

(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
2021年4月1日 (01.04.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/058000 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/118424

(22) 国际申请日: 2020年9月28日 (28.09.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910929614.0 2019年9月29日 (29.09.2019) CN

(71) 申请人: 迈威(上海)生物科技股份有限公司
(**MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.**)
[CN/CN]; 中国上海市自由贸易试验区蔡伦路
230号2幢105室, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 林鉴(**LIN, Jian**); 中国上海市自由贸易
试验区蔡伦路230号2幢105室, Shanghai 201210
(CN)。 邓小芳(**DENG, Xiaofang**); 中国上海市自
由贸易试验区蔡伦路230号2幢105室, Shanghai
201210 (CN)。 高攀(**GAO, Pan**); 中国上海市自
由贸易试验区蔡伦路230号2幢105室, Shanghai
201210 (CN)。 徐晓红(**XU, Xiaohong**); 中国上
海市自由贸易试验区蔡伦路230号2幢105室,
Shanghai 201210 (CN)。 王骊淳(**WANG, Lichun**);
中国上海市自由贸易试验区蔡伦路230号2
幢105室, Shanghai 201210 (CN)。 任红媛(**REN,
Hongyuan**); 中国上海市自由贸易试验区蔡伦路
230号2幢105室, Shanghai 201210 (CN)。 毕建军
(**BI, Jianjun**); 中国上海市自由贸易试验区蔡伦
路230号2幢105室, Shanghai 201210 (CN)。 王晋
(**WANG, Jin**); 中国上海市自由贸易试验区蔡伦
路230号2幢105室, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 北京瑞恒信达知识产权代理事
务所(普通合伙) (**LEADING INTELLECTUAL
PROPERTY FIRM**); 中国北京市西城区新街

口街道平安里大街28号中海国际中心
1802室, Beijing 100034 (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,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, 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, 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-HUMAN CLAUDIN 18.2 ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗人Claudin18.2抗体及其应用

(57) **Abstract:** The present invention provides an antibody that binds to human Claudin 18.2 or a fragment thereof, as well as encoded nucleic acids and the like thereof. The anti-human Claudin 18.2 antibody of the present invention has strong affinity to an antigen Claudin 18.2 and significant complement-dependent cytotoxicity (CDC) activity and antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) activity to target expression cells, and exhibits high specificity to human CLDN 18.2.

(57) 摘要: 本发明提供一种结合人Claudin18.2的抗体或其片段, 以及它们的编码核酸等。本发明的抗人Claudin18.2抗体对抗原Claudin18.2具有强亲和力, 对靶点表达细胞具有显著的补体依赖性细胞毒(CDC)活性和抗体依赖性细胞毒(ADCC)活性, 并且表现出与人CLDN18.2的高特异性。



WO 2021/058000 A1

抗人 Claudin18.2 抗体及其应用

本专利申请要求于2019年9月29日提交的申请号为CN201910929614.0的中国发明专利申请的优先权权益，在此将其全部内容引入作为参考。

技术领域

本发明属于生物医药领域，涉及一种新的抗人 Claudin18.2 抗体或其功能性片段。本发明还涉及所述抗体或其功能性片段的应用。

背景技术

人紧密连接蛋白 Claudin18 (CLDN18) 属于密连接蛋白家族，这类蛋白生物学上在构建细胞紧密连接、维持细胞屏障功能和参与细胞间分子传递等方面发挥作用。Claudin18 蛋白分子量约 26KD，可以通过选择性剪接使 Claudin 蛋白变成具有不同特性的 Claudin 亚型：CLDN18.1 和 CLDN18.2。CLDN18.1 和 CLDN18.2 均由 261 个氨基酸组成，均具有四个跨膜结构域，NH2 端和 COOH 端位于胞内，具有两个胞外环 (ExtracellularLoops: ECL1, ECL2)。CLDN18.1 和 CLDN18.2 胞外区 1 中仅存在 8 个氨基酸差别。

其中 CLDN18.2 在多种人上皮肿瘤类型的原发病灶和转移灶中表达，并在弥散性癌细胞中持续表达。在食管癌、胰腺癌、肺癌和胃癌细胞中，CLDN18.2 的表达水平更是有显著的增高。Sahin 等人研究认为 CLDN18.2 是个重要的胃癌生物标志物，它存在于 70% 的胃癌病人中，其中 90% 至 95% 被诊断为腺癌，另外 5-10% 包括淋巴瘤、胃肠道间质瘤 (GIST) 和类癌肿瘤。

德国的生物科技公司 Ganymed 开发了一种针对 CLDN18.2 的单克隆抗体 IMAB362，目前处于临床 III 期临床试验中，用于治疗胃食管癌晚期患者。单独的 IMAB362 抗体结合在体外和体内均导致表达 CLDN18.2 的靶细胞的增殖抑制，其抑制肿瘤生长和清除癌细胞作用机制一是通过补体依赖的细胞毒性作用 (CDC)，二是抗体依赖的细胞毒性作用 (ADCC)，各种作用模式被证明独立存在但有协同作用。IMAB362 抗体针对转移性食管癌、转移性胃癌适应症，目前美国和欧盟处于临床 3 期，预期将于 2021 年申请上市。

然而，IMAB362 是一个嵌合抗体，还有较多的鼠源氨基酸，在人体内引起排斥免疫反应的概率相对比较高。因此，本领域仍然存在对人 CLDN18.2

具有更高特异性、亲和力和生物活性的抗体、特别是人源化抗体的需要。此外，Claudin18 的两个亚型 CLDN18.1 和 CLDN18.2 结构高度相似，而功能却不相同，CLDN18.1 和 CLDN18.2 的高度同源性及 ECL1 存在高级结构，筛选针对 CLDN18.2 的高质量抗体具有较大的难度，在抗体特异性方面存在高度的不确定性。

发明内容

本发明要解决的技术问题是，通过单克隆抗体制备方法的优化，提高 Claudin18.2 特异性抗体的筛选效率，通过杂交瘤筛选和人源化技术，获得特异性结合人 CLDN18.2 的高亲和力抗体，其中通过人源化设计，该抗体最大程度减少了鼠源氨基酸的数目，预期拥有更好的体内安全性和应用前景。

针对上述技术问题，从免疫原方面，本发明采用了鼠源细胞表达人 CLDN18.2。一方面，作为宿主的鼠源细胞对小鼠不具备免疫原性或具有极低的免疫原性，从而避免了宿主细胞对目的免疫原 CLDN18.2 的遮蔽效应，避免因引入异源免疫原导致的对 CLDN18.2 特异性杂交瘤产生效率的不良影响；另一方面，以鼠源细胞表达人 CLDN18.2 可以实现膜表面表达，使筛选获得的单克隆抗体特异性结合 CLDN18.2 的胞外区，确保了 CLDN18.2 特异性抗体的生物活性。

从筛选策略方面，本发明采用了正反向筛选相结合的策略。首先，利用表达人 CLDN18.2 的重组细胞进行正向筛选，获得对其具有高亲和力的单抗克隆；然后，对于能够以高亲和力结合人 CLDN18.2 重组细胞的抗体克隆，进一步利用表达人 CLDN18.1 的重组细胞进行反向筛选，反向筛选能排除特异性结合 CLDN18.2、CLDN18.1 共同胞外区结构的单抗。此外，本发明使用的免疫原、正向筛选抗原、反向筛选抗原采用的均是相同的鼠源细胞平台，不仅简化了方法、避免了引入异种抗原，而且能够通过反向筛选步骤消除因鼠源细胞对小鼠个体的同种异体抗原效应而产生的抗体，进一步提高特异性结合 CLDN18.2 的胞外区 2 的单克隆抗体制备效率。

本发明的另一目的是提供一种特异性结合人 CLDN18.2 的抗体或其片段，并提供其用途。其中，本发明所述的抗体的片段涵盖抗体的各种功能性片段，例如其抗原结合部分，如 Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段。

本发明的技术方案如下。

一方面，本发明提供一种抗人 Claudin18.2 抗体的制备方法，包括：

(1) 利用表面表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞作为免疫原免疫动物；

(2) 利用步骤 (1) 中经过免疫的动物制备能产生抗体的细胞克隆；

(3) 利用表面表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞作为正向筛选抗原，筛选对其具有结合活性的抗体及其产生细胞；

(4) 利用表面表达人 Claudin18.1 蛋白的细胞作为反向筛选抗原，排除对其具有结合活性的抗体及其产生细胞。

优选的，本发明所述的制备方法，所述步骤 (1) 中表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞源自与所述被免疫动物相同的物种，优选所述表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞为小鼠细胞、所述被免疫动物为小鼠。

优选的，本发明所述的制备方法，所述步骤 (2) 中选自以下技术制备能产生抗体的细胞克隆：杂交瘤技术、单细胞扩增技术。

优选的，本发明所述的制备方法，所述步骤 (3) 中的正向筛选抗原与步骤 (1) 中的免疫原相同；所述步骤 (4) 中的反向筛选抗原与步骤 (1) 中免疫原的区别仅在于所述表达的蛋白为人 Claudin18.1。

优选的，本发明所述的制备方法，所述步骤 (3)、(4) 采用选自以下的方法进行筛选：酶联免疫法 (ELISA)、荧光共振能量转移 (FRET)。

另一方面，本发明还提供根据本发明所述抗人 Claudin18.2 抗体的制备方法获得的抗人 Claudin18.2 抗体。

优选的，本发明所述的抗人 Claudin18.2 抗体，其特异性结合人 Claudin18.2 的 N 端，优选特异性结合人 Claudin18.2 N 端的胞外区，包括第一胞外环 (Extracellular Loop 1, ECL1)。

优选的，本发明所述的抗人 Claudin18.2 抗体，其对人 CLDN18.2 有 nM 级的特异性结合；并且，其对人 CLDN18.1 的结合与同种型阴性抗体 (或无关抗体) 相比无显著差异。

另一方面，本发明提供一种抗体或其片段，所述抗体或其片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中所述重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 包含选自以下的 CDR 组合 (VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3；VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3)：

(1) 如 SEQ ID NO: 31 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 34 所示的

VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL-CDR3;

(2) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 40 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR3;

(3) 如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL-CDR3;

(4) 如 SEQ ID NO: 48 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 40 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VL-CDR3;

(5) 如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 54 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL-CDR3;

(6) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 58 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 59 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL-CDR3;

(7) 如 SEQ ID NO: 61 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 62 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 63 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 64 所示的 VL-CDR3;

(8) 如 SEQ ID NO: 65 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 66 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 67 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 68 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 69 所示的 VL-CDR3;

(9) 如 SEQ ID NO: 65 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 70 所示的

VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 71 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 72 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 73 所示的 VL-CDR3；

(10) 如 SEQ ID NO: 74 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 77 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 78 所示的 VL-CDR3；

(11) 如 SEQ ID NO: 79 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 80 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 82 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 83 所示的 VL-CDR3；

(12) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR3；

(13) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 86 所示的 VL-CDR3；

(14) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 87 所示的 VL-CDR3；

(15) 如 SEQ ID NO: 74 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 89 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 90 所示的 VL-CDR3；和

(16) 如 SEQ ID NO: 79 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 91 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 93 所示的 VL-CDR3。

优选地，在本发明提供的抗体或其片段中，所述重链可变区包含：

SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 29 中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和/或

所述轻链可变区包含：

选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30 中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列。

根据本发明的具体实施方式，所述抗体或其片段包含的重链可变区和轻链可变区选自以下组合：

(1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(2) 如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(3) 如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(4) 如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(5) 如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 9 所示的氨

氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(6) 如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(7) 如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(8) 如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(9) 如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(10) 如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(11) 如 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(12) 如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(13) 如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(14) 如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(15) 如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(16) 如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。

本发明的上下文中，所述至少 75% 同一性为例如至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、进一步优选至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或甚至 99% 同一性等 $\geq 75\%$ 的任何百分比的同一性。

本发明提供的抗体或其片段可以为单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式，或者，所述抗体或其片段为半抗体或半抗体的抗原结合片段，例如 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；关于本发明提供的抗体的片段，优选地，所述片段为抗体的能够特异性结合人 Claudin18.2 的任何片段。

优选地，所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区，优选包含人或鼠的轻链恒定区 (CL) 和/或重链恒定区 (CH)；

更优选地，所述抗体或其片段包含选自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。

优选地，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体；更优选地，所述单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1 或 IgG4 亚型，轻链

恒定区为 κ 型；

根据本发明的具体实施方式，所述单克隆抗体的重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

根据本发明的具体实施方式，所述单克隆抗体的轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 125 所示氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。

另一方面，本发明提供一种核酸分子，其编码本发明所述的抗体或其片段或者编码所述抗体或其片段中包含的重链 CDR、轻链 CDR、轻链可变区、重链可变区、重链或轻链。

根据本发明的具体实施方式，所述核酸分子编码本发明所述的抗体或其片段中的重链可变区或轻链可变区，例如，所述核酸分子包含如 SEQ ID NOs: 96-125 中任一个所示的核苷酸序列。

本发明的核酸分子可以被克隆到载体中，进而转化或转染宿主细胞。因此，还一方面，本发明提供一种载体，其包含本发明的核酸分子。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

