

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年7月20日 (20.07.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/134657 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/071504

(22) 国际申请日: 2023年1月10日 (10.01.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210025337.2 2022年1月11日 (11.01.2022) CN

(71) 申请人: 原启生物科技(上海)有限责任公司 (ORICELL THERAPEUTICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 杨沙沙 (YANG, Shasha); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。 陈晓锐 (CHEN, Xiaorui); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。 王华菁 (WANG, Huajing); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。 杨焕凤 (YANG, Huanfeng); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。 何晓文 (HE, Xiaowen); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海巛石知识产权代理事务所(普通合伙) (SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路608号2号103室/张琤, 蒋舫玮, Shanghai 201210 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: ANTI-CLDN18.2 AND 4-IBB BISPECIFIC ANTIGEN BINDING PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗CLDN18.2和4-IBB的双特异性抗原结合蛋白及其用途

(57) Abstract: An isolated antigen binding protein, a preparation method therefor, and a use thereof. The antigen binding protein comprises: a first antigen binding domain and a second antigen binding domain, wherein the first antigen binding domain can specifically bind to claudin 18.2 (CLDN18.2), and the first antigen binding domain contains at least one CDR in an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 100.

(57) 摘要: 一种分离的抗原结合蛋白及其制备方法和用途。该抗原结合蛋白包括: 第一抗原结合域和第二抗原结合域, 该第一抗原结合域能够特异性结合紧密连接蛋白18.2 (CLDN18.2), 且该第一抗原结合域包含SEQ ID NO: 100所示的氨基酸序列中的至少一个CDR。



WO 2023/134657 A1

抗 CLDN18.2 和 4-1BB 的双特异性抗原结合蛋白及其用途

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种抗 CLDN18.2 的双特异性抗原结合蛋白及其用途。

背景技术

CLDN18.2 (Claudin 18.2) 是形成紧密细胞连接的重要组成部分的一个蛋白质家族。CLDN18.2 只表达于分化型胃壁细胞，在正常组织中无表达。最新研究表明，CLDN18.2 在 77% 以上胃癌患者以及 80% 以上胰腺癌患者中都过表达，此外在肺癌，食管癌以及卵巢癌等实体瘤中过表达。

4-1BB (CD137, 肿瘤细胞坏死因子受体超家族 9) 是 TNF 受体超家族 (TNFRSF) 的成员，其作为一种共刺激分子，在免疫细胞 (固有免疫细胞和适应性免疫细胞) 激活后表达。4-1BB 在调节多种免疫细胞的活性方面起着重要作用。4-1BB 激动剂增强免疫细胞增殖、存活、细胞因子分泌和 CD8+T 细胞的细胞溶解活性。许多其他研究表明，激活 4-1BB 可增强免疫反应，消除小鼠肿瘤。因此，4-1BB 可能是一种有前途的肿瘤免疫靶分子。

目前已有 CLDN18.2 抗体，然而，现有抗体在治疗效果及免疫持久性上仍有很大的进步空间，因此，亟需开发更有效的针对 CLDN18.2 的抗体。

发明内容

本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，所述抗原结合蛋白包含第一抗原结合域和第二抗原结合域，所述第一抗原结合域能够特异性结合 CLDN18.2。在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白具有下述性质中的一种：1) 能够特异性结合 CLDN18.2；2) 能够特异性结合 4-1BB；3) 能够特异性结合人、鼠和食蟹猴的 CLDN18.2 蛋白；4) 能够刺激 T 细胞活化，促进 IL-2 因子的分泌；5) 能够抑制肿瘤细胞的生长和/或增殖；6) 具有肿瘤免疫记忆功能。

一方面，本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包括：第一抗原结合域和第二抗原结合域，所述第一抗原结合域能够特异性结合紧密连接蛋白 18.2 (CLDN18.2)，且所述第一抗原结合域包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包括 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包括 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 57 和 SEQ ID NO: 71 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 56 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 99 ($X_1YX_2X_3X_4$ ，其中， X_1 为 N 或 R， X_2 为 G、I 或 V， X_3 为 I 或 M， X_4 为 H、N 或 S) 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 55 和 SEQ ID NO: 69 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 99 ($X_1YX_2X_3X_4$ ，其中， X_1 为 N 或 R， X_2 为 G、I 或 V， X_3 为 I 或 M， X_4 为 H、N 或 S) 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 包含选自下述任一组氨基酸序列：

- (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；
- (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列；以及
- (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 H-FR1，

所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连, 且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 58 和 SEQ ID NO: 75 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 H-FR2, 所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间, 且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 59 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 H-FR3, 所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间, 且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 60 和 SEQ ID NO: 72 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 H-FR4, 所述 H-FR4 的 N 端与所述 HCDR3 的 C 端直接或间接相连, 且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 61 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含重链可变区 VH, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含重链可变区 VH, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 73 和 SEQ ID NO: 76 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 79 和 SEQ ID NO: 86 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 48 和 SEQ ID NO: 77 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 包含选自下述任一组氨基酸序列：

- (1) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；
- (2) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；
- (3) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列；
- (4) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列；以及
- (5) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 L-FR1，所述 L-FR1 的 C 端与所述 LCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 80 和 SEQ ID NO: 87 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 L-FR2，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 和所述 LCDR2 之间，且所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 L-FR3，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 和所述 LCDR3 之间，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 14、SEQ

ID NO: 50、SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 81 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 端与所述 LCDR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 82 和 SEQ ID NO: 88 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 104 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 83 和 SEQ ID NO: 89 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 包含选自下述任一组氨基酸序列：

- (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；
- (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；
- (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列；
- (4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含

SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；

- (5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列，所示 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列；以及
- (6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所示 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 104 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含 VH 和 VL，所述 VH 和 VL 选自下述任一组氨基酸序列：

- (1) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列，且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列；
- (2) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列，且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列；
- (3) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列，且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 66 所示的氨基酸序列；
- (4) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列，且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列；
- (5) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 76 所示的氨基酸序列，且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 83 所示的氨基酸序列；以及
- (6) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 76 所示的氨基酸序列，且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 89 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含重链恒定区。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述重链恒定区包含源自 IgG 的重链恒定区。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述重链恒定区包含源自人 IgG 的重链恒定区。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述重链恒定区包含源自人 IgG1 的重链恒定区。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述重链恒定区包含 Fc 片段。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 Fc 片段包含一个或多个突变。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 Fc 片段包含 N180A、D239E 和 L241M 中的一个或多个突变。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含轻链恒定区。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述轻链恒定区包含人 Ig κ 恒定区。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域包含抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述抗原结合片段包括 Fab, Fab', Fv 片段, F(ab)'₂, scFv, di-scFv 和/或 dAb。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域能够特异性结合 4-1BB。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 105 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 HCDR1，

且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 91 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 端与所述 HCDR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含重链可变区 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 L-FR1，且所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 L-FR2，

且所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 L-FR3，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 L-FR4，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含轻链可变区 VL，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，其中所述第二抗原结合域包含 VH 和 VL，所述 VH 和 VL 选自下述任一组的氨基酸序列：

- (1) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列；以及
- (2) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域的 VH 和 VL 直接或间接相连。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域的 VH 和 VL 通过连接子相连。在某些实施方式中，所述连接子包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段包含 scFv。

在某些实施方式中，所述 scFv 包含 SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 96 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域直接或间接相连。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域通过连接子相连。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述连接子包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域的 scFv 与所述第一抗原结合域的 Fc 片段的 C 端直接或间接相连。

另一方面，本申请还提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包含两个第一多肽和两个第二多肽，所述第一多肽从N端到C端依次包含VH，CH1，CH2，CH3和能够特异性结合4-1BB蛋白的scFv，所述第二多肽包含VL和轻链可变区CL；其中所述VH与所述VL配对且能够特异性结合CLDN18.2。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VH包含HCDR1，HCDR2和HCDR3，所述HCDR1包含SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列，所述HCDR2包含SEQ ID NO: 2所示的氨基酸序列，且所述HCDR3包含SEQ ID NO: 3所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VH包含HCDR1，HCDR2和HCDR3，所述HCDR1包含SEQ ID NO: 55所示的氨基酸序列，所述HCDR2包含SEQ ID NO: 56所示的氨基酸序列，且所述HCDR3包含SEQ ID NO: 57所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VH包含HCDR1，HCDR2和HCDR3，所述HCDR1包含SEQ ID NO: 69所示的氨基酸序列，所述HCDR2包含SEQ ID NO: 70所示的氨基酸序列，且所述HCDR3包含SEQ ID NO: 71所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VL包含LCDR1，LCDR2和LCDR3，所述LCDR1包含SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列，所述LCDR2包含SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列，且所述LCDR3包含SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VL包含LCDR1，LCDR2和LCDR3，所述LCDR1包含SEQ ID NO: 48所示的氨基酸序列，所述LCDR2包含SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列，且所述LCDR3包含SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VL包含LCDR1，LCDR2和LCDR3，所述LCDR1包含SEQ ID NO: 48所示的氨基酸序列，所述LCDR2包含SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列，且所述LCDR3包含SEQ ID NO: 63所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VL包含LCDR1，LCDR2和LCDR3，所述LCDR1包含SEQ ID NO: 77所示的氨基酸序列，所述LCDR2包含SEQ ID NO: 78所示的氨基酸序列，且所述LCDR3包含SEQ ID NO: 79所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述VL包含LCDR1，LCDR2和LCDR3，所述LCDR1包含SEQ ID NO: 48所示的氨基酸序列，所述LCDR2包含SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列，且所述LCDR3包含SEQ ID NO: 86所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述CH2和所述CH3构成Fc片段。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述Fc片段包含选自下组的一个或

多个氨基酸突变：N180A，D239E 和 L241M。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 scFv 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 scFv 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 scFv 包含 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 scFv 包含 VL，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请还提供了多肽，其包含本申请所述的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请还提供了一种或多种分离的核酸分子，其编码本申请所述的分离的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请还提供了载体，其包含本申请所述的核酸分子。

另一方面，本申请还提供了细胞，其包含所述的核酸分子或所述的载体。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其包含本申请所述的抗原结合蛋白，以及任选地药学上可接受的载剂。

另一方面，本申请还提供了制备所述抗原结合蛋白的方法，其包括在使得所述分离的抗原结合蛋白表达的条件下，培养本申请所述的细胞。

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白，所述多肽，所述核酸分子，所述载体，所述细胞和/或所述药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括 CLDN18.2 表达异常相关的疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤选自胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胃食管交界处癌和/或结肠癌。

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白，所述多肽，所述核酸分子，所述载体，所述细胞和/或所述药物组合物，其用于预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括 CLDN18.2 表达异常相关的疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤选自胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胃食管交界处癌和/或结肠癌。

另一方面，本申请还提供了一种预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本申请所述分离的抗原结合蛋白，所述多肽，所述核酸分子，所述载体，所述细胞和/或所述药物组合物。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括 CLDN18.2 表达异常相关的疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤选自胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胃食管交界处癌和/或结肠癌。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下：

图 1A 显示的是本申请所述分离的抗原结合蛋白的构建示意图；图 1B 显示的是纯化后抗原结合蛋白的 SEC-HPLC 纯度检测结果。

图 2A 显示的是抗原结合蛋白和 4-1BB-NF κ B-293T 细胞的结合活性；图 2B 显示的是抗原结合蛋白和 CHO-hCLDN18.2 细胞的结合活性。

图 3 显示的是流式验证抗原结合蛋白双头同时结合的活性检测。

图 4A 显示的是抗原结合蛋白和 293T-鼠 CLDN18.2 细胞的流式结合活性；图 4B 显示的是抗原结合蛋白和 293T-食蟹猴 CLDN18.2 细胞的流式结合活性。

图 5 显示的是本申请所述抗原结合蛋白的流式竞争结合实验。

图 6 显示的是荧光素酶活性分析实验结果。

图 7A 显示的是 SEA 超抗原激活 PBMC 条件下的 IL-2 分泌水平；图 7B 显示的是抗人 CD3 抗体激活 PBMC 条件下的 IL-2 分泌水平。

图 8 显示的是抗原结合蛋白在小鼠结肠癌肿瘤模型中的抑瘤活性检测。

图 9 显示的是给药后小鼠肿瘤体积统计。

图 10 显示的是本申请所述的 CLDN18.2 的靶向部分与高表达人 CLDN18.2 细胞的流式结合活性检测。

图 11 显示的是本申请所述的 CLDN18.2 的靶向部分与高表达人 CLDN18.1 细胞的流式结合活性检测。

图 12 显示的是本申请所述的 CLDN18.2 的靶向部分与肿瘤细胞系的流式结合活性检测。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“CLDN18.2”、或“Claudin18.2”可以互换使用，通常指细胞连接密蛋白 Claudin18 的亚型 2。所述术语涵盖“全长”、未加工的 CLDN18.2 以及由细胞加工所产生的任何形式的 CLDN18.2。CLDN18.2 可以包括完整的 CLDN18.2 及其片段，其功能性变体、同工型、物种同源物、衍生物、类似物以及具有至少一个与 CLDN18.2 共同表位的类似物。CLDN18.2（例如人 CLDN18.2）的氨基酸序列是本领域已知的。例如，人 CLDN18.2 核苷酸序列可以显示于 GeneBank 登录号 NM_001002026.3 下。例如，小鼠 CLDN18.2 核苷酸序列可以显示于 GeneBank 登录号 NM_001194921.1 下。例如，食蟹猴 CLDN18.2 核苷酸序列可以显示于 GeneBank 登录号 XM_001114708.4 下。

在本申请中，属于“4-1BB”，又名 4-1BB 或 TNFRS9，通常是指肿瘤坏死因子受体超家族（TNFRS）的一种跨膜蛋白质，是激活诱导的共刺激分子是免疫应答的重要调节剂。研究表明 CD137 激动型单克隆抗体在许多模型中增加共刺激分子表达，并且显著增强细胞溶解性 T 淋巴细胞应答，发挥抗肿瘤作用。CD137 靶向疗法的抗肿瘤作用可以通过利用激动型抗小鼠 CD137 单克隆抗体的小鼠体内抗肿瘤疗效研究证实。CD137 已经成为免疫细胞的有力激活剂，并成为治疗各种疾病的重要候选抗原。（参见 Vinay, Dass S., and Byoung S. Kwon. "4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy." BMB reports

47.3 (2014):122.)

