

抗 CLDN6 抗体及其用途

技术领域

本发明涉及疾病治疗及免疫学领域，具体而言，本发明涉及抗 CLDN6 的抗体或其
5 抗原结合片段，编码其的核酸分子，包含其的免疫缀合物、双特异性分子、嵌合抗原
受体及药物组合物，以及它们用于预防和/或治疗肿瘤的用途。

背景技术

卵巢癌 (Ovarian Cancer, OC) 是常见的妇科恶性肿瘤，属于高度异质性的上皮肿
10 瘤，具有不同的组织学亚型以及遗传和生物学特征，包括浆液性癌，子宫内膜样癌，透
明细胞癌和粘液性癌。卵巢癌全球每年新发病例 31 万，死亡超过 20 万例 (5)。75% 的卵
巢癌为浆液性癌，五年生存率 35%，是恶性极强的一类癌症，通常被诊断时已经是晚期。
这一类肿瘤表现出非凡的侵略性，在靶向药物方面，除了抗血管生成疗法已被临床证明
能改善 III-IV 期浆液性卵巢癌患者的无进展生存期外，晚期浆液性卵巢癌最初对铂类化
15 学疗法敏感，但在初始反应后不久会复发，大约 70 - 80% 的病例的主要治疗手段是外科
手术。近年针对卵巢癌发病机理和分子特征的研究为靶向治疗卵巢癌提供了更多的科学
依据和科学见解。90% 的卵巢与 TP53 的自发体细胞突变相关，更为重要的相关是 BRCA1
和 BRCA2 突变，这些突变导致遗传不稳定和同源 DNA 修复的纯合缺陷是细胞恶性转化的
主要原因。这些研究为靶向聚 ADP 核糖聚合酶 (Poly ADP-ribose Polymerase, PARP)
20 药物治疗卵巢癌提供了依据，其实际效果有待临床证明。

密蛋白 (Claudin, CLDN) 属于跨膜蛋白，是位于上皮细胞和内皮细胞紧密连接处的
膜蛋白。CLDN 家族蛋白分布具有组织器官特异性，功能主要为细胞间黏附、维持细胞极
性、调节细胞旁通透性及参与细胞增殖、分化的调节。近年研究表明 CLDN 家族部分成员
在癌变过程表达上调，并在非其正常分布的组织中出现癌变情况下的异位激活，这一性
25 质使得科学家们进一步考虑 CLDN 蛋白作为肿瘤靶点的可能性。2016 年美国临床肿瘤学
会 (ASCO) 上对靶向 CLDN18.2 的单克隆抗体药物 zolbetuximab 的二期临床研究进行了
报道，zolbetuximab 合用化疗显著增加胃癌/胃食管交界腺癌病人的总体生存期和无进
展生存，目前该药物在进行胃癌三期临床和胰腺癌二期临床。靶向 CLDN18.2 药物的成功
进一步增强了科学家对于 CLDN 家族成员作为肿瘤靶点的信心。

30 TCGA 中大量研究数据显示卵巢癌患者的 CLDN6 水平相比正常卵巢组织显著上调，正

常卵巢组织中 CLDN6 水平为 0 TPM (transcripts per million, n=88), 而在卵巢肿瘤中 CLDN6 水平为 31.4 TPM (n=426)。并且 CLDN6 仅在胚胎发育期间高表达, 在正常成人组织中不表达。CLDN6 在正常成人组织中表达最高的是睾丸, 表达水平也仅为 0.83 TPM。除了卵巢癌中的高表达, CLDN6 还在睾丸癌 (159.9 TPM, n=137), 子宫肉瘤 (8.4 TPM, n=57), 和部分子宫内膜癌, 胃癌, 肺癌高表达。研究表明, 子宫内膜癌中 CLDN6 的高表达与多种临床病理因素有关, 并且是独立的预后因素。Kaplan-Meier 分析显示了 CLDN6 高表达组和低表达组的总体生存率和无复发生存率存在显著差异, 高 CLDN6 表达组的 5 年生存率约 30%, 而低表达组的 5 年生存率为 89%。除了子宫内膜癌, CLDN6 的高表达还和胃癌, 尿路上皮癌的预后负相关。正常组织的不表达, 肿瘤组织高表达, 和肿瘤预后负相关使得 CLDN6 成为一个理想的肿瘤靶点。

CLDN6 蛋白是四次跨膜蛋白, 具有四个跨膜疏水区和两个胞外环, 其重组蛋白极难表达, 因而无合适蛋白抗原进行免疫, 给针对 CLDN6 的抗体的免疫和筛选带来难度。另外 CLDN 家族蛋白同源性较高, 靶向 CLDN6 的同时需要注意避免和在正常组织上表达较为广泛的并且和 CLDN6 同源性较高的 CLDN3 和 CLDN4 的结合, 以避免交叉结合可能带来的毒性问题。以上是抗 CLDN6 抗体的研发中的两大难点。

CLDN9 是 CLDN 家族中与 CLDN6 同源性最高的蛋白。TCGA 数据显示 CLDN9 在胰腺上低表达 (4.23 TPM, n=4), 在肾脏上低表达 (1.99 TPM, n=25), 在其他正常组织表达水平中几乎不表达 (表达最高的胆管中表达水平为 0.82 TPM, n=9)。同时 CLDN9 在卵巢癌中表达上调 (5.68 TPM, n=426), 在胆管癌中表达上调 (8.44 TPM, n=36)。

因此, 发展具有更高的特异性、更低的毒副作用的抗 CLDN6 抗体以及抗 CLDN6 和/或抗 CLDN9 抗体是迫切而必要的, 这将给癌症患者提供更多的用药选择。

发明内容

本发明的抗体能够特异性识别/结合人 CLDN6 和/或 CLDN9, 并且能够通过 ADCC 和/或 CDC 来诱导杀伤表达 CLDN6 的细胞 (例如, 肿瘤细胞)。因此, 本发明的抗体具有用于预防和/或治疗肿瘤的潜力, 具有重大的临床价值。

本发明的抗体

因此, 在一个方面, 本发明提供了能够特异性结合 CLDN6 的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 3, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 4 或 33, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 5, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 和/或

10 (b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 6, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 7, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

15 (vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 8, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

20 在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 4 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 5 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 7 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 8 的 VL CDR3; 或者,

25 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 33 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 5 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 7 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 8 的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的
30 框架区序列 (例如, 人免疫球蛋白)。

在某些优选的实施方案中，所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

在某些优选的实施方案中，本发明提供了能够特异性结合 CLDN6 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

5 (a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH)：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：3，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：4，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

10 和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：5，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL)：

15 (iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：6，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：7，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

20 (vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：8，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义。

25 在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，其包含：如下 3 个重链 CDRs：序列为 SEQ ID NO：3 的 VH CDR1，序列为 SEQ ID NO：4 的 VH CDR2，序列为 SEQ ID NO：5 的 VH CDR3；和/或，如下 3 个轻链 CDRs：序列为 SEQ ID NO：6 的 VL CDR1，序列为 SEQ ID NO：7 的 VL CDR2，序列为 SEQ ID NO：8 的 VL CDR3。

30 在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，其进一步包含来源于人的框架区序列（例如，人免疫球蛋白）。

在某些优选的实施方案中，所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段具备以下生物学功能中的一项或多项：

- (a) 以 5 μ g/ml 或更小（例如 3 μ g/ml 或更小）的 EC50 结合人 CLDN6；
- 5 (b) 不结合人 CLDN3、CLDN4 和 CLDN9；
- (c) 通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞（例如肿瘤细胞，如表达 CLDN6 的肿瘤细胞）；
- (d) 通过补体依赖的细胞毒性（CDC）来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞（例如肿瘤细胞，如表达 CLDN6 的肿瘤细胞）；
- 10 (e) 在受试者中预防和/治疗肿瘤（例如，表达 CLDN6 的肿瘤）。

在一个示例性实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- (a) 重链可变区（VH），其包含选自下列的氨基酸序列：
 - (i) SEQ ID NO: 1 所示的序列；
 - (ii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加
 - 15 （例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或
 - (iii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；
 - 和/或，
- 20 (b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：
 - (iv) SEQ ID NO: 2 所示的序列；
 - (v) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或
 - (vi) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、
 - 25 至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 1 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的 VL。

在某些优选的实施方案中，本发明提供了能够特异性结合 CLDN6 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH)：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：3，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：33，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，
和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：5，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；
和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL)：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：6，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：7，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：8，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，其包含：如下 3 个重链 CDRs：序列为 SEQ ID NO：3 的 VH CDR1，序列为 SEQ ID NO：33 的 VH CDR2，序列为 SEQ ID NO：5 的 VH CDR3；和/或，如下 3 个轻链 CDRs：序列为 SEQ ID NO：6 的 VL CDR1，序列为 SEQ ID NO：7 的 VL CDR2，序列为 SEQ ID NO：8 的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，其进一步包含来源于人的框架区序列（例如，人免疫球蛋白）。

在某些优选的实施方案中，所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

在一个示例性实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 19 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 19 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

5 (iii) 与 SEQ ID NO: 19 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列;

和/或,

(b) 轻链可变区 (VL), 其包含选自下列的氨基酸序列:

10 (iv) SEQ ID NO: 20 所示的序列;

(v) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、
15 或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 具有如 SEQ ID NO: 19 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 20 所示的序列的 VL。

20 在另一个方面, 本发明提供了能够特异性结合 CLDN6 和/或 CLDN9 的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

25 (ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14 或 23, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列;

30 和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 16 或 24, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

5 (v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 18, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列。

10 在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链
15 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 13 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 14 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 16 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 17 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 18 的 VL CDR3; 或者,

所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 13 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 23 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR3; 和
20 /或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 24 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 17 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 18 的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的框架区序列 (例如, 人免疫球蛋白)。

在某些优选的实施方案中, 所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

25

在某些优选的实施方案中, 本发明提供了能够特异性结合 CLDN6 和/或 CLDN9 的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与其相比具有一个或几个氨
30 基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 16, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 18, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 13 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 14 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 16 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 17 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 18 的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的框架区序列 (例如, 人免疫球蛋白)。

在某些优选的实施方案中, 所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段具备以下生物学功能中的一项或多项:

(a) 以 5 μ g/ml 或更小 (例如 3 μ g/ml 或更小) 的 EC₅₀ 结合人 CLDN6;

(b) 不结合人 CLDN3 和 CLDN4;

(c) 通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞

(例如肿瘤细胞, 如表达 CLDN6 的肿瘤细胞);

(d) 通过补体依赖的细胞毒性 (CDC) 来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞 (例如肿瘤细胞, 如表达 CLDN6 的肿瘤细胞);

(e) 在受试者中预防和/治疗肿瘤 (例如, 表达 CLDN6 的肿瘤)。

5 在一个示例性实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 11 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 11 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

10 (iii) 与 SEQ ID NO: 11 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列;

和/或,

(b) 轻链可变区 (VL), 其包含选自下列的氨基酸序列:

15 (iv) SEQ ID NO: 12 所示的序列;

(v) 与 SEQ ID NO: 12 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 12 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、
20 或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 具有如 SEQ ID NO: 11 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 12 所示的序列的 VL。

25 在某些优选的实施方案中, 本发明提供了能够特异性结合 CLDN6 和/或 CLDN9 的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

30 (ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, 或与其相比具有一个或几个氨

氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，
和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：15，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

5 和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区（CDR）的轻链可变区（VL）：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：24，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：17，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，
10 和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：18，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

15 在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，其包含：如下 3 个重链 CDRs：序列为 SEQ ID NO：13 的 VH CDR1，序列为 SEQ ID NO：23 的 VH CDR2，序列为
20 SEQ ID NO：15 的 VH CDR3；和/或，如下 3 个轻链 CDRs：序列为 SEQ ID NO：24 的 VL CDR1，序列为 SEQ ID NO：17 的 VL CDR2，序列为 SEQ ID NO：18 的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，其进一步包含来源于人的框架区序列（例如，人免疫球蛋白）。