本发明的载体或核酸分子可以用于转化或转染宿主细胞或以任何方式进入宿主细胞内，用于保存或表达抗体等目的。因此，又一方面，本发明提供一种宿主细胞，所述宿主细胞包含本发明的核酸分子和/或载体，或者所述宿主细胞被本发明的核酸分子和/或载体转化或转染。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞，例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

本发明提供的抗体可以利用本领域已知的任何方法获得。例如，可以先由本发明提供的核酸分子获得所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者获得所述抗体的重链和/或轻链，然后与所述抗体的任选其他结构域组装成抗体；或者，在允许本发明提供的宿主细胞表达所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区或者所述抗体的重链和/或轻链以组装成所述抗体的情况下，培养所述宿主细胞。任选地，所述方法还包括回收产生的抗体的步骤。

本发明提供的抗体或其片段还可与其他部分结合，例如细胞表面受体、小分子化合物如氨基酸和糖类、小分子聚合物或对本发明所述抗体进行修饰的任何其它部分，或者甚至是活性蛋白或多肽。因此，另一方面，本发明提供一种缀合物或融合蛋白，其包含本发明提供的抗体或其片段。例如，该缀

合物或融合蛋白可以是包含本发明所述抗体或其片段的双特异性抗体。

本发明提供的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或缀合物或融合蛋白可以被包含在药物组合物中，更特别地被包含在药物制剂中，从而根据实际需要用于各种目的。因此，在又一方面，本发明还提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本发明所述的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或缀合物或融合蛋白，以及可选的药学上可接受的辅料。

出于任何使用目的，本发明还提供一种试剂盒，所述试剂盒包括本发明的抗体分子或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物和/或缀合物或融合蛋白。

另一方面，本发明提供上述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物和/或缀合物或融合蛋白在制备用于预防和/或治疗癌症的药物中的用途。优选地，所述癌症选自胰腺癌、胃癌、结肠癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、胆囊癌和头颈癌。

再一方面，本发明还提供所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物和/或缀合物或融合蛋白在制备用于诊断癌症的试剂中的用途。优选地，所述癌症选自胰腺癌、胃癌、结肠癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、胆囊癌和头颈癌。

另一方面，本发明还提供一种预防和/或治疗癌症的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用本发明的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物和/或缀合物或融合蛋白，以及任选的其他药物或手段。该任选的其他药物或手段是指可以与本发明抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物和/或缀合物或融合蛋白联合施用的其他药物或手段，例如小分子化药、靶向药、抗体等重组蛋白药、疫苗、ADC、溶瘤病毒、基因和核酸治疗药物和放射疗法。二者的联合施用可以采取任意形式进行，例如同时、连续或间隔一定时间进行。

优选地，所述癌症选自胰腺癌、胃癌、结肠癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、胆囊癌和头颈癌。优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

或者，本发明还提供一种诊断癌症的方法，所述方法包括使本发明的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物和/或缀合物或融合蛋白与来自受试者的样品相接触。优选地，所述癌症选自胰腺癌、胃癌、结肠

癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、胆囊癌和头颈癌。优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

将本发明的抗人 Claudin18.2 抗体的编码基因通过慢病毒载体转导到原代健康供者的 T 细胞上，发现所制备的 CART 细胞能够被表达人 Claudin18.2 的细胞有效活化。因此，还一方面，本发明还提供本发明的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物和/或缀合物或融合蛋白在制备 CART 细胞中的用途。

本发明提供了一种新型的能够特异性结合人 Claudin18.2 的抗体。与现有抗人 Claudin18.2 抗体相比，本发明的抗体具有以下特点：

本发明提供的抗人 Claudin18.2 抗体对抗原 Claudin18.2 具有强亲和力，对靶点表达细胞具有显著的补体依赖性细胞毒（CDC）活性和抗体依赖性细胞毒（ADCC）活性，且所述性质强于 IMAB362 或与其相当。此外，与 IMAB362 相比，本发明的抗体表现出与人 CLDN18.2 更高的特异性。

此外，将本发明的抗人 Claudin18.2 抗体的编码基因通过慢病毒载体转导到原代健康供者的 T 细胞上，制备 CART 细胞。经靶细胞刺激后，检测 CART 细胞的表面活化蛋白 CD25 和分泌的 IFN γ ，发现制得的 CART 细胞能够被表达人 Claudin18.2 的细胞有效活化，同样证明了本发明的抗体与人 CLDN18.2 的靶点特异性。

定义

除非另有定义，本文中使用的科学和技术术语的含义是本领域技术人员所通常理解的含义。本文中所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡或多核苷酸化学及杂交中使用的命名和技术是本领域公知且普遍使用的。对于重组 DNA、寡核苷酸合成和组织培养与转化(如电穿孔、脂质转染)，使用了标准技术。酶促反应和纯化技术根据生产商的说明书或本领域普遍使用或本文所述的方法进行。前述技术和方法通常根据本领域公知且本说明书中引用和讨论的多部综合和较具体的文献中描述的那样使用。参见例如 Sambrook 等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，纽约冷泉港(1989))。本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且普遍使用的。

术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链[每对具有一条轻(L)链和

一条重(H)链]组成的免疫球蛋白分子。从一般意义上,重链可以理解为抗体中分子量较大的多肽链,轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链通常可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域[称为互补决定区(CDR)],其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各VH和VL由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对应的可变区(VH和VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat EA.Et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest[National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987and1991)],或 Chothia&Lesk 1987].Mol.Biol.196:901-917; Chothia 等人(1989)Nature342:877-883 的定义。特别地,重链还可以包含3个以上CDR,例如6、9或12个。例如在本发明的双特异性抗体中,重链可以是IgG抗体的重链的N端连接另一个抗体的ScFv,这种情况下重链含有9个CDR。

术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽,其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合,其也被称为“抗原结合部分”。通常参见Fundamental Immunology,Ch.7, Paul,W., ed., 第2版, Raven Press, N.Y.(1989), 其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下,抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链结合片段(例如,scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

术语“Fv”意指向抗体的单臂的VL和VH结构域组成的抗体片段;

术语“Fab”意指由 VL、VH、CL 和 CH1(或者 CH)结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')₂”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

在一些情况下，抗体的抗原结合片段是单链结合片段(例如，scFv)，其中 VL 和 VH 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子[参见，例如，Bird 等人，*Science* 242:423-426(1988)和 Huston 等人，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883(1988)]。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 G4S 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列 (G4S)₄ 接头，但也可使用其变体 [Holliger 等人(1993)，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6444-6448]。

可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体获得抗体的抗原结合片段(例如，上述抗体片段)，并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

术语“分离的”或“被分离的”指的是，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”或“被分离的”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。

术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌等原核细胞，如酵母细胞等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数(KD)，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10⁻⁵M，

例如小于大约 10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M 或 10⁻¹⁰M 或更小的解离平衡常数结合抗原，例如，如使用表面等离子体共振术(SPR)在 BIACORE 仪中测定的。例如用 KINEXA 方法 KINEXA 400 仪器上检测到的抗体和细胞结合的亲和力。

术语“特异性结合”指抗体与抗原的一种或多种抗原决定簇反应而不与其他多肽反应或以很低的亲和性($K_d > 10^{-6}$)结合其他多肽。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、dAb(结构域抗体)、单链、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段、Fv、scFv 及 Fab 表达文库。单克隆抗体(mAb)是由单一的克隆细胞株得到的抗体，所述的细胞株不限于真核的、原核的或噬菌体的克隆细胞株。单克隆抗体或抗原结合片段可以用如杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术及合成技术如 CDR grafting 或其它现有技术进行重组得到。

本发明所述的“鼠源抗体”为根据本领域知识和技能制备的对人 CLDN18.2 的单克隆抗体。制备时用 CLDN18.2 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。

本发明所述的“嵌合抗体”是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。

本发明所述的“人源化抗体”也称为 CDR 移植抗体，是将小鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架(FR)中产生的抗体。此类可变区框架序列可以从公共的 DNA 数据库或公开的参考文献获得，例如从 ImMunoGeneTics(IMG)网站 <http://imgt.cines.fr> 得到或从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN 012441351 上获得。

术语“CLDN18.2”包括同种型、哺乳动物(例如人)的 CLDN18.2、人 CLDN18.2 的物种同源物和包含至少一个与 CLDN18.2 的共同表位的类似物。CLDN18.2(例如人 CLDN18.2)的氨基酸序列是本领域中已知的，如 NCBI 数据库显示。

术语“CLDN18.1”包括同种型、哺乳动物(例如人)的 CLDN18.1、人 CLDN18.1 的物种同源物和包含至少一个与 CLDN18.1 的共同表位的类

似物。CLDN18.1 (例如人 CLDN18.1) 的氨基酸序列是本领域中已知的, 如 NCBI 数据库显示。

“任选”、“任选地”、“任意”或“任一”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生, 该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如, “任选包含 1 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本发明所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物, 以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药, 利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。治疗性组合物一般应当是无菌的并且在制造和储存条件下稳定。可以将组合物配制为溶液、微乳液、分散剂、脂质体或适合高抗体浓度的其他有序结构。可以通过将活性化合物 (即抗体或抗体部分) 以要求的量连同上文所列举的一种成分或成分组合在适宜的溶剂中并入, 根据需要, 随后过滤消毒, 制备无菌可注射溶液剂。

本发明所述的方法、组合物、联合治疗可以与其他活性剂或治疗方式, 所述的方法包括向对象以有效治疗或预防疾病 (例如, 癌症) 的量, 施用本发明所述的抗 CLDN18.2 抗体分子, 任选地, 与 PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、CTLA-4、Tim-3 抗体 (免疫治疗) 或其它肿瘤治疗抗体, Her-2、EGFR、VEGF、VEGFR 抗体等, 以及 ADC (抗体药物偶联, 如 T-DM1), 双特异抗体, 化疗药物等的一种或多种抑制剂的组合, 还包括施用抗 CLDN18.2 抗体分子、额外的活性剂或全部可以按这样的量或剂量施用, 所述量或剂量高于、低于或等于单独 (例如, 作为单一疗法) 使用的每种活性剂的量或剂量。抗 CLDN18.2 抗体, 额外的活性剂或全部的施用量或剂量比单独 (例如, 作为单一疗法) 使用的每种活性剂的量或剂量低 (例如, 至少 20%、至少 30%、至少 40% 或至少 50%)。

此外, 本发明抗 CLDN18.2 抗体可以结合 CLDN18.2 诱导靶细胞 (肿瘤细胞) 凋亡, 抑制肿瘤细胞生长, 增加体内效应细胞对肿瘤细胞 ADCC, CDC 杀伤作用来达到治疗癌症患者的目的。因此, 在某些实施方案中, 本发明所描述的抗 CLDN18.2 抗体分子通过这些机理显示本发明抗体抗肿瘤效应。以及抑制肿瘤细胞生长的方法, 包括将治疗有效量的本发明中所述

的抗 CLDN18.2 抗体分子施用于受试者。该方法适用于癌症的体内治疗。为了获得靶向特异治疗效果，抗 CLDN18.2 抗体分子可以与其它抗体一起施用。在将 CLDN18.2 抗体组合一种或多种活性剂施用，该组合可以以任何顺序或同时施用癌症类型，特别是 CLDN18.2 高表达的肿瘤患者。在某些方面中，提供在对象中治疗对象(例如，减少或缓解)过度增生性病状或疾病(例如，癌症)，例如，实体瘤、血液学癌、软组织肿瘤或转移性病灶的方法。该方法包括向对象单独或与其他活性剂或治疗方式组合地施用本发明所述的一种或多种抗 CLDN18.2 抗体分子。

术语“癌”、“癌症”、“癌症病人”意在包括全部类型的癌性生长物或致瘤过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织或器官，无论组织病理学类型或侵袭力阶段是什么。例子包括但不限于实体瘤、血液学癌、软组织肿瘤和转移性病灶。实体瘤的例子包括恶性肿瘤，例如，多个器官系统的肉瘤和癌(包括腺癌和鳞状细胞癌)，如侵袭肝、肺、乳腺、淋巴、胃肠道(例如，结肠)、生殖泌尿道(例如，肾、膀胱上皮细胞)、前列腺和咽的那些。腺癌包括恶性肿瘤如大部分结肠癌、直肠癌、胃癌、肾细胞癌、肝癌、肺癌中的非小细胞癌、小肠癌和食道癌。鳞状细胞癌包括恶性肿瘤，如在肺、食道、皮肤、头部和颈部区域、口腔、肛门和子宫颈中。前述癌的转移性病灶也可以使用本发明所述的方法和组合物治疗或预防。针对 CLDN18.2 的抗体分子可以与免疫原性剂如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和糖分子)、细胞和用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞组合。

术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)描述了优选地需要靶细胞被抗体标记的效应细胞(特别是淋巴细胞)的细胞杀伤能力。当抗体与肿瘤细胞上的抗原结合并且抗体 Fc 结构域与免疫效应细胞表面上的 Fc 受体(FcR)接合时，优选发生 ADCC。已经鉴定了数个 Fc 受体家族，并且特定细胞群特征性地表达限定的 Fc 受体。ADCC 可被视为直接诱导导致抗原呈递和诱导肿瘤导向的 T 细胞应答的可变程度的立即肿瘤破坏的机制。优选地，ADCC 的体内诱导将导致肿瘤导向的 T 细胞应答和宿主源性抗体应答。