在本申请中，术语“分离的”通常指从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

在本申请中，术语“分离的抗原结合蛋白”通常指从天然状态下经人工手段获得的具有抗原结合能力的蛋白。该“分离的抗原结合蛋白”可以包含结合抗原的部分和任选地，允许抗原结合部分采用促进所述抗原结合部分结合抗原的构象的框架或构架部分。抗原结合蛋白可以包含例如抗体来源的蛋白框架区（FR）或具有移植的 CDR 或 CDR 衍生物的备选蛋白框架区或人工框架区。此类框架包括，但不限于包含被引入例如以稳定抗原结合蛋白的三维结构的突变的抗体来源的框架区以及包含例如生物相容性聚合物的完全合成的框架区。参见例如 Korndorfer 等, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1):121-129(2003); Roque 等, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654(2004)。抗原结合蛋白的实例包括但不限于：人抗体、人源化抗体；嵌合抗体；重组抗体；单链抗体；双功能抗体；三功能抗体；四功能抗体；Fab, Fab', Fv 片段, F(ab')₂, F(ab)₂, scFv, di-scFv, dAb, IgD 抗体；IgE 抗体；IgM 抗体；IgG1 抗体；IgG2 抗体；IgG3 抗体；或 IgG4 抗体以及其片段。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含不止一个抗原结合域。在本申请中，所述抗原结合域可以靶向不同的抗原。在本申请中，所述抗原结合域可以靶向相同抗原的不同表位。例如，所述分离的抗原结合蛋白可以包含第一抗原结合域和第二抗原结合域。例如，所述第一抗原结合域可以靶向 CLDN18.2 蛋白，例如，所述第二抗原结合域可以靶向 4-1BB 蛋白。

在本申请中，术语“可变结构域”与“可变区”可以互换使用，通常指抗体重链和/或轻链的一部分。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“V_H”和“V_L”（或者分别称为“VH”和“VL”）。这些结构域通常是抗体的变化最大的部分(相对于相同类型的其它抗体)，且包含抗原结合位点。

在本申请中，术语“可变”通常指在抗体之间可变结构域的某些区段在序列上可能存在较大差异。可变结构域介导抗原结合并决定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而，可变性并非在整个可变结构域范围内均匀分布。它通常集中在轻链和重链可变结构域中称为高变区

(CDR 或 HVR)的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区,大多数采用 β -折叠构型,通过三个 CDR 连接,其形成环形连接,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密靠近地保持在一起,并且来自另一条链的 CDR 一同促进抗体的抗原结合位点的形成(参见 Kabat et al, Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))。

在本申请中,术语“抗体”通常指免疫球蛋白或其片段或其衍生物,涵盖包括抗原结合位点的任何多肽,无论其是在体外还是体内产生的。该术语包括但不限于多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂化的、突变的和移植的抗体。除非另外被术语“完整的”修饰,如在“完整的抗体”中,为了本发明的目的,术语“抗体”也包括抗体片段,比如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 和保持抗原结合功能(例如,特异性结合 CLDN18.2)的其它抗体片段。通常,这样的片段应当包括抗原结合结构域。基本的 4 链抗体单元是由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单元与另外一个称为 J 链的多肽组成,且含有 10 个抗原结合位点,而 IgA 抗体包括 2-5 个可以与 J 链相结合聚合形成多价组合的基本 4 链单元。就 IgG 而言,4 链单元一般为约 150,000 道尔顿。每个 L 链通过一个共价二硫键与 H 链连接,而两个 H 链通过一个或多个取决于 H 链同种型的二硫键相互连接。每个 H 和 L 链还具有规则间隔的链内二硫化桥键。每个 H 链在 N 末端具有可变结构域(VH),对于 α 和 γ 链各自继之以三个恒定结构域(CH)、对于 μ 和 ϵ 同种型继之以四个 CH 结构域。每个 L 链在 N 末端具有可变结构域(VL),在其另一端具有恒定结构域。VL 与 VH 对应,且 CL 与重链的第一恒定结构域(CH1)相对应。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。VH 和 VL 配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别抗体的结构和性质,参见例如 Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, 第 71 页和第 6 章。来自任何脊椎动物物种的 L 链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分为两种明显不同的类型中的一种,称为 κ 和 λ 。根据重链(CH)恒定结构域的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白分为不同的类别或同种型。目前存在五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,具有分别被命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于 CH 序列和功能方面的相对小的差异,将 γ 和 α 类进一步分成亚类,例如,人表达下述亚类: IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgK1。

在本申请中,术语“CDR”也称“互补决定区”,通常指抗体可变结构域中的区域,其

序列是高度可变的和/或形成结构定义环。通常，抗体包括六个 CDR；在 VH 中三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3)，和在 VL 中三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。在某些实施方案中，仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在缺乏轻链的情况下，其功能也能够正常且稳定。参见，例如，Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)。

在本申请中，术语“FR”通常指抗体可变结构域的更高度保守的部分，其被称为框架区。通常，天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区，即在 VH 中四个(H-FR1, H-FR2, H-FR3, 和 H-FR4)，和在 VL 中四个(L-FR1, L-FR2, L-FR3, 和 L-FR4)。例如，本申请所述的分离的抗原结合蛋白的 VL 可以包括框架区 L-FR1, L-FR2, L-FR3, 和 L-FR4。本申请所述的分离的抗原结合蛋白的 VH 可以包括框架区 H-FR1, H-FR2, H-FR3, 和 H-FR4。

在本申请中，术语“抗原结合片段”通常指具有特异结合抗原（例如，CLDN18.2）能力的一个或多个片段。在本申请中，所述抗原结合片段可以包括 Fab, Fab', F(ab)₂、Fv 片段、F(ab')₂, scFv, di-scFv 和/或 dAb。

在本申请中，术语“Fab”通常指抗体的抗原结合片段。如上所述，可以使用木瓜蛋白酶消化完整的抗体。抗体经木瓜蛋白酶消化后产生两个相同的抗原结合片段，即“Fab”片段，和残余的“Fc”片段(即 Fc 区，同上)。Fab 片段可以由一条完整的 L 链与一条重链的可变区和该 H 链(V_H)的第一恒定区(C_{H1})组成。

在本申请中，术语“Fab'片段”通常指人单克隆抗体的单价抗原结合片段，该片段比 Fab 片段稍大。例如，Fab'片段可以包括所有轻链，所有重链可变区以及重链的所有或部分第一和第二恒定区。例如，Fab'片段还可包括重链的部分或所有的 220-330 个氨基酸残基。

在本申请中，术语“F(ab')₂”通常指通过胃蛋白酶消化完整抗体所产生的抗体片段。F(ab')₂ 片段含有由二硫键维持在一起的两个 Fab 片段和部分铰链区。F(ab')₂ 片段具有二价抗原结合活性并且能够交联抗原。

在本申请中，术语“Fv 片段”通常指人单克隆抗体的单价抗原结合片段，包括所有或部分重链可变区和轻链可变区，并且缺乏重链恒定区和轻链恒定区。重链可变区和轻链可变区包括例如 CDR。例如，Fv 片段包括重链和轻链的约 110 个氨基酸的所有或部分氨基端可变区。

在本申请中，术语“scFv”通常指包含至少一个包括轻链的可变区抗体片段和至少一个包括重链的可变区的抗体片段的融合蛋白，其中所述轻链和重链可变区是邻接的(例如经由合成接头例如短的柔性多肽接头)，并且能够以单链多肽形式表达，且其中所述 scFv 保留其所

来源的完整抗体的特异性。除非特别说明，否则如本申请中使用的那样，scFv 可以以任何顺序(例如相对于多肽的 N-末端和 C 末端)具有所述的 VL 和 VH 可变区，scFv 可以包括 VL-接头-VH 或可以包括 VH-接头-VL。

在本申请中，术语“dAb”通常是指具有 VH 域、VL 域或具有 VH 域或 VL 域的抗原结合片段，参考例如 Ward 等人(Nature,1989Oct 12; 341(6242): 544-6)，参考 Holt 等人,Trends Biotechnol.,2003,21(11): 484-490; 以及参考例如 WO 06/030220、WO 06/003388 和 DomantisLtd 的其它公布的专利申请。

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常指单分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体通常针对单个抗原位点具有高度特异性。而且，与常规多克隆抗体制剂（通常具有针对不同决定簇的不同抗体）不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体的优点在于它们可以通过杂交瘤培养合成，不受其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，本申请使用的单克隆抗体可以在杂交瘤细胞中制备，或者可以通过重组 DNA 方法制备。

在本申请中，术语“嵌合抗体”通常是指其中可变区源自一个物种，而恒定区源自另一个物种的抗体。通常，可变区源自实验动物诸如啮齿动物的抗体（“亲本抗体”），且恒定区源自人类抗体，使得所得嵌合抗体与亲本（例如小鼠来源）抗体相比，在人类个体中引发不良免疫反应的可能性降低。

在本申请中，术语“人源化抗体”通常是指非人抗体（例如小鼠抗体）的 CDR 区以外的部分或全部有的氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应的氨基酸置换的抗体。在 CDR 区中，氨基酸的小的添加、缺失、插入、置换或修饰也可以是允许的，只要它们仍保留抗体结合特定抗原的能力。人源化抗体可任选地包含人类免疫球蛋白恒定区的至少一部分。“人源化抗体”保留类似于原始抗体的抗原特异性。非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式可以最低限度地包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在某些情形中，可以将人免疫球蛋白（受体抗体）中的 CDR 区残基用具有有所期望性质、亲和力和/或能力的非人物种（供体抗体）（诸如小鼠，大鼠，家兔或非人灵长类动物）的 CDR 区残基替换。在某些情形中，可以将人免疫球蛋白的 FR 区残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有的氨基酸修饰。进行这些修饰可以是为了进一步改进抗体的性能，诸如结合亲和力。

术语“全人源抗体”通常指仅包含人类免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如果其是在小鼠中、在小鼠细胞中或在衍生自小鼠细胞的杂交瘤中生产，那么全人源抗体可能含有鼠糖链。

类似地，“小鼠抗体”或“大鼠抗体”分别指仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗体。可通过噬菌体展示或其它分子生物学方法，在人体内、在具有人类免疫球蛋白种系序列的转基因动物体内生成全人源抗体。可用于制造抗体的示例性技术在美国专利：6,150,584、6,458,592、6,420,140 中描述。其它技术，如使用文库，是本领域已知的。

在本申请中，术语“直接相连”与术语“间接相连”相对，术语“直接相连”通常是指直接连接。例如，所述直接相连可以为物质间没有间隔子而直接相连的情况。所述间隔子可以是连接子。例如，所述连接子可以为肽连接子。术语“间接相连”通常是指物质间不直接相连的情况。例如，所述间接相连可以为通过间隔子而连接的情况。例如，在本申请所述的分离的抗原结合蛋白中，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端可以直接或间接相连。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”通常指任何长度的分离形式的核苷酸，脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或从其天然环境分离的或人工合成的类似物。

在本申请中，术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说，载体可以包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类可以包括逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

在本申请中，术语“细胞”通常指可以是或已经是受试者质粒或载体的接受者的单个细胞、细胞系或细胞培养物，其包括本发明所述的核酸分子或本发明所述的载体。细胞可以包括单个细胞的后代。由于天然、偶然或有意的突变，后代可以不一定与原始母细胞完全相同（在总 DNA 互补体的形态上或在基因组上）。细胞可包括用本申请所述的载体在体外转染的细胞。细胞可以是细菌细胞(例如，大肠杆菌)、酵母细胞或其它真核细胞，例如 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、CHO-K1 细胞、LNCAP 细胞、HeLa 细胞、HEK293 细胞、COS-1 细胞、NS0 细胞。在某些实施方案中，细胞为哺乳动物细胞。在某些实施方案中，哺乳动物细胞为 HEK293 细胞。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指用于预防/治疗疾病或病症的组合物。所述药物

组合物可以包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。此外，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载体、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下优选地对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在本申请中，术语“药学上可接受的载体”通常包括药剂学可接受的载体、赋形剂或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。生理学可接受的载体可包括例如缓冲剂，抗氧化剂，低分子量（少于约 10 个残基）多肽，蛋白质，亲水性聚合物，氨基酸，单糖，二糖和其它碳水化合物，螯合剂，糖醇，成盐反荷离子，例如钠；和/或非离子表面活性剂。

在本申请中，术语“特异性结合”或“特异性的”通常指可测量的和可再现的相互作用，例如靶标和抗体之间的结合，可在分子(包括生物分子)的异质群体存在的情况决定靶标的存在。例如，特异性结合靶标(其可以为表位)的抗体可以是以比它结合其它靶标更大的亲和性、亲合力、更容易、和/或以更大的持续时间结合该靶标的抗体。在某些实施方案中，抗体特异性结合蛋白质上的表位，所述表位在不同种属的蛋白质中是保守的。在某些实施方案中，特异性结合可以包括但不要求排他性地结合。

在本申请中，术语“受试者”通常指人类或非人类动物，包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

在本申请中，术语“肿瘤”通常指由异常细胞生长形成的赘生物或实体病变。在本申请中，肿瘤可以是实体瘤或非实体瘤。例如，在本申请中，肿瘤可以是 CLDN18.2 阳性的肿瘤。例如，在本申请中，肿瘤可以是 CLDN18.2 异常表达相关的疾病和/或病症。

术语“癌症”通常指以异常细胞快速且失控生长为特征的疾病。癌细胞可以局部地或通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部分。本申请中的癌症包括但不限于胃癌、结肠癌等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用，例如，两种术语涵盖实体瘤和液体肿瘤，例如，弥散型或循环型肿瘤。如本文所用，术语“癌症”或“肿瘤”可以包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤。

在本申请中，涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列，还应理解为至少包含以下的范围：与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

在本申请中，所述变体可以为，例如在所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CLDN18.2 和/或 4-1BB 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个

或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如，所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个，例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变（例如取代、缺失或添加）之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如，所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%，70%，80%，90%，或 100% 的生物学活性（例如抗原结合能力）。例如，所述取代可以为保守取代。

在本申请中，所述同源物可以为与所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CLDN18.2 和/或 4-1BB 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”：将两条待比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基（例如，A、T、C、G、I）或相同氨基酸残基（例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met）的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数（即，窗大小），并且将结果乘以 100，以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定：FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”，美国国家科学院院刊（*Proc. Natl. Acad. Sci.*），85: 2444-2448, 1988；和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”，*Science*，227: 1435-1441, 1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比（alignment）搜索工具”，*分子生物学杂志*，215: 403-410, 1990。