在某些优选的实施方案中，所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

25 在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段具备以下生物学功能中的一项或多项：

(a) 以 5 μ g/ml 或更小（例如 3 μ g/ml 或更小）的 EC50 结合人 CLDN6；

(b) 不结合人 CLDN3 和 CLDN4；

(c) 通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞
30 （例如肿瘤细胞，如表达 CLDN6 的肿瘤细胞）；

(d) 通过补体依赖的细胞毒性 (CDC) 来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞 (例如肿瘤细胞, 如表达 CLDN6 的肿瘤细胞);

(e) 在受试者中预防和/治疗肿瘤 (例如, 表达 CLDN6 的肿瘤)。

在一个示例性实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

5 (a) 重链可变区 (VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 9 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 9 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

10 (iii) 与 SEQ ID NO: 9 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列;

和/或,

(b) 轻链可变区 (VL), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(iv) SEQ ID NO: 10 所示的序列;

15 (v) 与 SEQ ID NO: 10 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 10 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

20 在某些优选的实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 具有如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 10 所示的序列的 VL。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

25 在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含来源于人免疫球蛋白的重链可变区 (VH) 构架区 (FR), 和/或所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含来源于人免疫球蛋白的轻链可变区 (VL) 构架区 (FR)。在此类实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区 FR 和/或轻链可变区 FR 可以包含一个或多个非人源 (例如, 鼠源) 氨基酸残基, 例如所述重链构架区 FR 和/或轻链构架区 FR 可以包含一或多个氨基酸回复
30 突变, 在这些回复突变中有相应的鼠源氨基酸残基。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区 (CH) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）；和

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区 (CL) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的保守置换）。

在某些优选的实施方案中，所述重链恒定区是 IgG 重链恒定区，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 21 所示的重链恒定区 (CH)。

在某些优选的实施方案中，所述轻链恒定区是 κ 或 λ 轻链恒定区。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 22 所示的轻链恒定区 (CL)。

在某些优选的实施方案中，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、双抗体 (diabody) 和单域抗体 (sdAb)；和/或，所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

在本发明中，本发明的抗体或其抗原结合片段可以包括这样的变体，所述变体与其所源自的抗体或其抗原结合片段相比差异仅在于一个或多个（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换）氨基酸残基的保守置换，或者与其所源自的抗体或其抗原结合片段具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性，且基本保留了其所源自的抗体或其抗原结合片段的上述生物学功能。

抗体的制备

本发明的抗体可以本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 PCR 扩增获得编码本发明抗体的重链和轻链基因的 DNA 分子。将所得 DNA 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的抗体。

本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得（参见 Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)）。另外，这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab' 片段可以直接从宿主细胞中获得；可以将 Fab' 片段化学偶联形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。另外，Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

因此，在另一个方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，其包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区的核苷酸序列。在某些优选的实施方案中，所述分离的核酸分子编码本发明的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区。

在另一个方面，本发明提供了一种载体（例如克隆载体或表达载体），其包含本发明的分离的核酸分子。在某些优选的实施方案中，本发明的载体是例如质粒，粘粒，噬菌体等。在某些优选的实施方案中，所述载体能够在受试者（例如哺乳动物，例如人）体内表达本发明的抗体或其抗原结合片段。

在另一个方面，本发明提供了一种宿主细胞，其包含本发明的分离的核酸分子或本发明的载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如大肠杆菌细胞，以及真核细胞例如酵母细胞，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。在某些优选的实施方案中，本发明的宿主细胞是哺乳动物细胞，例如 CHO（例如 CHO-K1、CHO-S、CHO DG44）。

在另一个方面，提供了制备本发明的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养本发明的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

衍生的抗体

本发明的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化，例如被连接至另一个分子（例如另一个多肽或蛋白）。通常，抗体或其抗原结合片段的衍生化（例如，标记）不会不利影响其对 CLDN6 和/或 CLDN9（特别是人 CLDN6 和/或人 CLDN9）的结合。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如，可以将本发明的抗体或其抗原

结合片段功能性连接（通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它方式）于一个或多个其它分子基团，例如另一个抗体（例如，形成双特异性抗体），检测试剂，药用试剂，和/或能够介导抗体或抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多组氨酸标签）。此外，本发明的抗体或其抗原结合片段还可以用化学基团进行衍生，
5 例如聚乙二醇（PEG），甲基或乙基，或者糖基。这些基团可用于改善抗体的生物学特性，例如增加血清半衰期。

因此，在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段带有标记。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记，例如酶、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。本发明所述的可检测的
10 标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的，其实例包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）、藻红蛋白（PE）、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750））、发光物质（例如化学发光物质，如吖啶酯类化合物）、磁珠
15 （例如，Dynabeads[®]）、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。教导该标记物的使用的专利包括，但不限于，美国专利 3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及 4,366,241（全部通过引用并入本文）。如上所述的可检测的标记可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测，及测热
20 标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中，此类标记能够适用于免疫学检测（例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等）。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头（linker）将如上所述的可检测的标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。

双特异性或多特异性分子

本发明的抗体或其抗原结合片段可用于形成双特异性或多特异性分子。本发明的
30 抗体或其抗原结合片段可以是双特异性或多特异性分子的一部分，所述双特异性或多

特异性分子包含具有不同于本发明的抗体或其抗原结合片段的结合特异性的第二功能模块（例如第二抗体），从而能够结合至少两个不同的结合位点和/或靶分子。例如，本发明的抗体或其抗原结合片段可连接至能够特异性结合可用作联合治疗的潜在靶标的任何蛋白质的第二抗体或其抗原结合片段。为产生所述双特异性或多特异性分子，

5 可以将本发明的抗体或其抗原结合片段连接（例如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式）至一个或多个其他结合分子（例如另外的抗体、抗体片段、肽或结合模拟物）。

因此，在另一个方面，本发明提供了一种双特异性或多特异性分子，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段。

10 在某些优选的实施方案中，所述双特异性或多特异性分子特异性结合 CLDN6，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标。

在某些优选的实施方案中，所述双特异性或多特异性分子还包含至少一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的分子（例如第二抗体）。

15 免疫缀合物

本发明的抗体或其抗原结合片段可以与治疗剂连接以形成免疫缀合物。由于免疫缀合物具有选择性递送一种或多种治疗剂至靶组织（例如与肿瘤相关的抗原，如表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤）的能力，因此，免疫缀合物可以提高本发明的抗体或其抗原结合片段在治疗疾病（例如癌症）中的治疗效力。

20 因此，在另一个方面，本发明提供了免疫缀合物，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段以及连接于所述抗体或其抗原结合片段的治疗剂。

在某些优选的实施方案中，所述免疫缀合物是抗体-药物偶联物 (ADC)。

在某些优选的实施方案中，所述治疗剂是细胞毒剂。在本发明中，所述细胞毒剂包括对细胞有害（例如杀伤细胞）的任何试剂。

25 在某些优选的实施方案中，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合。

可用于本发明的免疫缀合物的烷化剂的实例包括但不限于氮芥类（如双氯乙基甲胺、苯丁酸氮芥、美法仑、环磷酰胺等）、乙烯亚胺类（如塞替派等）、硫酸酯及多元醇类（如白消安、二溴甘露醇）、亚硝基脲类（如卡莫司汀、洛莫司汀等）、铂类抗肿瘤剂

30 （如顺铂、奥沙利铂、卡铂等）等。

可用于本发明的免疫缀合物的有丝分裂抑制剂的实例包括但不限于美登素类（例如美登素、美登醇、美登醇的 C-3 酯等）、紫杉烷类（例如多西他赛、紫杉醇或纳米颗粒紫杉醇等）、长春花生物碱类（例如硫酸长春地辛、长春新碱、长春花碱或长春瑞滨等）

可用于本发明的免疫缀合物的抗肿瘤抗生素的实例包括但不限于放线菌素、蒽环类
5 抗生素（例如柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星等）、卡利奇霉素、倍癌霉素等。

可用于本发明的免疫缀合物的抗代谢物的实例包括但不限于叶酸拮抗剂（例如甲氨蝶呤等）、嘧啶拮抗剂（例如 5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、卡培他滨、吉西他滨等）、嘌呤拮抗剂（例如 6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤等）、腺苷脱氨酶抑制剂（例如克拉屈滨、氟达拉滨、奈拉滨、喷司他丁等）。

10 可用于本发明的免疫缀合物的拓扑异构酶抑制剂的实例包括但不限于（喜树碱类及其衍生物（例如伊立替康、托泊替康等）、安吡啶、道诺霉素、阿霉素、表鬼臼毒素类、玫瑰树碱类、表柔比星、依托泊苷、丙亚胺、替尼泊苷等。

可用于本发明的免疫缀合物的酪氨酸激酶抑制剂的实例包括但不限于阿西替尼、博舒替尼、西地尼布、达沙替尼、厄洛替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、来妥替尼、
15 尼洛替尼、司马沙尼、舒尼替尼、凡德他尼等。

可用于本发明的免疫缀合物的放射性核素剂的实例包括但不限于 I^{131} 、 In^{111} 、 Y^{90} 、 Lu^{177} 等。

在某些实例性实施方案中，所述治疗剂选自铂类抗肿瘤剂、蒽环类抗生素、紫杉烷类化合物、核苷类似物、喜树碱类化合物，及其类似物或同系物，及其任意组合。

20 在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段任选地通过接头与所述治疗剂缀合。

在本发明中，使用本领域现有的接头技术可以将细胞毒剂偶联至本发明的抗体或其抗原结合片段。已经用于将细胞毒剂偶联至抗体的接头类型的实例包括但不限于脲、硫醚、酯、二硫化物和含肽的接头。可以选择例如易于在溶酶体隔室内被低 pH 切割或易于
25 被蛋白酶（例如优先在肿瘤组织中表达的蛋白酶，如组织蛋白酶，诸如组织蛋白酶 B、C、D）切割的接头。

关于细胞毒剂的类型、接头及将治疗剂偶联至抗体的方法的进一步讨论还可参见 Saito, G. 等人(2003)Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail, P. A. 等人(2003)Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne, G. (2003)Cancer Cell 3: 207-212; Allen, T. M. (2002)Nat. Rev. Cancer 2: 750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002)Curr. O
30

pin. Investig. Drugs 3: 1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264.

嵌合抗原受体

5 本发明的抗体或其抗原结合片段可用于构建嵌合抗原受体(CAR)，所述 CAR 包含特异性结合 CLDN6 和/或 CLDN9 的、与跨膜结构域连接的、与一个或多个细胞内 T 细胞信号结构域连接的细胞外抗原结合结构域（例如，scFv）。所述细胞内 T 细胞信号结构域可包括，例如 T 细胞受体信号结构域、T 细胞共刺激信号结构域或其组合。T 细胞受体信号结构域是指 CAR 中包含 T 细胞受体的细胞内结构域（例如 CD3 ζ 蛋白的细胞内部分）的部分。共刺激信号结构域是指 CAR 中包含共刺激分子的细胞内结构域的部分，所述共刺激分子是除了淋巴细胞对抗原的高效应答所需的抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。

本发明的 CAR 的特征包括其以非 MHC 限制的方式将 T-细胞特异性和反应性指向表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的细胞（例如肿瘤细胞）的能力。非 MHC 限制的 CLDN6 和/或 CLDN9 识别能力赋予表达本发明的 CAR 的 T 细胞独立于抗原加工而识别抗原的能力。

15 因此，在另一个方面，本发明提供了一种嵌合抗原受体(CAR)，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域。

在某些优选的实施方案中，所述抗原结合结构域包含本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，所述抗原结合结构域是 scFv。