术语“补体依赖性细胞毒性”(CDC)，是可由抗体指导的另一种细胞杀伤方法。IgM 是补体激活最有效的同种型。IgG1 和 IgG3 二者在通过经典补体激活途径指导 CDC 方面也非常有效。优选地，在该级联反应中，

抗原-抗体复合物的形成导致参与抗体分子(例如 IgG 分子)的 CH2 结构域上紧密接近的多个 C1q 结合位点暴露(C1q 是补体 C1 的三种亚组分之一)。优选地,这些暴露的 C1q 结合位点将先前低亲和力的 C1q-IgG 相互作用转化为高亲合力相互作用,其触发涉及一系列其他补体蛋白的级联事件并导致效应细胞趋化/活化剂 C3a 和 C5a 的蛋白水解释放。优选地,补体级联以形成膜攻击复合物结束,所述复合物在细胞膜中产生有利于水和溶质自由进入和离开细胞的孔。

令人吃惊地发现,本文中抗 CLDN18.2 抗体制备的抗体-药物缀合物能够通过诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解和/或抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)介导的裂解来介导杀伤细胞,特别是表达 CLDN18.2 的细胞,例如癌细胞。因此,在一个实施方案中,本发明的抗体-药物缀合物通过诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解和/或抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)介导的裂解(优选通过诱导 CDC 介导的裂解和 ADCC 介导的裂解)来介导细胞杀伤。

附图说明

以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

图 1 显示了抗人 CLDN18.2 嵌合抗体的体外细胞结合实验结果。

图 2 显示了抗人 CLDN18.2 人源化抗体的补体依赖性细胞毒性(CDC)实验结果,其中 2A: CHOK1; 2B: BxPC3; 2C: NCI-N87。

图 3 显示了抗人 CLDN18.2 人源化抗体的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)实验结果,其中 3A: CHOK1; 3B: BxPC3; 3C: NCI-N87。

图 4 显示了抗人 CLDN18.2 人源化抗体的同族蛋白结合特征分析结果。

图 5 显示了抗人 CLDN18.2 人源化抗体在不同浓度下与人 CLDN18.1 表达细胞的结合情况。

图 6 显示了抗人 CLDN18.2 人源化抗体的种属交叉结合特征分析结果。

图 7 显示了制备的各组 CART 细胞的阳性率检测结果。

图 8 显示了构建的各 CHO 细胞株的不同抗原表达情况。

图 9 显示了各组 CART 细胞与靶细胞孵育后上清中 IFN- γ 检测结果。

图 10 显示了各组 CART 细胞与靶细胞孵育后 CD25 表达的检测结果。

实施发明的最佳方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。其中：

IMAB362 的重链和轻链序列参见 SEQ ID NO: 126 和 SEQ ID NO: 127。

抗原人 CLDN18.2 参见 NP_001002026.1，抗原人 CLDN18.1 参见 NP_057453.1。

附图中的阴性对照 Isotype control（同型对照）为抗 CD33 全长 IgG 抗体 Lintuzumab。

实施例 1 鼠源单克隆抗体的筛选

使用细胞表面稳定表达人 CLDN18.2 蛋白的 CHOK1 细胞免疫 Balb/c 小鼠，1 个月后用流式细胞仪术（FACS）分析小鼠血清，取血清抗体滴度高的小鼠取其脾脏，标准方法分离得到的脾细胞与骨髓瘤细胞 P3X63Ag8.653 使用 PEG 或者电融合方法进行融合。将融合后的杂交瘤细胞接种于 384 孔板中，培养 10-14 天后，取上清用 FACS 分析杂交瘤细胞分泌的抗体，筛选得到若干克隆，所述克隆能够结合细胞表面稳定表达人 CLDN18.2 蛋白的 CHOK1 细胞而不能结合细胞表面稳定表达人 CLDN18.1 蛋白的 CHOK1 细胞。通过有限稀释的方法将筛选到的克隆单细胞化，3 轮之后得到的每个杂交瘤细胞克隆只分泌一个抗体。

将分泌抗人 CLDN18.2 抗体的杂交瘤细胞扩大培养后，按照 RNAfast200 试剂盒（上海飞捷生物技术有限公司）说明书步骤提取细胞总 RNA；利用 5×PrimeScript RT Master Mix (Takara) 将杂交瘤细胞总 RNA 反转录成 cDNA；使用简并引物（Anke Krebber.1997）和 Extaq PCR 试剂（Takara）扩增抗体轻链可变区 IgVL(κ)和重链可变区 VH 序列；利用 PCR clean-up Gel extraction 试剂盒（Macherey-Nagel 公司）纯化 PCR 扩增产物；按照 pClone007 Simple Vector Kit 试剂盒（擎科生物科技有限公司）说明书将扩增 PCR 产物连接至

T 载体并转化大肠杆菌感受态细胞，菌株扩增、抽提质粒后进行 DNA 测序获得单克隆抗体可变区序列。

表 1. 鼠源抗体的轻重链可变区

鼠源抗体	重链可变区 (VH)	轻链可变区 (VL)
11M23	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
16K15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
18B21	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
20L17	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
43B5	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
43L6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
46J05	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
48G12	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
50C14	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
52E22	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
8K13	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22

>11M23_vh (SEQ ID NO: 1)

QVQLKESGPDLVAPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWRQPPGKGLEWLVVIWSDGRINYSALKS
 RLSITKDNSKRQVFLKMNSLQIDDAIYYCVRHPAFGPHAMDYWGQGISVTVSS

>11M23_vl (SEQ ID NO: 2)

DIVMTQDAPSIPVTPGESVSISCRSSKLLNSNGNTYLYWFLQRPQSPHLLLYRMSNPASGAPD
 RFSGSGSGTEFTLRISRVEAEDVGVYYCMQYLEYPPTFGAGTRLELK

>16K15_vh (SEQ ID NO: 3)

EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCAGSGITLSTYAMSWWRQTPERRLEWWASIISSGGITYYLDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDAIYYCARKYHGNALDYWGQGTSVTVSL

>16K15_vl (SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLPVTAGETVTMRCKSSQSLLNSGNQRNYLTWYQRKPGQPPKLIYWASTRESGV
 PDRFTGSGSGTDFLTISGVQAEDLAVYYCQNNYFYPLTFGAGTKLELK

>18B21_vh (SEQ ID NO: 5)

QIQMVQSGPELKKPGETVRISCKASGYSFTTAGMQWVRKMPGEGLKWIGWIAHSGEPKYTEDE
KGRFAFSLETSASTTYLQISNLKNEDTATYFCARWGKGNTMDYWGQGTSVIVSS

>18B21_vl (SEQ ID NO: 6)

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNGGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTHFTLTISSVQAEDLAVYYCQNAYFFPLTFGAGTKLELK

>20L17_vh (SEQ ID NO: 7)

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWWAYISSGSSSTIYYPDTV
KGRFTVSRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYVCVRLGPRGNVMDHWGQGTSVTVSS

>20L17_vl (SEQ ID NO: 8)

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNVYFYPLTFGTGKLELR

>43B5_vh (SEQ ID NO: 9)

DVQLQESGPDVLPKPSQSLSLTCTVSGYSISGAYNWHWIRQFPGNKLEWLAYMQYSGSSNYNPSF
KSRISISRDTSKNQFFLQKSVTTEDATYYCARMYNGNSFLYWGQGTLTVVSA

>43B5_vl (SEQ ID NO: 10)

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCKSSQSLFNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPRLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLSLYYCQNSYSYPLTFGAGTKLELK

>43L6_vh (SEQ ID NO: 11)

QVQLKESGPDVAPSQSLSLTCSVSGFSLTSYGIHWVRQPPGKLEWLVVIWSDGRTTYNSGLK
SRLSISKDNSKSQVLLKMNSLRTDDTAIYYCVRHPAFGPHAMDYWGQGTSVTVSS

>43L6_vl (SEQ ID NO: 12)

DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMNSLASGVPD
RFSGSGSGTDFTLRISRVEAGDVGVYYCMQYLEYPVTFGAGTKLELK

>46J05_vh (SEQ ID NO: 13)

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPKKGLEWWAYISSGSNTIYYADTV
KGRFTISRDNPKNLFLQTTSLRSEDTAIYCGRLGFYGNSFDHWGQGTLTVVSA

>46J05_vl (SEQ ID NO: 14)

NILMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCKSSQSLLNGGNQRNYLTWYQQKAGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYCQNSYYYPLTFGAGTKLELK

>48G12_vh (SEQ ID NO: 15)

EVQLRQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTTYIINWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDTRYNERVK
GKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFYFGNSFTYWGQGLTVSA

>48G12_vl (SEQ ID NO: 16)

DIVMTQSPSSLPVTVGERVTMTCKSSQGLFNNGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNNYIYPLTFGAGTKLELK

>50C14_vh (SEQ ID NO: 17)

EVQLRQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTTYIINWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRYNERVK
GKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFHFHFGNSFTYWGQGLTVSA

>50C14_vl (SEQ ID NO: 18)

DIVMTQSPSSLPVTGKVTMTCKSSQGLFNNGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNNYIFPLTFGAGTKLELK

>52E22_vh (SEQ ID NO: 19)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTLTNYGMNWVRQAPGKGLKWMGWIRPNTGEPTYAEDF
KGRFVFSLETSAAATAYLQITNLKSEDSTYFCARLYRGNTLDNWGQGTSVIVSS

>52E22_vl (SEQ ID NO: 20)

DIVMTQSPSSLTVTTGKVTMSCKSSQNLNNGNQRNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PYRFTGSGSGTDFTLTISSVQTDLAIYYCQNGYSFPFTFGSGTKLEIK

>8K13_vh (SEQ ID NO: 21)

QVHLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSNYWMNWVRQRPQGLEWIGQIYPGNGDTKYSGK
FNSKDTLTADKSSNTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARFYGNVMDYWGQGTSTVTVSS

>8K13_vl (SEQ ID NO: 22)

DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQTLNNGNQKNYLTWYQQKSGQPPKLLIYWASTRESGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNGYSYPLTFGVGTKLELK

实施例 2 抗人 CLDN18.2 嵌合抗体的制备

将鼠源抗人 CLDN18.2 单克隆抗体的重链可变区序列和公开发表的人单克隆抗体 IgG1 亚类的重链恒定区序列 (参见 SEQ ID NO: 124) 拼接在一起, 构建到哺乳动物细胞表达载体中; 将鼠源抗人 CLDN18.2 单克隆抗体的轻链可变区序列和公开发表的人单克隆抗体 κ 亚类的轻链恒定区序列 (参见 SEQ ID NO: 125) 拼接在一起, 构建到哺乳动物细胞表达载体中。构建好的抗人 CLDN18.2 嵌合抗体的重链载体和轻链载体配对混合, 使用聚乙烯亚胺 (PEI) 转染 HEK293 细胞, 约 7 天后收集细胞上清, 使用 ProteinA 纯化得到抗人 CLDN18.2 嵌合抗体蛋白。

本发明的嵌合抗体命名为“鼠源抗体简称-xiIgG”。

实施例 3 抗人 CLDN18.2 嵌合抗体的体外细胞结合实验

将抗人 CLDN18.2 嵌合抗体从 100nM 的起始浓度开始做 2 倍的梯度倍比稀释, 共 16 个浓度点, 各个浓度点的抗体取 10ul 加入 384 孔板。100g 室温离心 5 分钟收集细胞表面表达 CLDN18.2 的 CHOK1 细胞, 用含 0.5% BSA 的 PBS 洗涤细胞一次, 100g 室温离心 5 分钟, 重悬细胞为密度约 2×10^6 个细胞/毫升, 取 10ul 加入到已加抗体的 384 孔板的孔中。4°C 孵育 1 小时后, 加入荧光标记的羊抗人 IgG 二抗。继续于 4°C 孵育 1 小时后, 用流式细胞仪分析细胞群的平均荧光读值。

结果显示嵌合抗体与表达人 CLDN18.2 细胞有 nM 级别的特异结合, 见图 1。

实施例 4 抗人 CLDN18.2 鼠源抗体的人源化

综合 Kabat、Chothia 的抗体编码方案, 确定鼠源抗体的重链和轻链的 6 个抗原互补决定簇 (CDR) 的氨基酸序列区域及支撑抗体保守三维构象的框架区域 (framework region)。随后通过分析搜索已知人源抗体序列, 选择与鼠源抗体最为相似接近的人源抗体重链可变区序列, 如 IGHV1|IGHJ4*01, 选择其抗体框架区序列作为模板, 将鼠源抗体重链 CDR 与人源抗体框架区结合, 最终生成人源化抗体重链可变区序列。同样过程, 生成人源化抗体轻链可变区序列。