在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

发明详述

抗体的 CDR 又称互补决定区,是可变区的一部分。该区域的氨基酸残基可以与抗原或抗原表位接触。抗体 CDR 可以通过多种编码系统来确定,如 CCG、Kabat、Chothia、IMGT、综合考虑 Kabat/Chothia 等。这些编码系统为本领域内已知,具体可参见 <http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#kabatnum>。本领域技术人员可以根据抗体的序列和结构,用不同的编码系统确定出 CDR 区。使用不同的编码系统,CDR 区可能存在差别。在本申请中,所述 CDR 涵盖根据任何 CDR 划分方式划分得到的 CDR 序列;也涵盖其变体,所述变体包括所述 CDR 的氨基酸序列经过取代、缺失和/或添加一个或多个氨基酸。例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个,又例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个或 9 个氨基酸取代、缺失和/或插入;也涵盖其同源物,所述同源物可以为与所述 CDR 的氨基酸序列具有至少约 85% (例如,具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的) 序列同源性的氨基酸序列。

在本申请中,例如,所述 CDR 可以根据 Kabat 方式进行划分。

第一抗原结合域

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含第一抗原结合域,所述第一抗原结合域能够特异性结合 CLDN18.2 或其功能活性片段。

在本申请中,所述第一抗原结合域可以包括抗体或其抗原结合片段或其变体。

本申请中,所述抗体可选自以下组:单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

在本申请中,所述的抗原结合片段可选自以下组: Fab, Fab', Fv 片段, F(ab)'₂, scFv, di-scFv 和/或 dAb。

在本申请中,所述第一抗原结合域可以包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR,所述 VH 包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列。

在本申请中,在所述分离的抗原结合蛋白中,所述第一抗原结合域可包括 HCDR3,且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列。

在本申请中,在所述分离的抗原结合蛋白中,所述第一抗原结合域可包括 HCDR3,且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 57 和 SEQ ID NO: 71 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中,在所述分离的抗原结合蛋白中,所述第一抗原结合域可包含 HCDR2,且所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含 HCDR2，且所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 56 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 99 (X₁YX₂X₃X₄，其中，X₁ 为 N 或 R，X₂ 为 G、I 或 V，X₃ 为 I 或 M，X₄ 为 H、N 或 S) 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 55 和 SEQ ID NO: 69 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 99 (X₁YX₂X₃X₄，其中，X₁ 为 N 或 R，X₂ 为 G、I 或 V，X₃ 为 I 或 M，X₄ 为 H、N 或 S) 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 可包含选自下述任一组氨基酸序列：

- (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；
- (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列；以及
- (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 58 和 SEQ ID NO: 75 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 59 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 H-FR3, 所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间, 且所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 60 和 SEQ ID NO: 72 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 H-FR4, 所述 H-FR4 的 N 端与所述 HCDR3 的 C 端直接或间接相连, 且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 61 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含重链可变区 VH, 所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含重链可变区 VH, 所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 73 和 SEQ ID NO: 76 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 79 和 SEQ ID NO: 86 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 48 和 SEQ ID NO: 77 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3, 所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 LCDR1, LCDR2

和 LCDR3, 所述 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 包含选自下述任一组氨基酸序列:

- (1) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;
- (2) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;
- (3) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列;
- (4) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列; 以及
- (5) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列, 且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 L-FR1, 所述 L-FR1 的 C 端与所述 LCDR1 的 N 端直接或间接相连, 且所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 80 和 SEQ ID NO: 87 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 L-FR2, 所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 和所述 LCDR2 之间, 且所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 L-FR3, 所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 和所述 LCDR3 之间, 且所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 81 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 L-FR4, 所述 L-FR4 的 N 端与所述 LCDR3 的 C 端直接或间接相连, 且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 82 和 SEQ ID NO: 88 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含轻链可变区 VL,

所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 104 所示的氨基酸序列。

在本申请中,在所述分离的抗原结合蛋白中,所述第一抗原结合域可包含轻链可变区 VL,所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 83 和 SEQ ID NO: 89 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中,在所述分离的抗原结合蛋白中,所述第一抗原结合域可包含 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 和 LCDR3,所述 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 可包含选自下述任一组氨基酸序列:

- (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列,且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;
- (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列,且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;
- (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列,且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列;
- (4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列,且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;
- (5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列,且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列; 以及

(6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 VH 和 VL, 所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列, 且所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 104 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含 VH 和 VL, 所述 VH 和 VL 可选自下述任一组氨基酸序列:

- (1) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列;
- (2) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列;
- (3) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 66 所示的氨基酸序列;
- (4) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列;
- (5) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 76 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 83 所示的氨基酸序列; 以及
- (6) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 76 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 89 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第一抗原结合域可包含重链恒定区。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述重链恒定区可包含源自 IgG 的重链恒定区。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述重链恒定区可包含源自人 IgG 的重链恒定区。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述重链恒定区可包含源自人 IgG1 的重链恒定区。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述重链恒定区可包含 Fc 片段。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 Fc 片段可包含一个或多个突变。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述 Fc 片段可包含 N180A、D239E 和 L241M 中的一个或多个突变。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述重链恒定区可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第一抗原结合域可包含轻链恒定区。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述轻链恒定区可包含人 Ig κ 恒定区。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述轻链恒定区可包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合域可包含能够结合 CLDN18.2 的单克隆抗体。

第二抗原结合域

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含第二抗原结合域，所述第二抗原结合域能够特异性结合 4-1BB 蛋白或其功能活性片段。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白的第二抗原结合域可以包含 scFv。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域可包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 105 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 HCDR3，且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 HCDR2，且所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域可包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域可包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 91 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域可包含 H-FR2，所述

H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间, 且所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 H-FR3, 所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间, 且所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 H-FR4, 所述 H-FR4 的 N 端与所述 HCDR3 的 C 端直接或间接相连, 且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含重链可变区 VH, 且所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3, 所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 L-FR1, 且所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 L-FR2, 且所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 L-FR3, 且所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含 L-FR4, 且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 所述第二抗原结合域可包含轻链可变区 VL, 且所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 在所述分离的抗原结合蛋白中, 其中所述第二抗原结合域可包含 VH 和 VL,

所述 VH 和 VL 可选自下述任一组的氨基酸序列：

- (1) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列；以及
- (2) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域的 VH 和 VL 可直接或间接相连。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域的 VH 和 VL 可通过连接子相连。在本申请中，所述连接子可包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合片段可包含 scFv。

在本申请中，所述 scFv 可包含 SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 96 所示的氨基酸序列。

在本申请中，在所述分离的抗原结合蛋白中，所述第二抗原结合域可包含抗体或其抗原结合片段。

在本申请中，所述框架区可以选自以下组：人共有框架序列和人种系序列。

在本申请中，所述第二抗原结合域可以包括抗体或其抗原结合片段或其变体。

本申请中，所述抗体可选自以下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

在本申请中，所述的抗原结合片段可选自以下组：Fab，Fab'，Fv 片段，F(ab)'₂，scFv，di-scFv 和/或 dAb。

例如，所述分离的抗原结合蛋白的第二抗原结合域可以为 scFv。

分离的抗原结合蛋白

本申请提供了一种抗原结合蛋白，其包括第一抗原结合域和第二抗原结合域。例如，所述第一抗原结合域可以特异性结合 CLDN18.2 蛋白。例如，所述第二抗原结合域可以特异性结合 4-1BB 蛋白。

例如，所述第一抗原结合域可以为单克隆抗体。例如，所述第二抗原结合域可以为 scFv。

在本申请中，所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域可以直接或间接相连。

在本申请中，所述第一抗原结合域可以和所述第二抗原结合域可以通过连接子相连。例如，所述连接子可以为肽接头。例如，所述连接子可以包括 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合域的 scFv 可以与第一抗原结合域的 Fc 片段的 C 端通过

连接子相连。例如，所述第二抗原结合域的 VH 可以与第一抗原结合域的 Fc 片段的 C 端通过连接子相连。例如，所述第二抗原结合域的 VL 可以与第一抗原结合域的 Fc 片段的 C 端通过连接子相连。

另一方面，本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其可以包含两个第一多肽和两个第二多肽。例如，所述第一多肽可以包含能够特异性结合 CLDN18.2 蛋白的抗原结合蛋白的重链和能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv。例如，所述第二多肽可以包含能够特异性结合 CLDN18.2 蛋白的抗原结合蛋白的轻链。

例如，所述第一多肽从 N 端到 C 端依次包含 VH，CH1，CH2，CH3 和能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv，所述第二多肽包含 VL 和轻链可变区 CL；其中所述 VH 与所述 VL 配对且能够特异性结合 CLDN18.2。例如，所述 VH 可以包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。例如，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。例如，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列。例如，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3。例如，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。例如，所述 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。例如，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。例如，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列。例如，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列。

例如，所述 CH2 和所述 CH3 可构成 Fc 片段。例如，所述 Fc 片段可包含选自下组的一个或多个氨基酸突变：N180A，D239E 和 L241M。

例如，所述能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv 可包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。例

如，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

例如，所述能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv 可包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3。例如，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

例如，所述能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv 可包含 VH。例如，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列。例如，所述能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv 可包含 VL。例如，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

例如，所述能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv 可包含 VH 和 VL。例如，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。例如，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

例如，所述分离的抗原结合蛋白的第一多肽可包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白的第二多肽可包含 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 85 和 SEQ ID NO: 90 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白的两条第一多肽可包含相同的氨基酸序列。在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白的两条第二多肽可包含相同的氨基酸序列。

多肽分子、核酸分子、载体、细胞和药物组合物

另一方面，本申请提供了多肽分子，其可以包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请提供了一种或多种核酸分子，其可以编码本申请所述的分离的抗原结合蛋白。例如，其可以是通过以下方法产生或合成的：(i) 在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增产生的，(ii) 通过克隆重组产生的，(iii) 纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者 (iv) 合成的，例如通过化学合成。

另一方面，本申请提供了一种载体，其可以包含本申请所述的核酸分子。此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或 mRNA 翻译的其他控制元件等。所述载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如，所述载体为表达载体。此

外，所述载体还可以包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

另一方面，本申请提供了一种细胞，其可以包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含多个（例如，2个或以上）或多种（例如，2种或以上）本申请所述的核酸分子或载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如真核细胞，如来自植物的细胞、真菌或酵母细胞等。在某些实施方式中，所述细胞可以是细菌细胞（例如，大肠杆菌）、酵母细胞或其它真核细胞。可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其可以包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白、本申请所述的多肽分子、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载剂。

在某些实施方案中，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)佐剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下优选地对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在某些实施方案中，所述药物组合物还可含有多于一种活性化合物，通常为不会不利地影响彼此的具有互补活性的那些活性化合物。此类药物的类型和有效量可以取决于例如制剂中存在的拮抗剂的量和类型，以及受试者的临床参数。

在某些实施方案中，所述药学上可接受的载剂可以包括与药物给药相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂，通常安全、无毒。

在某些实施方案中，所述药物组合物可以包含肠胃外、经皮、腔内、动脉内、鞘内和/或鼻内施用或直接注射到组织中。例如，所述药物组合物可以通过输注或注射施用于患者或者受试者。在某些实施方案中，所述药物组合物的施用可以通过不同的方式进行，例如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。在某些实施方案中，所述药物组合物可以不间断施用。所述不间断（或连续）施用可以通过患者佩戴的小泵系统来实现，以测量流入患者体内的治疗剂，如 WO2015/036583 所述。

制备方法

另一方面，本申请提供了制备所述的抗原结合蛋白的方法。所述方法可包括，在使得所述的抗原结合蛋白表达的条件下，培养所述本申请所述的宿主细胞。例如，可通过使用适当

的培养基、适当的温度和培养时间等，这些方法是本领域普通技术人员所了解的。

方法和用途

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述的多肽分子、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了预防、缓解或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法可以包括向有需要的受试者施用本申请所述分离的抗原结合蛋白、所述的多肽分子、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物。在本申请中，所述施用可以通过不同的方式进行，例如静脉内、瘤内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。

另一方面，本申请所述分离的抗原结合蛋白、所述的多肽分子、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物，其可以用于预防、缓解或治疗疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症可以包括 CLDN18.2 表达异常相关的疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症可以包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤可以包括实体瘤和/或非实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤可以包括 CLDN18.2 阳性的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤可以包括胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胃食管交界处癌和/或结肠癌。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CLDN18.2 的方法。所述方法包括施用本申请所述的分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞和/或所述药物组合物。所述方法可以是离体和/或体外方法。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CLDN18.2 的试剂或试剂盒，其可以包含所述的分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞和/或所述药物组合物。

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞和/或所述药物组合物在制备所述检测 CLDN18.2 的试剂或试剂盒中的用途。

在本申请中，所述试剂或试剂盒可以用于检测样品中 CLDN18.2 的存在和/或含量。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请发明的各个技术方案，而不用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 抗 CLDN18.2/4-1BB 双特异性抗体的生成

采用公司自主研发的人源化 Claudin18.2 单抗 5E6 (VH 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示, VL 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示) 和全人源 4-1BB 单抗 YN006 (VH 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示, VL 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示), 组合构建形成抗 CLDN18.2/4-1BB 双特异性抗体。该双抗采用经过了氨基酸突变的人 IgG1-Fc 骨架, 将完整 IgG 形式的抗 CLDN18.2 部分连接于 Fc 段的 N 端, 单链 scFv 形式的抗 4-1BB 部分连接于 Fc 段的 C 端; 其中人 IgG1-Fc 骨架区的氨基酸突变使该双抗的 ADCC 等效功能得以沉默, 该氨基酸突变具体为: N180A/D239E/L241M, 分子结构如图 1A。该双抗在 293F 瞬时表达体系中, 经 Protein A 一步法亲和层析纯化后, 抗体表达量可达到 130mg/L 左右, SEC-HPLC 纯度为 96%, 该双抗命名为 OriAb-362。(如图 1B)