20 在某些优选的实施方案中，所述抗原结合受体包含本发明抗体的抗原结合片段（例如 scFv）。

在某些优选的实施方案中，所述抗原结合受体由免疫效应细胞（例如 T 细胞）所表达。

在某些优选的实施方案中，在所述 CAR 的抗原结合结构域与跨膜结构域之间，可存在包含多肽序列的间隔结构域。所述间隔结构域可包含多达 300 个氨基酸，优选 10 至 100 个氨基酸，并且最优选 25 至 50 个氨基酸。在一些实施方案中，所述间隔结构域可包含免疫球蛋白结构域，例如人免疫球蛋白序列。在某些示例性实施方案中，所述免疫球蛋白结构域包含免疫球蛋白 CH2 和 CH3 结构域序列。在此类实施方案中，不受特定理论的约束，认为 CH2 和 CH3 结构域使所述 CAR 的抗原结合结构域从表达 CAR 的细胞的膜延伸出去，并且可更精确地模拟天然 TCR 的大小和结构域结构。

30

在某些优选的实施方案中，所述跨膜结构域可衍生自天然来源或合成来源。在此类实施方案中，所述结构域可衍生自任何膜结合的或跨膜的蛋白质。可用于本发明的 CAR 中的示例性跨膜结构域可包含至少 T 细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链的跨膜区，所述 T 细胞受体可以选自 CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、
5 CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。或者，所述跨膜结构域可为合成的，在这种情况下，其将主要包含疏水残基例如亮氨酸和缬氨酸。

在某些示例性实施方案中，所述跨膜结构域包含 T 细胞受体的跨膜结构域，例如 CD8 跨膜结构域。

在某些示例性实施方案中，所述跨膜结构域包含 T 细胞共刺激分子（例如 CD137 或
10 CD28）的跨膜结构域。

在某些优选的实施方案中，可用于在所述 CAR 中使用的细胞内 T 细胞结构域的实例包括 T 细胞受体 (TCR) 的胞质序列和共刺激分子，所述 T 细胞受体 (TCR) 的胞质序列和共刺激分子在抗原受体接合后协力启动信号转导，以及这些序列和任何具有相同功能性能力的合成序列的任何衍生物或变体。

在某些优选的实施方案中，所述 CAR 的细胞内区可包含以刺激的方式起作用的初级胞质信号序列，其可包含被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或 ITAM 的信号基序。可包含于所述 CAR 中的包含初级胞质信号序列的 ITAM 的实例包括来自 CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CDS、CD22、CD79a、CD79b、和 CD66d 蛋白的那些。

在某些优选的实施方案中，所述 CAR 的细胞内区可包含含有初级胞质信号结构域（例如 CD3 ζ ）本身或与可用于 CAR 的环境中的任何其他期望的胞质结构域组合的 ITAM。例如，所述 CAR 的胞质结构域包含 CD3 ζ 链部分和细胞内共刺激信号结构域。所述共刺激信号结构域是指所述 CAR 的包含共刺激分子的细胞内结构域的部分。共刺激分子是除了淋巴细胞对抗原的高效应答所需的抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。这样的分子的实例包括 CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细
25 胞功能相关抗原 1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C 和 B7-H3。

在某些优选的实施方案中，所述 CAR 可包含 CD3 ζ 信号结构域、CD8 信号结构域、CD28 信号结构域、CD137 信号结构域或其任意组合。所述一个或多个 T 细胞信号结构域在 CAR 上的顺序可由本领域技术人员根据需要而改变。

30 生成嵌合抗原受体、包含这样的受体的 T 细胞的方法以及它们的用途（例如，用于治

疗癌症)是本领域已知的,其详细描述可参见,例如,Brentjens 等人,2010, Molecular Therapy, 18:4,666-668; Morgan 等人,2010, Molecular Therapy, published online February 23, 2010, 第 1-9 页; Till 等人,2008, Blood, 112:2261-2271; Park 等人, Trends Biotechnol., 29:550-557, 2011; Grupp 等人, NEnglJMed., 368:1509-1518, 2013; Han 等人, J.Hematol Oncol., 6:47, 2013; PCT 专利公开文本 W02012/079000、W02013/126726; 和 U.S. 专利公开文本 2012/0213783, 其全部通过引用整体并入本文)。例如,可将编码本发明的嵌合抗原结合受体的核酸分子包含于用于在宿主细胞例如 T 细胞中表达的表达载体(例如,慢病毒载体)中,以制造所述 CAR。在某些实施例性实施方案中,使用所述嵌合抗原受体的方法包括从受试者分离 T 细胞,采用编码嵌合抗原受体的表达载体(例如慢病毒载体)转化 T 细胞,以及将表达所述嵌合抗原受体的工程化的 T 细胞施用至所述受试者以进行治疗,例如用于治疗所述受试者中的肿瘤。

因此,在另一个方面,本发明提供了一种分离的核酸分子,其包含编码本发明的嵌合抗原受体的核苷酸序列。在某些优选的实施方案中,所述分离的核酸分子编码本发明的嵌合抗原受体。

在另一个方面,本发明提供了一种载体(例如克隆载体或表达载体),其包含如上所述的分离的核酸分子。在某些优选的实施方案中,本发明的载体例如是质粒。

在另一个方面,本发明提供了一种宿主细胞,其包含如上所述的分离的核酸分子或载体。在某些优选的实施方案中,所述宿主细胞是 T 细胞。在某些优选的实施方案中,所述宿主细胞是嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)。

治疗方法和药物组合物

本发明的抗体或其抗原结合片段可通过结合 CLDN6 和/或 CLDN9 诱导 ADCC 和/或 CDC 从而杀伤细胞,从而能够用于预防和/或治疗肿瘤。

因此,在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其含有本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、或免疫缀合物,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些优选的实施方案中,所述药物组合物还可以包含另外的药学活性剂。

在某些优选的实施方案中,所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物,例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂(例如吉西他滨、5-氟尿嘧啶、紫杉烷、顺铂等)、

抗血管生成剂、细胞因子（例如 GM-CSF、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21 等）、分子靶向药物（例如，CD20 抗体如利妥昔单抗、Her2 抗体如曲妥珠单抗、VEGF 抗体如贝伐珠单抗、EGFR 抗体如西妥昔单抗等）、免疫检查点抑制剂（例如，PD-1 抗体、PD-L1 抗体、CTLA-4 抗体、LAG-3 抗体等）、溶瘤病毒等。

- 5 在某些优选的实施方案中，在所述药物组合物中，本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、或免疫缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、或免疫缀合物与所述另外的药学活性剂可以同时、分开或相继施用。

- 在某些示例性实施方案中，所述药物组合物包含无菌可注射液（如水性或非水性悬浮液或溶液）。在某些示例性实施方案中，此类无菌可注射液选自注射用水(WFI)、
10 抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液（例如 0.9% (w/v) NaCl）、葡萄糖溶液（例如 5%葡萄糖）、含有表面活性剂的溶液（例如 0.01%聚山梨醇 20）、pH 缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲溶液）、Ringer 氏溶液及其任意组合。

- 15 在另一个方面，本发明提供了一种降低 CLDN6 和/或 CLDN9 在细胞表面的表达水平的方法，其包括将所述细胞与本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、或药物组合物接触，使得 CLDN6 和/或 CLDN9 在所述细胞表面的表达水平降低；其中，所述细胞在其表面表达 CLDN6 和/或 CLDN9。

在某些优选的实施方案中，所述细胞是表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞。

- 20 在某些优选的实施方案中，所述方法用于在体外降低 CLDN6 和/或 CLDN9 在细胞表面的表达水平用于非诊断目的。

在另一个方面，提供了本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、或药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于降低 CLDN6 和/或 CLDN9 在细胞表面的表达水平。

- 25 在另一个方面，提供了本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、或药物组合物，其用于降低 CLDN6 和/或 CLDN9 在细胞表面的表达水平。

- 在另一个方面，本发明提供了一种抑制表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞的方法，其包括将所述肿瘤细胞与有效量的本发明的抗体或其抗原
30 结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达

所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T））接触。

所述方法可以用于治疗目的，或者非治疗目的。在某些优选的实施方案中，所述方法可以用于非治疗目的，所述方法用于在体外抑制表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞。

- 5 在另一个方面，提供了本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T））在制备药物中的用途，所述药物用于抑制表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞。

- 10 在另一个方面，提供了本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）），其用于抑制表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞。

- 15 在另一个方面，本发明提供了一种用于在受试者（例如人）中预防和/或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T））。

在某些优选的实施方案中，所述肿瘤涉及表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞。在某些优选的实施方案中，所述 CLDN6 和/或 CLDN9 在所述肿瘤细胞表面上表达。

- 20 在某些优选的实施方案中，所述肿瘤表达 CLDN6 和/或 CLDN9。

在某些优选的实施方案中，所述肿瘤选自卵巢癌、睾丸癌、胃癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌及其转移癌（例如，胃癌转移，如 Krukenberg 瘤、腹膜转移或淋巴结转移）。

- 25 在某些优选的实施方案中，将本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T））与另外的具有抗肿瘤活性的药物联合使用。这种另外的具有抗肿瘤活性的药物可以在施用所述抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 CAR-T）之前、同时或之后施用。

- 30 在某些优选的实施方案中，将本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特

性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 CAR-T）与额外的疗法组合施用。这种额外的疗法可以是已知用于肿瘤的任何疗法，例如手术、化学治疗、放射治疗、靶向治疗、免疫治疗、激素治疗、基因治疗或姑息治疗。这种额外的疗法可以在施用本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 CAR-T）之前、同时或之后施用。

本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 T 细胞）可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式 and 治疗用途。本发明的药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的抗体，以及任选地，同时掺入其他期望的成分（包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合），随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂（例如，通过真空干燥或冷冻干燥）以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如注射用水（WFI）、抑菌性注射用水（BWF1）、氯化钠溶液（例如 0.9% (w/v) NaCl）、葡萄糖溶液（例如 5%葡萄糖）、含有表面活性剂的溶液（例如 0.01%聚山梨醇 20）、pH 缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲溶液）、Ringer 氏溶液及其任意组合。

此外，本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 T 细胞）可以以单位剂量形式存在于药物组合物中，以便于施用。

本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 T 细胞）可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部（如，粉剂、药膏或滴剂），或鼻腔途径。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药（例如静脉注射或推注，皮下注射，腹膜内注射，肌内注射）。技术人员应理解，给药途径和/

或方式将根据预期目的而发生变化。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 T 细胞）通过静脉注射或推注给予。

5 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物、药物组合物、嵌合抗原受体或表达所述嵌合抗原受体的宿主细胞（例如 T 细胞）。“预防有效量”是指，足以预防，阻止，或延迟疾病的发生的量。“治疗有效量”是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。本发明的抗体或其抗原结合片段的治疗有效量可根据如下因素发生变化：待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

在本发明中，可调整给药方案以获得最佳目的反应（例如治疗或预防反应）。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

在本发明中，所述受试者可以为哺乳动物，例如人。

15

检测方法和试剂盒

本发明的抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 CLDN6 和/或 CLDN9，从而可用于检测 CLDN6 和/或 CLDN9 在样品中的存在或其水平。

因此，在另一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包括本发明的抗体或其抗原结合片段。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。在一个优选的实施方案中，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别本发明的抗体或其抗原结合片段。优选地，所述第二抗体还包括可检测的标记。

在本发明中，所述可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。特别优选的是，此类标记能够适用于免疫学检测（例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等）。这类标记是本领域熟知的，包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）、藻红蛋白（PE）、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750）、发光物质（例如化学发光物质，如吖啶酯类化合物）、磁珠（例如，

30

Dynabeads®)、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。教导该标记物的使用的专利包括，但不限于，美国专利 3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及 4,366,241（全部通过引用并入本

5 文）。本发明中涵盖的标记物可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测，及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头将如上所述的可检测的标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。

10

在另一个方面，本发明提供了检测 CLDN6 和/或 CLDN9 在样品中的存在或其量的方法，其包括以下步骤：

(1) 将所述样品与本发明的抗体或其抗原结合片段接触；

(2) 检测所述抗体或其抗原结合片段与 CLDN6 和/或 CLDN9 之间复合物的形成或检测

15 所述复合物的量。

所述复合物的形成表明存在 CLDN6 和/或 CLDN9 或表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的细胞。