鼠源抗体 CDR 直接移植至人框架区的抗体常出现结合活性急剧下降,

因此需要将框架区个别氨基酸从人源的改回鼠源的。确定回复突变位点，一是对照设计好的人源化抗体序列和原始的鼠源抗体序列，检查有哪些氨基酸的不同；二是检查这些氨基酸是否对支持抗体结构起重要作用或者对与抗原的结合起重要作用。人源化设计后的序列的同时需要检查是否有一些潜在的翻译后修饰位点 (PTM)，如 N (天冬酰胺) 糖基化位点、N 脱酰胺化位点、D (天冬氨酸) 异构化位点等。

将人源化抗体重链可变区基因构建到含人单克隆抗体 IgG1 亚类的重链恒定区基因的哺乳动物细胞表达载体中；轻链可变区基因构建到含人单克隆抗体 κ 亚类的轻链恒定区基因的哺乳动物细胞表达载体中。构建好的抗人 CLDN18.2 人源化抗体的重链载体和轻链载体配对混合，使用聚乙烯亚胺 (PEI) 转染 HEK293 细胞，约 7 天后收集细胞上清，使用 ProteinA 纯化得到抗人 CLDN18.2 人源化抗体蛋白。

本发明的人源化抗体命名为“鼠源抗体简称-hz”。鼠源抗体 CDR 直接移植至人框架区的抗体命名为“鼠源抗体简称-hz00”。进一步改造得到的抗体根据序列不同进行编号。

利用 Fortebio (BLITZ pro1.1.0.28) 仪器分析鼠源嵌合抗体及其人源化抗体与抗原人 CLDN18.2 的结合动力学参数。测定前先将 NTA 生物探针浸泡于 PBS 中 10 分钟；然后将该探针置于含 100nM 的抗原的 PBS 中 300 秒，捕获带 His 标签的抗原；进一步将探针与 100nM 抗体进行结合反应，结合时间 400 秒；之后将探针转移至 PBS 中，进行解离反应，时间为 600 秒。实验完毕，扣除空白对照响应值，用软件进行 1:1 Langmuir 结合模式拟合，计算抗原抗体结合的动力学常数。结果见表 2。

表 2. 鼠源抗体人源化后的结合动力学参数比较

Ab ID	PTM	响应	K_D (M)	K_{on}	k_{off} (s^{-1})	$K_{off}/$
				(1/Ms)		$K_{off}(Xi-IgG)$
8K13-xiIgG	有	0.134	3.82E-10	2.98E+05	1.14E-04	1.00
8K13-hz00	有	0.133	7.44E-10	2.66E+05	1.98E-04	1.74
8K13-hz11	有	0.139	2.97E-10	2.27E+05	6.73E-05	0.59
8K13-hz24	无	0.133	1.51E-09	2.64E+05	3.99E-04	3.50
11M23-xiIgG	有	0.184	2.93E-10	3.66E+05	1.07E-04	1.00
11M23-hz00	有	0.164	1.49E-09	2.18E+05	3.24E-04	3.03

11M23-hz11	有	0.174	1.29E-09	3.56E+05	4.60E-04	4.30
11M23-hz22	无	0.136	2.92E-09	6.70E+05	1.95E-03	18.22
16K15-xiIgG	有	0.261	5.57E-10	2.76E+05	1.54E-04	1.00
16K15-hz00	有	0.176	8.95E-11	2.40E+05	2.15E-05	0.14
16K15-hz11	有	0.17	5.35E-10	1.88E+05	1.00E-04	0.65
16K15-hz22	无	0.266	1.10E-09	2.59E+05	2.86E-04	1.86
52E22-xiIgG	有	0.223	9.96E-11	3.57E+05	3.55E-05	1.00
52E22-hz00	有	0.188	3.09E-10	1.98E+05	6.11E-05	1.72
52E22-hz11	有	0.238	5.42E-10	3.63E+05	1.97E-04	5.55
52E22-hz12	无	0.226	3.60E-10	2.18E+05	7.83E-05	2.21

结果显示，人源化并移除了关键的翻译后修饰位点(PTM)后，11M23-hz22 相对鼠源嵌合抗体，解离常数值上升了 10 倍以上，因此将其从候选分子名单中去除。其余的 8K13-hz24、16K15-hz22 和 52E22-hz12 的解离常数值与原始鼠源嵌合抗体比，上升幅度在 1-4 倍之间，可以选做先导分子继续开展后续的研究。其中 16K15-hz22 轻链氨基酸序列中包含 2 个连续的“NN”残基，做了进一步优化的 16K15-hz22_2 和 16K15-hz22_3 突变抗体，分别将“NN”残基变为“SN”和“QN”残基。

表 3. 人源化抗体的轻重链可变区

鼠源抗体	人源化的轻链可变区	人源化的重链可变区	人源化抗体
16K15	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 129	16K15-hz00
	SEQ ID NO: 128, 同时 在第 52 位和 89 位 具有回复突变	SEQ ID NO: 129, 同 时 在第 24 位具有回复 突变	16K15-hz11
	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 23	16K15-hz22
	SEQ ID NO: 25		16K15-hz22_2
	SEQ ID NO: 26		16K15-hz22_3
52E22	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 131	52E22-hz00
	SEQ ID NO: 130, 同 时 在第 89 位具有回复 突变	SEQ ID NO: 27	52E22-hz11

	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 27	52E22-hz12
8K13	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 133	8K13-hz00
	SEQ ID NO: 132, 同时在第 4 位和第 89 位具有回复突变	SEQ ID NO: 133, 同时在第 74 位和第 77 位具有回复突变	8K13-hz11
	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 29	8K13-hz24
11M23	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 84	11M23-hz00
	SEQ ID NO: 88, 同时 在第 41 位具有回复突 变	SEQ ID NO: 84, 同时 在第 71 位具有回复突 变	11M23-hz11
	SEQ ID NO: 88, 同时 在第 41 位具有回复突 变, 第 31 位和第 33 位 N-S	SEQ ID NO: 84, 同时 在第 71 位具有回复突 变, 第 54 位 D-E 和第 60 位 N-Q	11M23-hz22

>16K15_vl_hz2 (SEQ ID NO: 24)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYCQNNYFYPLTFGQGGTKLEIK

>16K15_vl_hz2_N-S (SEQ ID NO: 25)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYCQSNYFYPLTFGQGGTKLEIK

>16K15_vl_hz2_N-Q (SEQ ID NO: 26)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYCQQNYFYPLTFGQGGTKLEIK

>16k15_vh_hz2 (SEQ ID NO: 23)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGITLSTYAMSWWRQAPGKGLEWVSSIIISGGITYYLDVSKG
RFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARKYHGNAIDYWGQGTLVTVSS

>52E22_vl_hz2 (SEQ ID NO: 28)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP

DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLAVYYCQQGYSFPFTFGQGTKLEIK

>52E22_vh_hz1 (SEQ ID NO: 27)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTLTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWIRPNTGEPTYAED
FKGRFVFLDTSVATAYLQITSLKAEDTAVYYCARLYRGNTLDNWGQGTLVTVSS

>8K13_vl_hz4_N-S_N-Q (SEQ ID NO: 30)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLSGGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD
RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLAVYYCQQGYSYPLTFGQGTKLEIK

>8K13_vh_hz2 (SEQ ID NO: 29)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSNYWMNWRQAPGQGLEWMGQIYPGSGDTKYSG
KFQSRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYGNVMDYWGQGTLVTVSS

实施例 5 抗人 CLDN18.2 人源化抗体的体外结合亲和力的动力学实验采用 GE 公司 BIAcore 仪器 S200 测定抗体抗原相互作用力。

参考 GE 公司 Human antibody capture kit (货号 BR-1008-39, Lot10261753) 操作说明, 首先在传感芯片 CM5 分析通道和对照样品通道都饱和偶联最大量抗人 Fc 抗体, 然后在分析通道流过含有 7.5µg/ml 抗人 CLDN18.2 嵌合抗体、人源化抗体或对照抗体 IMAB362 的缓冲液使其均匀分布, 最后在分析通道和对照样品通道一起流过梯度稀释的抗原样品 (起始浓度 20nM, 1:3 稀释 8 个浓度点, 并且设定 0.741nm 浓度点重复), 测定抗体抗原结合后发生的光反应值。经仪器软件拟合分析, 最终得到抗体的结合常数 K_{on} 和解离常数 K_{off} , 以及亲和力常数 KD 。

结果表明, 抗人 CLDN18.2 人源化抗体的体外结合亲和力常数与原始鼠源抗体比没有显著的改变, 与 IMAB362 相比低了 1 个数量级, 见表 4。

表 4. 本发明抗体的结合动力学

抗体	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)
8K13-xiIgG	8.19E+04	5.73E-04	6.99E-09
8K13-hz24	7.09E+04	2.02E-03	2.85E-08

16K15-xiIgG	1.07E+05	1.44E-03	1.35E-08
16K15-hz22	5.71E+04	5.63E-04	9.85E-09
52E22-xiIgG	4.90E+05	5.45E-04	1.11E-09
52E22-hz12	1.46E+05	1.72E-04	1.18E-09
IMAB362	1.48E+06	0.201	1.36E-07

实施例6 抗人CLDN18.2人源化抗体的体外细胞学试验

6.1 补体依赖性细胞毒性 (CDC)

使用Quidel公司的商品化人血清全补体对本发明人源化抗体进行分析，分析其对稳定表达人CLDN18.2的CHOK1、BxPC3和NCI-N87细胞诱导补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力。

将细胞与终浓度为250 μ g/ml至3.8ng/ml的待测抗体混匀；加入溶于细胞培养基RPMI-1640中的6.25%人血清全补体，在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时；然后通过CCK-8试剂盒进行细胞毒性检测；最终通过MD酶标仪检测450nm吸光度。通过吸光值采用softmax pro7软件进行4参数拟合曲线，计算样品的EC50值。

结果表明，抗人CLDN18.2人源化抗体针对靶点表达细胞有特异的补体依赖性细胞毒 (CDC) 活性，并且细胞杀伤活性显著优于IMAB362，见图2和表5。

表 5. 本发明抗体的 CDC

靶点表达细胞	a. CHOK1	b. BxPC3	c. NCI-N87
抗体	EC50 (nM)	EC50 (nM)	EC50 (nM)
8K13-hz24 IgG	21.27	28.53	57.7
16K15-hz22 IgG	5.2	12.22	17.36
52E22-hz12 IgG	2.08	NA	NA
IMAB362	30.45	52.23	474.2

6.2 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

使用工程改造的Jurkat细胞作为效应细胞，该细胞稳定表达Fc γ RIIIa-Fc ϵ RI α 杂合受体，由NFAT应答元件驱动表达萤火虫萤光素酶。抗体在ADCC作用机制中的生物活性通过NFAT通路活化产生的萤光素酶定

量。将 $1.5E5$ 个效应细胞与终浓度 $33\mu\text{g/ml}$ 至 85pg/ml 的待测抗体混匀，然后将 $2.5E4$ 个靶细胞加入其中（效应细胞与靶细胞E:T比例6:1），在 37°C 下孵育16小时；然后通过Promega公司试剂盒Bio-Glo™ Luciferase Assay System进行检测；最终通过MD酶标仪检测LUM值。

数据处理方式如下，诱导倍数=(受检孔读值-背景值)/(阴性对照孔读值-背景值)，用prism软件进行4参数拟合曲线，计算出样品的EC50值。

结果表明，抗人CLDN18.2人源化抗体针对靶点表达细胞有特异的抗体依赖性细胞毒（ADCC）活性，细胞杀伤活性与IMAB362相当，见图3和表6。

表 6. 本发明抗体的 ADCC

靶点表达细胞	a. CHOK1	b. BxPC3	c. NCI-N87
抗体	EC50 (nM)	EC50 (nM)	EC50 (nM)
8K13-hz24 IgG	0.5894	0.3045	0.1499
16K15-hz22 IgG	0.7122	0.1759	0.0677
52E22-hz12 IgG	0.5672	NA	NA
IMAB362	0.5929	0.1056	0.0909

实施例 7 抗人 CLDN18.2 人源化抗体的同簇蛋白结合特征分析

将人 CLDN18.2 和 CLDN18.1 的基因分别构建到真核表达载体中，使用聚乙烯亚胺（PEI）转染 HEK293 细胞。转染后第三天离心收集细胞，用 PBS 洗涤细胞 1 次，重悬细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ，每个 384 孔板中加入 10ul 的细胞；第二步往 384 孔板中加入不同浓度的人源化抗体， 4°C 孵育 1 小时；第三步加入荧光标记的羊抗人 IgG 二抗， 4°C 孵育 1 小时；使用流式细胞仪读取 384 孔板的荧光值。分析数据获得细胞与抗人 CLDN18.2 人源化抗体的结合特征。实验用的阳性对照为商品化抗人 CLDN18 兔单抗 34H14L15（购自 Abcam 公司），阴性 Isotype control（同型对照）为抗 CD33 全长 IgG 抗体 Lintuzumab。

结果表明，抗人 CLDN18.2 人源化抗体表现出结合人 CLDN18.2 而不结合人 CLDN18.1 的特征，见图 4；并且，在低、中、高三种浓度下与人 CLDN18.1 细胞的非特异结合均比 IMAB362 低，见图 5。

