

特异性结合Claudin18.2的抗体及其制法和应用

5 技术领域

本发明涉及工程化免疫治疗领域，具体地涉及特异性结合Claudin18.2 的抗体及其制法和应用。

背景技术

10 Claudin 家族蛋白广泛分布于上皮细胞的紧密连接结构。Claudin18.2具有四个跨膜区的膜蛋白，N端和C端在细胞质内，胞外有两个loop区，这两个胞外区可作为特异性靶点，用于靶向治疗。在正常组织中Claudin18.2特异性表达于胃部高度分化的上皮细胞中，除了胃癌，也有高比例的胆管癌、卵巢癌、肺癌、食道癌和胰腺癌等肿瘤细胞中表达Claudin18.2。

15 嵌合抗原受体T细胞(Chimeric Antigen Receptor T cell, CAR T)是一种针对肿瘤细胞表面特异性抗原的新型免疫治疗方法。目前，应用于开发实体瘤的细胞治疗。

骆驼源抗体的优势在于其性质稳定，水溶性好，免疫原性低，亲和力更强，分子量小，且能深入到抗原内部，组织穿透性强于传统抗体，可作为诊断工具，也可用于CAR-T和靶向药物的递送，来开发一种亲和力更高、特异性更强、免疫原性更低的CAR-T。

发明内容

本发明的目的是提供一种高亲和力和高生物活性的并能特异性识别的Claudin 18.1和/或Claudin 18.2抗原的抗体及其应用。

25

在本发明的第一方面，提供了一种特异性结合 Claudin18.2 的纳米抗体，所述纳米抗体中的 VHH 链的互补决定区 CDR 区为选自下组：

(1) SEQ ID NO: 36 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 37 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 38 所示的 CDR3；

30 (2) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 40 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3；

(3) SEQ ID NO: 42 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR3；

35 (4) SEQ ID NO: 45 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 46 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 47 所示的 CDR3；

(5) SEQ ID NO: 48 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 49 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

(6) SEQ ID NO: 51 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 53 所示的 CDR3;

5 (7) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 54 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3;

(8) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3;

10 (9) SEQ ID NO: 67 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 68 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3;

(10) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 69 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3; 和/或

(11) SEQ ID NO: 36 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 65 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 66 所示的 CDR3。

15 在另一优选例中, 所述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 由 VHH 链的框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 所隔开。

在另一优选例中, 所述的特异性结合 Claudin18.2 的纳米抗体包括人源化抗体、骆驼源抗体、嵌合抗体。

20 在另一优选例中, 所述的特异性结合 Claudin18.2 的纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1~26 中任一所示。

在另一优选例中, 所述纳米抗体的 VHH 链的氨基酸序列选自下组: SEQ ID NO: 1~26、或其组合。

25 在另一优选例中, 所述的纳米抗体 VHH 链的 CDR 区包含与 SEQ ID NO: 1~26 任一具有至少 80%、优选地至少 90%、更优选地至少 95%、甚至更优选地至少 99% 的序列相似性的氨基酸序列。

在另一优选例中, 所述的纳米抗体 VHH 链 CDR 区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1~26 中任一相比包含一个或多个氨基酸取代, 优选保守氨基酸取代。

30 在另一优选例中, 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如 1-3 个, 较佳地 1-2 个, 更佳地 1 个) 氨基酸并能保留与 Claudin18.2 特异性结合能力的衍生序列。

在另一优选例中, 所述 Claudin18.2 为人或非人哺乳动物的 Claudin18.2。

在另一优选例中, 所述 Claudin18.2 为人、小鼠、大鼠、或非人灵长类动物(如猴)的 Claudin18.2。

35 在本发明的第二方面, 提供了一种特异性结合 Claudin18.2 的多价抗体或多特

异性抗体，所述的多价抗体或多特异性抗体包括至少一个针对 Claudin18.2 表位的抗体元件，所述抗体元件为本发明第一方面所述的抗 Claudin18.2 纳米抗体。

在另一优选例中，所述抗 Claudin18.2 多价抗体或多特异性抗体包括一个或多个抗 Claudin18.2 纳米抗体。

5 在另一优选例中，所述抗 Claudin18.2 抗体包括单体、二价体(二价抗体)、四价体(四价抗体)、和/或多价体(多价抗体)。

在另一优选例中，所述抗 Claudin18.2 抗体包括一条或多条具有如 SEQ ID NO: 1~26 中任一所示的氨基酸序列的 VHH 链。

10 在另一优选例中，所述抗 Claudin18.2 抗体包括两条具有如 SEQ ID NO: 1~26 所示的氨基酸序列的 VHH 链。

在另一优选例中，所述抗体选自：动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。

在本发明的第三方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

15 (i) 本发明第一方面所述的特异性结合 Claudin18.2 纳米抗体、或本发明第二方面所述的特异性结合 Claudin18.2 的多价抗体或多特异性抗体；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的抗体为多价抗体。

20 在另一优选例中，所述的标签序列包括 Fc 标签、HA 标签、Flag 标签和 6His 标签。

在另一优选例中，所述的 Fc 标签包含 hIgG1Fc 和 mIgG1Fc。

在另一优选例中，所述的重组蛋白特异性结合于 Claudin18.1 和/或 Claudin18.2 蛋白。

25 在本发明的第四方面，提供了一种嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白，其特征在于，所述嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含：

(i) 特异性结合 Claudin18.2 的抗原结合域，所述的抗原结合域含有本发明第一方面所述的纳米抗体；

(ii) 跨膜结构域；

30 (iii) 至少一个共刺激结构域；和

(iv) 激活结构域。

在另一优选例中，所述的抗原结合域为单价或多价的。

在另一优选例中，所述的抗原结合域来自本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第三方面所述的重组蛋白。

35 在另一优选例中，所述的 CAR 具有式 Ia 所示结构：

L-VHH-H-TM-C-CD3 ζ (Ia)

式中，

各“-”独立地为连接肽或肽键；

L 为信号肽序列；

5 VHH 为特异性结合 Claudin18.2 的抗原结合域；

H 为铰链区；

TM 为跨膜结构域；

C 为共刺激信号结构域；

CD3 ζ 为源于 CD3 ζ 的胞浆信号传导序列(包括野生型、或其突变体/修饰体)。

10 在另一优选例中，所示 L 为选自下组的蛋白的信号肽：CD28、4-1BB、GM-CSF、CD3、CD8a 或其组合。

在另一优选例中，所述 L 为 CD8 来源的信号肽。

在另一优选例中，所述 L 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的 VHH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、5、18 所示。

15 在另一优选例中，所述的 H 包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的 TM 包括 CD28 来源的跨膜区。

在另一优选例中，所述的 C 为选自下组的蛋白的跨膜区：CD28、4-1BB、CD8a 或其组合。

在另一优选例中，所述的 C 包括 4-1BB 来源的共刺激信号分子。

20 在另一优选例中，所述的 CAR 融合蛋白具有 SEQ ID NO: 33-35 所示的氨基酸序列。

在本发明的第五方面，提供了一种抗体药物偶联物，所述的抗体药物偶联物含有：

25 (a) 本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的多价抗体或多特异性抗体、本发明第三方面所述的重组蛋白；以及

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分，所述偶联部分选自下组：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

30 在另一优选例中，所述的抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

在本发明的第六方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质：本发明第一方面所述的纳米抗体、或本发明第二方面所述的多价抗体或多特异性抗体、本发明第三方面所述的重组蛋白、或本发明第四方面所述的 CAR 融合蛋白。

35

在本发明的第七方面，提供了一种表达载体，所述表达载体含有本发明第六方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的表达载体选自下组：DNA、RNA、病毒载体、质粒、
5 转座子、其他基因转移系统、或其组合。

在另一优选例中，所述表达载体为慢病毒载体。

在本发明的第八方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明第七方面所述的表达载体，或其基因组中整合有本发明第六方面所述的多核苷酸、或表
10 达本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的多价抗体或多特异性抗体、本发明第三方面所述的重组蛋白、或本发明第四方面所述的 CAR 融合蛋白。

在另一优选例中，所述细胞为分离的细胞，和/或所述细胞为基因工程化的细胞。

在另一优选例中，所述细胞为哺乳动物细胞。

15 在另一优选例中，所述细胞为 T 细胞。

在另一优选例中，所述的宿主细胞为工程化的免疫细胞。

在另一优选例中，所述的工程化免疫细胞选自下组：

- (i) 嵌合抗原受体 $\alpha\beta$ T 细胞(CAR-T 细胞);
- (ii) 嵌合抗原受体 $\gamma\delta$ T 细胞(CAR-T 细胞);
- 20 (iii) 嵌合抗原受体 NKT 细胞(CAR-NKT 细胞);
- (iv) 嵌合抗原受体 NK 细胞(CAR-NK 细胞);
- (v) 嵌合抗原受体巨噬细胞。

