

针对密蛋白 18A2 和 CD3 的双特异性抗体及其应用

技术领域

本发明属于免疫学领域,更具体地,本发明涉及针对密蛋白 18.2(Claudin 18.2, CLDN18A2, CLDN18.2) 和 CD3 的双特异性抗体。该抗体同时包含识别密蛋白 18.2 的结合结构域和与 T 细胞特异结合的 CD3 结合结构域。以及,本发明还涉及包含所述双特异性抗体的药物组合物及其在治疗癌症方面的相关应用。

背景技术

密蛋白 18(Claudin 18, CLDN18)是位于上皮和内皮的紧密连接中的内在膜蛋白,分子量约为 27.9KD,与其他紧密连接蛋白共同形成细胞间紧密连接,调节组织分子和离子在细胞间隙通透,维持组织内环境的稳定。以人密蛋白 18 为例,已知存在 2 个亚型,剪接变体 1 (CLDN18A1、CLDN18.1): GenBank 登记号为 NP_057453、NM_016369,以及剪接变体 2 (CLDN18A2、CLDN18.2): GenBank 登记号为 NP_001002026、NM_001002026。在正常细胞中,CLDN18A1 在肺的上皮中选择性表达,而 CLDN18A2 则特异性表达于正常胃上皮已分化细胞,在具有细胞分裂活性的胃上皮干细胞中无表达。但在肿瘤细胞中,CLDN18A2 在多种癌症类型中均呈现过度表达,如 75% 的胃癌患者高表达 CLDN18A2,50% 的胰腺癌患者高表达 CLDN18A2,30% 的食管癌患者高表达 CLDN18A2,在肺癌等癌症类型中也有高表达。因此,找到特异性结合 CLDN18A2 而不结合 CLDN18A1 的抗体,对癌症的治疗和检测具有重要意义。

现有 CLDN18.2 抗体 IMAB362 已经进入临床研究阶段,临床结果显示在 CLDN18.2 高表达的胃癌患者中,化疗+IMAB362 相比单纯化疗,无进展生存期由 6.1 个月延长至 9.1 个月,总生存期从 9.3 个月延长到 16.6 个月。除抗体 IMAB362 以外,目前至少有三种 CLDN18.2 单抗药物进入临床 I 期研究阶段。针对 CLDN18.2 靶点制备的 CAR-T 也已进入临床研究。然而,这些已进入临床阶段的抗体与 CLDN18.2 的亲合力较弱,且临床前体内抗肿瘤作用较弱,副作用较大。因此,仍然需要继续筛选和制备具有较高活性,毒性更低,有更大治疗安全窗的 CLDN18.2 抗体,才能在较小的给药剂量下产生更强的药效作用,提高最佳用药剂量空间。

基于 T 细胞的治疗已在许多动物模型上显示出明显的抗肿瘤作用,而且许多 T 细胞治疗最近在治疗癌症适应症方面也取得了显著的进展。因此,通过发挥 T 细胞的潜能,开发高效低毒的新型 T 细胞双特异性抗体就显得尤为关键。本发明提供了一种抗 CLDN18.2 和 CD3 的双特异性抗体,该分子能够通过 CD3 靶标招募 T 细胞到肿瘤部位,特异性地杀伤高表达 CLDN18.2 的肿瘤细胞,使得 T 细胞的细胞毒性效应靶向于癌细胞成为可能。目前现有技术已知的同时识别 CLDN18.2 和 CD3 ϵ 的双特异性结合分子,例如 CN105073776B 中公开的 1BiMAB,该分子的分子量较小,也缺少像 Fc 段这样的组件,因此,分子半衰期较短,稳定性较差。因此,仍然需要构建一种体内、外稳定性更优,半衰期更长的双特异性结合分子,从而预期可以实现一周一次或两次静脉给药,而不是像 1BiMAB 那样需要每天静脉给药。

发明概述

本发明提供了一种包含抗 CLDN18.2 和 CD3 两个抗原结合结构域的双特异性抗体,第一结合结构域能与 CLDN18.2 蛋白结合,第二结合结构域能与 CD3 ϵ 结合。

在一些实施方案中,所述 CLDN18.2 是具有 GenBank 登记号 NP_001002026 的蛋白(mRNA:NM_001002026)。CLDN18.1 是具有 GenBank 登记号 NP_057453 的蛋白(mRNA:NM_016369)。

本发明的双特异性抗体中,抗 CLDN18.2 的结合结构域衍生自抗体 6#AA,所述抗体 6#AA 或其抗原结合片段特异性地结合 CLDN18.2,并且不显著结合 CLDN18.1。在一些实施方案中,抗体 6#AA 或其抗原结合片段与 CLDN18.1 的结合水平不超过其与 CLDN18.2 的结合水平的 20%。例如,结合水平可以是所述抗体或抗原结合片段与 CLDN18.2 的结合水平的 20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或小于 1%。在一些实施方案中,抗体 6#AA 或其抗原结合片段与 CLDN18.2 的结合水平是其与 CLDN18.1 的结合水平的 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、

6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍或多于 10 倍。

抗体 6#AA 或其抗原结合片段能够特异性结合 CLDN18.2，其包含：重链可变区，所述的重链可变区中的 3 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO:11, 12, 13 所示；和，轻链可变区，所述的轻链可变区中的 3 个 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO:14, 15, 16 所示。