实施例 8 抗人 CLDN18.2 人源化抗体的人、猴、鼠种属交叉结合特征

分析

将人、鼠和恒河猴 (Rhesus) 的 CLDN18.2 基因分别构建到真核表达载体中, 使用聚乙烯亚胺 (PEI) 转染 HEK293 细胞, 2 天后收集细胞。使用流式细胞仪分析细胞与抗人 CLDN18.2 人源化抗体的结合特异性。流式细胞实验方法参见实施例 7。

结果表明, 抗人 CLDN18.2 人源化抗体 16K15-22 IgG 和三个种属的 CLDN18.2 均有结合, 8K13-24 IgG 和 52E22-12 IgG 与猴子的 CLDN18.2 结合但不与小鼠的 CLDN18.2 结合。结果见图 6。

实施例 9 采用抗人 CLDN18.2 人源化抗体的 CART 细胞制备及其活化

9.1 慢病毒包装

按照表 7 分组情况, 进行慢病毒包装。首先构建了包含不同抗体基因的慢病毒载体质粒 pLTR, 测序正确以后使用 Qiagen 公司的质粒抽提试剂盒提取它们的质粒 DNA, 质粒 DNA 溶于除菌的 TE 中, 以紫外光吸收法测定其浓度及纯度, 保证所提质粒 DNA 的 A260/A280 在 1.8~2.0 之间。同时提取两种辅助包装元件载体质粒 pCMV-VSV-G 和 pCMV-dR8.2 的 DNA。准备转染用的 HEK293T 细胞, 需新鲜传代, 生长至约 60% 的汇合度。使用磷酸钙作为转染试剂将 3 种质粒共转入 HEK293T 细胞。转染 48 小时后, 低温离心收集含包装好病毒的细胞上清, 使用 0.45 μ m 的过滤器去除细胞碎片。使用超滤离心管对病毒进行浓缩换液, 分装后保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。取少量病毒浓缩液用 FACS 法测定病毒滴度。

表 7. 慢病毒分组

编号	病毒	病毒滴度	组别
135	LV-135.N	8.75E+06	阴性对照
417	LV-417.N	1.65E+07	16k15 (16K15-hz22) scfv*
418	LV-418.N	1.38E+07	52E22 (52E22-hz12) scfv*
419	LV-419.N	5.13E+07	8K13 (8K13-hz24) scfv*
420	LV-420.N	1.50E+07	阳性对照

表 7 中阴性对照是不结合 CLDN18.2 的其他抗体, 阳性对照是科济生物 hu8E5 抗体 (参见 WO2018006882A1)。*所示单链抗体为相应的人源化 VH、VL 通过短肽(GSTSGGGSGGGSGGGSS)连接形成。

9.2 CART 细胞制备

选择 HBV、HCV 和 HIV 检测阴性的健康供者，肘正中静脉抽血 100ml，Ficoll 密度梯度离心分离 PBMC 白膜层，按 DynaBeads CD3/CD28 (Lifetechnologies, 货号: 40203D) 与 CD3+ T 细胞比例 3:1，分离 CD3+ T 细胞，活化 24 小时后流式检测 CD25+CD69+T 细胞比例。CD3+T 活化后，进行慢病毒转导，MOI 为 5。用 Novonectin 包被 24 孔板 37°C 孵育 2 小时，将上述操作后得到的细胞悬液分别与制备得到的各种慢病毒 (MOI=5)、Synperonic® F108 (Sigma, 货号: 07579-250G-F)、Tscm (2U/ml) 配制成转导体系置于包被的 24 孔板中，细胞密度调整至 1.0E+06/ml，500g 离心 30min，离心后 37°C CO₂ 培养箱静置培养 48h。转染后以含 5% FBS X-vivo15 培养液 (LONZA, 货号: 04-418Q) 培养，隔日补充 Tscm (终浓度 2U/ml)，计数细胞，调整细胞密度至 0.5E+06/ml，培养至第 8-10 天收获细胞。

得到的各组 CART 细胞的阳性率检测结果见图 7。

9.3 CART 细胞活化

用 CHO 构建表达人 CLDN18.1 抗原和人 CLDN18.2 抗原的细胞，作为靶细胞。

细胞的相关抗原表达检测结果见图 8。CHO-BLANK (空白对照)、CHO-CLDN18.1 无 CLDN18.2 抗原的表达，CHO-CLDN18.2 高表达 CLDN18.2 抗原。

于 1.5mL 的离心管中将上述调整好密度的效应细胞，包括各组 CAR-T 细胞和未转导慢病毒 T 细胞，分别与靶细胞混合，效靶比 16:1，用 T 细胞培养液 X-vivo15 培养液 (不含自体血清以及 Tscm) 将总体积补足至 200 μ L；将配制的 200 μ L 体系分别移入 96 孔 V 型板中共孵育 24 小时。

孵育结束后，取各组培养体系的上清检测人 IFN γ 。发现 417 组 CART 与 CHO-CLDN18.1 以及 CHO-CLDN18.2 孵育后，IFN γ 释放显著增加，418、419、420 组 CART 仅与 CHO-CLDN18.2 孵育后，IFN γ 释放增加。结果见表 8 和图 9。

表 8. 培养体系的上清中检测到的人 IFN γ

组别	T: CHO-BLANK	T: CHO-claduin18.1	T: CHO-claduin18.2
nc	1020.1	912	1095.2
135	1441.2	1458.6	1877

417	9016	60328.2	79178.6
418	3940.8	4540	78903.4
419	4486.2	4670.6	75516.8
420	7381.1	6973.2	78247

取各组 CART 细胞检测 T 细胞活化标志蛋白 CD3/CD25。发现 417 CART 与 CHO-CLDN18.1 以及 CHO-CLDN18.2 孵育后, CD25 表达上调, 418、419、420 CART 仅与 CHO-CLDN18.2 孵育后, CD25 表达上调。见图 10。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明, 本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形, 只要不脱离本发明的精神, 均应属于本发明所附权利要求的范围。

权 利 要 求

1. 一种抗人 Claudin18.2 抗体的制备方法，其特征在于，包括：
 - (1) 利用表面表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞作为免疫原免疫动物；
 - (2) 利用步骤 (1) 中经过免疫的动物制备能产生抗体的细胞克隆；
 - (3) 利用表面表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞作为正向筛选抗原，筛选对其具有结合活性的抗体及其产生细胞；
 - (4) 利用表面表达人 Claudin18.1 蛋白的细胞作为反向筛选抗原，排除对其具有结合活性的抗体及其产生细胞。
2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 (1) 中表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞源自与所述被免疫动物相同的物种，优选所述表达人 Claudin18.2 蛋白的细胞为小鼠细胞、所述被免疫动物为小鼠。
3. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 (2) 中选自以下技术制备能产生抗体的细胞克隆：杂交瘤技术、单细胞扩增技术。
4. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 (3) 中的正向筛选抗原与步骤 (1) 中的免疫原相同；所述步骤 (4) 中的反向筛选抗原与步骤 (1) 中免疫原的区别仅在于所述表达的蛋白为人 Claudin18.1。
5. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 (3)、(4) 采用选自以下的方法进行筛选：酶联免疫法 (ELISA)、荧光共振能量转移 (FRET)。
6. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的制备方法获得的抗人 Claudin18.2 抗体。
7. 根据权利要求 6 所述的抗人 Claudin18.2 抗体，其特异性结合人 Claudin18.2 的 N 端，优选特异性结合人 Claudin18.2 N 端的胞外区，包括第一胞外环 (Extracellular Loop 1, ECL1)。
8. 根据权利要求 6 所述的抗人 Claudin18.2 抗体，其对人 CLDN18.2 有 nM 级的特异性结合；并且，其对人 CLDN18.1 的结合与同种型阴性抗体 (或无关抗体) 相比无显著差异。
9. 一种抗体或其片段，所述抗体或其片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中所述重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 包含选自以下的 CDR 组合 (VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3；VL-CDR1、VL-CDR2、

VL-CDR3):

(1) 如 SEQ ID NO: 31 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL-CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 40 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR3；

(3) 如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL-CDR3；

(4) 如 SEQ ID NO: 48 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 40 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VL-CDR3；

(5) 如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 54 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL-CDR3；

(6) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 58 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 59 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL-CDR3；

(7) 如 SEQ ID NO: 61 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 62 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 63 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 64 所示的 VL-CDR3；

(8) 如 SEQ ID NO: 65 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 66 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 67 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 68 所示的

VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 69 所示的 VL-CDR3;

(9) 如 SEQ ID NO: 65 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 70 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 71 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 72 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 73 所示的 VL-CDR3;

(10) 如 SEQ ID NO: 74 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 77 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 78 所示的 VL-CDR3;

(11) 如 SEQ ID NO: 79 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 80 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 82 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 83 所示的 VL-CDR3;

(12) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR3;

(13) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 86 所示的 VL-CDR3;

(14) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 87 所示的 VL-CDR3;

(15) 如 SEQ ID NO: 74 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH-CDR3; 如 SEQ ID NO: 89 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 90 所示的 VL-CDR3; 和

(16) 如 SEQ ID NO: 79 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 91 所示的

VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 93 所示的 VL-CDR3。

10. 根据权利要求 6 至 9 中任一项所述的抗体或其片段，其特征在于，所述重链可变区包含：

SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 29 中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和/或

所述轻链可变区包含：

SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 30 中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 6 至 10 中任一项所述的抗体或其片段，其特征在于，所述抗体或其片段包含的重链可变区和轻链可变区选自以下组合：

(1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(2) 如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(3) 如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(4) 如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 7 所示的氨

氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(5) 如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(6) 如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(7) 如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(8) 如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(9) 如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(10) 如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(11) 如 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(12) 如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(13) 如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(14) 如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(15) 如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(16) 如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 6 至 11 中任一项所述的抗体或其片段，其特征在于，所述抗体或其片段为单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式，或者，所述抗体或其片段为半抗体或半抗体的抗原结合片段，例如 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；

优选地，所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区，优选包含人或鼠的轻链恒定区 (CL) 和/或重链恒定区 (CH)；

更优选地，所述抗体或其片段包含选自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。

13. 根据权利要求 6 至 12 中任一项所述的抗体或其片段，其特征在于，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体；优选地，

所述单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1 或 IgG4 亚型，轻链恒定区为 κ 型；

优选地，所述单克隆抗体的重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

优选地，所述单克隆抗体的轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 125 所示氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。

14. 一种核酸分子，其编码权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段或者编码所述抗体或其片段中包含的重链 CDR、轻链 CDR、轻链可变区、重链可变区、重链或轻链。

15. 一种载体，其包含权利要求 14 所述的核酸分子。

16. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 14 所述的核酸分子和/或权利要求 15 所述的载体，或者所述宿主细胞被权利要求 14 所述的核酸分子和/或权利要求 15 所述的载体转化或转染。

17. 一种缀合物或融合蛋白，所述缀合物或融合蛋白包含权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段。

18. 一种药物组合物，其包含权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞和/或权利要求 17 所述的缀合物或融合蛋白，以及可选地药学上可接受的辅料。

19. 一种试剂盒，所述试剂盒包括权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体分子或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 所述的缀合物或融合蛋白和/或权利要求 18 所述的药物组合物。

20. 权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 所述的药物组合物或权利要求 18 所述的缀合物或融合蛋白在制备用于预防和/或治疗癌症的药物中的用途。

21. 权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 所述的药物组合物或权利要求 18 所述的缀合物或融合蛋白在制备用于诊断癌症的试剂中的用途。

22. 权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 14 所述

的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 所述的药物组合物或权利要求 18 所述的缀合物或融合蛋白在制备 CART 细胞中的用途。

23. 一种预防和/或治疗癌症的方法, 所述方法包括给有此需要的受试者施用权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 所述的药物组合物或权利要求 18 所述的缀合物或融合蛋白, 以及任选的其他药物或手段。

24. 一种诊断癌症的方法, 所述方法包括使权利要求 6 至 13 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 14 所述的核酸分子、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 所述的药物组合物或权利要求 18 所述的缀合物或融合蛋白与来自受试者的样品相接触。