在本发明的第九方面，提供了一种制备工程化免疫细胞的方法，包括以下步
25 骤：将本发明第六方面所述的核酸分子或本发明第七方面所述的载体转导入 T 细胞或 NK 细胞内，从而获得所述工程化免疫细胞，所述的工程化免疫细胞表达本发明第四方面所述的 CAR 融合蛋白。

在另一优选例中，所述的方法还包括步骤：对获得的工程化免疫细胞进行功能和有效性检测。

30

在本发明的第十方面，提供了一种制剂，所述制剂含有本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的多价抗体或多特异性抗体、本发明第三方面所述的重组蛋白、本发明第四方面所述的 CAR 融合蛋白、或本发明第七方面所述的载体、或本发明第八方面所述的宿主细胞，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋
35 形剂。

在另一优选例中，所述的宿主细胞为工程化的免疫细胞。

在本发明的第十一方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

5 (i) 本发明第一方面所述的纳米抗体、或本发明第二方面所述的多价抗体或多特异性抗体、或本发明第三方面所述的重组蛋白、或表达本发明第四方面所述的 CAR 融合蛋白的免疫细胞；以及

(ii) 药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的免疫偶联物的偶联部分为药物、毒素、和/或治疗用同位素。

10 在另一优选例中，所述的药物组合物中还含有其他的治疗免疫系统疾病或肿瘤疾病的药物。

在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备预防和/或治疗与 Claudin18.2 相关的疾病或病症的药物。

15 在另一优选例中，所述的与 Claudin18.2 相关的疾病或病症选自下组：乳腺癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、宫颈癌、头颈癌、肺癌、食道癌、肾癌、膀胱癌、子宫癌、卵巢癌、或其组合。

在本发明的第十二方面，提供了一种试剂盒，所述试剂盒含有本发明第六方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的重组蛋白或本发明第七方面所述的载体。

20 在另一优选例中，所述试剂盒用于制备表达本发明第四方面所述的受体 CAR 融合蛋白的免疫细胞。

25 在本发明的第十三方面，提供了本发明第一方面所述的纳米抗体、或本发明第二方面所述的多价抗体或多特异性抗体、或本发明第三方面所述的重组蛋白、或表达本发明第四方面所述的 CAR 融合蛋白的免疫细胞的用途，用于制备预防和/或治疗与 Claudin18.2 相关的癌症或肿瘤的药物。

30 在本发明的第十四方面，提供了一种治疗疾病的方法，包括给需要治疗的对象施用：本发明第一方面所述的纳米抗体、或本发明第二方面所述的多价抗体或多特异性抗体、或本发明第三方面所述的重组蛋白、或表达本发明第四方面所述的 CAR 融合蛋白的免疫细胞。

在另一优选例中，所述疾病为 Claudin18.2 表达阳性的癌症或肿瘤。

35 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)

中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

5 图1显示了抗Claudin 18.2重组抗体对293FT-CLDN18.1和293FT-CLDN18.2细胞的结合效率。

图2显示了靶向Claudin 18.2的嵌合抗原受体的单CAR、双表位CAR的示范性设计。

图3显示了靶向Claudin 18.2 T细胞的CAR表达水平。

10 图4显示了体外连续培养的靶向Claudin 18.2 CAR-T细胞的记忆表型。

图5显示了CAR-T瞬时杀伤结果靶向Claudin 18.2 CAR-T细胞对靶细胞293FT-Claudin18.2、293FT-Claudin18.1、293FT细胞的细胞毒性。

图6显示了靶向Claudin 18.2 CAR-T细胞对靶细胞AGS-Claudin18.2的体外细胞毒性。

15 图7显示了靶向Claudin18.2 CAR-T细胞与靶细胞共培养时的细胞因子释放水平。

图8显示了人源化Claudin18.2 CAR-T细胞与母本CAR-T的体外细胞毒性比较。

图9显示了使用ELISA检测抗Claudin 18.2重组抗体与Claudin18.2 VLP抗原结合的亲和力。

20 图10显示了靶向Claudin18.2 CAR-T细胞的体内药效。

具体实施方式

25 本发明人经过广泛而深入的研究，首次意外地获得一种高亲和力优异和高抗肿瘤活性的抗CLDN18.2抗体。具体地，本发明人经过大量筛选，首次获得了多株特异性结合CLDN18.2的纳米抗体。在纳米抗体基础上，本发明进一步制备了重组抗体和人源化抗体，以及靶向Claudin 18.2的嵌合抗原受体。本发明以特异性结合Claudin18.2 的羊驼重链抗体为基础，提供与传统抗体相比亲和力更高，对目标抗原特异性更强、免疫原性更低的CAR-T。本发明的CAR-T细胞具有优异的靶细胞杀伤活性，能够很好的浸润至实体肿瘤内部，在动物体内发挥优异的抑瘤效果。在此
30 基础上完成了本发明。

术语

为了可以更容易地理解本公开，首先定义某些术语。如本申请中所使用的，除非本文另有明确规定，否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。
35

术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。例如，如本文所用，表述“约 100”包括 99 和 101 和之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

如本文所用，术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。
5 换言之，所述术语也包括“基本上由...构成”、或“由...构成”。

序列同一性通过沿着预定的比较窗(其可以是参考核苷酸序列或蛋白的长度的 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 100%)比较两个对齐的序列，并且确定出现相同的残基的位置的数目来确定。通常地，这表示为百分比。核苷酸序列的序列同一性的测量是本领域技术人员熟知的方法。

10 如本文所用，术语“重链可变区”与“V_H”可互换使用。

如本文所用，术语“可变区”与“互补决定区(complementarity determining region, CDR)”可互换使用。

在本发明中，术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，都指特异性结合CLDN18.2的抗体，例如具有重链可变区 (如SEQ ID NO:1~14所示
15 的氨基酸序列)的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

CLDN18.2

人CLDN18全长含261个氨基酸，为四次跨膜蛋白，具有四个跨膜疏水区，胞外为两个环状结构，环1由跨膜区1和跨膜区2环绕而成；环2由跨膜区3和跨膜区4
20 环绕而成。人CLDN18.1与CLDN18.2的N端、跨膜区1及胞外环1的氨基酸组成上存在8个氨基酸差异，其余部分均完全一致，其序列相似度达92%。

抗体

如本文所用，术语“抗体”指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的
25 轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。

已有的抗体编号方案包括：

1. Kabat方案(Kabat等，1991)是基于相同结构域类型的序列之间的高序列变异区域的位置，抗体重(VH)和轻(V_λ和V_κ)可变结构域的编号不同。

2. Chothia的方案(Al-Lazikani，1997)与Kabat的方案相同，但校正了在第一个
30 VH互补决定区(CDR)周围插入注释的位置，使其对应于结构环。同样，增强型Chothia计划(Abhinandan和Martin，2008)对插入位置进行了进一步的结构修正。

3. 与这些类似Kabat的方案相反，IMGT(Lefranc，2003)和AHO(Honegger和Plückthun，2001)都定义了抗体和T细胞受体(TCR)(V_α和V_β)可变结构域的独特方案。因此，可以容易地在域类型之间比较等效残基位置。IMGT和AHO在他们注释
35 的位置数量(分别为128和149)以及他们认为indel发生的位置上有所不同。

免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类Ig根据其较链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如IgG可分为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链根据恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类Ig中每类Ig都可以有 κ 链或 λ 链。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

本发明所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区，所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

10 在本发明中，本发明所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区，所述的重链恒定区包含人源或鼠源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大，为可变区(Fv区)；靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可
15 变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区和4个FR区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2和LCDR3；重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。本发明的实施例13中，结合kabat及Chothia方法，对ch782抗体的6个CDR进行划分。

20 术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的抗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。在本发明一个优选的实施方案中，所述的鼠源CLDN18.2抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3或其变体的重链恒定区。

25 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”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。

术语“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。人源化抗体可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共
30 DNA数据库或公开的参考文献获得。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。

术语“抗体的抗原结合片段”(或简称“抗体片段”)是指抗体的保持特异性结合抗原(例如，CLDN18.2)的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段
35 来进行抗体的抗原结合功能。术语“抗体的抗原结合片段”中包含的结合片段的实例

包括

- (i) Fab片段，由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；
- (ii) F(ab')₂片段，包含通过较链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；
- (iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段；
- (iv) 由抗体的单臂的VH和VL结构域组成的Fv片段。

Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的，Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。