在某些优选的实施方案中，所述样品是细胞样品，即包含细胞（例如肿瘤细胞）的样品。在此类实施方案中，优选地，所述复合物是由所述抗体、抗原结合片段或缀合物与

所述样品中的细胞所表达的 CLDN6 和/或 CLDN9 之间形成的。

20 在一个优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段还带有可检测的标记。

在另一个优选的实施方案中，在步骤(2)中，使用带有可检测的标记的试剂来检测本发明的抗体或其抗原结合片段。

所述方法可以用于诊断目的，或者非诊断目的（例如，所述样品是细胞样品，而非来自患者的样品）。在某些优选的实施方案中，所述 CLDN6 和/或 CLDN9 是人 CLDN6 和/或

25 CLDN9。

在另一个方面，提供了本发明的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 CLDN6 和/或 CLDN9 在样品中的存在或其量。在某些优选的实施方案中，所述 CLDN6 和/或 CLDN9 是人 CLDN6 和/或 CLDN9。

30 在另一个方面，本发明提供了一种用于检测肿瘤是否能够通过靶向 CLDN6 和/或

CLDN9的抗肿瘤疗法来治疗的方法，其包括以下步骤：

- (1) 将含有所述肿瘤细胞的样品与本发明的抗体或其抗原结合片段接触；
- (2) 检测所述抗体或其抗原结合片段与 CLDN6 和/或 CLDN9 之间复合物的形成。

在某些优选的实施方案中，所述复合物是所述抗体或其抗原结合片段与所述样品中的
5 的肿瘤细胞所表达的 CLDN6 和/或 CLDN9 之间形成的。

在某些优选的实施方案中，所述样品来自受试者，所述受试者患有肿瘤、怀疑患有
肿瘤或具有患有肿瘤风险。在某些优选的实施方案中，所述样品来自在组织或器官未患
癌症时其中的细胞基本不表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的组织或器官。在某些优选的实施方案
中，所述组织选自胃组织、肺组织、食管组织、胰腺组织或乳腺组织，并且所述组织任
10 选地已被诊断为被癌症影响，例如通过对所述组织或器官的细胞进行目视检查或培养测
试被诊断。在某些优选的实施方案中，所述组织是除胃组织以外的组织。在某些优选的
实施方案中，所述组织是肺组织、食管组织、胰腺组织或乳腺组织。在此类实施方案中，
当存在 CLDN6 和/或 CLDN9 或表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的细胞，和/或与参照水平相比(例
如与无肿瘤疾病的患者相比)，CLDN6 和/或 CLDN9 或表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的细胞的量
15 增加时，表明所述受试者适于靶向 CLDN6 和/或 CLDN9 的抗肿瘤疗法。

在一个优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段还带有可检测的标记。
在另一个优选的实施方案中，在步骤(2)中，使用带有可检测的标记的试剂来检测本发明
的抗体或其抗原结合片段。

在某些优选的实施方案中，所述 CLDN6 和/或 CLDN9 是人 CLDN6 和/或 CLDN9。

20 在某些优选的实施方案中，所述肿瘤选自卵巢癌、睾丸癌、胃癌、子宫内膜癌、肺
癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆
囊癌及其转移癌(例如，胃癌转移，如 Krukenberg 瘤、腹膜转移或淋巴结转移)。

在另一个方面，提供了本发明的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途，所
述试剂盒用于检测肿瘤是否能够通过靶向 CLDN6 和/或 CLDN9 的抗肿瘤疗法来治疗。

25 在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。

在某些优选的实施方案中，所述 CLDN6 和/或 CLDN9 是人 CLDN6 和/或 CLDN9。

在某些优选的实施方案中，所述肿瘤选自卵巢癌、睾丸癌、胃癌、子宫内膜癌、肺
癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆
囊癌及其转移癌(例如，胃癌转移，如 Krukenberg 瘤、腹膜转移或淋巴结转移)。

30

术语定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、生物化学、核酸化学、免疫学实验室等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本
5 发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“CLDN6 (Claudin 6, 紧密连接蛋白6)”具有本领域技术人员通常理解的含义，其属于密蛋白 (Claudin) 家族，是上皮与内皮的紧密连接内的跨膜蛋白，可能参与细胞自噬。CLDN6的序列均是本领域公知的，可参见NCBI数据库登录号P56747。如本文中所使用的，术语“CLDN9 (Claudin 9, 紧密连接蛋白9)”具有本领域技术人员通常理解的含义，其属于密蛋白 (Claudin) 家族，是上皮与内皮的紧密连接内的跨膜蛋白。CLDN9的序列均是本领域公知的，可参见NCBI数据库登录号
10 095484。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，通常由两对多肽链（每对具有一条轻链 (LC) 和一条重链 (HC)）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ
15 (lambda) 轻链。重链可分类为 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
20 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如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 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个
25 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区 (VH 和 VL) 分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

如本文中所使用的，术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在重链和轻链的可变区中各含有三个 CDR，命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些 CDR 的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义，例如可按照 Kabat 编号系统（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）、Chothia 编号系统（Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883）或 IMGT 编号系统（Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）中的定义。对于给定的抗体，本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的 CDR。并且，不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的（例如，可参见 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）。

在本发明中，本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 优选地通过 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统确定。在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 优选地通过 IMGT 编号系统确定。

如本文中所使用的，术语“构架区（framework region）”或“FR”残基是指，抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG（例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型），IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，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相同抗原的能力，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。抗原结合片段的非限制性实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、互补决定区(CDR)片段、scFv、双抗体（diabody）、单域抗体（single domain antibody）、嵌合抗体、线性抗体（linear antibody）、纳米抗体（技术来自 Domantis）、probody 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。工程改造的抗体变体综述于 Holliger 等, 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136 中。

如本文中所使用的, 术语“全长抗体”意指, 由两条“全长重链”和两条“全长轻链”组成的抗体。其中, “全长重链”是指这样的多肽链, 其在 N 端到 C 端的方向上由重链可变区 (VH)、重链恒定区 CH1 结构域、铰链区 (HR)、重链恒定区 CH2 结构域、重链恒定区 CH3 结构域组成; 并且, 当所述全长抗体为 IgE 同种型时, 任选地还包括重链恒定区 CH4 结构域。优选地, “全长重链”是在 N 端到 C 端方向上由 VH、CH1、HR、CH2 和 CH3 组成的多肽链。“全长轻链”是在 N 端到 C 端方向上由轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 组成的多肽链。两对全长抗体链通过在 CL 和 CH1 之间的二硫键和两条全长重链的 HR 之间的二硫键连接在一起。本发明的全长抗体可以来自单一物种, 例如人; 也可以是嵌合抗体或人源化抗体。本发明的全长抗体包含分别由 VH 和 VL 对形成的两个抗原结合部位, 这两个抗原结合部位特异性识别/结合相同的抗原。

如本文中所使用的, 术语“Fd”意指由 VH 和 CH1 结构域组成的抗体片段; 术语“dAb 片段”意指由 VH 结构域组成的抗体片段 (Ward 等人, Nature 341:544-546 (1989)); 术语“Fab 片段”意指由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的抗体片段; 术语“F(ab')₂ 片段”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; 术语“Fab' 片段”意指还原连接 F(ab')₂ 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段, 由一条完整的轻链和重链的 Fd 片段 (由 VH 和 CH1 结构域组成) 组成。

如本文中所使用的, 术语“Fv”意指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是, 能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为, 六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而, 即便是一个可变区 (例如 Fd 片段, 其仅仅含有三个对抗原特异的 CDR) 也能够识别并结合抗原, 尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

如本文中所使用的, 术语“Fc”意指, 由抗体的第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合而形成的抗体片段。抗体的 Fc 片段具有多种不同的功能, 但不参与抗原的结合。

如本文中所使用的, 术语“scFv”是指, 包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链, 其中所述 VL 和 VH 通过接头 (linker) 相连 (参见, 例如, Bird 等人, Science 242:423-426 (1988); Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); 和 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷,

Roseburg 和 Moore 编, Springer-Verlag, 纽约, 第 269-315 页(1994))。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 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如, 可使用具有氨基酸序列 (GGGGS)₄ 的接头, 但也可使用其变体 (Holliger 等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi 等人(2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu 等人(1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 和 Roovers 等人(2001), Cancer Immunol. 描述。在一些情况下, scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。

10 如本文中所使用的, 术语“双抗体”意指, 其 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达, 但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对, 从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见, 例如, Holliger P. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993), 和 Poljak R. J. 等人, Structure 2:1121-1123 (1994))。

15 如本文中所使用的, 术语“单域抗体(single-domain antibody, sdAb)”具有本领域技术人员通常理解的含义, 其是指由单个单体可变抗体结构域(例如单个重链可变区)所组成的抗体片段, 其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力。单域抗体也称为纳米抗体(nanobody)。

如本文中所使用的, 术语“probody”具有本领域技术人员通常理解的含义, 其是指一种经掩蔽的抗体, 其在健康组织中保持惰性, 但在疾病环境中特异性活化(例如, 经由疾病环境中富集或特有的蛋白酶的蛋白酶裂解)。其详细教导可参见, 例如 Desnoyers 等人, Sci. Transl. Med., 5:207ra144, 2013。可对本文所描述的任何抗体或其抗原结合部分使用类似掩蔽技术。

25 上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

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(例如本发明提供的抗体)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。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”、“单抗”、“mAb”具有相同的含义且可互换使用可互换，其是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即，除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。此外，修饰语“单克隆”仅表明该抗体的特征为从高度同源的抗体群中获得，不能理解为需要通过任何特定方法来制备所述抗体。

10 本发明的单克隆抗体可以通过多种技术进行制备，例如杂交瘤技术（参见，例如 Kohler 等人. *Nature*, 256:495, 1975），重组 DNA 技术（参见，例如美国专利申请 4,816,567），或噬菌体抗体库技术（参见，例如 Clackson 等. *Nature* 352 : 624-628, 1991，或 Marks 等. *J. Mol. Biol.* 222 : 581-597, 1991）。

15 抗体可通过公知的技术，例如使用蛋白 A 或蛋白 G 的亲合层析进行纯化。随后或作为替代，可将特异性抗原（该抗体识别的靶分子）或其抗原表位固定在柱上，并通过免疫亲和层析法来纯化免疫特异性抗体。免疫球蛋白的纯化可参考例如 D. Wilkins on (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia Pa., Vol. 14, No. 8 (Apr. 17, 2000), pp. 25-28)。

如本文中所使用的，术语“嵌合抗体 (Chimeric antibody)”是指，这样的抗体，20 其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体（其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类），且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体（其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类），但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性（U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)）。例如，术语“嵌合抗体”可包括这样的抗25 体（例如人鼠嵌合抗体），其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体（例如鼠源抗体），而抗体的重链和轻链可变区来自第二抗体（例如人抗体）。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体（供体抗体），全部或部分的非 CDR 区（例如，可变30 区 FR 和/或恒定区）来自于人源免疫球蛋白（受体抗体）。人源化抗体通常保留了供体

抗体的预期性质，包括但不限于，抗原特异性、亲和性、反应性等。供体抗体可以是有预期性质（例如，抗原特异性、亲和性、反应性等）的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物（例如，食蟹猴）抗体。

在本申请中，本发明抗体的预期性质包括：(1) 特异性识别/结合 CLDN6 和/或
5 CLDN9（特别是人 CLDN6 和/或人 CLDN9）；(2) 介导 CLDN6 内化；(3) 通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞；(4) 通过补体依赖的细胞毒性（CDC）来诱导杀伤表达人 CLDN6 的细胞；(5) 预防和/治疗肿瘤的能力。本发明的抗体具有上述预期性质中的一项或多项。

本发明的嵌合抗体或人源化抗体可以根据上述制备的鼠单克隆抗体的序列进行制
10 备。编码重链和轻链的 DNA 可以从目标鼠杂交瘤中获得，并且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠（例如人）免疫球蛋白序列。