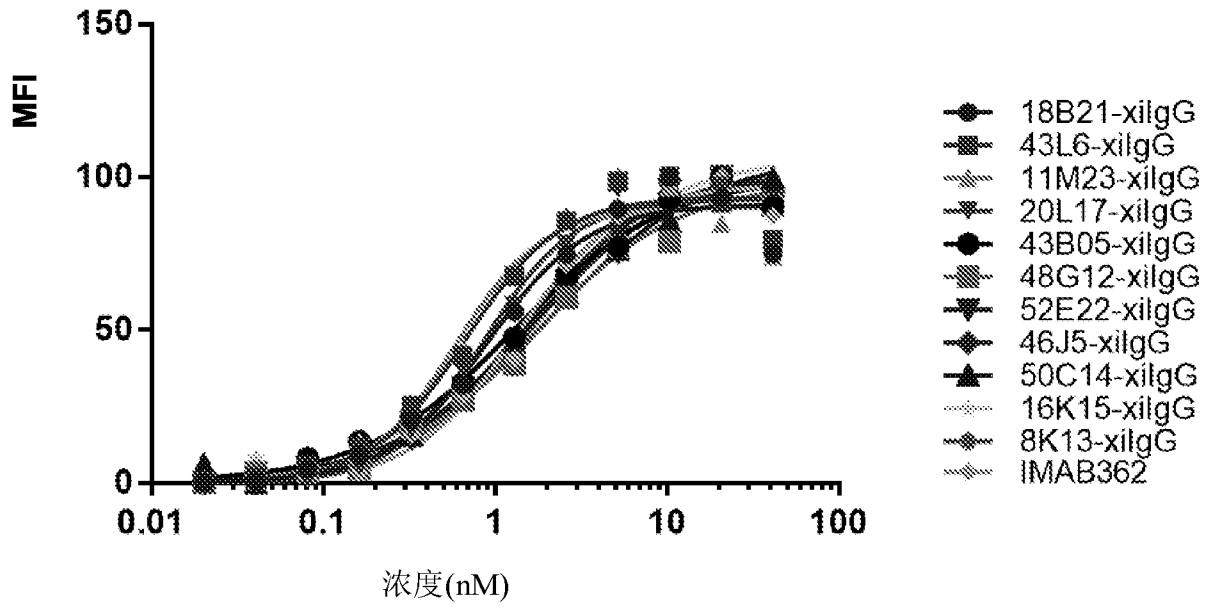
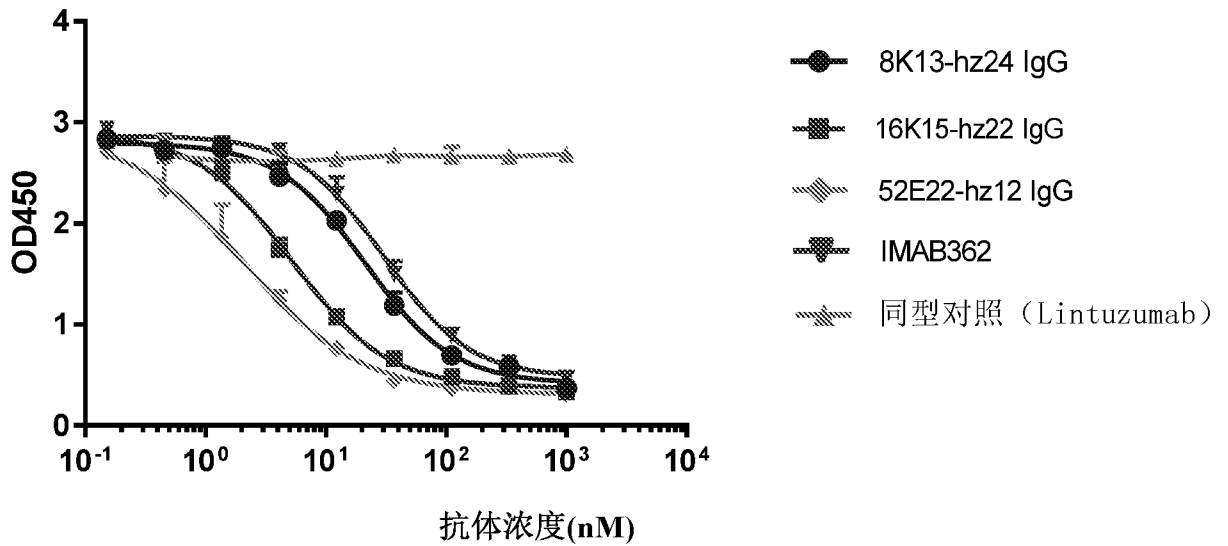
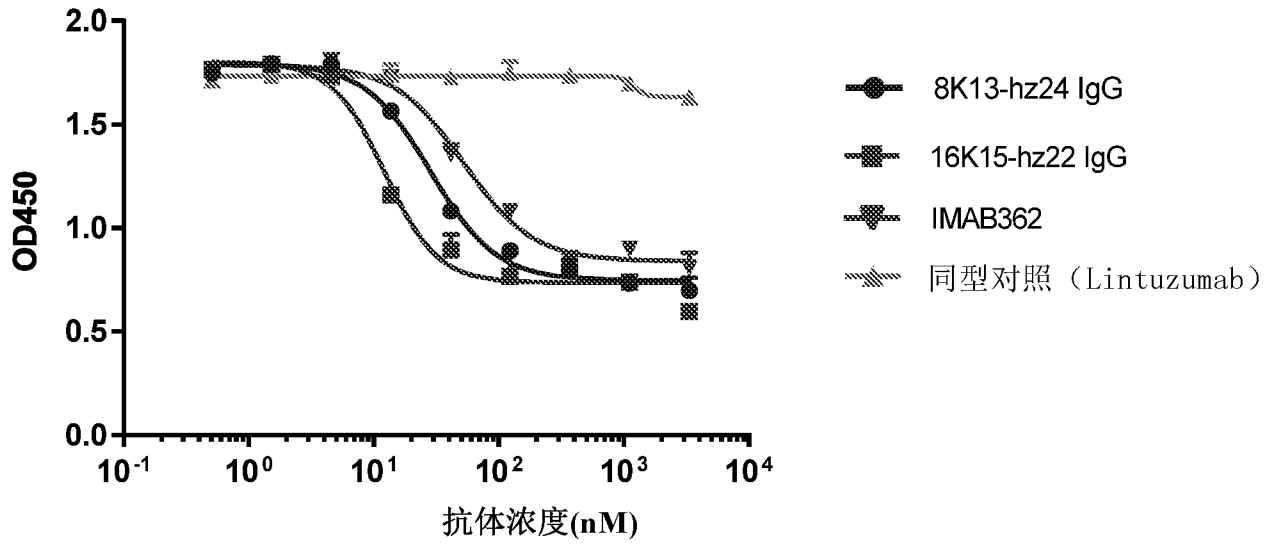