实施例 2 OriAb-362 双抗的抗原结合活性的鉴定

采用流式的方法验证 OriAb-362 双抗的抗原结合活性, 具体方法如下: 96 孔 V 底板中均匀铺上过表达人 4-1BB 的靶细胞 (41BB-NFkB-293T) 或过表达人 CLDN18.2 的靶细胞 (hCLDN18.2-CHO); 加入梯度稀释的一抗 (即 OriAb-362 双抗和 4-1BB 亲本单抗 YN006; OriAb-362 双抗和 CLDN18.2 亲本单抗 5E6), 一抗的起始工作浓度为 100nM, 3 倍比梯度稀释, 共形成 11 个浓度梯度; 4°C 孵育 1h 后离心洗板, 然后再加入对应的二抗 (Goat pAb to human IgG-Dylight 650, abcam, Cat#ab98593), 4°C 孵育 30min 后离心洗板, 之后使用 iQue Screener 流式仪 (购自 IntelliCyt 公司) 上机检测荧光信号。结果如图 2A, OriAb-362 双抗与 4-1BB 细胞抗原的结合活性较亲本单抗 YN006 略有下将, EC50 值约为 2 倍左右; 结果如图 2B, OriAb-362 双抗与 CLDN18.2 细胞抗原的结合活性较亲本单抗 5E6 相比基本相同, 保留了 CLDN18.2 亲本单抗的抗原结合活性。

实施例 3 OriAb-362 双抗两头同时结合活性的流式鉴定

采用流式的方法验证 OriAb-362 双抗的两头同时结合活性, 方法如下: 选择过表达人 CLDN18.2 的细胞 CHO-hCLDN18.2 铺板, 随后加入梯度稀释的 OriAb-362 双抗, 抗体从 25nM 的工作浓度起始进行两倍比梯度稀释, 共形成 9 个浓度梯度, 同时设置单抗 5E6 做为阴性对照, 抗体浓度同 Ori-Ab362 双抗; 再加入等体积的固定浓度 (1.5ug/ml 的工作浓度) 的生物素化的 4-1BB 蛋白 (h4-1BB-Biotin), 4°C 共孵育 1h 后离心洗板, 加入二抗 (BD phamingen APC

Streptavidin, Cat#554067), 4°C 孵育 30min 后离心洗板, 之后使用 iQue Screener 流式仪 (购自 IntelliCyt 公司) 上机检测荧光信号。结果如图 3, OriAb-362 双抗可以同时与 CHO-CLDN18.2 细胞、生物素化的 4-1BB 蛋白结合, 即 OriAb-362 双抗具有两头同时结合活性。

实施例 4 OriAb-362 双抗的种属交叉结合活性鉴定

利用本公司的慢病毒包装、感染和稳定细胞株构建体系, 筛选获得了过表达鼠 CLDN18.2 的细胞 293T-mouseCLDN18.2 和过表达食蟹猴 CLDN18.2 的细胞 293T-macacaCLDN18.2 细胞, 并利用流式的方法验证了 OriAb-362 双抗与鼠/食蟹猴 CLDN18.2 的结合活性: 一抗为梯度稀释的 OriAb-362 双抗和 CLDN18.2 亲本单抗 5E6, 抗体从 33.3nM 的工作浓度起始, 3 倍比梯度稀释, 共形成 10 个浓度梯度; 二抗为 Goat pAb to human IgG (Dylight 650) (abcam, Cat#ab98593), 4°C 孵育 30min 后离心, 离心后用 30ul/孔的流式缓冲液重悬, 最后使用 iQue Screener 流式仪 (购自 IntelliCyt 公司) 上机检测荧光信号。结果如图 4A, 与 293T-mouseCLDN18.2 细胞的结合活性上, OriAb-362 双抗与亲本单抗 5E6 基本无异, 表现为 EC50 值基本相同; 结果如图 4B, 与 293T-macacaCLDN18.2 细胞的结合活性上, OriAb-362 双抗稍弱于亲本单抗 5E6, 表现为 EC50 值为 1.5 倍关系。所以, OriAb-362 双抗基本保留了亲本单抗 5E6 与鼠/食蟹猴 CLDN18.2 抗原的结合活性, 可以同时与人、鼠、食蟹猴 CLDN18.2 结合, 具有种属交叉结合活性。

实施例 5 OriAb-362 双抗的流式竞争结合活性分析

首先, 用生物素 (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Thermo, A39257) 标记 OriAb-362 双抗、人 CLDN18.2 单抗 5E6 及人 CLDN18.2 阳性对照单抗 IMAB362 (见专利 CN103509114A 提供的 175D10 克隆), 各标记 500ug, 生物素化的抗体分子使用分子相互作用分析仪 OctetRED384 (sartorius) 来测定标记效果, 选择 SA 传感器固化抗体, 抗体浓度为 100nM, 标记 180s, 标记完成的生物素化抗体命名为 Biotin-OriAb362、Biotin-5E6、Biotin-IMAB362。

通过流式细胞荧光分选技术 (FACS), 使用 iQue Screener 流式仪 (购自 IntelliCyt 公司), 用含有 0.1% BSA 的 PBS 作为缓冲液检测上述抗体与 CHO-humanCLDN18.2 细胞的竞争结合活性, 具体过程如下: 1) 配置受试抗体 (Biotin-OriAb362、Biotin-5E6、Biotin-IMAB362), 使抗体浓度为 1.5 μ g/ml, 30ul/孔, 即工作浓度为 0.5 μ g/ml; 配置竞争抗体 (OriAb-362、5E6、IMAB362), 抗体稀释浓度从 6666nM 起始, 按 4 倍比梯度稀释抗体, 形成 9 个浓度梯度, 设 PBS 为阴性对照孔, 30ul/孔, 即抗体工作浓度为 2222 nM 浓度起始; 将这两种抗体预先混合

后铺在 96 孔板中；2)使用缓冲液配置浓度为 1×10^6 cells/ml 的 CHO-humanCLDN18.2 细胞，加入上述 96 孔尖底板 (corning 3894)，每孔 30 μ l；3) 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 1 小时后离心重悬，加入荧光二抗 (BD phamingen APC Streptavidin, Cat#554067)，4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 30 分钟；4) 最后每孔加 25 μ l 缓冲液混匀后用流式仪器检测。流式竞争结合活性检测的分析结果如图 5 所示，OriAb-362 双抗和 5E6 单抗存在互相完全竞争的关系，而阳性对照单抗 IMAB362 始终无法完全竞争 OriAb-362 双抗或 5E6 单抗，存在不完全竞争关系。说明 OriAb362 双抗、5E6 单抗与 IMAB362 单抗可能具有不同的抗原结合表位，在抗原结合活性上 OriAb-362 双抗比 IMAB362 更具竞争能力，且 OriAb-362 双抗完全保留了亲本单抗 5E6 的抗原结合表位，具有同等竞争结合活性。

实施例 6 OriAb-362 双抗以 CLDN18.2 依赖性激活 4-1BB 信号通路

为了验证 OriAb-362 双抗激活 4-1BB 信号通路的激动剂活性，本实施例采用荧光素酶的实验方法进行了检测：1) 效应细胞 41BB-NF κ B-293T 为稳定整合了 NF κ B 荧光素酶报告因子且过表达了人 4-1BB 的 293T 细胞，胰酶消化细胞并用 DMEM+10%FBS 培养基重悬，使细胞密度为 5×10^5 /孔，50 μ l/孔均匀铺在白底不透光的无菌 96 孔板中 (Nunclon Delta Surface CAT:136101)；2) CHO-hCLDN18.2 为慢病毒转染的高表达人 CLDN18.2 的细胞，NUGC-4 为天然低表达人 CLDN18.2 的人胃癌细胞，本实施例分别选择 CHO-hCLDN18.2 和 NUGC-4 作为不同 CLDN18.2 表达水平的靶细胞，胰酶分别消化 CHO-hCLDN18.2 和 NUGC-4 细胞并用 DMEM+10%FBS 培养基重悬，使细胞密度为 5×10^5 /孔，50 μ l/孔均匀铺在上述 96 板中；3) 加入梯度稀释的抗体 (YN006, 5E6, OriAb-362, YN006+5E6, hIgG-Fc)，抗体起始工作浓度为 50nM，5 倍比梯度稀释，共 6 个梯度，50 μ l/孔铺在上述 96 孔板中，同时设置不含抗体的对照孔，每个处理设置两个复孔；4) 96 孔板放入 37 度细胞培养箱中孵育 24h；5) 利用荧光素酶检测试剂盒 (promega, E6120)，加入荧光素酶底物获得发光，用 Tecan 酶标仪测定荧光素酶含量；6) 数据处理：Fold stimulation=RLU 抗体处理组/RLU 不加抗体组。结果如图 6，OriAb-362 双抗能够刺激靶细胞对 4-1BB 荧光素酶信号的激活，此激活依赖于 CLDN18.2 的表达，其激活强度与靶细胞 human CLDN18.2 表达丰度正相关 (图 6A，高表达人 CLDN18.2 的靶细胞，激活倍数约为 5 倍；图 6B，低表达人 CLDN18.2 的靶细胞，激活倍数约为 2 倍)，且呈现抗体浓度依赖性，而亲本单抗及其联合应用均不能激活 4-1BB 荧光素酶信号。

实施例 7 OriAb-362 双抗可以刺激 T 细胞活化，促进 IL-2 因子的分泌

SEA 等超级抗原能够交联 TCR 和 MHCII 类分子激活 CD4 $^{+}$ T 细胞。本实施例采用 SEA 超抗原持续刺激人 PBMC，利用因子释放实验验证 OriAb-362 双抗促进人 PBMC 免疫应答

的活性，具体如下：37 度水浴复苏冻存的 PBMC，离心润洗两次后，用“X-VIVO+5%FBS+5ug/ml SEA”的培养基重悬，细胞密度为 1.25×10^6 /孔，100ul 细胞悬液/孔，均匀铺在 V 底的无菌 96 孔板中；阳性靶细胞为高表达人 CLDN18.2 的 CHO-hCLDN18.2 细胞和天然低表达人 CLDN18.2 的人胃癌细胞 NUGC-4，阴性靶细胞为 CHO、CHO-hCLDN18.1 细胞，细胞按照 5×10^5 /孔的细胞密度进行重悬（X-VIVO+5%FBS），50ul/孔铺在上述 96 孔板中，即效靶比 PBMC:靶细胞=5: 1；抗体（YN006, 5E6, OriAb-362, YN006+5E6, hIgG-Fc）用 X-VIVO+5%FBS 培养基进行稀释，50ul/孔铺在上述 96 孔板中，使抗体工作浓度为 100nM、10nM 和 1nM；将抗体、PBMC 和靶细胞在 37°C 细胞培养箱中共孵育 72h，离心后保留细胞培养上清，采用 ELISA 法检测 IL-2 水平(R&D, DY202)。

固相结合高密度抗 CD3 抗体可引起 TCR-CD3 复合物交联，直接产生活化信号，刺激 T 细胞活化。本实施例采用固相结合的抗人 CD3 抗体持续刺激人 PBMC，利用因子释放实验验证 OriAb-362 双抗促进人 PBMC 免疫应答的活性，具体如下：用可吸附蛋白的无菌 96 孔板包被抗人 CD3 抗体，无菌 PBS 稀释成 $1 \mu\text{g/mL}$ 的浓度，每孔 100mL，4°C 包被过夜；洗涤 CD3 蛋白：第二天用吸引器吸去 96 孔板中的 PBS，用 X-VIVO+5%FBS 的培养基洗涤板子三次；然后依次加入 PBMC、靶细胞和抗体，抗体浓度及细胞量同上，重悬缓冲液为 X-VIVO+5%FBS；37°C 细胞培养箱孵育 72h，后用 IL-2 试剂盒检测因子分泌量。

结果如图 7，在 SEA 超抗原（图 7A）或固化抗 CD3 抗体（图 7B）持续刺激人 PBMC 的情况下，当 CHO-hCLDN18.2 或 NUGC-4 细胞存在时，OriAb-362 能有效增强 T 细胞功能，导致 IL-2 因子的释放，而阴性细胞 CHO/CHO-hCLDN18.1 的存在不会导致 IL-2 的释放水平提高，说明这种激活信号是依赖 CLDN18.2 的；同时只有 Ori-Ab362 双抗可以有效增强 T 细胞功能，导致 IL-2 的释放，对应的亲本单抗及药物组合方式均无法诱导 IL-2 的分泌。

实施例 8 OriAb-362 双抗在小鼠结肠癌肿瘤模型中的抑瘤活性

为了研究 OriAb-362 双抗在小鼠体内的抗肿瘤作用，本实施例选择了人 4-1BB 转基因 C57BL/6 小鼠（百奥赛图，110004，B-h4-1BB mice），通过皮下接瘤过表达人 CLDN18.2 的小鼠结肠癌细胞，即 MC38-hCLDN18.2 细胞（ 1.5×10^6 /只），待小鼠肿瘤平均体积为 80mm^3 时进行分组，分组情况见下表 1，分组当天开始腹腔给药（BIW*3；每周给药两次，给药三周）并记为 D1，每周测量三次小鼠体重和肿瘤体积，当小鼠肿瘤体积大于 3000mm^3 安乐死小鼠。小鼠体重和肿瘤体积持续观察至 D30，在整个观察期间小鼠体重正常，见图 8A；小鼠抑瘤情况见图 8B，相对于 Group1: PBS 组和 Group2: hIgG-Fc 组，Group3/Group4/Group5/Group6 组均存在显著的抑瘤活性（ $p < 0.0001$ ），其中 Group3: 5E6

单抗组中没有小鼠完全消瘤 (0/6)，肿瘤体积抑制率 TGI_{TV}(%)为 39.22%、Group4: YN006 单抗组有 4 只小鼠完全消瘤 (4/6)，TGI_{TV}(%)为 102.62%、Group5: OriAb-362 双抗组有 6 只小鼠完全消瘤 (6/6)，TGI_{TV}(%)为 102.81%、Group6: 5E6+YN006 联合给药组有 5 只小鼠完全消瘤 (5/6)，TGI_{TV}(%)为 98.62%，具体数据见表 2。即 OriAb-362 双抗组在小鼠体内具有极显著的抑瘤活性，且优于 5E6 亲本单抗、YN006 亲本单抗以及联合给药处理。

表 1 小鼠分组情况

组别	抗体	剂量 (mg/kg)	小鼠数量	给药途径&周期
Group1	PBS	/	6	IP, Biw*3 weeks
Group2	hIgG-Fc	10	6	IP, Biw*3 weeks
Group3	5E6	10	6	IP, Biw*3 weeks
Group4	YN006	10	6	IP, Biw*3 weeks
Group5	OriAb-362	13.3	6	IP, Biw*3 weeks
Group6	5E6+YN006	10+10	6	IP, Biw*3 weeks