为制备嵌合抗体，可使用本领域已知的方法将鼠免疫球蛋白可变区连接至人免疫球蛋白恒定区（参见例如 Cabilly 等人的美国专利 No. 4, 816, 567）。例如，将编码 VH 的 DNA 可操作的连接至编码重链恒定区的另一 DNA 分子以获得全长重链基因。人重链
15 恒定区基因的序列是本领域已知的（参见例如 Kabat, E. A. 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242），包含这些区的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区，但是通常优选为 IgG1 或 IgG4 恒定区。例如，将编码 VL 的
20 DNA 可操作的连接至编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子以获得全长轻链基因（以及 Fab 轻链基因）。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的（参见例如 Kabat, E. A. 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242），包含这些区的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定
25 区，但通常优选为 κ 恒定区。

为制备人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入人源框架序列（参见 Winter 的美国专利 No. 5, 225, 539；Queen 等人的美国专利 Nos. 5, 530, 101；5, 585, 089；5, 693, 762 和 6, 180, 370；以及 Lo, Benny, K. C., editor, in Antibody Engineering: Methods and Protocols, volume 248, Humana Press,
30 New Jersey, 2004）。或者，还可以利用转基因动物，其能够在免疫后不产生内源性免

疫球蛋白、并且能够产生完整人抗体库。例如，已有报道在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失可以完全抑制了内源性抗体产生，然后将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到所述种系突变小鼠中将导致该小鼠在遇到抗原刺激时产生人抗体（参见例如，Jakobovits 等，1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 : 2551 ;
5 Jakobovits 等，1993，Nature362 : 255-258 ; Bruggermann 等，1993，Year in Immunology 7 : 33 ; 和 Duchosal 等，1992，Nature 355 : 258）。上述转基因动物的非限制性实例包括，HuMAb 小鼠（Medarex, Inc.），其含有编码未重排的人重链（ μ 和 γ ）和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座（miniloci），加之使内源 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变（参见例如 Lonberg 等人（1994）Nature
10 368(6474):856-859); 或携带人重链转基因和人轻链转染色体的“KM 小鼠™”（参见专利申请 W002/43478）。其他抗体人源化改造的方法还包括噬菌体展示技术（Hoogenboom 等，1991，J.Mol.Biol.227 : 381 ; Marks 等，J.Mol.Biol.1991，222 : 581-597 ; Vaughan 等，1996，Nature Biotech 14 : 309）。

如本文中所使用的，术语“胚系抗体基因（germline antibody gene）”或“胚
15 系抗体基因片段（germline antibody gene segment）”是指，存在于生物体的基因组中的编码免疫球蛋白的序列，其没有经历过能够导致表达特异性免疫球蛋白的遗传学重排及突变的成熟过程。在本发明中，表述“重链胚系基因”是指，编码免疫球蛋白重链的胚系抗体基因或基因片段，其包括 V 基因(variable)、D 基因(diversity)、J 基因(joining)和 C 基因(constant)；类似地，表述“轻链胚系基因”是指，编码免疫
20 球蛋白轻链的胚系抗体基因或基因片段，其包括 V 基因(variable)、J 基因(joining)和 C 基因(constant)。在本发明中，由所述胚系抗体基因或胚系抗体基因片段所编码的氨基酸序列也称为“胚系序列（germline sequence）”。胚系抗体基因或胚系抗体基因片段及其相应的胚系序列是本领域技术人员熟知的，并且可从专业数据库（例如，IMGT、UNSWIg、NCBI 或 VBASE2）获得或查询。

25 如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。特异性结合相互作用的强度或亲和力可以该相互作用的平衡解离常数(K_D)表示。在本发明中，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，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。在某些实施方式中，特异性结
30 合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于约 10^{-9} M，例如小

于约 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M 或 10^{-12} M 或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定, 例如使用表面等离子体共振术 (SPR) 在 BIACORE 仪中测定。

如本文中所使用的, 术语“细胞毒剂”包括对细胞有害(例如杀死细胞)的任何试剂, 例如化疗药物、细菌毒素、植物毒素或放射性同位素等。

如本文中所使用的, 术语“载体(vector)”是指, 可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时, 载体称为表达载体。载体可以通过转化, 转导或者转染导入宿主细胞, 使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的, 包括但不限于: 质粒; 噬菌粒; 柯斯质粒; 人工染色体, 例如酵母人工染色体(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。可用作载体的动物病毒包括但不限于, 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)。一种载体可以含有多种控制表达的元件, 包括但不限于, 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。

如本文中所使用的, 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, 如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞, 如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞, 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。

如本文中所使用的, 术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如, 两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据, 或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据), 那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times$ 100 的函数。例如, 如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配, 那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如, DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性(总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常, 在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用, 例如, 可通过计算机程序例如 Align 程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的 Needleman 等人(1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-

17 (1988))的算法, 使用 PAM120 权重残基表(weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外, 可使用已整合入 GCG 软件包(可在 www.gcg.com 上获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (J MoI Biol. 48:444-453 (1970))算法, 使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及
5 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重(gap weight)和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

如本文中所使用的, 术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如, 可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换, 例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质, 包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如, 赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如, 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此, 优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见, 例如, Brummell 等人, Biochem. 32:1180-1187
15 (1993); Kobayashi 等人 Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); 和 Burks 等人 Proc. Natl Acad. Set USA 94:412-417 (1997), 其通过引用并入本文)。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如, Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其以引用的方式并入本文中。在本发明
25 中, 术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中, 氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如, 丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的, 术语“嵌合抗原受体(CAR)”是指, 具有与 T 细胞受体的一个或多个细胞内信号结构域接合的细胞外抗体衍生的靶向结构域(例如 scFv)的工程化的
30 T 细胞受体。在本发明中, 术语“嵌合抗原受体 T 细胞”是表达 CAR 并且具有由该 CAR

的靶向结构域决定的抗原特异性的 T 细胞。制造 CAR(例如, 用于癌症治疗)的方法是本领域已知的, 可参见例如, Park 等人, Trends Biotechnol., 29:550-557, 2011; Grupp 等人, N Engl J Med., 368:1509-1518, 2013; Han 等人, J. Hematol Oncol., 6:47, 2013; PC T 专利公开文本 W02012/079000、W02013/059593; 和美国专利公开文本 2012/0213783, 其全部通过引用整体并入本文。

如本文中所使用的, 术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂, 其是本领域公知的(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), 并且包括但不限于: pH 调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 稀释剂, 维持渗透压的试剂, 延迟吸收的试剂, 防腐剂。例如, pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子, 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如 Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水, 水性缓冲液(如缓冲盐水), 醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如硫柳汞, 2-苯氧乙醇, 对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义, 其能够稳定药物中的活性成分的期望活性, 包括但不限于谷氨酸钠, 明胶, SPGA, 糖类(如山梨醇, 甘露醇, 淀粉, 蔗糖, 乳糖, 葡聚糖, 或葡萄糖), 氨基酸(如谷氨酸, 甘氨酸), 蛋白质(如干燥乳清, 白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。在某些示例性实施方案中, 所述药学上可接受的载体或赋形剂包括无菌可注射液体(如水性或非水性悬浮液或溶液)。在某些示例性实施方案中, 此类无菌可注射液体选自注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如 0.9% (w/v) NaCl)、葡萄糖溶液(例如 5%葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如 0.01%聚山梨醇 20)、pH 缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer 氏溶液及其任意组合。

如本文中所使用的, 术语“预防”是指, 为了阻止或延迟疾病或病症或症状(例如, 肿瘤)在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的, 术语“治疗”是指, 为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的, 有益或所需的临床结果包括但不限于, 减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即, 不再恶化)疾病的状态, 延迟

或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状（无论部分或全部），无论是可检测或是不可检测的。此外，“治疗”还可以指，与期望的存活期相比（如果未接受治疗），延长存活期。

如本文中使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如灵长类哺乳动物，例如人。

- 5 在某些实施方式中，所述受试者（例如人）患有肿瘤（例如表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤），或者，具有患有上述疾病的风险。

- 如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如，肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如，肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患
- 10 者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

- 如本文中所使用的，术语“免疫效应细胞”包括具有造血的起源并在免疫应答中
- 15 起作用的细胞，例如淋巴细胞，例如 B 细胞和 T 细胞；天然杀伤细胞；髓样细胞，例如单核细胞、巨噬细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和粒细胞。在某些优选的实施方案中，所述免疫效应细胞是 T 细胞。

- 如本文中所使用的，术语“转移”是指，指癌细胞从其原始部位扩散到身体的其他部位。转移的形成是非常复杂的过程，并依赖于恶性细胞从原发肿瘤中脱离、侵袭
- 20 胞外基质、透过内皮基底膜以进入体腔和血管以及其后由血液转运后浸润靶器官。最后，新肿瘤（即继发性肿瘤或转移性肿瘤）在靶部位的生长依赖于血管发生。肿瘤转移经常甚至在切除原发肿瘤后发生，因为肿瘤细胞或组分可能残留并发展出转移潜力。在一个实施方案中，根据本发明的术语“转移”涉及“远端转移”，这涉及远离原发肿瘤和局部淋巴结系统的转移。继发性或转移性肿瘤的细胞与原始肿瘤中的细胞类似。
- 25 这意味着例如如果卵巢癌转移至肝，则所述继发性肿瘤由异常的卵巢细胞（而不是异常的肝细胞）构成。则肝中的肿瘤被称为转移性卵巢癌（而不是肝癌）。

发明的有益效果

与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下有益效果：

- 30 本发明的抗体能够特异性识别/结合 CLDN6 和/或 CLDN9，并且能够通过 ADCC 和/或

CDC 来诱导杀伤表达 CLDN6 的细胞（例如，肿瘤细胞）。因此，本发明的抗体具有用于预防和/或治疗肿瘤（特别是表达 CLDN6）的潜力。本发明的人源化抗体不仅保留了亲本抗体的功能和性质，而且具有较高的人源化程度，从而可安全地施用给人受试者，而不引发免疫原性反应。特别的，本发明的抗体几乎不结合 CLDN 家族中的其他蛋白（例如，
5 CLDN3 和 CLDN4）。因此，本发明的抗体（特别是人源化抗体）具有重大的临床价值。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员
10 来说将变得可实施。

附图说明

图 1A-1D 分别显示了抗 CLDN6 鼠源抗体 15H2 与不同细胞表面 CLDN 蛋白的结合活性测定结果。图 1A: CHOS-hCLDN6; 图 1B: CHOS-CLDN3; 图 1C: CHOS-CLDN4; 图 1D:
15 CHOS-CLDN9。

图 2A-2D 分别显示了抗 CLDN6 鼠源抗体 9H3 与不同细胞表面 CLDN 蛋白的结合活性测定结果。图 2A: CHOS-hCLDN6; 图 2B: CHOS-CLDN3; 图 2C: CHOS-CLDN4; 图 2D: CHOS-CLDN9。

图 3A-3D 分别显示了人源化抗体 7008-01 和 7008-03 对天然表达人 CLDN6 的四种肿瘤细胞的结合结果。图 3A: OV90; 图 3B: NEC8; 图 3C: NTERA2; 图 3D: Bewo。
20

图 4A-4D 分别显示了人源化抗体 7008-01 和 7008-03 诱导效应细胞对天然表达人 CLDN6 的四种肿瘤细胞的抗体依赖的细胞毒杀作用结果。图 4A: OV90; 图 4B: NEC8; 图 4C: NTERA2; 图 4D: Bewo。

图 5 显示了人源化抗体 7008-01 和 7008-03 诱导补体对天然表达人 CLDN6 的 NTERA2
25 肿瘤细胞的补体依赖的毒杀作用结果。

图 6A-6D 分别显示了热点突变抗体与不同的 CLDN6 表达肿瘤细胞的结合结果。图 6A: 15H2 抗体与 NEC8 的结合结果; 图 6B: 15H2 抗体与 Bewo 的结合结果; 图 6C: 9H3 抗体与 NEC8 的结合结果; 图 6D: 9H3 抗体与 Bewo 的结合结果。