术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。所述6个CDR的最常用的定义之一由Kabat E.A等人，(1991) Sequences of proteins of immunological interest.NIH Publication, No. 91-3242)提供。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位(例如，CLDN18.2分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或非连续的氨基酸。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体以大约小于 10^{-7} M，例如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的亲和力(KD)结合。

术语“竞争结合”是指与本发明的单克隆抗体识别CLDN18.2的胞外区上的相同表位(也称为抗原决定簇)或相同表位的一部分并与所述抗原结合的抗体。与本发明的单克隆抗体结合相同表位的抗体是指识别并结合于本发明的单克隆抗体所识别的CLDN18.2的氨基酸序列的抗体。

术语“KD”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常，本发明的抗体以小于大约 10^{-7} M，例如小于大约 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的解离平衡常数(KD)结合CLDN18.2。

如本文所用，术语“抗原决定簇”指抗原上不连续的，由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

本发明不仅包括完整的抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

在本发明中，抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体，例如嵌合的和人源化的单克隆抗体，包括人的和非人的部分，可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

如本文所用，术语“单克隆抗体”指得自单个细胞来源的克隆分泌的抗体。单克隆抗体是高度特异性的，针对单个抗原表位。所述的细胞可能是真核的、原核的或噬菌体的克隆细胞株。

在本发明中，抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重

特异性。

在本发明中，本发明的抗体还包括其保守性变异体，指与本发明抗体的氨基酸序列相比，有至多10个，较佳地至多8个，更佳地至多5个，最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据下

5 表A进行氨基酸替换而产生。

表A		
最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

抗CLDN18.2人源化抗体

本发明提供抗CLDN18.2人源化抗体(以下简称CLDN 18.2抗体)。具体地，本发

10 明提供一种针对CLDN18.2的高特异性和高亲和力的人源化抗体，其包括重链和轻链，所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列，所述轻链含有轻链可变区(VL)氨基酸序列。

抗体人源化中人骨架区的选择通常有两种，一种是已知的成熟抗体，一种是人Germline序列。已知的成熟抗体骨架区通常含有体细胞突变位点，可能带来潜在

的免疫原性。相比已成熟抗体，人Germline序列骨架区理论上免疫原性更低，而且结构更灵活，可塑性强，容易接受不同的CDR区。人抗体Germline基因在人体中的使用频率具有一定的偏向性，选择使用频率高的Germline骨架区人源化后的抗体具有免疫原性低、表达量高、结构稳定等优点。

5 在本发明的一个优选地实施方式中，在人源化时并未选择与鼠源抗体相似度最高的Germline序列，而是兼顾相似性及人体使用频率，经过大量实验筛选，选择了优选序列的骨架区进行人源化。选用人抗体Germline骨架区进行CDR移植，这样构建的人源化抗体结构更加稳定、表达量高、免疫原性低、成药性更高。

10 在另一优选例中，所述的重链恒定区和/或轻链恒定区可以是人源化的重链恒定区或轻链恒定区。更优选地，所述的人源化的重链恒定区或轻链恒定区为人IgG1、IgG2等的重链恒定区或人kappa、Lambda轻链恒定区。

在另一优选例中，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性的至少80%，较佳地至少85%，更佳地至少为90%，最佳地至少95%的氨基酸序列。

15 本发明的抗体可以是双链或单链抗体，并且可以优选为全人源化抗体。

本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段，如：Fab、Fab'、(Fab')₂、或该领域内其他已知的抗体衍生物等，以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

本发明抗体可以是靶向CLDN18.2的人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

20 本发明上述内容中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%，更优选为不超过35%，更优选为1-33%，更优选为5-30%，更优选为10-25%，更优选为15-20%。

抗体的制备

25 任何适于产生单克隆抗体的方法都可用于产生本发明的CLDN18.2抗体。例如，可以用连接或天然存在的CLDN18.2蛋白或其片段免疫动物。可以使用合适的免疫接种方法，包括佐剂、免疫刺激剂、重复加强免疫接种，可以使用一种或多种途径。

30 任何合适形式的CLDN18.2都可以作为免疫原(抗原)，用于产生对CLDN18.2特异的非人抗体，筛选所述抗体的生物学活性。免疫原可以单独使用，或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合使用。免疫原可以由天然来源纯化，或者在遗传修饰的细胞中产生。编码免疫原的DNA在来源上可以是基因组或非基因组的(例如cDNA)。可以使用合适的遗传载体表达编码免疫原的DNA，所述载体包括但不限于腺病毒载体、杆状病毒载体、质粒和非病毒载体。

35 人源化抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白，包括IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

同样，任一类轻链都可以在本文的化合物和方法中使用。具体地说， κ 、 λ 链或其变体在本发明的化合物和方法中是可以用的。

本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术，比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外，还可将轻链和重链的编码序列融合在一起，
5 形成单链抗体。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。然后可将该
10 DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的，但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子
15 有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。

本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。
20

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如植物或动物细胞(如哺乳动物细胞)。

本发明中所述的用重组DNA转化宿主细胞的步骤可用本领域熟知的技术进行。获得的转化子可用常规方法培养，转化子表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，用常规培养基在合适的条件下培养。
25

通常，在适合本发明抗体表达的条件下，培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤，如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的
30 常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如，单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。

35 抗体制剂

抗体在不同的制剂缓冲液中具有不同的稳定性，表现为电荷异质性的变化、抗体分子的降解、聚合等，这些质量性质的变化与抗体本身的理化性质相关，因此，在抗体药物开发过程，需根据不同抗体的理化性质筛选适合其自身的制剂缓冲液。目前常用的抗体制剂缓冲体系有磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液、组氨酸缓冲液等，
5 同时根据抗体性质会添加不同浓度的盐离子或山梨醇、海藻糖、蔗糖等赋形剂，以及适量的诸如吐温等表面活性剂，以维持抗体的稳定性。

药物组合物

本发明还提供了一种组合物。在优选例中，所述的组合物是药物组合物，它
10 含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC或相应的CAR-T细胞，以及药学上可接受的载体。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为5-8，较佳地pH约为6-8，尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但不限于)：瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

15 本发明所述抗体也可以是由核苷酸序列在细胞内表达用于的细胞治疗，比如，所述抗体用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)等。

本发明的药物组合物可直接用于结合CLDN18.2蛋白分子，因而可用于预防和
治疗CLDN18.2相关的疾病。此外，还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%，较佳地0.01-90wt%，更
20 佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例
25 如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的药物组合物施用于哺乳动物，其中该
安全有效量通常至少约10微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约50毫克/千
克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然，具体剂量
30 还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内。

检测用途和试剂盒

本发明的抗体可用于检测应用，例如用于检测样本，从而提供诊断信息。

本发明中，所采用的样本(样品)包括细胞、组织样本和活检标本。本发明使用的
35 的术语“活检”应包括本领域技术人员已知的所有种类的活检。因此本发明中使用的

活检可以包括例如通过内窥镜方法或器官的穿刺或针刺活检制备的组织样本。

本发明中使用的样本包括固定的或保存的细胞或组织样本。

本发明还提供了一种指含有本发明的抗体(或其片段)的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。在优选例中,本

5 发明的抗体可以固定于检测板。

本发明的主要优点包括:

1. 本发明Claudin 18.2的单结构域抗体(VHH结构域)具有高特异性和亲和力。
2. 本发明的抗Claudin 18.2抗体结合CLDN18.2亲和力比其对CLDN18.1的亲
- 10 力大至少100倍(cell based)。
3. 本发明的Claudin 18.2 CAR T细胞对Claudin 18.2阳性靶细胞显示特异性的体外细胞毒性,明显高于Claudin 18.1靶细胞的体外杀伤效率。
4. 本发明的Claudin 18.2 CAR T细胞能有效抑制体内Claudin18.2阳性肿瘤的生长,并显示出持久抗肿瘤药效。
- 15 5. 本发明的Claudin 18.2 CAR05 T细胞在体外连续培养过程中显示更强的免疫记忆表型。
6. 本发明的人源化Claudin 18.2 CAR T细胞与其母本CAR-T细胞比较,对靶细胞毒性无明显降低,也无明显降低亲和力。
7. 本发明的抗体可用于特异检测Claudin 18.2蛋白和/或Claudin 18.1蛋白。

20

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条

25

件。除非特别说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

除非特别说明,否则本发明实施例中所用材料和试剂均为市售产品。

实施例1

1. 羊驼抗体筛选

30

从噬菌体抗体库中筛选得到抗体,羊驼抗体库建立过程简述如下:

将抗原 Claudin 18.2 VLP(0.5mg)和 293-Claudin 18.2 细胞(2e7)在羊驼颈部下多点注射,多轮免疫后,采集 50ml 外周血,用于抗体效价滴度检测及纳米抗体库构建。