表 2 抑瘤结果统计

组别	1st 给药后 30 天小鼠消瘤情况	1st 给药后 30 天的 TGI _{TV} (%)值
G1,PBS,10ml/kg	0/6	/
G2,hIgG-Fc,10mg/kg	0/6	13.89%
G3,5E6,10mg/kg	0/6	39.22%
G4,YN006,10mg/kg	4/6	102.62%
G5,OriAb362,13.3mg/kg	6/6	102.81%
G6,5E6+YN006,10+10mg/kg	5/6	98.62%

实施例 9 OriAb-362 双抗在低剂量下的抑瘤活性和肿瘤免疫记忆功能

为了进一步研究低给药剂量下 OriAb-362 双抗的抑瘤活性，本实施例降低了 OriAb-362 双抗的给药剂量设计了如下实验方案：小鼠为人 4-1BB 转基因 C57BL/6 小鼠（百奥赛图，110004，B-h4-1BB mice），皮下接瘤过表达人 CLDN18.2 的小鼠结肠癌细胞，即 MC38-hCLDN18.2 细胞 (1.5×10^6 /只)，待小鼠肿瘤平均体积为 80mm^3 时进行分组，分组情况见表 3，分组当天开始腹腔给药 (BIW*3；每周给药两次，给药三周)并记为 D1，每周测量三次小鼠体重和肿瘤体积，当小鼠肿瘤体积大于 3000mm^3 安乐死小鼠。对小鼠 1st 给药后 Day31 的抑瘤

数据进行分析, 每组小鼠的消瘤情况见表 4: G2: OriAb-362, 13.3mg/kg 高剂量组和 G3: OriAb-362, 3.325mg/kg 低剂量组小鼠均全部消瘤 (6/6), G4: 5E6+YN006 联合给药组有 3 只小鼠消瘤 (3/6), 相对于 G1: hIgG-Fc 对照组均存在显著的抑瘤活性 ($p < 0.01$), 如图 9 所示。已经消瘤的小鼠持续观察至 Day40, 然后对每只小鼠进行皮下对侧接瘤, 接瘤所用的肿瘤细胞及接瘤剂量同上 (MC38-hCLDN18.2 细胞, 1.5×10^6 /只), 同时选取 6 只空白未做过任何实验的同品系小鼠做为 Naive 对照组同时进行皮下接瘤处理, 接瘤后观察 20 天, 每周三次测量小鼠肿瘤体积, 对侧接瘤后小鼠肿瘤生长情况见图 9, 只有 Naive 对照组的 6 只小鼠全部生成肿瘤, G2/G3/G4 三组中之前完全消瘤的小鼠在经过对侧皮下接瘤后依然保持消瘤状态。综上, OriAb-362 双抗即使在 3.325 mg/kg 的低剂量下同样可以诱导所有入组小鼠完全消瘤(6/6), 且对已消瘤的小鼠进行对侧再次接瘤, 小鼠依然保持消瘤状态, 无新肿瘤形成, 体现出良好的肿瘤免疫记忆功能, 具有长期的保护性免疫记忆。

表 3 小鼠分组情况

组别	抗体	剂量 (mg/kg)	小鼠数量	给药途径&周期
1	hIgG-Fc	10	6	IP, Biw*3 weeks
2	Ori-Ab362	13.3	6	IP, Biw*3 weeks
3	Ori-Ab362	3.325	6	IP, Biw*3 weeks
4	5E6+YN006	10+3	6	IP, Biw*3 weeks

表 4 小鼠消瘤情况统计

组别	1st 给药后 31 天小鼠消瘤情况
G1: hIgG-Fc, 10mg/kg	0/6
G2: OriAb-362, 13.3mg/kg	6/6
G3: OriAb-362, 3.325mg/kg	6/6
G4: 5E6+YN006, 10+3mg/kg	3/6

实施例 10 CLDN18.2 抗原结合蛋白与 CLDN18.2 特异性结合活性测定

通过流式细胞荧光分选技术 (FACS), 使用 iQue Screener 流式仪 (购自 IntelliCyt 公司), 用含有 0.1% BSA 的 PBS 作为缓冲液检测上述嵌合抗体与靶细胞的特异性结合活性, 选择三种靶细胞: 表达人 CLDN18.2 的稳转细胞株、表达人 CLDN18.1 的稳转细胞株以及肿瘤细胞系, 分别进行结合活性的测定。

1. 本申请的 CLDN18.2 抗原结合蛋白与高表达人 CLDN18.2 细胞的流式结合活性检测构建获得稳定高表达 CLDN18 的细胞株分别标记为 293T-人 CLDN18.2、CHO-人 CLDN18.2 和 SP2/0-人 CLDN18.2 细胞, 细胞消化计数, 使用流式缓冲液重悬细胞并调整至

$1 \times 10^6/\text{ml}$, 30ul/孔加入 V 底 96 孔板; 30ul/孔加入一抗, 抗体以 30ug/ml 浓度起始, 用流式缓冲液按两或三倍比梯度稀释, 形成 7 个梯度, 每种抗体设 PBS 阴性对照, 阳性对照抗体为实施例 1 中纯化获得的 zolbetuximab; 4°C 孵育 1 小时, 流式缓冲液清洗一遍, 加入二抗 (abcam, Cat#ab98593), 30ul/孔, 4°C 孵育 30 分钟; 流式缓冲液清洗两遍, 细胞震松散, 加入 25ul/孔流式缓冲液, 等待上机。将原始数据代入 GraphPad8.0 软件作图并计算, 结果如图 10。

2. 本申请的 CLDN18.2 抗原结合蛋白与高表达人 CLDN18.1 细胞的流式结合活性检测
阳性对照抗体为市售抗 CLDN18 抗体 (Anti-Claudin 18 antibody) (abcam, Cat#ab203563), 其抗原结合位点位于 CLDN18.2 四次跨膜蛋白的胞内部分, 需要进行流式胞内染色分析。具体地, 细胞为构建的 293T-人 CLDN18.1 和 SP2/0-人 CLDN18.1 细胞, 细胞消化计数后进行固定破膜处理, 处理后的细胞用流式缓冲液重悬至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 30ul/孔加入 V 底 96 孔板; 30ul/孔加入一抗, 抗体以 30ug/ml 浓度起始, 用流式缓冲液按三倍比梯度稀释, 形成 7 个梯度, 每种抗体设 PBS 阴性对照, 阳性对照抗体稀释条件同上; 4°C 孵育 1 小时, 流式缓冲液清洗一遍, 加入二抗 (abcam, Cat#ab98593 和 Cat#ab150079), 30ul/孔, 4°C 孵育 30 分钟; 流式缓冲液清洗两遍, 细胞震松散, 加入 25ul/孔流式缓冲液, 等待上机。将原始数据代入 GraphPad8.0 软件作图并计算, 结果如图 11。

3. 本申请的 CLDN18.2 抗原结合蛋白与肿瘤细胞系的流式结合活性检测

选择构建获得的稳定高表达人 CLDN18.2 的肿瘤细胞 MC38-人 CLDN18.2 为靶细胞, 细胞消化计数, 使用流式缓冲液重悬细胞并调整至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 30ul/孔加入 V 底 96 孔板; 30ul/孔加入一抗, 抗体以 30ug/ml 浓度起始, 用流式缓冲液按三倍比梯度稀释, 形成 7 个梯度, 每种抗体设 PBS 阴性对照, 阳性对照抗体为纯化获得的 zolbetuximab, 稀释条件同上; 4°C 孵育 1 小时, 流式缓冲液清洗一遍, 加入二抗 (abcam, Cat#ab98593), 30ul/孔, 4°C 孵育 30 分钟; 流式缓冲液清洗两遍, 细胞震松散, 加入 25ul/孔流式缓冲液, 等待上机。将原始数据代入 GraphPad8.0 软件作图并计算, 结果如图 12。

通过以上操作步骤, 表达纯化获得 5 个 CLDN18.2 抗原结合蛋白 (其中, 5E6 的 VH 序列如 SEQ ID NO: 8 所示, VL 序列如 SEQ ID NO: 16 所示; 7E3 的 VH 序列如 SEQ ID NO: 73 所示, VL 序列如 SEQ ID NO: 52 所示; 3A6 的 VH 序列如 SEQ ID NO: 62 所示, VL 序列如 SEQ ID NO: 66 所示; 14E12 的 VH 序列如 SEQ ID NO: 76 所示, VL 序列如 SEQ ID NO: 83 所示, 17B10 的 VH 序列如 SEQ ID NO: 76 所示, VL 序列如 SEQ ID NO: 89 所示), 流式验证其抗原结合活性: 如图 10 所示, 5 个抗原结合蛋白均呈现和人 CLDN18.2 浓度依赖性结合活性, 且大部分强于 zolbetuximab 阳性抗体, 3 种细胞的检测结果保持一致; 如图 11 所示,

5 个抗原结合蛋白均能特异性与人 CLDN18.2 结合而不与人 CLDN18.1 结合；如图 12 所示，5 个抗原结合蛋白均与稳定高表达人 CLDN18.2 的小鼠结肠癌 MC38 细胞强结合，结合活性强度呈浓度依赖性，效果与 zolbetuximab 阳性抗体相当或强于 zolbetuximab（重链序列如 SEQ ID NO: 106 所示，轻链序列如 SEQ ID NO: 107 所示）。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方式的范围内。

权利要求书

1. 分离的抗原结合蛋白，其包括：第一抗原结合域和第二抗原结合域，所述第一抗原结合域能够特异性结合紧密连接蛋白 18.2 (CLDN18.2)，且所述第一抗原结合域包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包括 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包括 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 57 和 SEQ ID NO: 71 中任一项所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 56 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 99 (X₁YX₂X₃X₄，其中，X₁ 为 N 或 R，X₂ 为 G、I 或 V，X₃ 为 I 或 M，X₄ 为 H、N 或 S) 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 55 和 SEQ ID NO: 69 中任一项所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 99 (X₁YX₂X₃X₄，其中，X₁ 为 N 或 R，X₂ 为 G、I 或 V，X₃ 为 I 或 M，X₄ 为 H、N 或 S) 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 包含选自下述任一组合的氨基酸序列：
 - (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；
 - (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID

- NO: 56 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列；以及
- (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 6-9 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 58 和 SEQ ID NO: 75 中任一项所示的氨基酸序列。
 11. 根据权利要求 6-10 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 59 中任一项所示的氨基酸序列。
 12. 根据权利要求 4-11 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 60 和 SEQ ID NO: 72 中任一项所示的氨基酸序列。
 13. 根据权利要求 2-12 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 端与所述 HCDR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 61 中任一项所示的氨基酸序列。
 14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含重链可变区 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列。
 15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含重链可变区 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 73 和 SEQ ID NO: 76 中任一项所示的氨基酸序列。
 16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。
 17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 79 和 SEQ ID NO: 86 中任一项所示的氨基酸序列。
 18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列。
20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列。
21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 48 和 SEQ ID NO: 77 中任一项所示的氨基酸序列。
22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 包含选自下述任一组氨基酸序列：
 - (1) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；
 - (2) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；
 - (3) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列；
 - (4) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列；以及
 - (5) 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列。
24. 根据权利要求 20-23 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 L-FR1，所述 L-FR1 的 C 端与所述 LCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 L-FR1 包

- 含 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 80 和 SEQ ID NO: 87 中任一项所示的氨基酸序列。
25. 根据权利要求 20-24 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 L-FR2，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 和所述 LCDR2 之间，且所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。
26. 根据权利要求 18-25 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 L-FR3，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 和所述 LCDR3 之间，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 81 中任一项所示的氨基酸序列。
27. 根据权利要求 16-26 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 端与所述 LCDR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 82 和 SEQ ID NO: 88 中任一项所示的氨基酸序列。
28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 104 所示的氨基酸序列。
29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含轻链可变区 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 83 和 SEQ ID NO: 89 中任一项所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 包含选自下述任一组氨基酸序列：
- (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；
- (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；

- (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列, 所示 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列;
 - (4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列, 所示 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列;
 - (5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列, 所示 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列; 以及
 - (6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列, 所示 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列。
31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述第一抗原结合域包含 VH 和 VL, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列, 且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 104 所示的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述第一抗原结合域包含 VH 和 VL, 所述 VH 和 VL 选自下述任一组氨基酸序列:
- (1) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列;
 - (2) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列;
 - (3) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 66 所示的氨基酸序列;

- (4) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列;
- (5) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 76 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 83 所示的氨基酸序列; 以及
- (6) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 76 所示的氨基酸序列, 且所示 VL 包含 SEQ ID NO: 89 所示的氨基酸序列。
33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述第一抗原结合域包含重链恒定区。
34. 根据权利要求 33 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述重链恒定区包含源自 IgG 的重链恒定区。
35. 根据权利要求 33-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述重链恒定区包含源自人 IgG 的重链恒定区。
36. 根据权利要求 33-35 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述重链恒定区包含源自人 IgG1 的重链恒定区。
37. 根据权利要求 33-36 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述重链恒定区包含 Fc 片段。
38. 根据权利要求 37 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 Fc 片段包含一个或多个突变。
39. 根据权利要求 37-38 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 Fc 片段包含 N180A、D239E 和 L241M 中的一个或多个突变。
40. 根据权利要求 33-39 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。
41. 根据权利要求 1-40 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述第一抗原结合域包含轻链恒定区。
42. 根据权利要求 41 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述轻链恒定区包含人 Ig κ 恒定区。
43. 根据权利要求 41-42 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。
44. 根据权利要求 41-43 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述第一抗原结合域包含抗体或其抗原结合片段。
45. 根据权利要求 44 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述抗体包括单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和/或全人源抗体。

46. 根据权利要求 44 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合片段包括 Fab，Fab'，Fv 片段，F(ab)₂，scFv，di-scFv 和/或 dAb。
47. 根据权利要求 1-46 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域能够特异性结合 4-1BB。
48. 根据权利要求 1-47 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 105 所示的氨基酸序列。
49. 根据权利要求 1-48 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。
50. 根据权利要求 1-49 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。
51. 根据权利要求 1-50 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。
52. 根据权利要求 1-51 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。
53. 根据权利要求 51-52 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 91 所示的氨基酸序列。
54. 根据权利要求 51-53 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。
55. 根据权利要求 50-54 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。
56. 根据权利要求 49-55 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 端与所述 HCDR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。
57. 根据权利要求 1-56 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含重链可变区 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序