序列信息

本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表中。

SEQ ID NO	描述	序列信息
1	15H2 重链可变区	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEW MGYISYDGSNNYNPSLKNRFSIIRDTSKNQFSLKFNSTTDTATYYC ARGGYFDYWGQGTTLTVSS
2	15H2 轻链可变区	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPGQ SPKLLVFASTRESGVDPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQ HYNAPRTFGGGTKLEIK
3	15H2 HCDR1	GYSITSGYY
4	15H2 HCDR2	ISYDGSN
5	15H2 HCDR3	ARGGYFDY
6	15H2 LCDR1	QSLNTNNQKNY
7	15H2 LCDR2	FASTRES
8	15H2 LCDR3	QQHYNAPRT
9	7008-03 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYGMSWVRQAPGKLEWV ATISRDASYTFPDSPVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRLGDNDRGYAMDYWGQGTTLTVSS
10	7008-03 轻链可变区	DVMTQSPSLPLPVTLGQPASISCRSSQSVVHVNTYLEWYQQRPQGS PRLLIYKVSNNRFPQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYVYCFQG SHVPRTFGGGTKVEIK
11	9H3 重链可变区	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSIYGMSWVRQSPDRRLWV ATISRDGSYTFPDSPVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYC VRLGDNDRGYAMDYWGQGTSTVTVSS
12	9H3 轻链可变区	DVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSVVHVNGNTYLEWYLQKPGQS PRLLIYKVSNNRFPQVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLVGYVYCFQG SHVPRTFGGNTNLEIK
13	9H3 HCDR1	GFTFSIYG
14	9H3 HCDR2	ISRDSY
15	9H3 HCDR3	VRLGDNDRGYAMDY
16	9H3 LCDR1	QSVVHVNGNTY
17	9H3 LCDR2	KVSNRFP
18	9H3 LCDR3	FQGSHPRT
19	7008-01 重链可变区	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYYWNWIRQPPGKLEW MGYISYSGNNYNPSLKNRVTSRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC ARGGYFDYWGQGTTLTVSS
20	7008-01 轻链可变区	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTNNQKNYLAWYQQKPGQ PPKLLIYFASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQ HYNAPRTFGGGTKVEIK
21	人 IgG1 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLT

		HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	人 κ 轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGEC
23	7008-03 HCDR2	ISRDA SYT
24	7008-03 LCDR1	QSVVHV NANTY
25	15H2 重链可变区编 码核酸序列	GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAG TCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGT TATTACTGGAACCTGGATCCGGCAGTTCCAGGAAACAACTGGAATGG ATGGGCTACATAAGCTACGACGGTAGCAATACTACAACCCATCTCTC AAAAATCGATTCTCCATCATTCTGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTC CTGAAGTTCAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCTACATATTACTGC GCCAGGGGGGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTC ACAGTCTCCTCA
26	15H2 轻链可变区编 码核酸序列	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCACTAGGA CAGAAGGTCATATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATACT AACAATCAAAAGAACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAG TCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGGGAGTCTGGGGTC CCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTCAACAA CATTATAACGCTCCTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATC AAA
27	9H3 重链可变区编 码核酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGG TCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACTATCTAT GGCATGTCTTGGGTTCCGACAGTCCAGACAGGAGGCTGGAATGGGTC GCAACCATTAGTCGTGATGGTAGTTACACCTACTTTCCAGACAGTGTG AAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCTGTAT TTGCAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGT GTAAGACTGGGTGATAACGACAGGGGCTATGCTATGGACTACTGGGGT CAAGGAACCTTCAGTACCGTCTCCTCA
28	9H3 轻链可变区编 码核酸序列	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTTGA GATCAAGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGTGTTGTACATGTT AATGGAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCT CCAAGGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGCTTTCCTGGGGTCCCA GACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTCAAGGT TCACATGTTCTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAACCTGGAATCAAA
29	7008-01 重链可变区 编码核酸序列	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGACTGGTGAAGCCCTCAGAG ACACTGAGCCTGACATGCACAGTGAGCGGCTACTCCATTACAAGCGGC TACTACTGGAACCTGGATCAGACAGCCCCCGCAAGGGCCTGGAATGG ATGGGCTATATCTCCTACAGCGGCAGCAACAATAACAACCCAGCCTG AAGAACAGGGTGACCATCTCTCGCGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCC CTGAAGCTGAGTAGCGTACTGCCGCTGACACCGCGGTGTACTATTGC GCCAGAGGCGGCTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTG

		ACCGTGAGCAGC
30	7008-01 轻链可变区 编码核酸序列	GACATTGTGATGACCCAGAGCCCCGACTCCCTGGCCGTGAGCCTGGGA GAAAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACACC AACAACCAGAAAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGCCAG CCCCCAAAGTCTGATCTACTTCGCCTCCACCCGCGAGTCCGGCGTG CCTGATAGATTCTCCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACT ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAG CATTACAACGCTCCAGAACCTTTGGAGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAG
31	7008-03 重链可变区 编码核酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGACTGGTGCAGCCAGGAGGA AGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTACATTTAGCATTTAT GGGATGTCCTGGGTGAGACAGGCCCCGAAAAGGACTGGAGTGGGTG GCTACTATCAGCAGAGACGCTAGCTACACCTACTTCCCCGATTCCGTG AAGGGCAGATTACAATCAGCAGAGATAACGCTAAGAACAGCCTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGC GTGAGGCTGGGCGACAACGATAGAGGATACGCCATGGACTACTGGGGG CAGGGAACACTGGTGACCGTGAGCAGC
32	7008-03 轻链可变区 编码核酸序列	GACGTGGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCTGGGA CAGCCCGCTAGTATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCGTGGTGACGTG AACGCCAACACATATCTGGAGTGGTATCAGCAGAGGCCTGGACAGAGC CCCAGACTGCTGATCTACAAGGTGAGCAACAGATTCCCAGGCGTGCCA GACAGATTCTCTGGAAGCGGCAGCGGAACAGACTTTACCCTGAAGATC TCCAGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGCTTCCAGGGC AGCCACGTGCCCAGAACATTTCGGCGGCGGCACCAAAGTGGAGATCAAA
33	7008-01 HCDR2	ISYSGSN

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明(而非限定本发明)的实施例来描述本发明。

除非特别指明，本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上参
 5 照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，
 以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons，
 Inc.，1995 中所述的方法进行；限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本
 领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本发明，且不意欲限制本发明所要求保护的
 范围。

10

实施例 1：抗 CLDN6 鼠源抗体的产生

通过慢病毒感染的方法(MOI=3-10, 5 μg/ml polybrene)在 HEK293 细胞(ATCC)、
 CHOS 细胞(Invitrogen)上分别过表达人源 CLDN6 (hCLDN6) 或小鼠 CLDN6 (mCLDN6)，或
 人源 CLDN3 (CLDN3)，或人源 CLDN4 (CLDN4)，或人源 CLDN9 (CLDN9)。慢病毒由上海

吉凯基因化学技术有限公司提供，细胞感染 72 小时后加相应抗生素继续培养 2-4 周，扩增并冻存，得到 HEK293-hCLDN6，HEK293-mCLDN6，HEK293-CLDN3，HEK293-CLDN4，HEK293-CLDN9，CHOS-hCLDN6，CHOS-CLDN3，CHOS-CLDN4，CHOS-CLDN9 共 9 株细胞，以用于后续实验。

- 5 为了获得抗人 CLDN6 抗体，使用构建的过表达人源 CLDN6 的 CHOS-hCLDN6 细胞免疫 Balb/c 小鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司，品系代码 216）；初免佐剂使用完全弗氏佐剂 CFA（InvivoGen 公司，货号 vac-cfa-60），之后免疫佐剂都使用 IFA（InvivoGen 公司，货号 vac-ifa-60）；免疫途径为皮下多点。多次免疫后将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 使用聚乙二醇法进行融合，得到既能表达抗体又能在体
- 10 外无限增殖的 B 细胞融合，并且在 HAT 选择培养基中培养。将融合后的杂交瘤细胞铺在 96 孔细胞培养板中，并且通过对上清中抗体在细胞水平结合 CLDN3/4/6/9 能力的检测，筛选出目的阳性克隆（仅结合 CLDN6，不结合 CLDN3/4/9 的抗体；同时结合 CLDN6/9，不结合 CLDN3/4 的抗体）进行 2-3 轮亚克隆。

- 鼠抗结合细胞水平高通量筛选：在筛选中通过使用人源 CLDN3/4/6/9 表达的细胞
- 15 （CHOS-hCLDN6，CHOS-CLDN3，CHOS-CLDN4，CHOS-CLDN9）分别进行铺板。将 10000 个细胞稀释于 100 μ L 完全培养基中，使用平底 96 孔板，过夜使细胞贴壁或沉于孔底，第二天去掉上清。将 100 μ L 待筛选杂交瘤上清加入细胞板中，室温孵育 1 小时。去掉上清后，每孔加入 100 μ L 第二抗体（DyLight488 山羊抗鼠 IgG（Abcam 目录编号 ab97015），浓度为 5 μ g/mL，室温孵育 0.5 小时。染色完成后去掉上清后每孔加入 100 μ L DPBS，上机器
- 20 进行读数。使用全视野细胞扫描分析仪（Nexcelom，型号 Celigo® Image Cytometer）对实验板进行测定读数。测定时选择第二抗体对应荧光通道和明场通道同时对孔内细胞进行高速扫描成像。荧光通道得到的成像根据有荧光标记的细胞形态和荧光强度设定参数对抗体结合的细胞进行计数，明场通道得到的成像根据细胞形态设定参数对贴壁细胞进行计数，然后两组数据相除得到和抗体结合的显示荧光的细胞占细胞总数的百分比。根据
- 25 该比例判定融合瘤上清中抗体与表达 CLDN3/4/6/9 的细胞的结合效果。

- 鼠抗与 CLDN3/4/6/9 的结合的流式评价：将 500,000 个 CLDN6 表达细胞（CHOS-hCLDN6，CHOS-CLDN3，CHOS-CLDN4，CHOS-CLDN9）置于 FACS buffer（PBS+2%FBS）/孔中，加入待测鼠源抗体后 4 摄氏度孵育 1 小时。离心去掉上清，使用 FACS buffer 清洗两遍，加入第二抗体（DyLight488 山羊抗鼠 IgG，Abcam 目录编号 ab97015）4 摄氏度孵
- 30 育 0.5 小时。染色完成后离心去掉上清，用 FACS buffer 清洗两次后使用 FACS buffer

重悬细胞，然后上机器进行读数。使用流式细胞分析仪(BD 公司，型号 CantoII)对实验细胞进行测定读数。测定时先根据 FCS 和 SSC 圈定细胞位置，然后选择第二抗体对应荧光通道和 SSC 对细胞进行分析。

鼠源抗体 15H2 与 CHOS-hCLDN6, CHOS-CLDN3, CHOS-CLDN4, CHOS-CLDN9 结合情况如图 1A-1D 所示，如图所示的，同型对照抗体 ISO (Beyotime, CatA7028) 不与 CHOS-hCLDN6, CHOS-CLDN3, CHOS-CLDN4, CHOS-CLDN9 细胞结合，抗体 15H2 能够与 CHOS-hCLDN6 细胞结合，而几乎不与 CHOS-CLDN3, CHOS-CLDN4 和 CHOS-CLDN9 细胞结合；鼠源抗体 9H3 与 CHOS-hCLDN6, CHOS-CLDN3, CHOS-CLDN4, CHOS-CLDN9 结合情况如图 2A-2D 所示，如图所示的，同型对照抗体 ISO 不与 CHOS-hCLDN6, CHOS-CLDN3, CHOS-CLDN4, CHOS-CLDN9 细胞结合，抗体 9H3 能够与 CHOS-hCLDN6 和 CHOS-CLDN9 细胞结合，而几乎不与 CHOS-CLDN3 和 CHOS-CLDN4 细胞结合。