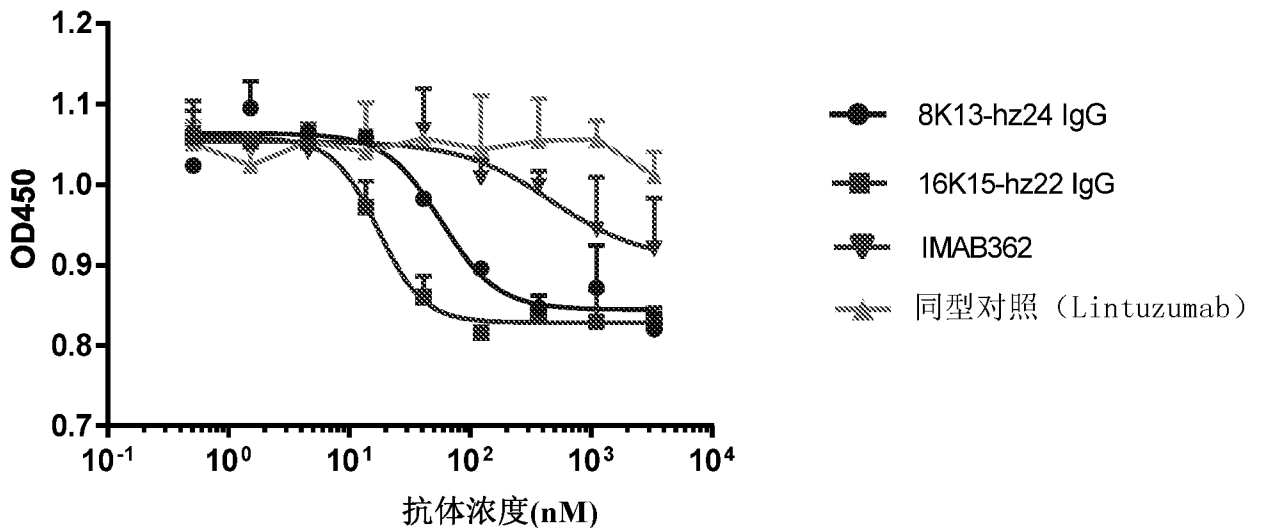
图 1



2A

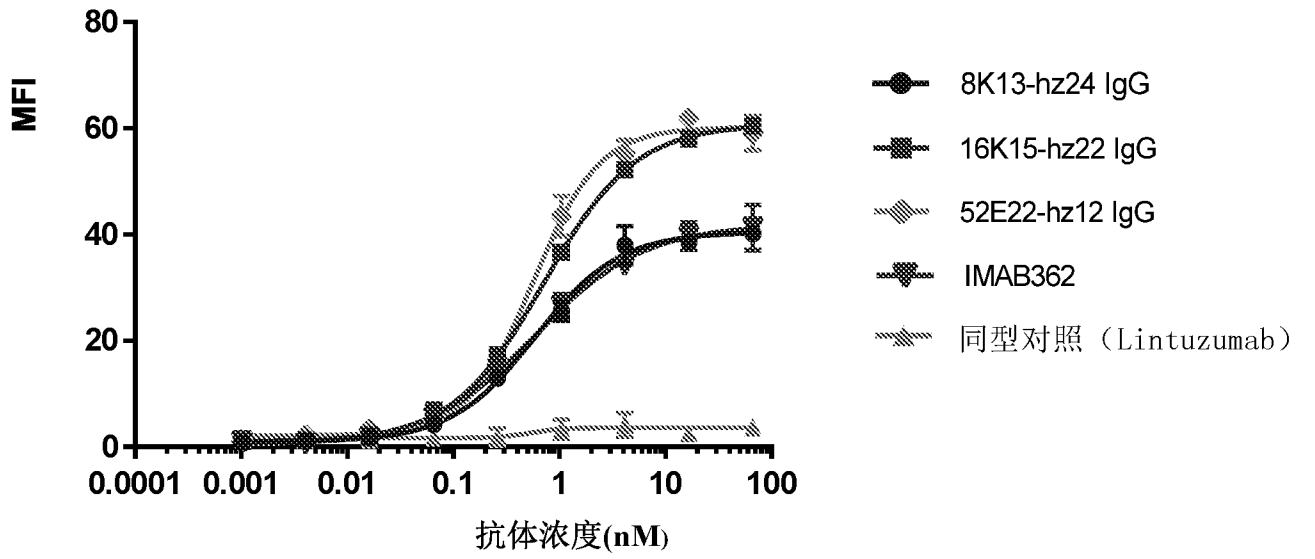


2B

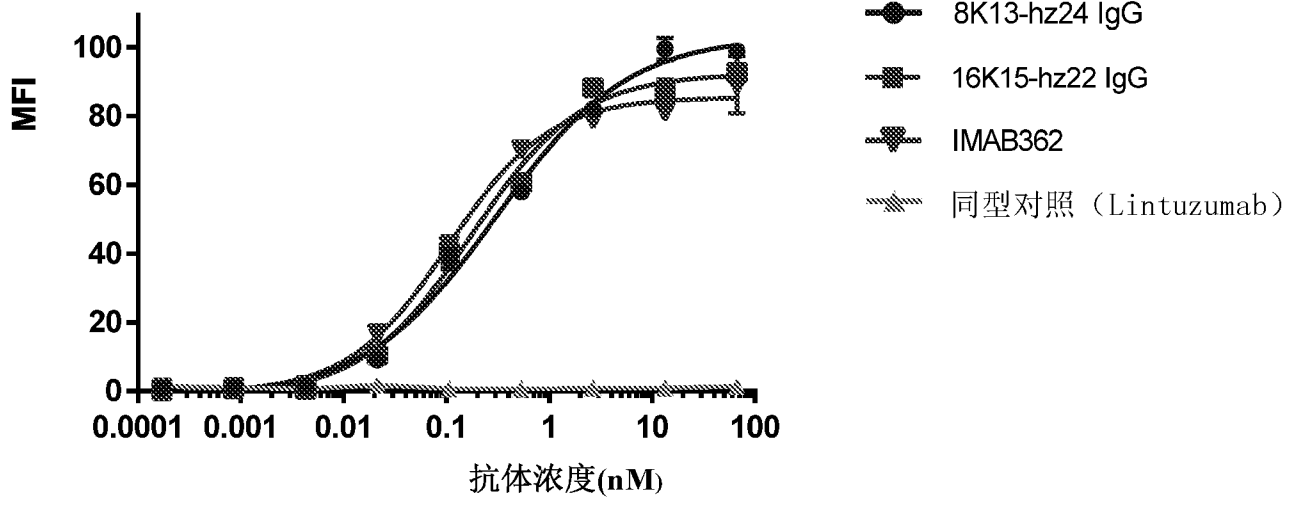


2C

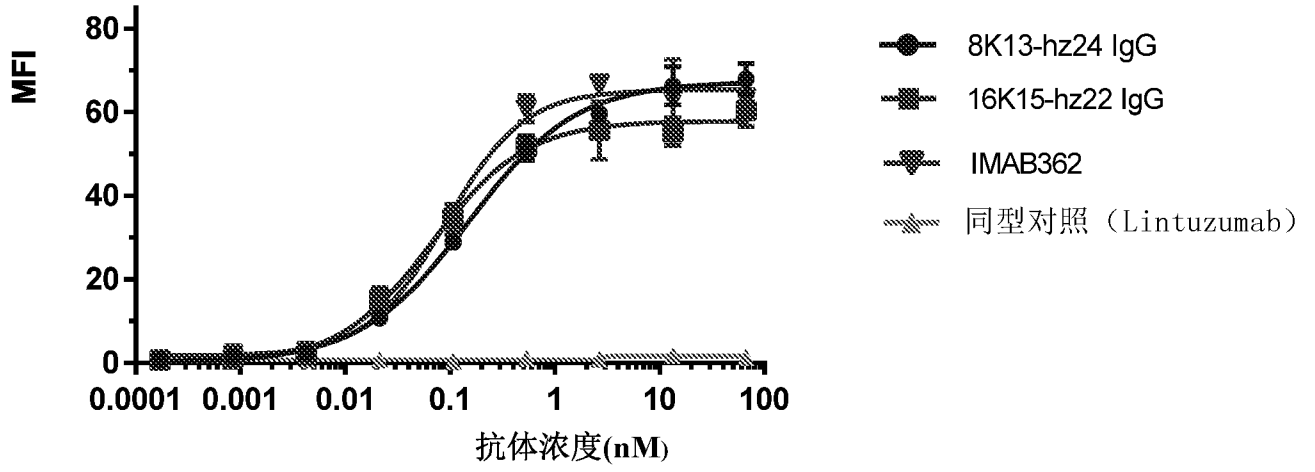
图 2



3A



3B



3C

图 3

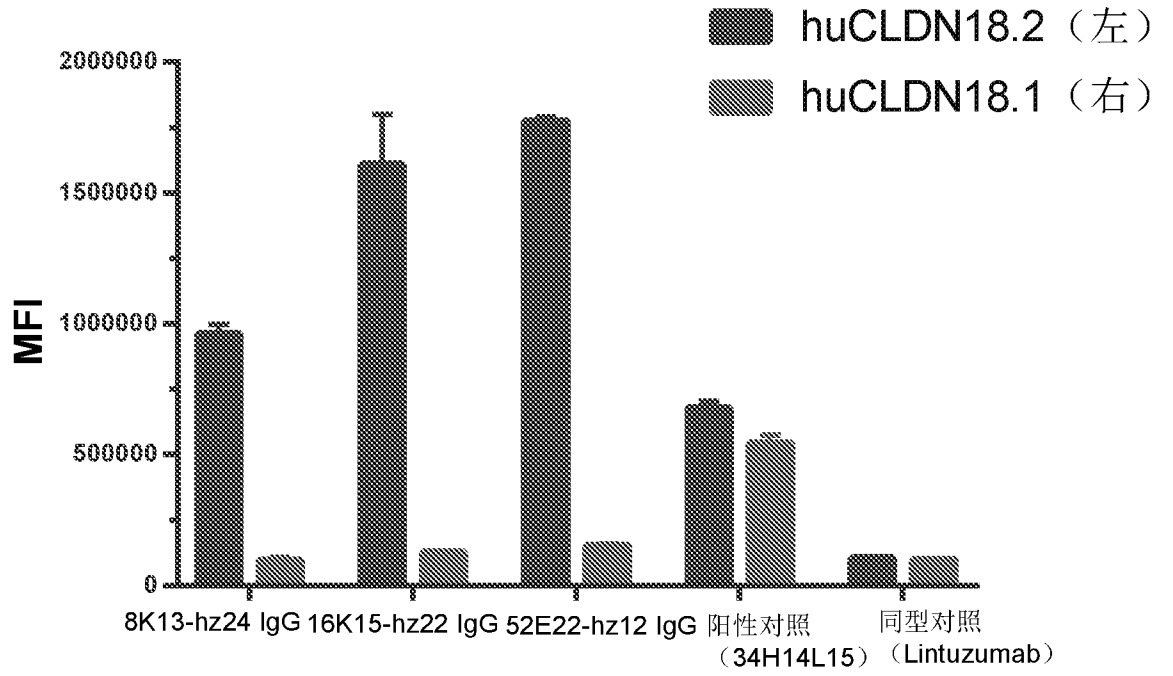


图 4

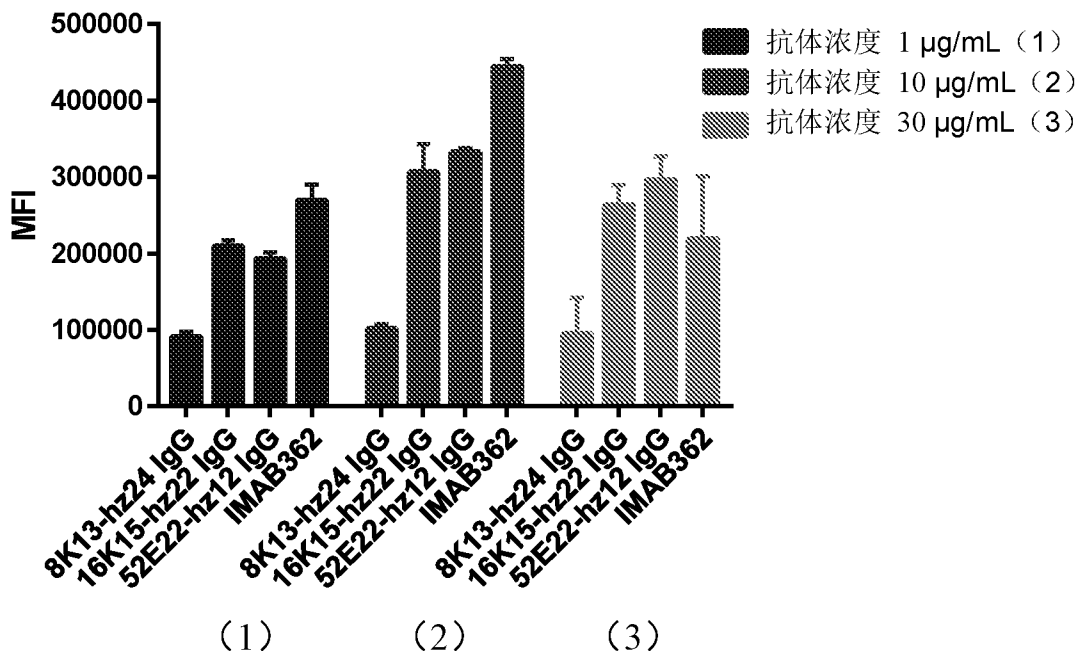


图 5

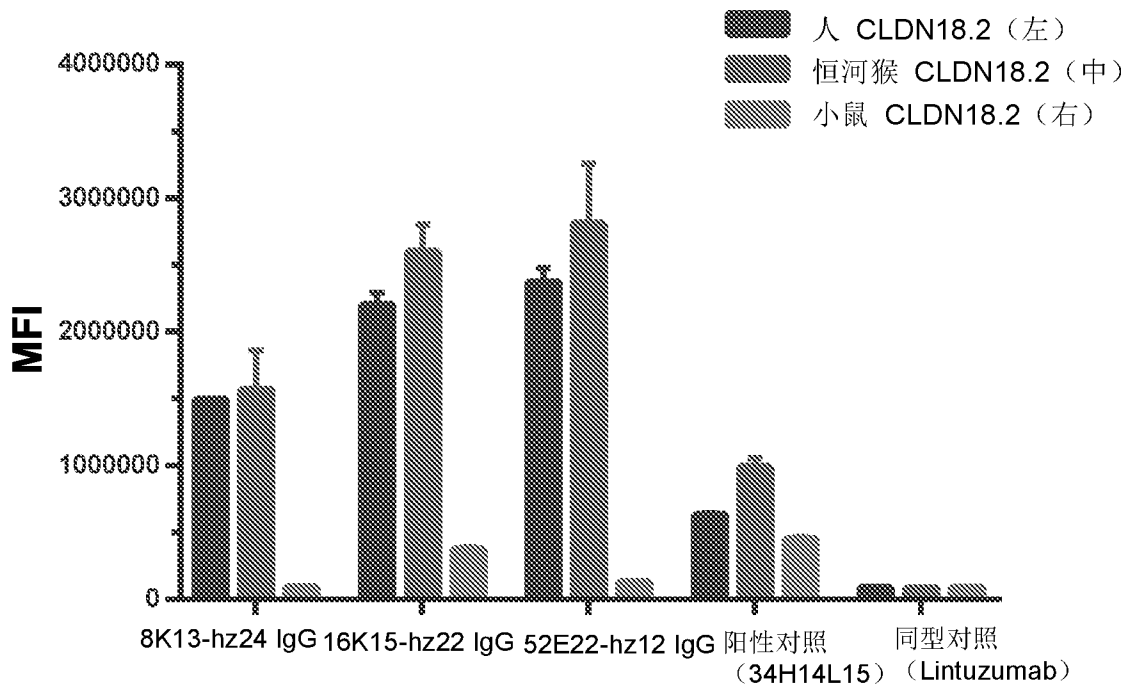


图 6

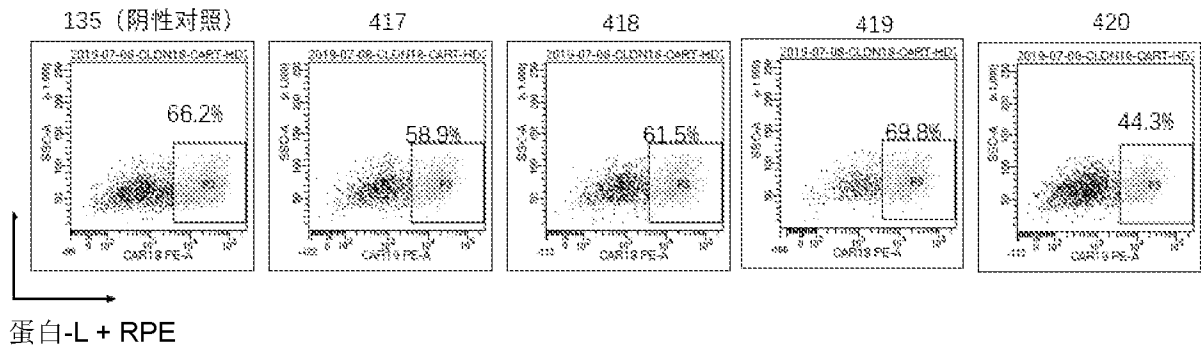


图 7

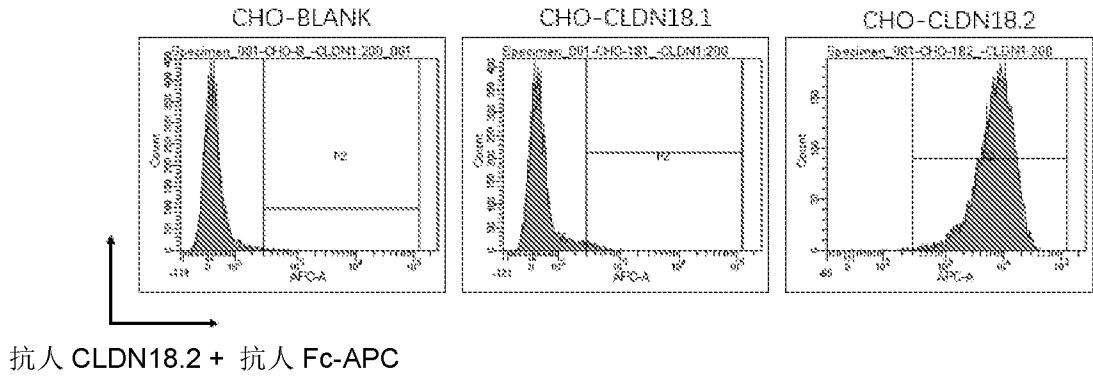


图 8

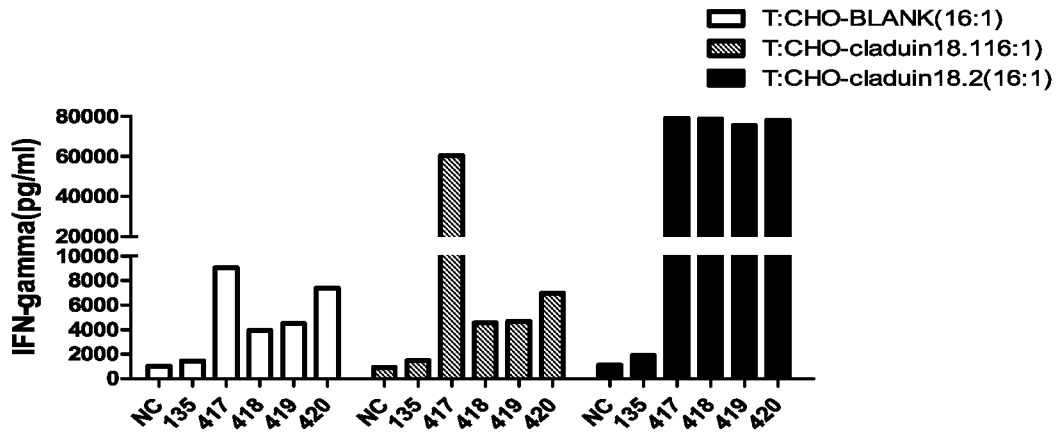


图 9

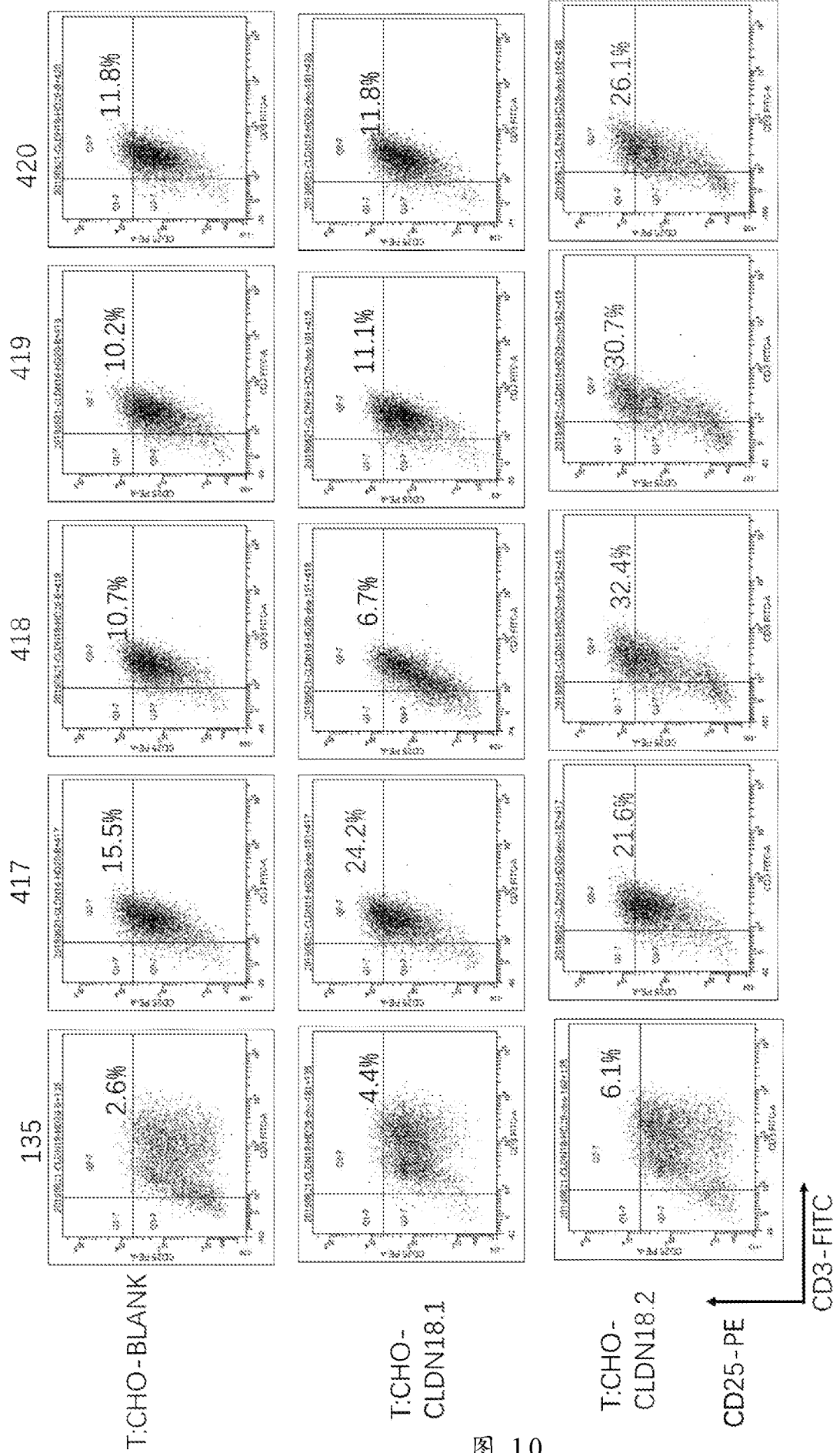


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/118424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
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) C07K; A61K; C12N; A61P; G01N		
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) DWPI; CNABS; CNKI; ISI Web of Science and Keywords: 表面, 细胞, 筛选, 表达, 抗原, 抗体, surface, cell, screen, express +, antigen, antibod???, claudin18.2, 密蛋白, cldn, 密封蛋白, 封闭蛋白, "18.2", claudin?18, claudin, etc. GENBANK; EMBL; STN Registry; 中国专利生物序列检索系统和氨基酸序列 CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM and AMINO ACID SEQUENCE: SEQ ID NO: 1-93, etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107219351 A (GUANGDONG INSTITUTE OF APPLIED BIOLOGICAL RESOURCES) 29 September 2017 (2017-09-29) claim 1	1-5
X	CN 108047331 A (GANYMED PHARMACEUTICALS AG) 18 May 2018 (2018-05-18) the abstract, claims 1-20, and description, paragraphs [0010]-[0080]	6-8, 12-17, 19, 21, 24
A	CN 108047331 A (GANYMED PHARMACEUTICALS AG) 18 May 2018 (2018-05-18) entire description	9-11
X	CN 109762067 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 17 May 2019 (2019-05-17) the abstract, and claims 1-18	6-8, 12-22, 24
A	CN 109762067 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 17 May 2019 (2019-05-17) entire description	9-11
<input 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 "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 17 December 2020		Date of mailing of the international search report 04 January 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

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:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
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.: **23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.

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/CN2020/118424

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	107219351	A	29 September 2017	None	
CN	108047331	A	18 May 2018	EP	2847225 B1 27 November 2019
				US	2018319891 A1 08 November 2018
				WO	2013167259 A1 14 November 2013
				DK	2847225 T3 20 January 2020
				PT	2847225 T 16 January 2020
				NZ	718280 A 27 April 2018
				SI	2847225 T1 31 March 2020
				UA	116445 C2 26 March 2018
				AU	2013258432 B2 01 June 2017
				US	9512232 B2 06 December 2016
				AU	2019222874 A1 19 September 2019
				JP	2018052934 A 05 April 2018
				AR	090973 A1 17 December 2014
				BR	112014026755 B1 16 June 2020
				AU	2017216513 B2 30 May 2019
				IL	235261 D0 31 December 2014
				WO	2013167153 A1 14 November 2013
				US	10053512 B2 21 August 2018
				ZA	201407336 B 27 July 2016
				JP	2015517476 A 22 June 2015
				EP	2847225 A1 18 March 2015
				SG	11201406472W A 27 November 2014
				EP	3666796 A1 17 June 2020
				ES	2763965 T3 01 June 2020
				RU	2661772 C2 19 July 2018
				HR	P20192347 T1 03 April 2020
				NZ	700823 A 29 July 2016
				US	2016333109 A1 17 November 2016
				LT	2847225 T 11 May 2020
				MX	2014013542 A 08 May 2015
				US	2015147763 A1 28 May 2015
				RS	59868 B1 31 March 2020
				AU	2017216513 A1 31 August 2017
				HK	1202557 A1 02 October 2015
				SG	10201606048P A 29 September 2016
				BR	112014026755 A2 11 July 2017
				JP	2019172675 A 10 October 2019
				JP	6232646 B2 22 November 2017
				PL	2847225 T3 18 May 2020
				BR	112014026755 B8 07 July 2020
				KR	20150008095 A 21 January 2015
				MX	369740 B 20 November 2019
				CN	104321345 B 30 March 2018
				AU	2013258432 A1 30 October 2014
				CN	104321345 A 28 January 2015
				RU	2014149332 A 27 June 2016
				CA	2869725 A1 14 November 2013
				JP	6514294 B2 15 May 2019
CN	109762067	A	17 May 2019	EP	3683239 A1 22 July 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/118424

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2020147321 A1	23 July 2020
		US 10421817 B1	24 September 2019
		CN 109762067 B	28 February 2020
<hr/>			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/118424