35

1.1 VHH 噬菌体展示文库构建

羊驼多轮免疫后，其血清效价满足：1) ELISA 效价>32000, 2) FACS 效价>200, 到达建库条件。

分离 PBMC，提取 PBMC 的总 RNA，再反转录为 cDNA，通过巢式 PCR 扩增 VHH，再将 VHH 片段插入噬菌粒，扩增噬菌体收获得到抗体库。

- 5 经检测 VHH3 抗体库的库容为 5.2×10^9 ，重组效率(克隆 PCR 阳性克隆数/总克隆数)为 90%，符合高品质免疫库的相关指标。

1.2 通过细胞筛选(cell panning)进行 Claudin18.2 抗体筛选

简述过程如下：

- 10 1.2.1 预处理：使用 Claudin 18.1 过表达细胞(作为阴性细胞)加入抗体库；
1.2.2 结合步骤，将步骤 1 离心取上清，使用预处理的抗体库分别与 Claudin18.1，Claudin18.2 过表达细胞结合，液相筛选；
1.2.3 清洗，清洗 6-8 次；
1.2.4 扩增，感染 NEBalpha5F'细胞，加入辅助噬菌体后，过夜培养；
15 1.2.5 涂板检测富集度(阳性细胞富集的克隆数/阴性细胞富集的克隆数>10，则认为富集成功)；
1.2.6 收获 R1 轮噬菌体，并富集进入下一轮筛选；

1.3 细胞筛选获得克隆的鉴定-噬菌体的流式细胞分析(phage-based FACS)

- 20 1.3.1 细胞筛选获得克隆鉴定：随机挑选与 Claudin18.2 过表达细胞结合的克隆，扩大培养获得噬菌体(phage)，鉴定与 Claudin 18.1 和 Claudin 18.2 过表达细胞的结合力。

1.3.1 细胞准备：

Claudin18.1、18.2 过表达细胞以 2×10^5 个细胞/组，离心，DPBS 洗涤 3 次；

- 25 1.3.2 样品孵育

分别加入扩大培养的噬菌体上清，4℃孵育 2h；

1.3.3 二抗孵育

加入 PE 标记的抗 M13 抗体(浓度 5ug/ml, 100ul)，于 4℃孵育 45min；

1.3.4 DPBS 洗涤

- 30 用 DPBS 洗涤 3 次，用 300ul DPBS 重悬

1.3.5 流式检测

将重悬的细胞用流式仪检测细胞的荧光值结果显示，14 个随机克隆都与 Claudin 18.2 过表达细胞结合，而不与 Claudin18.1 过表达细胞结合。

- 35 1.4 阳性克隆测序

选择将 14 个阳性克隆（from 1.3）进行测序，克隆号与 VHH 结构域序列 ID 见下表，其中 CDR1、CDR2、CDR3 根据 Kabat 编号定义，参考 Deschacht 等人，2010。《免疫学杂志》，184： 5696-704，克隆 7、8、9 和克隆 12、13 的 CDR1、2、3 相同，仅 FR 区不一样，表 1 所示如下。

5

表 1

克隆 ID	VHH 结构域 (SEQ ID NO)	CDR1	CDR2	CDR3
1	SEQ ID NO: 1	LMTTG (SEQ ID NO: 36)	TITFGGTTNYADSVKG (SEQ ID NO: 37)	DVIVGFQDRRVA (SEQ ID NO: 38)
2	SEQ ID NO: 2	INYMG (SEQ ID NO: 39)	TITRGGSTNYQG NLKG (SEQ ID NO: 40)	RINFGILGGLRDY (SEQ ID NO: 41)
3	SEQ ID NO: 3	NYNVA (SEQ ID NO: 42)	GATWSGRITNYSDSVRG (SEQ ID NO: 43)	NSFQLGDKPGDYHY (SEQ ID NO: 44)
4	SEQ ID NO: 4	LNyla (SEQ ID NO: 45)	LVSSGGSTQYGDSVKG (SEQ ID NO: 46)	HTYDFLGRDY (SEQ ID NO: 47)
5	SEQ ID NO: 5	SYIMG (SEQ ID NO: 48)	GITWSGGIKDYADSVKG (SEQ ID NO: 49)	NAIQLTRRSGDYAY (SEQ ID NO: 50)
6	SEQ ID NO: 6	INYMG (SEQ ID NO: 39)	TITRGGSTNYQG NLKG (SEQ ID NO: 40)	RINFGILGGLRDY (SEQ ID NO: 41)
7	SEQ ID NO: 7	LNFMG (SEQ ID NO: 51)	IATSGGSIQYGDSVKG (SEQ ID NO: 52)	HTYDFLGRDY (SEQ ID NO: 53)
8	SEQ ID NO: 8	LNFMG (SEQ ID NO: 51)	IATSGGSIQYGDSVKG (SEQ ID NO: 52)	HTYDFLGRDY (SEQ ID NO: 53)
9	SEQ ID NO: 9	LNFMG (SEQ ID NO: 51)	IATSGGSIQYGDSVKG (SEQ ID NO: 52)	HTYDFLGRDY (SEQ ID NO: 53)
10	SEQ ID NO: 10	INYMG (SEQ ID NO: 39)	TITRGGTTNYQGDLKG (SEQ ID NO: 54)	RINFGILGGLRDY (SEQ ID NO: 41)
11	SEQ ID NO: 11	INYMG (SEQ ID NO: 39)	IITRGGSTTYAPSLKG (SEQ ID NO: 55)	RINFGILGGLRDY (SEQ ID NO: 41)
12	SEQ ID NO: 12	LNFMG (SEQ ID NO: 51)	IATSGGSIQYGDSVKG (SEQ ID NO: 52)	HTYDFLGRDY (SEQ ID NO: 53)
13	SEQ ID NO: 13	LNFMG (SEQ ID NO: 51)	IATSGGSIQYGDSVKG (SEQ ID NO: 52)	HTYDFLGRDY (SEQ ID NO: 53)
14	SEQ ID NO: 14	IITMG (SEQ ID NO: 56)	TVTRGGRLNYGDSVKG (SEQ ID NO: 57)	ILESGNF (SEQ ID NO: 58)

1.5 细胞筛选富集噬菌体 NGS 测序

10 将经过 293FT-Claudin 18.2 过表达细胞筛选富集的噬菌体 pool，用 PCR 方法 扩增 VHH3 基因片段，进行 NGS 测序，获得 30 个 VHH3 基因序列。

对这 30 个 VHH3 基因，进一步测试所表达的 VHH 结构域与 Claudin 18.2 的结合性能，获得 6 个性能最优的纳米抗体，其 VHH 结构域的序列，以及 CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列见表 2。

表 2：细胞筛选富集噬菌体的 NGS 测序分析

克隆 ID	VHH 结构域 (SEQ ID NO)	CDR1	CDR2	CDR3
15	SEQ ID NO: 15	TSPSAMG (SEQ ID NO: 59)	TIGWTGGKQYYADSVK G (SEQ ID NO: 60)	RRAGYTGTPTRGDSYEH (SEQ ID NO: 61)
16	SEQ ID NO: 16	YWAIS (SEQ ID NO: 62)	CIRFSDGSTYDADSVKG (SEQ ID NO: 63)	DMWADCGSMEYDY (SEQ ID NO: 64)
17	SEQ ID NO: 17	LMTTG (SEQ ID NO: 36)	TITFGGTTNYADSVKG (SEQ ID NO: 37)	DVIVGFQDRRVA (SEQ ID NO:38)
18	SEQ ID NO: 18	LMTTG (SEQ ID NO: 36)	TITFGGTTNYADAVKG (SEQ ID NO: 65)	DYIFGFGDRRVA (SEQ ID NO: 66)
19	SEQ ID NO: 19	INYAG (SEQ ID NO: 67)	LITRGGSTTYGASLKG (SEQ ID NO: 68)	RINFGILGGLRDY (SEQ ID NO: 41)
20	SEQ ID NO: 20	INYMG (SEQ ID NO: 39)	LITRGGTTNYAESLKG (SEQ ID NO: 69)	RINFGILGGLRDY (SEQ ID NO: 41)

1.6 优选序列的亲合力检测-ELISA

5 基于 ELISA 方法检测重组抗体的亲合力,从 14 个克隆中优选 4 个序列(克隆 1、5、8 和 10), 合成重组抗体 VHH-hIgG1Fc, 检测其与抗原的亲合力, 抗原分别用 Claudin 18.2 VLP 与 Claudin18.2 重组蛋白(His tag), ELISA EC50 数据见表 2。

检测方法如下:

- 1.5.1 包被: 第一天将抗原(200 ng/孔)包被于 ELISA 板中, 4℃, 过夜;
- 10 1.5.2 封闭: 第 2 天使用 0.5% BSA 封闭 ELISA 板, 室温 2 h;
- 1.5.3 结合: 第 2 天将 VHH-hIgG1 Fc 以 10 μg/mL 开始, 1:3 做 7 个浓度, 100 μL/孔加入 ELISA 板中, 室温 2 h;
- 1.5.4 清洗: 用 PBS-Tween 清洗 ELISA 板 加入抗人 IgG1Fc HRP 抗体 100 μL 室温 1 h;
- 15 1.5.5 显色: 用 PBS-Tween 清洗 ELISA 板, 再用 PBS 清洗, 加入 100 μL TMB, 置于 37℃, 5-10 min;
- 1.5.6 终止: 加入 1 M 磷酸 50 μL 终止反应;
- 1.5.7 测值: 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光值, 结果如表 3 所示。

表 3

浓度(ug/mL)	Claudin18.2 VLP (200ng/孔)				Claudin 18.2-his (200ng/孔)		
	1-hIgG1 Fc	5-hIgG1 Fc	8-hIgG1 Fc	10-hIgG1 Fc	1-hIgG1 Fc	5-hIgG1 Fc	10-hIgG1 Fc
10	2.657	2.353	2.464	2.623	2.361	溢出	3.379
3.333	2.126	2.138	2.103	2.512	1.083	3.499	2.149
1.111	1.355	1.859	1.872	2.141	0.473	2.530	1.065
0.37	0.585	0.942	0.931	1.458	0.216	1.411	0.476
0.123	0.293	0.39	0.474	0.568	0.100	0.463	0.172

0.041	0.271	0.275	0.337	0.355	0.070	0.207	0.084
0.014	0.282	0.274	0.326	0.329	0.066	0.108	0.063
0	0.275	0.247	0.289	0.311	0.060	0.057	0.054
EC50(ug/mL)	1.46	0.55	0.61	0.40	15.68	0.81	4.00
EC50(nM)	18.28	6.87	7.66	4.96	196	10.1	50

如表 3 所示，本公开的重组抗体均以剂量依赖性与 Claudin18.2 VLP 或 Claudin18.2-his 抗原结合，其结合效力在 4nM-200nM 范围内（EC50 值）。

5 **1.7 优选序列的亲合力检测-FACS**

基于细胞的流式细胞技术检测重组抗体与293FT-hClaudin18.1细胞（阴性细胞）和 293FT-hClaudin18.2细胞（阳性细胞）的结合能力。将293FT-Claudin 18.1细胞和 293FT-Claudin 18.2细胞分别与4个优选序列的重组抗体(5ug/mL、10ug/mL)在4℃下 10 孵育30分钟，然后用DPBS洗涤，洗涤后将细胞沉淀重悬于二抗（1:100, Goat anti human IgG(H+L), FITC），继续避光孵育15分钟，然后再用DPBS洗涤，取细胞进行流式检测重组抗体与293FT-hClaudin18.1细胞和293FT-hClaudin18.2细胞的结合水平。重组抗体分别带有Fc标签，标记为1-hIgG1Fc、5-hIgG1Fc、8-hIgG1Fc、10-hIgG1Fc，使用的重组抗体浓度为10ug/mL。每种测试重组抗体的结合能力被描述为结合百分比，用(具有抗体结合的细胞/总细胞)×100%计算。

15 结果如图 1 所示，重组抗体与 Claudin 18.1 细胞结合百分比分别为 2.75%、2.06%、2.26%、2.06%，与 Claudin 18.2 细胞结合其结合百分比分别为 88.94%、95.96%、93.86%、96.1%，表明重组抗体与人的 Claudin18.2 结合特异性

1.8 人源化抗 Claudin 18.2 抗体

20 人源化抗Claudin18.2抗体是以Claudin 18.2 VHH 抗体为基础，参照例如Vincke 等人，《生物化学杂志》，284(5):3273-3284(2009)文献对抗体进行了人源化改造，本申请所公开的人源化VHH结构域的框架区在此基础上进行改造，拟降低抗原性。来自骆驼科物种的人源化单结构域抗体的设计，其VHH中的标志残基编号根据 Kabat，例如残基11、37、44、45和47 (Muyldermans, 《分子生物技术综述》，74: 25 277□302(2001)，人源化序列见表4。

表 4

克隆 ID	VHH 结构域 (SEQ ID NO.)	CDR1	CDR2	CDR3
5H1	SEQ ID NO: 21	SYIMG (SEQ ID NO: 48)	GITWSGGIKDYADSV KG (SEQ ID NO: 49)	NAIQLTRRSGDYAY (SEQ ID NO: 50)
5H2	SEQ ID NO: 22			
5H3	SEQ ID NO: 23			
5H4	SEQ ID NO: 24			
18H1	SEQ ID NO: 25	LMTTG (SEQ ID No: 36)	TITFGGTTNYADAVKG (SEQ ID NO: 65)	DYIFGFGDRRVA (SEQ ID NO: 66)
2H1	SEQ ID NO: 26	INYMG (SEQ ID NO: 39)	TITRGGSTNYQG NLKG (SEQ ID NO: 40)	RINFGILGGLRDY (SEQ ID NO: 41)

1.9 靶向 Claudin 18.2 的嵌合抗原受体的单 CAR、双表位 CAR 的示范性设计

设计 Claudin 18.2 单 CAR、双 CAR 的示例结构如图 2 所示, CAR 构建体示范性氨基酸序列如表 5 所列。

实施例 2 靶向 Claudin18.2 CAR-T 的制备

2.1 靶向 Claudin18.2 CAR-T 的制备

通用材料和方法:

从供体血液中分离外周血单个核细胞(PBMC), 并扩增 T 细胞通过密度梯度离心机使用 Ficoll 从供体血液中分离外周血单个核细胞(PBMC)。然后富集 T 细胞, 通过与抗 CD3/抗 CD28 偶联的磁珠激活, 培养和扩增。

靶细胞系、PBMC、CAR-T 培养:

1. 在 DMEM 培养基中培养 293FT-Luc 、 293FT-CLDN18.1-luc 、 293FT-CLDN18.2-Luc 细胞系、 AGS-CLDN18.2-Luc 、 AGS-CLDN18.1(KO CLDN18.2)-Luc(KO CLDN18.2 指敲除内源性 Claudin18.2)、Aspc-1-CLDN 18.2-Luc 和 293FT 系列细胞, 所述带 Luc 标签的细胞都稳定表达萤火虫荧光素酶。在 F12 培养基中培养 AGS-CLDN 18.2-Luc 和 AGS-CLDN 18.1(KO CLDN18.2)-Luc 系列细胞, 在 RPMI1640 培养基中培养 Aspc-1-CLDN 18.2-Luc 细胞。RPMI1640、F12 和 DMEM 培养基均添加了 10% (v/v)胎牛血清和 100U/ml 青霉素和链霉素、2mM 谷氨酰胺和 1mM 丙酮酸钠。所有所述细胞均在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。

2. 在 X-vivo15 培养基(含 5%FBS、2mM L-谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠和 300IU/ml rhIL2)中培养 CAR-T 细胞。CAR-T 细胞培养基添加 rhIL-2, 每两天添加 300IU/ml IL-2。所有所述细胞均在 37℃、5%CO₂ 培养。

CAR-T 制备

使用 Gene 密码子优化将所选抗体的 VHH 编码序列进行优化, 合成编码嵌合抗原受体(CAR)骨架多肽的核苷酸分子, 克隆到慢病毒载体(pCDH 带有 GFP 表达序列的骨架载体)中, flag tag 插入到铰链区 N 端, VHH 编码序列选自表 1、2、4 对应其 CAR-T 编号, 具体见表 5, 对照抗体(IMAB)为具有 IMAB362 序列包括其重链和轻链可变区片段。

将含有慢病毒包装质粒混合物与表达 CAR 构建体的载体以预先优化的比例与聚醚酰亚胺(PEI)预混合, 室温下孵育 15-20 分钟, 然后将转染混合物添加到 HEK293 细胞中, 继续培养 48-72 小时, 收取上清, 然后浓缩慢病毒。

用慢病毒转染 Dynabeads CD3/CD28 激活的原代 T 细胞。转染后 3 天, 使用

抗 flag 标签抗体检测表达 CAR 的阳性细胞百分比，同时检测 FITC 通道(显示 GFP 表达)。分别生产了三批 CAR-T 细胞，检测其 CAR 的阳性率分别在 30-70%之间，Flag 和 GFP 都表现出接近 1: 1 表达，说明 CAR 与 GFP 共表达成功，见图 3。