实施例 2：抗 CLDN6 鼠源抗体的可变区序列测定

离心收集杂交瘤细胞，每 $5-10 \times 10^6$ 细胞加入 1ml TRIzol 和 0.2ml 氯仿，剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 分钟，离心取水相加入 0.5ml 异丙醇，室温放置 10 分钟后收集沉淀，乙醇洗涤后干燥得到 RNA。在冰浴离心管里面加入模板 RNA 和引物，使引物和模板正确配对后进行反转录过程，再进行 PCR 扩增。4 个微量离心管中各加入 dNTP/ddNTP 混合物 2.5 μ l，混合物 37°C 温浴 5min，备用。在一个空的微量离心管中加入 1pmol 的 PCR 扩增双链 DNA，10pmol 测序引物，2 μ l 5 $\times$ 测序缓冲液，加双蒸水至总体积 10 μ l，96°C 加热 8min，冰浴冷却 1min，4°C 10000g 离心 10s。加入 2 μ l 预冷的标记混合物(dCTP、dGTP、dTTP 各 0.75 μ mol/L)，1 μ l 0.1mol/L DDT，测序酶 2U，加水至 15 μ l，混匀后置冰上 2min，标记新合成的 DNA 链。3.5 μ l 标记反应混合物加入到准备好的 4 个微量离心管中，37°C 温浴 5min。每管各加入 4 μ l 终止液。样品在 80°C 的水浴中热变性 5min，每一泳道加 2 μ l 加到测序胶上，电泳分离这些片段，收集序列信息。

2 株鼠源抗体的 VH 和 VL 序列如表 1 所示。进一步，通过 IMGT 编号系统确定了 2 株鼠源单抗的 CDR 序列。

表 1：鼠源抗体的序列信息

抗体	SEQ ID NO:							
	VH	VHCDR1	VHCDR2	VHCDR3	VL	VLCDR1	VLCDR2	VLCDR3
15H2	1	3	4	5	2	6	7	8
9H3	11	13	14	15	12	16	17	18

实施例 3: 嵌合抗 CLDN6 抗体的重组表达

在抗体基因序列验证后, 鼠源抗体的可变区连接人源抗体的恒定区 (人源 IgG1), 将含有抗体基因的表达质粒转染至哺乳动物细胞。收获培养瓶生长的含有抗体克隆的哺乳动物细胞上清液, 使用 protein A 柱纯化, 并且使用 100mM 醋酸 pH3.0 洗脱抗体蛋白。然后将纯化的抗体蛋白上样到分子排阻层析柱上进一步分离纯化。将对应于单体的抗体蛋白配制于 PBS 缓冲液中, 配制品缓冲液补充有 20% 甘油。

实施例 4: 鼠抗人 CLDN6 抗体的人源化和翻译后修饰热点突变

为提高候选抗体与人源抗体的序列的同源性, 减少抗体对人的免疫原性, 可以对以上实施例提供的鼠源抗体进行人源化设计和制备, 使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入人源框架序列 (参见 Winter 的美国专利 No. 5, 225, 539; Queen 等人的美国专利 Nos. 5, 530, 101; 5, 585, 089; 5, 693, 762 和 6, 180, 370; 以及 Lo, Benny, K. C., editor, in Antibody Engineering: Methods and Protocols, volume 248, Humana Press, New Jersey, 2004)。

具体而言, 将鼠源抗体 15H2 和 9H3 的重链和轻链 CDR 区分别构建到对应的人源化模板的 FR 框架上, 并对人源化模板的 FR 区氨基酸残基进行了一系列的回复突变, 以使人源化抗体尽可能保留鼠源抗体的抗原结合能力。

同时考虑到鼠源抗体 CDR 区中可能的翻译后修饰热点 Post-Translation Modification hotspot, PTM hotspot), 如 15H2 HCDR2 中天冬氨酸异构化热点 DG, 9H3 HCDR2 中天冬氨酸异构化热点 DG, 9H3 LCDR1 中脱氨化热点 NG, 使用本领域已知的方法对这些热点进行突变。如将天冬氨酸异构化热点 DG 中 D 突变成 E/S/G 等, 或将 DG 中 G 突变成 A/S/D 等, 又如将脱氨化热点 NG 中 N 突变成 Q/S/A 等, 或将 NG 中 G 突变为 A/S/D 等, 经实验验证, 上述提到的大多数突变不改变抗体与 CLDN6 表达细胞结合的能力 (如 15H2 HCDR2 DG 突变为 EG/SG/GG; 9H3 LCDR1 NG 突变为 QG/NA/SG; 9H3 LCDR1 NG 突变为 QG 且其 HCDR2 DG 同时突变为 DA) 或改变在三倍以内 (9H3 LCDR1 NG 突变为 NA 且其 HCDR2 DG 同时突变为 DA; 9H3 LCDR1 NG 突变为 SG 且其 HCDR2 DG 同时突变为 DA)。图 6A 和 6B 展示了 15H2 的部分热点突变抗体与 CLDN6 表达肿瘤细胞 NEC8/Bewo 的结合, 图 6C 和 6D 展示了 9H3 的部分热点突变抗体与 CLDN6 表达肿瘤细胞 NEC8/Bewo 的结合。

根据以上方法，本发明人制备获得了鼠源抗体 15H2 和鼠源抗体 9H3 的一系列人源化且热点突变抗体，经过与 CLDN6 表达细胞结合的能力的筛选优选每个鼠抗对应人源化且热点突变抗体各一个，分别命名为 7008-01（其重链可变区及轻链可变区分别如 SEQ ID NO: 19 和 20 所示）和 7008-03（其重链可变区及轻链可变区分别如 SEQ ID NO: 9 和 10 所示）。各抗体的重链恒定区均为 SEQ ID NO:21，轻链恒定区均为 SEQ ID NO:22。

实施例 5：人源化抗 CLDN6 抗体的抗原结合活性评价

将 500,000 个 CLDN6 天然表达肿瘤细胞（OV90，ATCC；NEC8，JCRB；NTERA2，南京科佰生物；Bewo，南京科佰生物）置于 FACS buffer 中待用，使用圆底低吸附 96 孔板。抗体样本使用 FACS buffer 进行梯度稀释。细胞板中加入经稀释的抗体，相应阴性对照孔加入 FACS buffer，4 摄氏度孵育 1 小时。离心去掉上清后，使用 FACS buffer 清洗两遍，每孔加入第二抗体（DyLight488 山羊抗人 IgG，Abcam 目录编号 ab97003）4 摄氏度再孵育 0.5 小时。染色完成后离心去掉上清，用 FACS buffer 清洗两次后每孔加入 FACS buffer 重悬细胞，然后上机器进行读数。使用流式细胞分析仪（BD 公司，型号 CantoII）对实验板中细胞进行测定读数。测定时先根据 FCS 和 SSC 圈定细胞位置，然后选择第二抗体对应荧光通道和 SSC 对细胞进行分析，数据分析使用 GraphPad，横坐标使用抗体浓度的对数，纵坐标使用平均荧光强度数值，根据曲线拟合出抗 CLDN6 抗体的 EC50。

人源化抗体 7008-01 和 7008-03 对天然表达人 CLDN6 的四种肿瘤细胞（OV90/ NEC8/ NTERA2/ Bewo 的结合情况分别如图 3A-3D 所示。表 2 列出了两个抗体在肿瘤细胞上结合的 EC50 和最大结合值（Top MFI）。结果表明，人源化抗体 7008-01 和 7008-03 对膜表面 CLDN6 具备良好的结合活性。

表 2. 抗体对 CLDN6 阳性肿瘤细胞的结合

	7008-01		7008-03	
	EC50 (ug/mL)	Top MFI	EC50 (ug/mL)	Top MFI
OV90	2.85	4438	3.79	5692
NEC8	1.31	2427	0.91	3046
NTERA2	1.22	52326	1.02	47527
Bewo	1.06	7815	0.90	9069

实施例 6：抗体诱导 ADCC（Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity）作用靶细胞使用 CLDN6 天然表达肿瘤细胞（OV90，ATCC；NEC8，JCRB；NTERA2，南京科

佰生物; Bewo, 南京科佰生物), 效应细胞使用 in-house 构建的稳定转染的 CD16 受体和 NFAT(Nuclear Factor of Activated T-cells)反应原件的 Jurkat-NFAT-Luc-CD16 细胞系, 实验在 96 孔平底细胞板中(Corning 3903)进行。梯度稀释的抗体加入靶细胞中, 37° C 条件下孵育 30 分钟。每 10000 个靶细胞加入 60000 个效应细胞, 37° C 条件下进行反应 4-6 小时, 反应结束加入 One-Glo™ 试剂(Promega, E6110)进行荧光显色, 细胞板使用 Tecan Spark10 酶标仪测定发光读数。数据分析使用 GraphPad, 横坐标使用抗体浓度的对数, 纵坐标使用对应孔发光读数, 根据曲线拟合出抗 CLDN6 抗体的抗体依赖的细胞毒杀作用的 EC50。

人源化抗体 7008-01 和 7008-03 诱导效应细胞对天然表达人 CLDN6 的四种肿瘤细胞(OV90/ NEC8/ NTERA2/ Bewo)的抗体依赖的细胞毒杀作用分别如图 4A-4D 所示。表 3 列出了两个抗体在不同肿瘤细胞 ADCC 的 EC50 和最大值(Top Lum)。结果表明, 人源化抗体 7008-01 和 7008-03 均能有效诱导效应细胞对表达 CLDN6 的肿瘤细胞的杀伤。

表 3. 抗体对 CLDN6 阳性肿瘤细胞 ADCC 作用

	7008-01		7008-03	
	EC50 (ug/mL)	Top Lum	EC50 (ug/mL)	Top Lum
OV90	0.55	346241	0.16	295296
NEC8	0.15	29400	0.071	229365
NTERA2	0.55	179190	0.40	176043
Bewo	0.70	259125	0.21	181171

实施例 7: 抗体诱导 CDC (Complement Dependent Cytotoxicity) 作用

靶细胞使用 CLDN6 天然表达肿瘤细胞 NTERA2。靶细胞预先与 EuTDA 细胞毒性检测试剂盒中的 BATDA 荧光增强配体试剂(PerkinElmer, AD0116)以 1×10^5 细胞每毫升添加 2 微升的比例混合, 37° C 下孵育 20 分钟; 处理后的靶细胞(5×10^3)与各种不同浓度的抗体和作为补体来源的人血清(TPCS, A515)以 1: 8 的比例混合, 在 96 孔圆底板(Coring, GLS3799) 37° C 下共同孵育 3 小时。孵育完成后 96 孔圆底板中的上清转到加有钨溶液(PerkinElmer, AD0116)的 96 孔平底板(Coring, 货号 3903)室温进一步孵育 15 分钟, 在多功能酶标仪(Tecan, Spark10)上检测每个孔内细胞死亡后被释放到上清中的荧光供体受到能量激发后能量转移给受体后受体发出的发射光(激发: 320/340nm, 发射: 615nm)。

使用以下公式计算细胞毒性: 细胞毒性百分比 = $100 \times [1 - (\text{Max} - \text{data}) / (\text{Max} -$

Min)]

其中 Data 是实验的数值（细胞与抗体和补体一起孵育），Min 是最小细胞毒性即实验的本底数值（细胞与培养基和补体），而 Max 是最大细胞毒性（细胞与裂解液和补体共同孵育）。数据分析使用 GraphPad，横坐标使用抗体浓度的对数，纵坐标使用对应孔荧光读数，根据曲线拟合出抗 CLDN6 抗体的补体依赖的毒杀作用的 EC50。

人源化抗体 7008-01 和 7008-03 诱导补体对天然表达人 CLDN6 的 NTERA2 肿瘤细胞的补体依赖的毒杀作用如图 5 所示。结果表明，人源化抗体 7008-01 和 7008-03 均能有效诱导补体对表达 CLDN6 的肿瘤细胞的杀伤。

10 实施例 8：抗 CLDN6 抗体介导的 CLDN6 内化

本实施例通过流式细胞术测试抗 CLDN6 抗体介导的 CLDN6 内化。测定抗体引起的内化和时间的关系，在 37℃/4℃ 下将 CLDN6 天然表达的肿瘤细胞(OV90/Bewo)与 10 μg/mL 抗体一起孵育不同时间。用含 2% FBS 的 PBS 洗涤若干次后，加入 10 μg/mL 第二抗体 4℃ 下染色 30 分钟，然后通过流式细胞术分析细胞的 CLDN6 表达。