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(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>C07K; A61K; C12N; A61P; G01N</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>DWPI;CNABS;CNKI;ISI Web of Science和关键词: 表面, 细胞, 筛选, 表达, 抗原, 抗体, surface, cell, screen, express+, antigen, antibod???, claudin18.2, 密蛋白, cldn, 密封蛋白, 封闭蛋白, "18.2", claudin?18, claudin, 等 GENBANK;EMBL;STN Registry;中国专利生物序列检索系统和氨基酸序列: SEQ ID NO: 1-93, 等</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>X</td> <td>CN 107219351 A (广东省生物资源应用研究所) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 权利要求1</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 108047331 A (加尼梅德药物公司) 2018年 5月 18日 (2018 - 05 - 18) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第[0010]-[0080]段</td> <td>6-8, 12-17, 19, 21, 24</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108047331 A (加尼梅德药物公司) 2018年 5月 18日 (2018 - 05 - 18) 说明书全文</td> <td>9-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 109762067 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 说明书摘要, 权利要求1-18</td> <td>6-8, 12-22, 24</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109762067 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 说明书全文</td> <td>9-11</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	X	CN 107219351 A (广东省生物资源应用研究所) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 权利要求1	1-5	X	CN 108047331 A (加尼梅德药物公司) 2018年 5月 18日 (2018 - 05 - 18) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第[0010]-[0080]段	6-8, 12-17, 19, 21, 24	A	CN 108047331 A (加尼梅德药物公司) 2018年 5月 18日 (2018 - 05 - 18) 说明书全文	9-11	X	CN 109762067 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 说明书摘要, 权利要求1-18	6-8, 12-22, 24	A	CN 109762067 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 说明书全文	9-11
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 107219351 A (广东省生物资源应用研究所) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 权利要求1	1-5																		
X	CN 108047331 A (加尼梅德药物公司) 2018年 5月 18日 (2018 - 05 - 18) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第[0010]-[0080]段	6-8, 12-17, 19, 21, 24																		
A	CN 108047331 A (加尼梅德药物公司) 2018年 5月 18日 (2018 - 05 - 18) 说明书全文	9-11																		
X	CN 109762067 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 说明书摘要, 权利要求1-18	6-8, 12-22, 24																		
A	CN 109762067 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 说明书全文	9-11																		
<p><input 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>"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>																				
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2020年 12月 17日	2021年 1月 4日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	贾涛																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(010)-62411993																			

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列表进行的:

a. 作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式

纸件或图形文件形式

b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

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： 23
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1 (iv) ——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
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/CN2020/118424

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)
CN	107219351	A	2017年 9月 29日	无			
CN	108047331	A	2018年 5月 18日	EP	2847225	B1	2019年 11月 27日
				US	2018319891	A1	2018年 11月 8日
				WO	2013167259	A1	2013年 11月 14日
				DK	2847225	T3	2020年 1月 20日
				PT	2847225	T	2020年 1月 16日
				NZ	718280	A	2018年 4月 27日
				SI	2847225	T1	2020年 3月 31日
				UA	116445	C2	2018年 3月 26日
				AU	2013258432	B2	2017年 6月 1日
				US	9512232	B2	2016年 12月 6日
				AU	2019222874	A1	2019年 9月 19日
				JP	2018052934	A	2018年 4月 5日
				AR	090973	A1	2014年 12月 17日
				BR	112014026755	B1	2020年 6月 16日
				AU	2017216513	B2	2019年 5月 30日
				IL	235261	D0	2014年 12月 31日
				WO	2013167153	A1	2013年 11月 14日
				US	10053512	B2	2018年 8月 21日
				ZA	201407336	B	2016年 7月 27日
				JP	2015517476	A	2015年 6月 22日
				EP	2847225	A1	2015年 3月 18日
				SG	11201406472W	A	2014年 11月 27日
				EP	3666796	A1	2020年 6月 17日
				ES	2763965	T3	2020年 6月 1日
				RU	2661772	C2	2018年 7月 19日
				HR	P20192347	T1	2020年 4月 3日
				NZ	700823	A	2016年 7月 29日
				US	2016333109	A1	2016年 11月 17日
				LT	2847225	T	2020年 5月 11日
				MX	2014013542	A	2015年 5月 8日
				US	2015147763	A1	2015年 5月 28日
				RS	59868	B1	2020年 3月 31日
				AU	2017216513	A1	2017年 8月 31日
				HK	1202557	A1	2015年 10月 2日
				SG	10201606048P	A	2016年 9月 29日
				BR	112014026755	A2	2017年 7月 11日
				JP	2019172675	A	2019年 10月 10日
				JP	6232646	B2	2017年 11月 22日
				PL	2847225	T3	2020年 5月 18日
				BR	112014026755	B8	2020年 7月 7日
				KR	20150008095	A	2015年 1月 21日
				MX	369740	B	2019年 11月 20日
				CN	104321345	B	2018年 3月 30日
				AU	2013258432	A1	2014年 10月 30日
				CN	104321345	A	2015年 1月 28日
				RU	2014149332	A	2016年 6月 27日
				CA	2869725	A1	2013年 11月 14日
				JP	6514294	B2	2019年 5月 15日
CN	109762067	A	2019年 5月 17日	EP	3683239	A1	2020年 7月 22日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/118424

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	2020147321	A1	2020年 7月 23日
		US	10421817	B1	2019年 9月 24日
		CN	109762067	B	2020年 2月 28日
<hr/>					