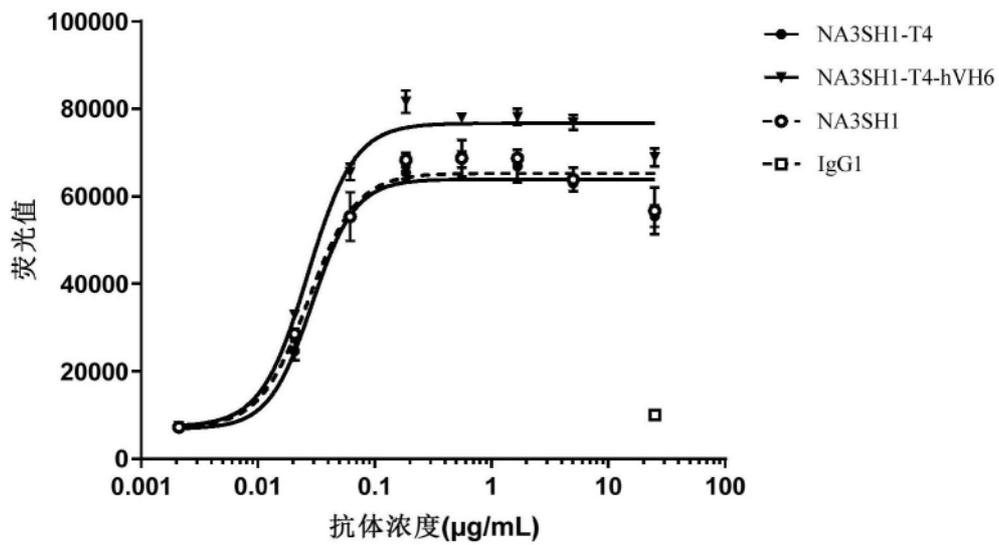


图7

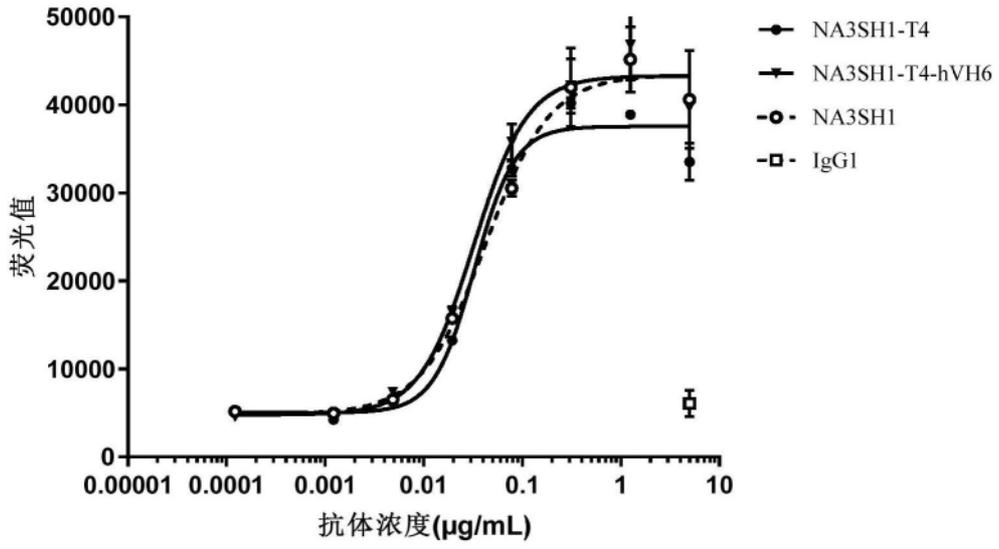


图8

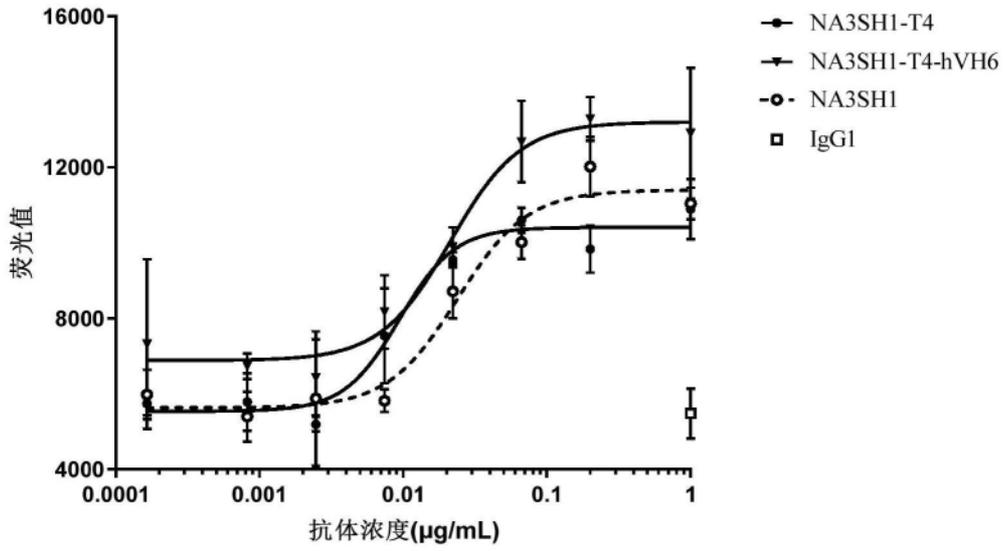


图9