15 MFI37 为 37℃ 条件下孵育的样品的 MFI；MFI4 为 4℃ 条件下孵育的样品的 MFI，该条件下只发生结合而不发生内吞，MFI 背景为仅有第二抗体的 MFI，抗体介导的细胞表面 CLDN6 内吞百分比由以下公式计算：

$$\text{内化 CLDN6 的百分比} = 100 - 100 \times (\text{MFI4} - \text{MFI37}) / \text{MFI4}$$

结果如表 4 所示，人源化抗体 7008-01 和 7008-03 介导了不同程度的肿瘤细胞表面上 CLDN6 的内化。

表 4：抗体介导肿瘤细胞表面上 CLDN6 的内化比例(%)

细胞	抗体	4 小时	2.5 小时	2 小时	1.5 小时	1 小时	0.5 小时	0 小时
OV90	7008-01	6.2	-	12.8	-	9.1	8.5	0.0
	7008-03	22.0	9.3	-	-0.1	-3.1	-	0.0
Bewo	7008-01	2.6	-	4.3	-	4.0	1.6	0.0
	7008-03	20.0	12.3	-	10.0	3.9	-	0.0

25 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 能够特异性结合 CLDN6 的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 3, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 4 或 33, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 5, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列;

和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 6, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 7, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 8, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的置换为保守置换;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 4 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 5 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 7 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 8 的 VL CDR3; 或者,

所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 33 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 5 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 7 的 VL

CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 8 的 VL CDR3;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的框架区序列 (例如, 人免疫球蛋白);

优选地, 所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 3, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 4, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 5, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 6, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 7, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 8, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的置换为保守置换;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 4 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 5 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 7 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 8 的 VL CDR3;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的框架区序列 (例如,

人免疫球蛋白);

优选地,所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

3. 权利要求 2 所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH),其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 1 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个,2 个,3 个,4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;或

(iii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列;

和/或,

(b) 轻链可变区 (VL),其包含选自下列的氨基酸序列:

(iv) SEQ ID NO: 2 所示的序列;

(v) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个,2 个,3 个,4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;或

(vi) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列;

优选地,(ii)或(v)中所述的置换是保守置换;

优选地,所述抗体或其抗原结合片段包含:具有如 SEQ ID NO: 1 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的 VL。

4. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段,其包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1,其由下述序列组成: SEQ ID NO: 3,或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个,2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,

(ii) VH CDR2,其由下述序列组成: SEQ ID NO: 33,或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个,2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,

和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 5, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 6, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 7, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列, 和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 8, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 33 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 5 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 7 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 8 的 VL CDR3;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的框架区序列(例如, 人免疫球蛋白);

优选地, 所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

5. 权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区(VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 19 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 19 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列; 或

(iii) 与 SEQ ID NO: 19 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、

或 100% 的序列同一性的序列；

和/或，

(b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 20 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

优选地，(ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 19 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 20 所示的序列的 VL。

6. 能够特异性结合 CLDN6 和/或 CLDN9 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH)：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 13，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 14 或 23，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 15，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL)：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 16 或 24，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 17，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 18, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 13 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 14 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 16 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 17 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 18 的 VL CDR3; 或者,

所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 13 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 23 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 24 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 17 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 18 的 VL CDR3;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的框架区序列(例如, 人免疫球蛋白);

优选地, 所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

7. 权利要求 6 的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区(CDR)的重链可变区(VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,

(ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列,

和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 16, 或与其相比具有一个或几个氨

氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 17，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，
和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 18，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

优选地，(i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换；

优选地，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义；

优选地，(i)-(vi)任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段，其包含：如下 3 个重链 CDRs：序列为 SEQ ID NO: 13 的 VH CDR1，序列为 SEQ ID NO: 14 的 VH CDR2，序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR3；和/或，如下 3 个轻链 CDRs：序列为 SEQ ID NO: 16 的 VL CDR1，序列为 SEQ ID NO: 17 的 VL CDR2，序列为 SEQ ID NO: 18 的 VL CDR3；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段，其进一步包含来源于人的框架区序列（例如，人免疫球蛋白）；

优选地，所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

8. 权利要求 7 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区（VH），其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 11 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 11 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 11 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和/或，

(b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 12 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 12 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加

(例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 12 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列;

优选地, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 具有如 SEQ ID NO: 11 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 12 所示的序列的 VL。

9. 权利要求 6 的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 和/或

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 24, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 18, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的置换为保守置换;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义;

优选地, (i)-(vi) 任一项中所述的 CDR 根据 IMGT 编号系统定义;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID

NO: 13 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 23 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 24 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 17 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 18 的 VL CDR3;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含来源于人的框架区序列 (例如, 人免疫球蛋白);

优选地, 所述人免疫球蛋白选自人重排抗体序列或人胚系抗体序列。

10. 权利要求 9 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 9 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 9 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

(iii) 与 SEQ ID NO: 9 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列;

和/或,

(b) 轻链可变区 (VL), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(iv) SEQ ID NO: 10 所示的序列;

(v) 与 SEQ ID NO: 10 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 10 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列;

优选地, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 具有如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 10 所示的序列的 VL。

11. 权利要求 1-10 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段进一步包含:

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区 (CH) 或其变体, 所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如, 至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加; 例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加); 和

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区 (CL) 或其变体, 所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换 (例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换; 例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的保守置换);

优选地, 所述重链恒定区是 IgG 重链恒定区, 例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 21 所示的重链恒定区 (CH);

优选地, 所述轻链恒定区是 κ 或 λ 轻链恒定区;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 22 所示的轻链恒定区 (CL)。

12. 权利要求 1-11 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、双抗体(diabody)和单域抗体(sdAb); 和/或, 所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

13. 权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段带有标记; 优选地, 所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记, 例如酶 (例如辣根过氧化物酶)、放射性核素、荧光染料、发光物质 (如化学发光物质) 或生物素。

14. 分离的核酸分子, 其编码权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 或其重链可变区和/或轻链可变区。

15. 载体, 其包含权利要求 14 所述的分离的核酸分子; 优选地, 所述载体为克隆载体或表达载体。

16. 宿主细胞, 其包含权利要求 14 所述的分离的核酸分子或权利要求 15 所述的载

体。

17. 制备权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求 16 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

18. 双特异性或多特异性分子，其包含权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述双特异性或多特异性分子特异性结合 CLDN6，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标；

优选地，所述双特异性或多特异性分子还包含至少一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的分子（例如第二抗体）。

19. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及连接于所述抗体或其抗原结合片段的治疗剂；

优选地，所述治疗剂选自细胞毒剂；

优选地，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合；

优选地，所述免疫缀合物是抗体-药物偶联物（ADC）。

20. 药物组合物，其含有权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 18 所述的双特异性或多特异性分子或者权利要求 19 所述的免疫缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；

优选地，药物组合物还包含另外的药学活性剂；

优选地，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。

21. 试剂盒，其含有权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素；

优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。

22. 嵌合抗原受体，其包含权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域；

优选地，所述抗原结合结构域包含权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区；

优选地，所述抗原结合结构域是 scFv；

优选地，所述抗原结合受体包含权利要求 1-13 任一项所述的抗体的抗原结合片段；

优选地，所述抗原结合受体由免疫效应细胞（例如 T 细胞）所表达。

23. 分离的核酸分子，其编码权利要求 22 所述的嵌合抗原受体。

24. 载体，其包含权利要求 23 所述的分离的核酸分子；优选地，其用于制备嵌合抗原受体 T 细胞。

25. 宿主细胞，其包含权利要求 23 所述的分离的核酸分子或权利要求 24 所述的载体；

优选地，所述宿主细胞是免疫效应细胞（例如，T 细胞或 NK 细胞）；

优选地，所述宿主细胞是嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）。

26. 一种用于降低 CLDN6 和/或 CLDN9 在细胞表面的表达水平的方法，其包括将所述细胞与权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 18 所述的双特异性或多特异性分子，或权利要求 19 所述的免疫缀合物，或权利要求 20 所述的药物组合物，或权利要求 22 所述的嵌合抗原受体，或权利要求 25 所述的宿主细胞接触，使

得 CLDN6 和/或 CLDN9 在所述细胞表面的表达水平降低；其中，所述细胞在其表面表达 CLDN6 和/或 CLDN9；

优选地，所述细胞是表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞。

27. 一种抑制表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞的方法，其包括将所述肿瘤细胞与有效量的权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 18 所述的双特异性或多特异性分子，或权利要求 19 所述的免疫缀合物，或权利要求 20 所述的药物组合物，或权利要求 22 所述的嵌合抗原受体，或权利要求 25 所述的宿主细胞接触。

28. 一种用于在受试者（例如人）中预防和/或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 18 所述的双特异性或多特异性分子，或权利要求 19 所述的免疫缀合物，或权利要求 20 所述的药物组合物，或权利要求 22 所述的嵌合抗原受体，或权利要求 25 所述的宿主细胞；

优选地，所述肿瘤表达 CLDN6 和/或 CLDN9；

优选地，所述肿瘤涉及表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞；优选地，所述 CLDN6 和/或 CLDN9 在所述肿瘤细胞表面上表达；

优选地，所述肿瘤选自卵巢癌、睾丸癌、胃癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌及其转移癌（例如，胃癌转移，如 Krukenberg 瘤、腹膜转移或淋巴结转移）；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人；

优选地，所述方法还包括施用另外的具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒；

优选地，所述方法还包括施用另外的抗肿瘤疗法，例如手术、化学治疗、放射治疗、靶向治疗、免疫治疗、激素治疗、基因治疗或姑息治疗。

29. 权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 18 所述的双特

异性或多特异性分子，或权利要求 19 所述的免疫缀合物，或权利要求 20 所述的药物组合物，或权利要求 22 所述的嵌合抗原受体，或权利要求 25 所述的宿主细胞，在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者（例如人）中预防和/治疗肿瘤；

优选地，药物还包含另外的药理学活性剂；

优选地，所述另外的药理学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒；

优选地，所述肿瘤表达 CLDN6 和/或 CLDN9；

优选地，所述肿瘤涉及表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤细胞；优选地，所述 CLDN6 和/或 CLDN9 在所述肿瘤细胞表面上表达；

优选地，所述肿瘤选自卵巢癌、睾丸癌、胃癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌及其转移癌（例如，胃癌转移，如 Krukenberg 瘤、腹膜转移或淋巴结转移）；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

30. 一种检测 CLDN6 和/或 CLDN9（例如人 CLDN6 和/或人 CLDN9）在样品中的存在或其量的方法，其包括以下步骤：

(1) 将所述样品与权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触；

(2) 检测所述抗体或其抗原结合片段与 CLDN6 和/或 CLDN9 之间复合物的形成或检测所述复合物的量；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记；

优选地，所述 CLDN6 是人 CLDN6；

优选地，所述 CLDN9 是人 CLDN9。

31. 一种用于检测肿瘤是否能够通过靶向 CLDN6 和/或 CLDN9 的抗肿瘤疗法来治疗的方法，其包括以下步骤：

(1) 将含有所述肿瘤细胞的样品与权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触；

(2) 检测所述抗体或其抗原结合片段与 CLDN6 和/或 CLDN9 之间复合物的形成；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记；

优选地，所述 CLDN6 是人 CLDN6；

优选地，所述 CLDN9 是人 CLDN9；

优选地，所述肿瘤选自卵巢癌、睾丸癌、胃癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌及其转移癌（例如，胃癌转移，如 Krukenberg 瘤、腹膜转移或淋巴结转移）。

32. 权利要求1-13任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测肿瘤是否能够通过靶向CLDN6和/或CLDN9的抗肿瘤疗法来治疗；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记；

优选地，所述 CLDN6 是人 CLDN6；

优选地，所述 CLDN9 是人 CLDN9；

优选地，所述肿瘤选自卵巢癌、睾丸癌、胃癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌及其转移癌（例如，胃癌转移，如 Krukenberg 瘤、腹膜转移或淋巴结转移）。