5 表 5 用于制备靶向 Claudin18.2 CAR-T 细胞的 CAR VHH 氨基酸序列与相应的 VHH 结构域对应表

CAR 编号	VHH 结构域的 SEQ ID NO.	CAR 编号	VHH 结构域的 SEQ ID NO.
CAR01	SEQ ID NO.1	CAR14	SEQ ID NO.14
CAR02	SEQ ID NO.2	CAR15	SEQ ID NO.15
CAR03	SEQ ID NO.3	CAR16	SEQ ID NO.16
CAR04	SEQ ID NO.4	CAR17	SEQ ID NO.17
CAR05	SEQ ID NO.5	CAR18	SEQ ID NO.18
CAR06	SEQ ID NO.6	CAR19	SEQ ID NO.19
CAR07	SEQ ID NO.7	CAR20	SEQ ID NO.20
CAR08	SEQ ID NO.8	CAR21	SEQ ID NO.21
CAR09	SEQ ID NO.9	CAR22	SEQ ID NO.22
CAR10	SEQ ID NO.10	CAR23	SEQ ID NO.23
CAR11	SEQ ID NO.11	CAR24	SEQ ID NO.24
CAR12	SEQ ID NO.12	CAR25	SEQ ID NO.25
CAR13	SEQ ID NO.13	CAR26	SEQ ID NO.26

实施例 3 靶向 Claudin18.2 CAR-T 细胞的体外功能

3.1 CAR- T 细胞记忆表型分析

10 连续培养 CAR-T 8-10 天后，使用流式细胞仪检测细胞表型，分别用抗-flag 抗体来区分 CAR 阳性细胞和阴性细胞。同时用 CD45RA、CD45RO、CCR7 抗体检测 T 细胞记忆表型，圈门在 CAR 阳性细胞上，分析 Naïve、T_{CM}、T_{EM}、T_{EMRA} 细胞群落如图 4 所示，CAR15、CAR 16、CAR 05 的 CD45RA⁺、CCR7⁺(Naïve cell) 比例大于其他组(20%、23%、13% vs 2%左右)，且 CD45RA⁺CD45RO⁻细胞比例也大于其他组，显示其细胞的年轻化水平比其他 CAR-T 细胞高。

15

3.2 靶向 Claudin18.2 CAR-T 细胞的细胞毒性

构建表达荧光素酶靶细胞包括 293FT-Luc、293FT-Claudin18.1-Luc、293FT-Claudin18.2-Luc。检测时加入荧光素底物后，荧光素酶可以和荧光素反应产生荧光。通过检测荧光的强度，可以通过测量荧光素酶的活性，检测靶细胞的活细胞数，从而评估 CAR-T 细胞的细胞毒性，特异性细胞毒性由下列公式计算：特异性细胞毒性% = 100% × (RLU_{only} - RLU_{样品} / RLU_{only})。RLU_{样品}表示在含有靶向 Claudin18.2 CAR T 细胞的孔中测量的荧光素酶活性，并且 RLU_{only}是指靶细胞 only 组孔中测定的荧光素酶活性。

20

将表达荧光素酶靶细胞 293FT-Luc、293FT-Claudin18.1-Luc 和 293FT-Claudin18.2-Luc 分别与 CAR-T 共孵育，在效：靶比情况下(E:T=1:1)，孵育 6 小时，比较细胞毒性。

结果如图 5 所示，从左至右 3 根数据柱分别代表 CAR T 细胞对靶细胞 293FT-Luc、293FT-Claudin18.1-Luc 和 293FT-Claudin18.2-Luc 的裂解率。

结果表明，IMAB、CAR02、CAR04 至 CAR13、以及 CAR18 T 细胞对 293FT-Luc 细胞和稳定表达人 Claudin18.1 的 293FT-Luc 细胞没有显示出明显的细胞毒性。CAR01、CAR17 CAR-T 细胞对稳定表达人 Claudin18.1、Claudin18.2 的 293FT-Luc 细胞显示出明显的细胞毒性，CAR14 T 细胞对 293FT-Luc、293FT-Claudin18.1-Luc、293FT-Claudin18.2-Luc 细胞都有明显的细胞毒性。此外，CAR02、CAR05 和 CAR18 T 细胞表现出更优异的杀伤特异性(其针对 293FT-Claudin18.2-Luc 细胞的裂解率/293FT-Claudin18.1-Luc 的裂解率的比值最高)。

实时细胞分析(RTCA)结果如图 6 所示，在效：靶比(1:1)情况下，除了 CAR16，对稳定表达人 Claudin18.2 的 AGS 细胞没有显示出明显的细胞毒性，CAR15 对稳定表达人 Claudin18.2 AGS 细胞毒性低于其他 CAR-T；除了 CAR15，16 外的 CAR-T 与靶细胞 AGS-Claudin18.2 共孵育 10 小时都能表现明显的细胞毒性。

3.3 细胞因子的释放

CAR-T 细胞和 AGS-Claudin18.2 细胞各 100ul，以 1:1 的比例混合在 RPMI 培养基中，密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 每个 CAR-T 细胞，在 96 孔板中培养过夜。然后收集培养基并进行离心，取上清，通过细胞因子检测试剂盒(CBA 试剂盒，BD)检测释放到细胞培养基的细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 和 TNF。

检测结果如图 7 所示，CAR17-CAR20、CAR02 至 CAR06、CAR10 的共培养上清中都检测出大量 IL-2、TNF α 和 IFN γ ，表明了 Claudin18.2 CAR-T 细胞对 CLDN18.2 阳性靶细胞作用过程中特异性释放细胞因子包括 IL-2、TNF α 和 IFN γ 。

有利地，本发明的这些 CAR T 细胞均不会导致 IL-6 的大量释放，提示引起细胞因子风暴的风险低。

另外，CAR05 T 细胞出乎意料地导致 IL-2、TNF α 和 IFN γ 因子的高释放(明显高于其他 CAR T 细胞)。

实施例 4 人源化 VHH 结构域 CAR-T 细胞的体外数据

同实施例 3 靶向 Claudin18.2 CAR-T 细胞的体外功能方法，检测人源化 VHH 结构域 CAR-T 细胞的体外功能如图 8。

分析培养 8 天后 CAR-T 表型，结果显示除了 CAR21 与 CAR05 表型有明显差异，CAR21 其 CD45RA+CCR7+(Naïve) cell 比例明显低于 CAR05、CAR22、

CAR23(27.5% vs. 2.4%)，CAR21 T_{EMRA} 细胞比例明显高于 CAR05(61.4% vs. 43.9%)，符合其瞬时杀伤结果，瞬时杀伤速率大于 CAR05。

结果如图 8 显示，人源化结构域 CAR-T 细胞与母本 CAR-T 比较瞬时杀伤效力，其中 CAR21(人源化)比 CAR05(未人源化)对 293FT-CLDN18.2-Luc(80% vs. 50%)、Nugc4-CLDN18.2-Luc(70% vs. 45%)显示更高瞬时杀伤效力，而 CAR22、CAR23(人源化)与 CAR05(未人源化)瞬时杀伤效力相近。CAR25(人源化)与 CAR18(未人源化)对 293FT-CLDN18.2-Luc 瞬时裂解率为 75% VS. 60%，CAR26(人源化)与 CAR02(未人源化)对 293FT-CLDN18.2-Luc 瞬时裂解率为 70% VS. 60%，结果显示人源化 CAR25 和 CAR26 的比母本 CAR-T 显示更高的瞬时杀伤效率。

10

实施例 5 亲和力检测

5.1 使用 ELISA 检测重组抗体与 Claudin18.2 VLP 抗原的结合曲线

分别合成下表重组抗体，利用 ELISA 来检测 Claudin18.2-VLP 蛋白与上述重组抗体结合。ELISA 实验具体操作如下：

15 酶标板中加入 Claudin18.2-VLP 蛋白 200ng/孔，4℃包被过夜。PBS 清洗三遍，加入 1% BSA/PBS，200uL/孔，37℃封闭 1 小时。100ul PBS 洗板后加入梯度稀释的上述融合抗体，37℃结合 1 小时。PBST 清洗三遍，加入 100ul 1：5000 稀释的 HRP-山羊抗鼠 IgG Fc 37℃结合 1 小时。PBST 清洗三遍，加入 100uL/孔 TMB 显色液，37℃显色 10 分钟，加入 1 M 磷酸 50 μL 终止反应，用酶标仪测量 450 nm 处的吸光值