列。

58. 根据权利要求 1-57 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。
59. 根据权利要求 1-58 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。
60. 根据权利要求 1-59 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。
61. 根据权利要求 1-60 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。
62. 根据权利要求 1-61 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 L-FR1，且所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。
63. 根据权利要求 1-62 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 L-FR2，且所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。
64. 根据权利要求 1-63 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 L-FR3，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。
65. 根据权利要求 1-64 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 L-FR4，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。
66. 根据权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含轻链可变区 VL，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。
67. 根据权利要求 1-66 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含 VH 和 VL，所述 VH 和 VL 选自下述任一组的氨基酸序列：
 - (1) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列；以及
 - (2) 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。
68. 根据权利要求 1-67 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域的 VH 和 VL 直接或间接相连。
69. 根据权利要求 1-68 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域的 VH 和 VL 通过连接子相连。

70. 根据权利要求 69 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述连接子包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。
71. 根据权利要求 1-70 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域包含抗体或其抗原结合片段。
72. 根据权利要求 71 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合片段包含 scFv。
73. 根据权利要求 72 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 scFv 包含 SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 96 所示的氨基酸序列。
74. 根据权利要求 1-73 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域直接或间接相连。
75. 根据权利要求 1-74 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域通过连接子相连。
76. 根据权利要求 75 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述连接子包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。
77. 根据权利要求 72-76 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二抗原结合域的 scFv 与所述第一抗原结合域的 Fc 片段的 C 端直接或间接相连。
78. 分离的抗原结合蛋白，其包含两个第一多肽和两个第二多肽，所述第一多肽从 N 端到 C 端依次包含 VH, CH1, CH2, CH3 和能够特异性结合 4-1BB 蛋白的 scFv，所述第二多肽包含 VL 和轻链可变区 CL；其中所述 VH 与所述 VL 配对且能够特异性结合 CLDN18.2。
79. 根据权利要求 78 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
80. 根据权利要求 78 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列。
81. 根据权利要求 78 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列。
82. 根据权利要求 78-81 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

基酸序列。

83. 根据权利要求 78-81 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。
84. 根据权利要求 78-81 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。
85. 根据权利要求 78-81 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列。
86. 根据权利要求 78-81 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所示 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列。
87. 根据权利要求 78-86 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 CH2 和所述 CH3 构成 Fc 片段。
88. 根据权利要求 87 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 Fc 片段包含选自下组的一个或多个氨基酸突变：N180A，D239E 和 L241M。
89. 根据权利要求 78-88 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 scFv 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。
90. 根据权利要求 78-89 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 scFv 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。
91. 根据权利要求 78-90 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 scFv 包含 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 92 所示的氨基酸序列。

92. 根据权利要求 78-91 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 scFv 包含 VL，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。
93. 多肽，其包含权利要求 1-92 中任一项所述的抗原结合蛋白。
94. 一种或多种分离的核酸分子，其编码权利要求 1-92 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 93 所述的多肽。
95. 载体，其包含权利要求 94 所述的核酸分子。
96. 细胞，其包含权利要求 94 所述的核酸分子或权利要求 95 所述的载体。
97. 药物组合物，其包含权利要求 1-92 中任一项所述的抗原结合蛋白，以及任选地药学上可接受的载剂。
98. 制备权利要求 1-92 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白的方法，其包括在使得所述分离的抗原结合蛋白表达的条件下，培养权利要求 96 所述的细胞。
99. 权利要求 1-92 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 93 所述的多肽、权利要求 94 所述的核酸分子、权利要求 95 所述的载体、权利要求 96 所述的细胞和/或权利要求 97 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症。
100. 根据权利要求 99 所述的用途，其中所述疾病和/或病症包括 CLDN18.2 表达异常相关的疾病和/或病症。
101. 根据权利要求 99-100 中任一项所述的用途，其中所述疾病和/或病症包括肿瘤。
102. 根据权利要求 101 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。
103. 根据权利要求 101-102 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤选自胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胃食管交界处癌和/或结肠癌。
104. 权利要求 1-92 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 93 所述的多肽、权利要求 94 所述的核酸分子、权利要求 95 所述的载体、权利要求 96 所述的细胞和/或权利要求 97 所述的药物组合物，其用于预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症。
105. 根据权利要求 104 所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物，其中所述疾病和/或病症包括 CLDN18.2 表达异常相关的疾病和/或病症。
106. 根据权利要求 104-105 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物，其中所述疾病和/或病症包括肿瘤。
107. 根据权利要求 106 所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的核酸分子、所述的

- 载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。
108. 根据权利要求 106-107 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物，其中所述肿瘤选自胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胃食管交界处癌和/或结肠癌。
109. 一种预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1-92 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 93 所述的多肽、权利要求 94 所述的核酸分子、权利要求 95 所述的载体、权利要求 96 所述的细胞和/或权利要求 97 所述的药物组合物。
110. 根据权利要求 109 所述的方法，其中所述疾病和/或病症包括与 CLDN18.2 表达异常相关的疾病和/或病症。
111. 根据权利要求 109-110 中任一项所述的方法，其中所述疾病和/或病症包括肿瘤。
112. 根据权利要求 111 所述的方法，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。
113. 根据权利要求 111-112 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤选自胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胃食管交界处癌和/或结肠癌。

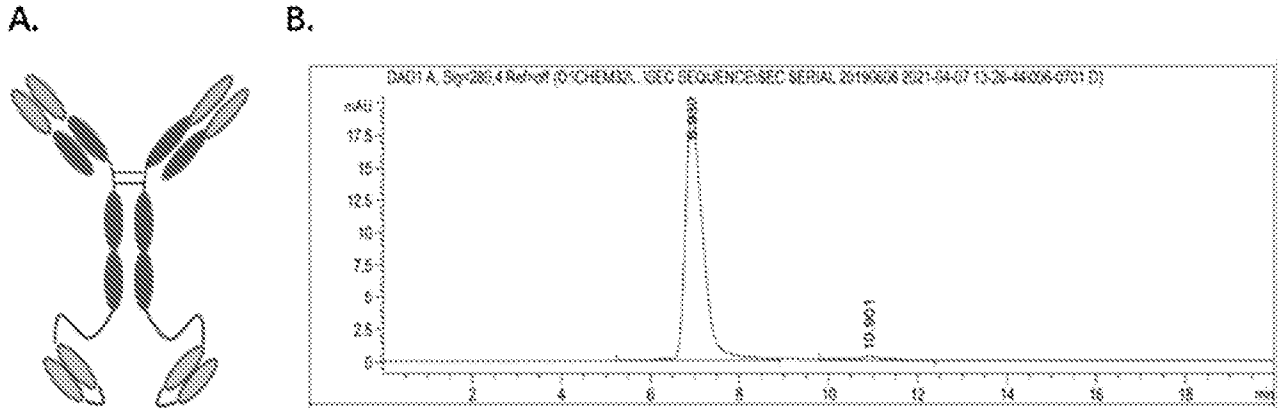


图 1

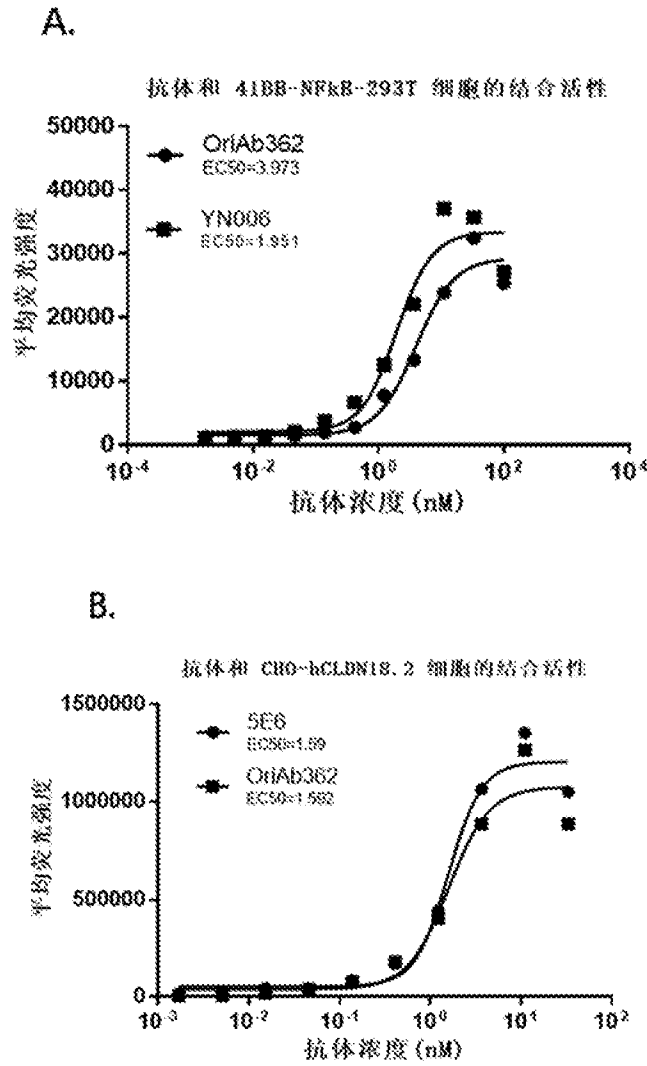


图 2

流式验证双抗两头同时结合的活性

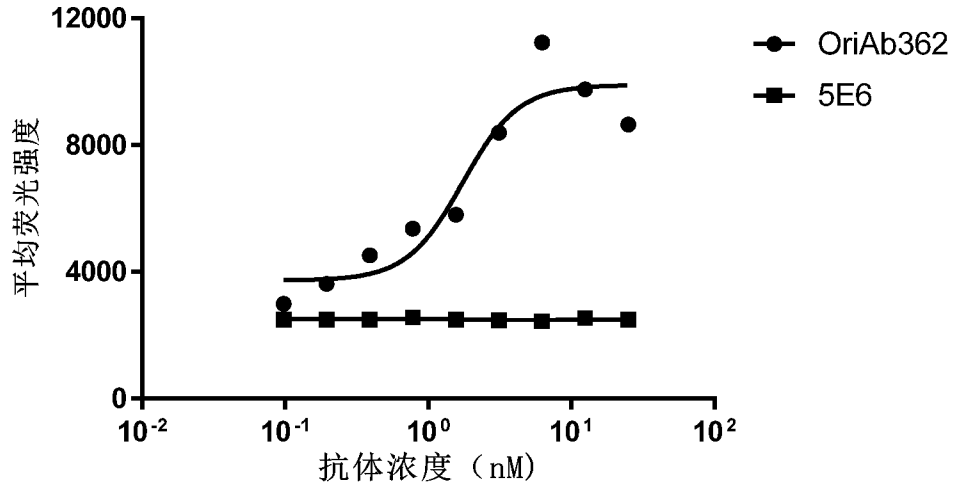
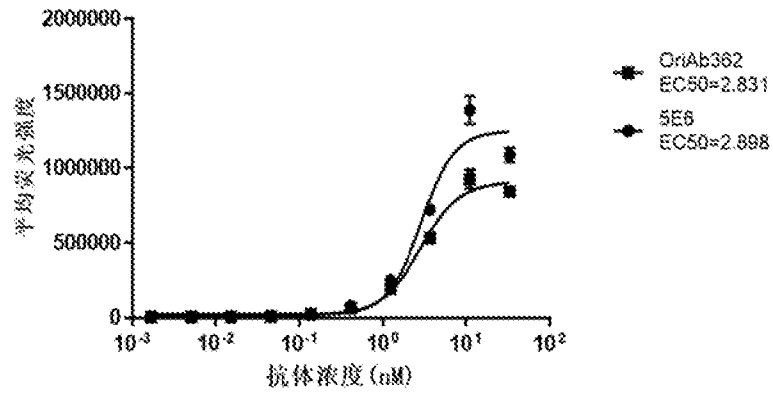