20

ELISA 技术检测 VHH 结合抗原能力的实验结果如图 9 所示。经测试的几种本发明纳米抗体的 EC₅₀ 值均优于阳性对照抗体 IMAB。

基于 EC₅₀ 值，亲和能力从高到底排序为 5H3>5>2,18,5H2>5H1>IMAB。

25 5.2 使用流式方法检测重组抗体与 293FT-CLDN18.1-Luc 或 293FT-CLDN18.2-Luc 细胞的结合能力

以 293FT-Claudin 18.1 细胞做阴性细胞，293FT-Claudin 18.2 细胞作为阳性细胞，分别与梯度稀释的融合抗体 anti-Claudin18.2 VHH-mIgG2aFc 于 4℃共孵育 1 小时，PBS 清洗三遍，加入二抗(1：200 APC goat anti-mouse IgG Fc)，于 4℃孵育 30 分钟，30 PBS 清洗一遍，上机进行流式检测，FACS 技术检测 VHH 亲和力结果见表 6。

表 6

抗体 ID	EC50, nM	
	结合到 293FT CLDN18.1-Luc	结合 293FT CLDN18.2-Luc
2-mIgG2aFc	133.2nM	0.02nM
5-mIgG2aFc	N.D.	0.013nM
18-mIgG2aFc	N.D.	0.06nM

IMAB-mIgG2aFc	N.D.	0.07nM
---------------	------	--------

5.3 使用 SPR 技术检测重组抗体与人 Claudin18.2 蛋白的亲和力

将 6 个抗体用运行试剂稀释至 5 μg/mL 并以 10 μL/min 的流速注入到 Protein A 捕获实验通道(Fc2)约 200 RU。参比通道(Fc1)不需要进行配体的捕获

5 将人 Claudin-18.2 蛋白用运行试剂进行 2 倍倍比稀释(表 5)。将稀释后的人 Claudin-18.2 蛋白依次以 30 μL/min 的流速注入到实验通道(Fc2)与参比通道(Fc1)，结合和解离相应时间。结合解离步骤均在运行试剂中进行。每一个浓度分析后，芯片需要用 pH 值为 1.5 的甘氨酸盐酸以 20 μL/min 的流速再生 30 s，洗掉配体以及未解离的分析物。进行下一个浓度分析时，实验通道(Fc2)需要重新捕获相同量的配体。

使用 Biacore 8K 分析软件 Biacore Insight Evaluation Software 计算每个样品的 KD 值。参比通道(Fc1)用于背景的扣减。

解离常数 KD 值（解离速率 Kd/结合速率 Ka 的比值）越低，代表抗体的亲和力越高。KD 值因抗体和抗原的不同复合物而异，并且取决于 Ka 和 Kd。

15 结果见表 7，H1-mIgG Fc 、IMAB-mIgG Fc 、5H2-mIgG2a Fc、5-mIgG2a Fc、2-mIgG2a Fc 的 KD 分别为 7.21nM、5.65nM、3.32nM、3.02nM、1.1nM。抗体亲和力排序（从大到小）2-mIgG2a Fc、5-mIgG2a Fc、5H2-mIgG2a Fc、IMAB-mIgG Fc、5H1-mIgG Fc。

20 Ka 排序（从大到小）： 2-mIgG2a Fc、IMAB-mIgG Fc、5H2-mIgG2a Fc、5-mIgG2a Fc、5H1-mIgG Fc。

Kd 排序（从大到小）： IMAB-mIgG Fc、5H1-mIgG Fc、2-mIgG2a Fc、5H2-mIgG2a Fc、5-mIgG2a Fc。

表 7 4 个抗体与人 Claudin-18.2 蛋白亲和力测试结果

抗体编号	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
5-mIgG Fc	1.23E+05	3.73E-04	3.02nM
5H1-mIgG Fc	7.66E+04	5.52E-04	7.21nM
5H2-mIgG Fc	1.26E+05	4.17E-04	3.32nM
2-mIgG Fc	4.71E+05	5.20E-04	1.10nM
IMAB-mIgG Fc (阳性对照)	1.33E+05	7.53E-04	5.65nM

5.4 体内抗肿瘤药效研究

在 Aspc-1 18.2-Luc 胰腺癌 NOG-DKO 小鼠 (NOD.Cg-B2mem1Tac Prkdcscid H2-Ab1tm1Doi Il2rgtm1Sug/JicCr1) 模型中评估 Claudin18.2 CAR-T 细胞的体内抗肿瘤药效。

30 皮下注射 2E6 AsPC-1 CLDN18.2-Luc 细胞(CLDN18.2+MSLN+)，待肿瘤负荷

200mm³ 左右时，分组，每组 3-4 只小鼠，分组后一天尾静脉注射 200uL CLDN18.2 CAR-T 细胞、MSLN CAR-T 或 NT 细胞，5E6 CAR-T/鼠，CAR-T 注射后第 1 天，取少量小鼠血检测 CAR-T 细胞体内存活数量，其后每周取一次血样，检测 CAR-T 细胞各种表型，每周两次检测皮下瘤大小和小鼠体重。

5

结果如图 10 所示，Claudin18.2 CAR-T 细胞与 MSLN CAR-T 在体内对移植肿瘤细胞有明显抗肿瘤功能，VHH 候选 CAR-T，包括 CAR02、05、18 显示相似抑制肿瘤效果，至回输 CAR-T 细胞后 Day80 和 D90，小鼠仍旧生存并无肿瘤复发。采用针对 MSLN 靶点的对照 MSLN CAR-T 时，虽然也可杀灭肿瘤细胞，但是在回输 CAR-T 细胞后 Day80 时，肿瘤开始复发，到 Day90 时，肿瘤开始复发至肿瘤体积为约 200mm³。

10

体内实验结果显示，靶向 Claudin18.2 CAR-T（CAR02、05、18）细胞具有较强的抗肿瘤活性、持久性。

15

表 8

SEQ ID NO.	VHH 结构域序列
1	EVQLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILNMTTGWYRQAPGKQ RDLVATITFGGTTNYADSVKGRFTISRDKSKNTAYLQMDNLKPEDT AVYFCYADVIVGFQDRRVAWDAGTQVTVSS
2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNLSINYMGWYRQAPGKER ELVATITRGGSTNYQGNLKGRIISGDNTKDTVYLQMNNLQPEDTA VYYCYFRINFGILGGLRDYWGQGTQVTVSS
3	QVQLVESGGGLVQAGDSVRLSCAASGQTLNYNVAWFRQAPGKE REFVAGATWSGRITNYSDSVRGRFTISRDNAKNTVYLMNSLGP DTAVYHCAANSFQLGDKPGDYHYWGQGTQVTVSS
4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGQFFSLNYLAWYRQAPGSQR ELIALVSSGGSTQYGDSVKGRFTISRDNAKNTVYLMASLKPEDT AVYYCNLHTYDFLGRDYWGQGTQVTISS
5	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASDSTFSSYIMGWFRQAPGKER EFVAGITWSGGIKDYADSVKGRFTIARDNAKNTVYLMNSLKPED AAIYYCAANAIQLTRRSGDYAYWGQGTQVTVSS
6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNLSINYMGWYRQAPGKE RELVATITRGGSTNYQGNLKGRIISGDNTKDTVYLQMNNLQPEDT AVYYCYFRINFGILGGLRDYWGPGTQVTVSS
7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGLNFMGWWRQAPGSQ RELVAIATSGGSIQYGDSVKGRFTISRDNAKNTVYLMASLKPEDT AVYYCNVHTYDFLGRDYWGQGTQVTVSL
8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGLNFMGWWRQAPGSQ RELVAIATSGGSIQYGDSVKGRFTISRDNAKNTVYLMASLKPEDT AVYYCNVHTYDFLGRDYWGQGTQVTVSL
9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGLNFMGWWRQAPGSQ RELVAIATSGGSIQYGDSVKGRFTISRDNAKNTVYLMANLKPEDT AVYYCNVHTYDFLGRDYWGQGTQVTVSL
10	QVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNLSINYMGWYRQAPGKE RELVATITRGGTTNYQGDLKGRFIISGDNTKDTVYLQMNNLQPEDT AVYYCYFRINFGILGGLRDYWGQGTQVTVSS

11	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNILSINYMGWYRQAPGKE RELVAITRGGSTTYAPSLKGRFTISGDNAKDTVYQLQMNSLQPEDT AVYYCNFRINFGILGGLRDYWGQGTQVTVSS
12	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFGLNFMGWWRQAPGSQ RELVAIATSGGSIQYGDSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMASLKPEDT AVYYCNVHTYDFLGRDYWGQGTQVTVSL
13	QVQLVESGGGLAQLGGSRLRLSCAASGSIFGLNFMGWWRQAPGSQ RELVAIATSGGSIQYGDSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMASLKPEDT AVYYCNVHTYDFLGRDYWGQGTQVTVSL
14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSITMGWYRQAPGKQR ELVATVTRGGRLNYGDSVKGRFTISSGNVENTLDLQMNNLKPEDT AVYYCNAILESGNFWGRGTQVTVSS
15	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFSTSPSAMGWFRQAPG KREFVATIGWTGGKQYYADSVKGRFTISRDNVKNNTGYLQMNSL KPEDTAVYYCAARRAGYTGTPTRGDSYEHWGQGTQVTVSS
16	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYWAISWFRQAPGKER EGVSCIRFSDGSTYDADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKPED TGIYYCAADMWADCGSMEYDYWGQGTQVTVSS
17	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILNLMTTGWYRQAPGKQ RDLVATITFGGTTNYADSVKGRFTISRDKSKNTAYLQMDNLKPEDT AVYFCYADVIVGFQDRRVAWDAGTQVTVSS
18	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILNLMTTGWYRQAPGKQ RDLVATITFGGTTNYADAVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNLEPED TAVYFCYLDYIFGFGDRRVAWDQGTQVTVSS
19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNILSINYAGWYRQAPGKER ELVALITRGGSTTYGASLKGRFTISSDNAKDTVYQLQMSSLQPDSTA VYYCNFRINFGILGGLRDYWGQGTQVTVSP
20	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNILSINYMGWYRQAPGKE RELVALITRGGTTNYAESLKGRFTISGDNAKDTVYQLQMNSLQPEDT AVYYCYFRINFGILGGLRDYWGQGTQVTVSS
21	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASDSTFSSYIMGWVRQAPGKG LEWVAGITWSGGIKDYADSVKGRFTIARDNAKNTVYQLQMNSLKP EDAAIYYCAANAIQLTRRSGDYAYWGQGTQVTVSS
22	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDSTFSSYIMGWFRQAPGKG LEFVAGITWSGGIKDYADSVKGRFTIARDNSKNTLYLQMNSLRAE DAAVYYCAANAIQLTRRSGDYAYWGQGTQVTVSS
23	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDSTFSSYIMGWFRQAPGKG LEFVAGITWSGGIKDYADSVKGRFTIARDNAKNTLYLQMNSLRA EDAAVYYCAANAIQLTRRSGDYAYWGQGTQVTVSS
24	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASDSTFSSYIMGWFRQAPGKG LEWVAGITWSGGIKDYADSVKGRFTIARDNAKNTVYQLQMNSLKP EDAAIYYCAANAIQLTRRSGDYAYWGQGTQVTVSS
25	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILNLMTTGWYRQAPGKG LDLVATITFGGTTNYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYFCYLDYIFGFGDRRVAWDQGTQVTVSS
26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNILSINYMGWYRQAPGKG LELVATITRGGSTNYQGNLKGRIISGDNSKDTLYLQMNSLRAED TAVYYCYFRINFGILGGLRDYWGQGTQVTVSS

表 9 CAR 组成序列

SEQ ID. NO.	结构	序列
27	CD8 信号 肽	MALPVTALLPLALLHAARP
28	Hinge+flag	TTTDYKDDDDKPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL

	tag	DFACD
29	CD28 跨膜区	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
30	CD28 胞内区	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
31	CD3ζ 胞内区	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
32	4-1BB 共刺激信号胞内区	RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELR
33	CAR02	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG NILSINYMGWYRQAPGKERELVATITRGGSTNYQGNLKGRIISGDN KDTVYLMQMNLPEDTAVYYCYFRINFGILGGLRDYWGQGTQVTVS STTTDYKDDDDKAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
34	CAR05	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASD STFSSYIMGWFRQAPGKEREFVAGITWSGGIKDYADSVKGRFTIARDN AKNTVYLMQNSLKPEDAIIYYCAANAIQLTRRSRDYAYWGQGTQVT VSSTTTDYKDDDDKAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
35	CAR18	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG SILNLMTTGWYRQAPGKQRDLVATITFGGTTNYADAVKGRFTISRDN KNTVYLMQMNLEPEDTAVYFCYLDYIFGFGDRRVAWDQGTQVTVSST TTDYKDDDDKAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求 书

1. 一种特异性结合 Claudin18.2 的纳米抗体，其特征在于，所述纳米抗体中的 VHH 链的互补决定区 CDR 区为选自下组：

- 5 (1) SEQ ID NO: 36 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 37 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 38 所示的 CDR3；
- (2) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 40 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3；
- 10 (3) SEQ ID NO: 42 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR3；
- (4) SEQ ID NO: 45 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 46 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 47 所示的 CDR3；
- (5) SEQ ID NO: 48 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 49 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3；
- 15 (6) SEQ ID NO: 51 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 53 所示的 CDR3；
- (7) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 54 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3；
- (8) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 20 41 所示的 CDR3；
- (9) SEQ ID NO: 67 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 68 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3；
- (10) SEQ ID NO: 39 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 69 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR3；和/或
- 25 (11) SEQ ID NO: 36 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 65 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 66 所示的 CDR3。

2. 如权利要求 1 所述的纳米抗体，其特征在于，所述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 由 VHH 链的框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 所隔开。

3. 如权利要求 1 所述的纳米抗体，其特征在于，所述纳米抗体的 VHH 链的氨基酸序列选自下组：SEQ ID NO: 1~26、或其组合。

4. 一种特异性结合 Claudin18.2 的多价抗体或多特异性抗体，其特征在于，所述的多价抗体或多特异性抗体包括至少一个针对 Claudin18.2 表位的抗体元件，所述抗体元件为权利要求 1 所述的纳米抗体。

5. 如权利要求 4 所述的多价抗体或多特异性抗体，其特征在于，所述抗 Claudin18.2 抗体包括一条或多条具有如 SEQ ID NO: 1~26 中任一所示的氨基酸序

列的 VHH 链。

6. 一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白具有：

(i) 权利要求 1 所述的特异性结合 Claudin18.2 的纳米抗体、或权利要求 4 所述的特异性结合 Claudin18.2 的多价抗体或多特异性抗体；以及

5 (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

7. 一种嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白，其特征在于，所述嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白从N末端到C末端包含：

(i) 特异性结合Claudin18.2的抗原结合域，所述的抗原结合域含有权利要求1所述的纳米抗体；

10 (ii) 跨膜结构域；

(iii) 至少一个共刺激结构域；和

(iv) 激活结构域。

8. 如权利要求 7 所述的嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白，其特征在于，所述的 CAR 具有式 Ia 所示结构：

15
$$\text{L-VHH-H-TM-C-CD3}\zeta \quad (\text{Ia})$$

式中，

各“-”独立地为连接肽或肽键；

L 为信号肽序列；

VHH 为特异性结合 Claudin18.2 的抗原结合域；

20 H 为铰链区；

TM 为跨膜结构域；

C 为共刺激信号结构域；

CD3 ζ 为源于 CD3 ζ 的胞浆信号传导序列(包括野生型、或其突变体/修饰体)。

9. 如权利要求 8 所述的嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白，其特征在于，所述的 VHH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、5、18 所示。

10. 一种抗体药物偶联物，其特征在于，所述的抗体药物偶联物含有：

(a) 如权利要求 1 所述的纳米抗体、权利要求 4 所述的多价抗体或多特异性抗体、权利要求 6 所述的重组蛋白；以及

30 (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分，所述偶联部分选自下组：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

11. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质：权利要求 1 所述的纳米抗体、或权利要求 4 所述的多价抗体或多特异性抗体、权利要求 6 所述的重组蛋白、或权利要求 7 所述的 CAR 融合蛋白。

35 12. 一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有权利要求 11 所述的多核苷酸。

13. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求 12 所述的表达载体，或其基因组中整合有权利要求 11 所述的多核苷酸、或表达权利要求 1 所述的纳米抗体、权利要求 4 所述的多价抗体或多特异性抗体、权利要求 6 所述的重组蛋白、或权利要求 7 所述的 CAR 融合蛋白。

5 14. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(i) 权利要求1所述的纳米抗体、或权利要求4所述的多价抗体或多特异性抗体、或权利要求6所述的重组蛋白、或表达权利要求7的CAR融合蛋白的免疫细胞；以及

(ii) 药学上可接受的载体。

10 15. 权利要求1所述的纳米抗体、或权利要求4所述的多价抗体或多特异性抗体、或权利要求6所述的重组蛋白、或表达权利要求7所述的CAR融合蛋白的免疫细胞的用途，其特征在于，用于制备预防和/或治疗与Claudin18.2相关的癌症或肿瘤的药物。