图 3

A. 抗体和293T-mouseCLDN18.2 细胞的流式结合活性



B. 抗体和 293T-macacaCLDN18.2 细胞的流式结合活性

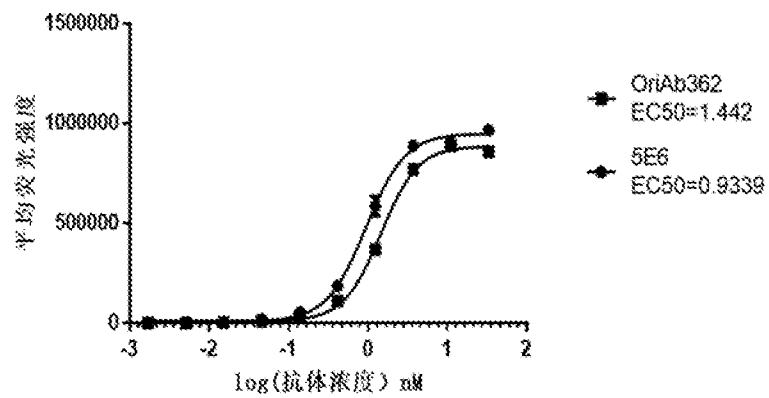


图 4

流式竞争结合实验

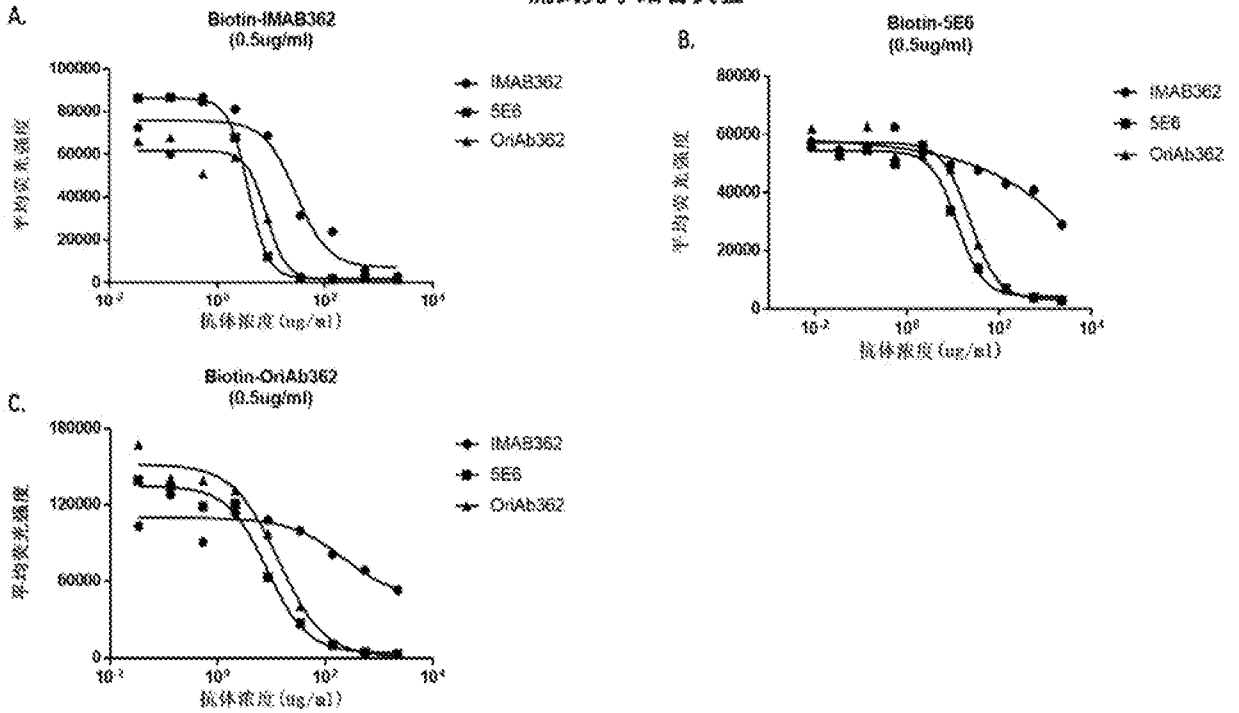


图 5

荧光素酶活性分析实验

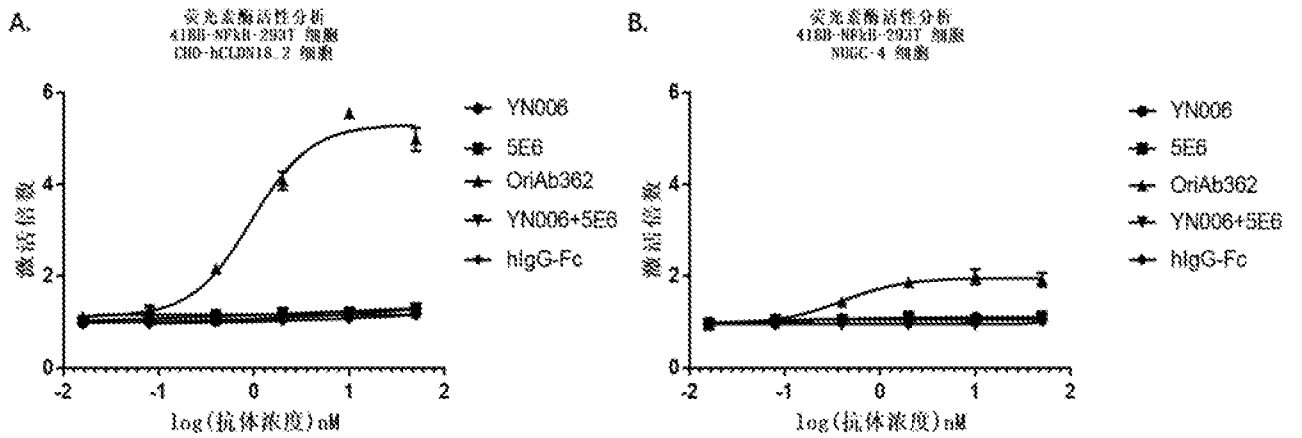


图 6

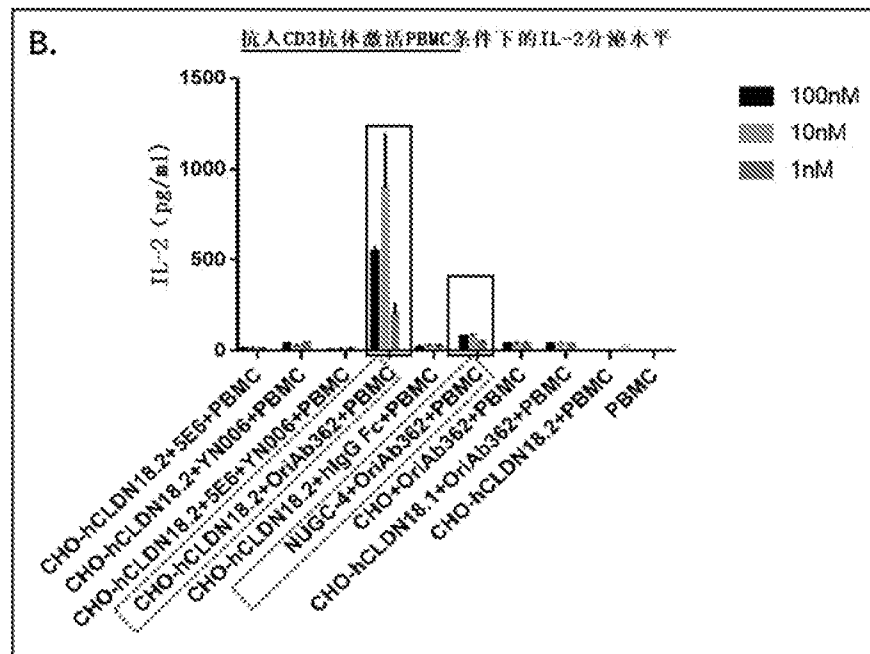
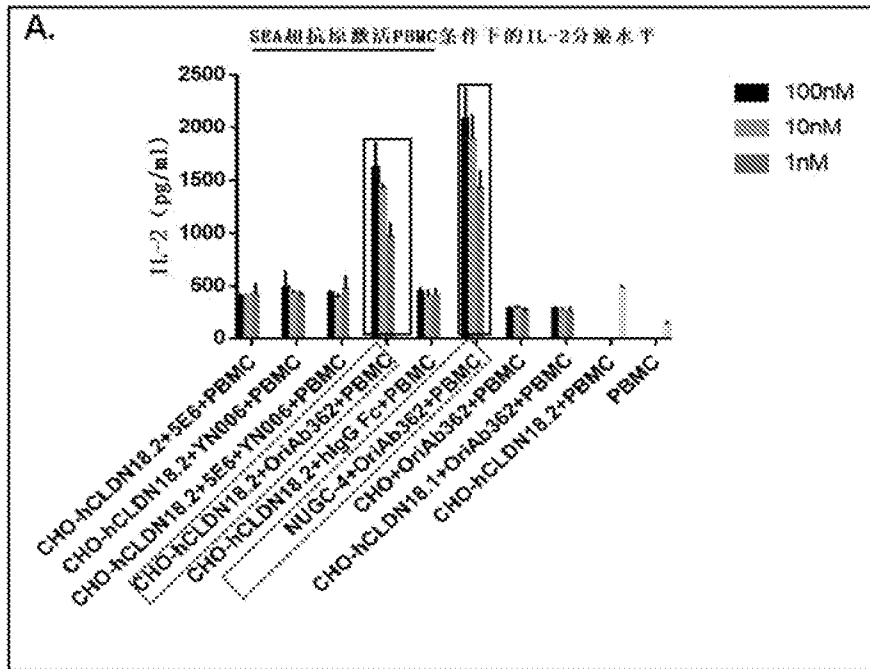


图 7

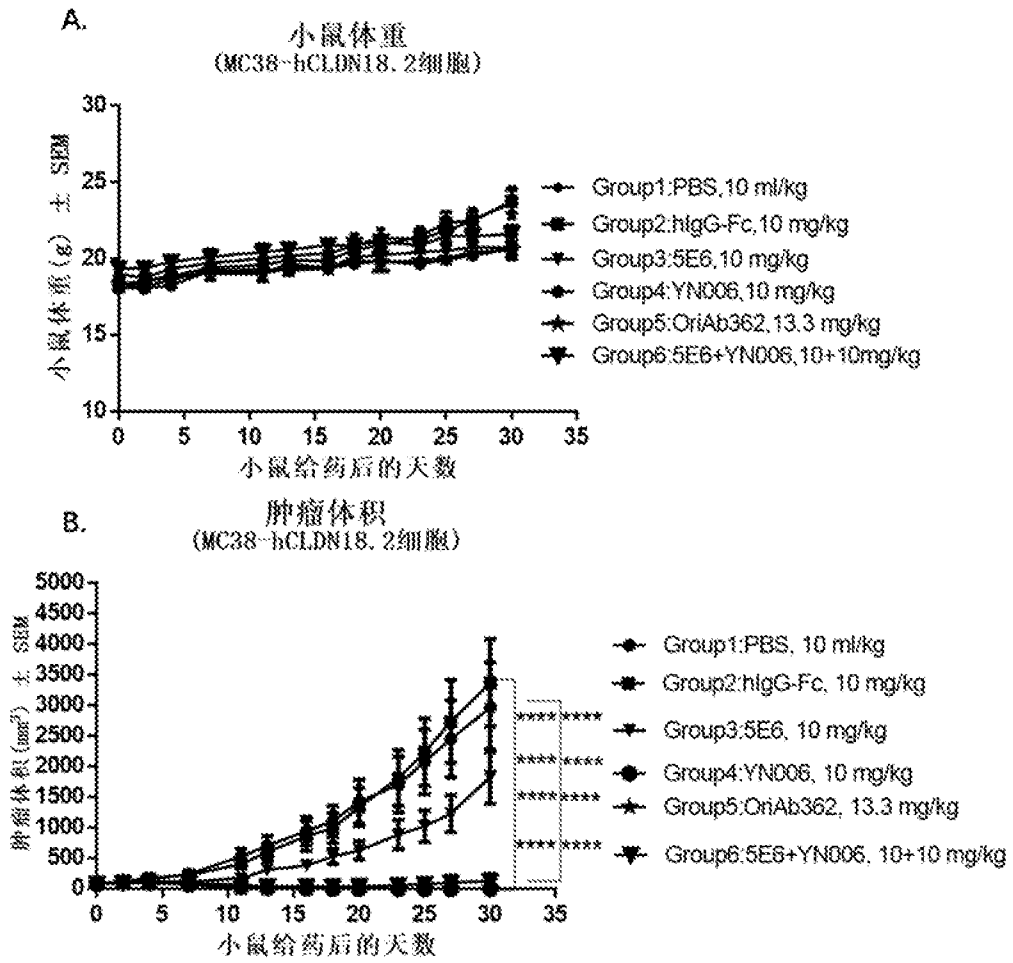


图 8

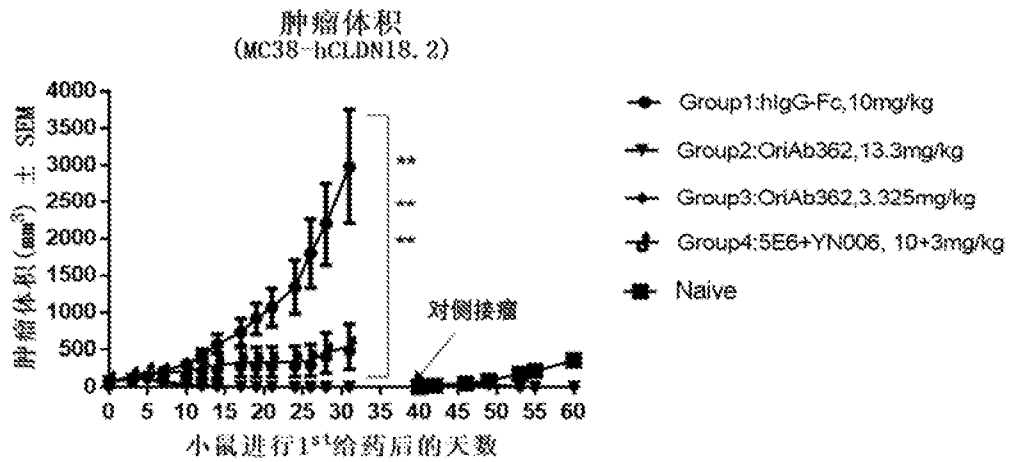


图 9

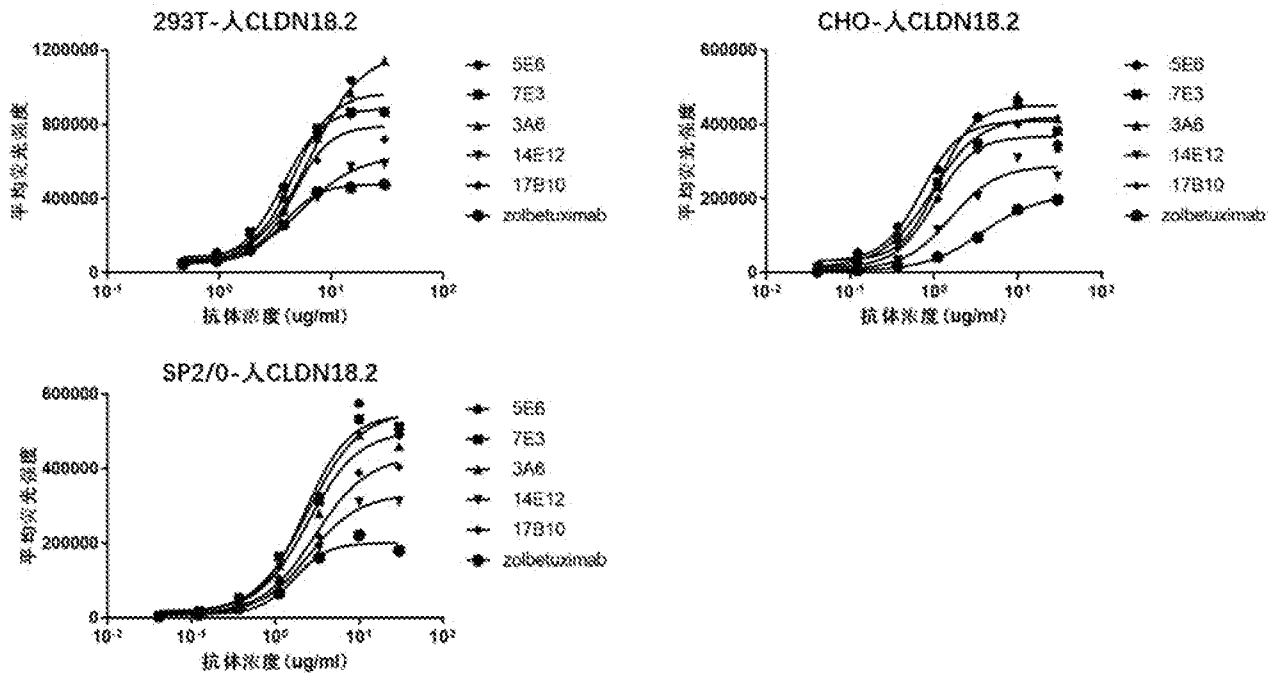


图 10

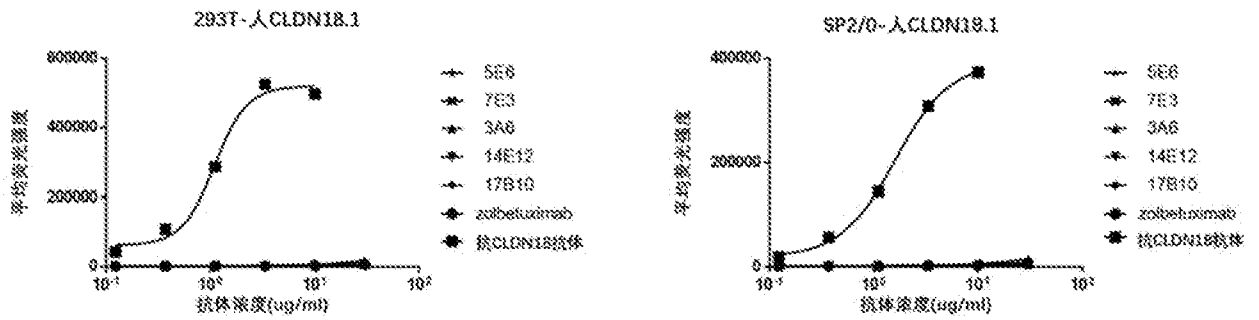


图 11

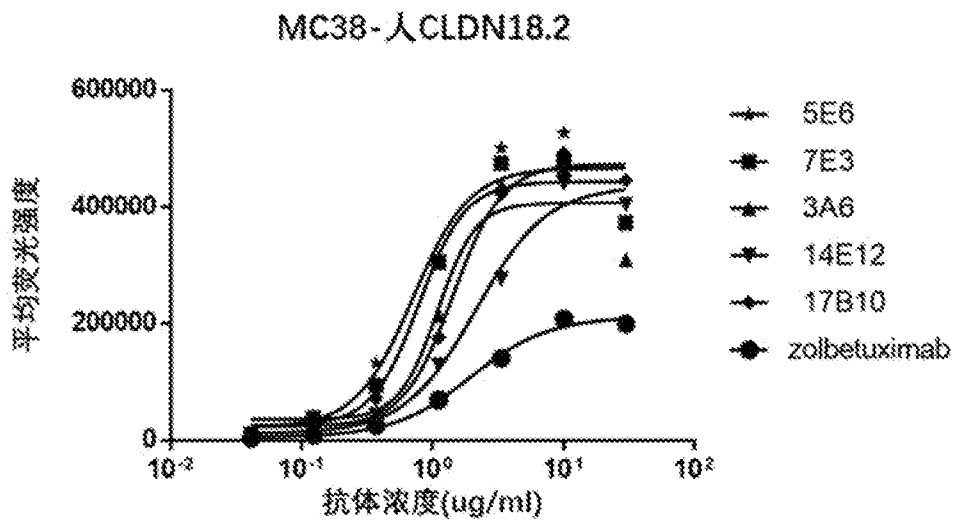


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01);C12N 15/13(2006.01);A61K 39/395(2006.01);A61P 35/00(2006.01);		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07K; C12N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, NCBI, STN: 双特异性抗体, bispecific antibodies, 双特异性抗原结合蛋白, Claudin18.2, CLDN18.2, 4-1BB, SEQ ID NOs: 1-100		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2022206975 A1 (ORICELL THERAPEUTICS CO., LTD.) 06 October 2022 (2022-10-06) claims 1-87, description page 28, embodiment 3	1-113
A	CN 113166265 A (I-MAB BIOPHARMA CO., LTD. et al.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-38	1-113
A	CN 113121698 A (ORICELL THERAPEUTICS (SHANGHAI) CO., LTD.) 16 July 2021 (2021-07-16) entire document	1-113
A	CN 111788228 A (LANOVA MEDICINES LIMITED) 16 October 2020 (2020-10-16) entire document	1-113
A	WO 2021239026 A1 (HANGZHOU BANGSHUN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 02 December 2021 (2021-12-02) entire document	1-113
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 March 2023		30 March 2023
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071504

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2018086828 A1 (PATRICIUS HENDRIKUS CORNE VAN BERKEL et al.) 29 March 2018 (2018-03-29) entire document	1-113
.....		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **109-113**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The technical solutions of claims 109-113 relate to "a method for preventing, alleviating and/or treating diseases and/or conditions", which falls within the subject matter defined in PCT Rule 39.1(iv); however, in the present search report, a search is carried out on the basis of the corresponding pharmaceutical use.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/071504

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022206975	A1	06 October 2022	None			
CN	113166265	A	23 July 2021	PH	12021551269	A1	03 November 2021
				SG	11202104131	VA	28 May 2021
				WO	2021027850	A1	18 February 2021
				PE	20211147	A1	28 June 2021
				IL	283379	A	29 July 2021
				CL	2021001375	A1	07 January 2022
				CA	3117740	A1	18 February 2021
				JP	2022543508	A	13 October 2022
				US	2021317224	A1	14 October 2021
				US	11261259	B2	01 March 2022
				KR	20210082482	A	05 July 2021
				AU	2020329466	A1	27 May 2021
				CO	2021006953	A2	19 August 2021
				US	2022348675	A1	03 November 2022
				EP	3853257	A1	28 July 2021
				EP	3853257	A4	29 June 2022
CN	113121698	A	16 July 2021	SG	11202009791	VA	27 November 2020
				EP	3778635	A1	17 February 2021
				EP	3778635	A4	26 January 2022
				CO	2020013833	A2	21 December 2020
				IL	277893	A	30 November 2020
				KR	20200140882	A	16 December 2020
				WO	2019196309	A1	17 October 2019
				MX	2020010653	A	28 October 2020
				AU	2018418224	A1	26 November 2020
				BR	112020020637	A2	23 March 2021
				PH	12020551661	A1	07 June 2021
				CL	2020002600	A1	29 January 2021
				US	2021380698	A1	09 December 2021
				EA	202092420	A1	28 January 2021
				JP	2021530430	A	11 November 2021
				IL	297847	A	01 January 2023
				ZA	202006255	B	30 March 2022
				CA	3095498	A1	17 October 2019
CN	111788228	A	16 October 2020	SG	11202007074	PA	28 August 2020
				SG	10202111141	WA	29 November 2021
				US	2021171628	A1	10 June 2021
				US	11098118	B2	24 August 2021
				US	2021380681	A1	09 December 2021
				CA	3090726	A1	21 November 2019
				EP	3794037	A1	24 March 2021
				EP	3794037	A4	02 March 2022
				KR	20210003808	A	12 January 2021
				KR	102421427	B1	18 July 2022
				JP	2022087341	A	09 June 2022
				JP	2021517888	A	29 July 2021
				JP	7117795	B2	15 August 2022
				US	2020385463	A1	10 December 2020
				US	11059887	B2	13 July 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/071504

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				KR	20220103820	A	22 July 2022
				WO	2019219089	A1	21 November 2019
				AU	2019270865	A1	13 August 2020
WO	2021239026	A1	02 December 2021	None			
US	2018086828	A1	29 March 2018	AU	2016247584	A1	26 October 2017
				AU	2016247584	B2	28 January 2021
				JP	2018516243	A	21 June 2018
				JP	7033922	B2	11 March 2022
				GB	201506402	D0	27 May 2015
				JP	2022088373	A	14 June 2022
				BR	112017022258	A2	31 July 2018
				EP	3283122	A1	21 February 2018
				MX	2017013167	A	16 January 2018
				US	2020399365	A1	24 December 2020
				KR	20170137116	A	12 December 2017
				KR	102315256	B1	21 October 2021
				CA	2982522	A1	20 October 2016
				WO	2016166307	A1	20 October 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/071504

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i;C12N 15/13(2006.01)i;A61K 39/395(2006.01)i;A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, STN: 双特异性抗体, bispecific antibodies, 双特异性抗原结合蛋白, Clau-din18.2, CLDN18.2, 4-1BB, SEQ ID NOs: 1-100</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2022206975 A1 (ORICELL THERAPEUTICS CO., LTD.) 2022年10月6日 (2022 - 10 - 06) 权利要求1-87, 说明书第28页, 实施例3</td> <td>1-113</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113166265 A (天境生物科技(上海)有限公司等) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 权利要求1-38</td> <td>1-113</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113121698 A (原启生物科技(上海)有限责任公司) 2021年7月16日 (2021 - 07 - 16) 全文</td> <td>1-113</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111788228 A (礼新医药科技(上海)有限公司) 2020年10月16日 (2020 - 10 - 16) 全文</td> <td>1-113</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2021239026 A1 (HANGZHOU BANGSHUN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2021年12月2日 (2021 - 12 - 02) 全文</td> <td>1-113</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	WO 2022206975 A1 (ORICELL THERAPEUTICS CO., LTD.) 2022年10月6日 (2022 - 10 - 06) 权利要求1-87, 说明书第28页, 实施例3	1-113	A	CN 113166265 A (天境生物科技(上海)有限公司等) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 权利要求1-38	1-113	A	CN 113121698 A (原启生物科技(上海)有限责任公司) 2021年7月16日 (2021 - 07 - 16) 全文	1-113	A	CN 111788228 A (礼新医药科技(上海)有限公司) 2020年10月16日 (2020 - 10 - 16) 全文	1-113	A	WO 2021239026 A1 (HANGZHOU BANGSHUN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2021年12月2日 (2021 - 12 - 02) 全文	1-113
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	WO 2022206975 A1 (ORICELL THERAPEUTICS CO., LTD.) 2022年10月6日 (2022 - 10 - 06) 权利要求1-87, 说明书第28页, 实施例3	1-113																		
A	CN 113166265 A (天境生物科技(上海)有限公司等) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 权利要求1-38	1-113																		
A	CN 113121698 A (原启生物科技(上海)有限责任公司) 2021年7月16日 (2021 - 07 - 16) 全文	1-113																		
A	CN 111788228 A (礼新医药科技(上海)有限公司) 2020年10月16日 (2020 - 10 - 16) 全文	1-113																		
A	WO 2021239026 A1 (HANGZHOU BANGSHUN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2021年12月2日 (2021 - 12 - 02) 全文	1-113																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年3月22日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年3月30日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>张蕾</p> <p>电话号码 (+86) 010-53962037</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2018086828 A1 (PATRICIUS HENDRIKUS CORNE VAN BERKEL等) 2018年3月29日 (2018 - 03 - 29) 全文	1-113

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的;
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 109-113
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求109-113的技术方案涉及“一种预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症的方法”，属于PCT实施细则39.1(iv)规定的主题，但是本检索报告基于相应的制药用途进行检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/071504

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2022206975	A1	2022年10月6日	无			
CN	113166265	A	2021年7月23日	PH	12021551269	A1	2021年11月3日
				SG	11202104131	VA	2021年5月28日
				WO	2021027850	A1	2021年2月18日
				PE	20211147	A1	2021年6月28日
				IL	283379	A	2021年7月29日
				CL	2021001375	A1	2022年1月7日
				CA	3117740	A1	2021年2月18日
				JP	2022543508	A	2022年10月13日
				US	2021317224	A1	2021年10月14日
				US	11261259	B2	2022年3月1日
				KR	20210082482	A	2021年7月5日
				AU	2020329466	A1	2021年5月27日
				CO	2021006953	A2	2021年8月19日
				US	2022348675	A1	2022年11月3日
				EP	3853257	A1	2021年7月28日
				EP	3853257	A4	2022年6月29日
CN	113121698	A	2021年7月16日	SG	11202009791	VA	2020年11月27日
				EP	3778635	A1	2021年2月17日
				EP	3778635	A4	2022年1月26日
				CO	2020013833	A2	2020年12月21日
				IL	277893	A	2020年11月30日
				KR	20200140882	A	2020年12月16日
				WO	2019196309	A1	2019年10月17日
				MX	2020010653	A	2020年10月28日
				AU	2018418224	A1	2020年11月26日
				BR	112020020637	A2	2021年3月23日
				PH	12020551661	A1	2021年6月7日
				CL	2020002600	A1	2021年1月29日
				US	2021380698	A1	2021年12月9日
				EA	202092420	A1	2021年1月28日
				JP	2021530430	A	2021年11月11日
				IL	297847	A	2023年1月1日
				ZA	202006255	B	2022年3月30日
				CA	3095498	A1	2019年10月17日
CN	111788228	A	2020年10月16日	SG	11202007074	PA	2020年8月28日
				SG	10202111141	WA	2021年11月29日
				US	2021171628	A1	2021年6月10日
				US	11098118	B2	2021年8月24日
				US	2021380681	A1	2021年12月9日
				CA	3090726	A1	2019年11月21日
				EP	3794037	A1	2021年3月24日
				EP	3794037	A4	2022年3月2日
				KR	20210003808	A	2021年1月12日
				KR	102421427	B1	2022年7月18日
				JP	2022087341	A	2022年6月9日
				JP	2021517888	A	2021年7月29日
				JP	7117795	B2	2022年8月15日
				US	2020385463	A1	2020年12月10日
				US	11059887	B2	2021年7月13日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/071504

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				KR	20220103820	A	2022年7月22日
				WO	2019219089	A1	2019年11月21日
				AU	2019270865	A1	2020年8月13日
WO	2021239026	A1	2021年12月2日	无			
US	2018086828	A1	2018年3月29日	AU	2016247584	A1	2017年10月26日
				AU	2016247584	B2	2021年1月28日
				JP	2018516243	A	2018年6月21日
				JP	7033922	B2	2022年3月11日
				GB	201506402	D0	2015年5月27日
				JP	2022088373	A	2022年6月14日
				BR	112017022258	A2	2018年7月31日
				EP	3283122	A1	2018年2月21日
				MX	2017013167	A	2018年1月16日
				US	2020399365	A1	2020年12月24日
				KR	20170137116	A	2017年12月12日
				KR	102315256	B1	2021年10月21日
				CA	2982522	A1	2016年10月20日
				WO	2016166307	A1	2016年10月20日