因此，本发明的双特异性抗体中，抗 CLDN18.2 的结合结构域也能够特异性结合 CLDN18.2，其包含：重链可变区，所述的重链可变区中的 3 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO:11, 12, 13 所示；和，轻链可变区，所述的轻链可变区中的 3 个 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 14, 15, 16 所示。

抗体 6#AA 或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有与 SEQ ID NO: 23 至少 80%至 100%的序列同一性；和，所述轻链可变区具有与 SEQ ID NO: 24 至少 80%至 100%的序列同一性。

因此，本发明的双特异性抗体中，抗 CLDN18.2 的结合结构域也包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有与 SEQ ID NO: 23 至少 80%至 100%的序列同一性；和，所述轻链可变区具有与 SEQ ID NO: 24 至少 80%至 100%的序列同一性。

本发明的双特异性抗体中，抗 CD3 的结合结构域衍生自抗体 h160C9AA，所述抗体 h160C9AA 或其抗原结合片段特异性地结合 CD3。h160C9AA 包含：重链可变区，所述的重链可变区中的 3 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO:17, 18, 19 所示；和，轻链可变区，所述的轻链可变区中的 3 个 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO:20, 21, 22 所示。

因此，本发明的双特异性抗体中，抗 CD3 的结合结构域也能够特异性结合 CD3，其包含：重链可变区，所述的重链可变区中的 3 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO:17, 18, 19 所示；和，轻链可变区，所述的轻链可变区中的 3 个 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO:20, 21, 22 所示。

抗体 h160C9AA 或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有与 SEQ ID NO:6 至少 80%至 100%的序列同一性；和，所述轻链可变区具有与 SEQ ID NO: 7 至少 80%至 100%的序列同一性。

因此，本发明的双特异性抗体中，抗 CD3 的结合结构域也包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有与 SEQ ID NO: 6 至少 80%至 100%的序列同一性；和，所述轻链可变区具有与 SEQ ID NO:7 至少 80%至 100%的序列同一性。

在一些优选的实施方案中，本发明的双特异性抗体所包含的结合结构域为 Fab、Fv、scFv、F(ab')₂、线性抗体、单域抗体或全长抗体。

在一些优选的实施方案中，本发明的双特异性抗体，还进一步包括重链恒定区和/或轻链恒定区，优选的，所述重链恒定区包括 Fc 或变体 Fc，优选的，Fc 来源于人。

在一些更优选的实施方案中，所述双特异性抗体的结构是：在抗 CLDN18.2 全长抗体的一条重链 C 末端连接结合 CD3 的 scFv 或在抗 CLDN18.2 全长抗体的两条轻链 C 末端连接结合 CD3 的 scFv，从而构建出两个具有不同结构的双特异性抗体。所述双特异性抗体分子能够通过结合 CD3 抗原招募 T 细胞到靶肿瘤部位，同时通过识别 CLDN18.2 高表达的肿瘤细胞后实现特异性杀伤。

在一些优选的实施方案中，本发明的双特异性抗体中的抗 CLDN18.2 的结合结构域为全长抗体，抗 CD3 的结合结构域为 scFv。其中，所述全长抗体的重链序列如 SEQ ID NO:1 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:5 所示。scFv 的构建是由接头将 VH 和 VL 串联在一起，既可以是 VH-接头-VL，也可以是 VL-接头-VH，优选 VL-接头-VH，所述 VL-接头-VH 的序列如 SEQ ID NO:8 所示。

在一个优选的方案中，本发明的双特异性抗体在抗 CLDN18.2 全长抗体的一条重链的 C 末端或两条轻链的 C 末端连接有抗 CD3 的 scFv。

在一个优选的实施方案中，当抗 CD3 的两条 scFv 肽链各自融合至抗 CLDN18.2 全长抗体的两条轻链的 C 末端时，则所形成的双特异性抗体包含融合后的两条同源轻链和未经改造的两条同源重链，其中，融合后

的轻链的序列如 SEQ ID NO:2 所示, 重链的序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在一个优选的实施方案中, 当抗 CD3 的一条 scFv 肽链融合至抗 CLDN18.2 全长抗体的一条重链的 C 末端时, 则所形成的双特异性抗体包含同源的两条轻链和异源的两条重链。异源的两条重链中, 含有 scFv 的重链经若干氨基酸取代后被构建为“节”(knob) 结构, 不含有 scFv 的重链经若干氨基酸取代后被构建为“穴”(hole) 结构。其中, 构建后的同源轻链序列如 SEQ ID NO:5 所示, “节”(knob) 结构重链的序列如 SEQ ID NO:3 所示, “穴”(hole) 结构重链的序列如 SEQ ID NO:4 所示。

本发明还提供了编码所述双特异性抗体的核酸。以及, 包含所述核酸的重组载体, 优选地, 所述载体为重组表达载体。

在一些实施方案中, 本发明还提供了一种宿主细胞, 其包含所述的重组载体或基因组中整合有编码所述双特异性抗体的核酸。在一些优选的方案中, 宿主细胞可以是原核细胞, 例如大肠杆菌; 也可以是真核细胞, 例如酵母或哺乳动物细胞, 哺乳动物细胞例如 CHO 细胞, HEK293 细胞, HEK293E 细胞或 Expi293 细胞。

在一些实施方案中, 本发明提供了制备所述双特异性抗体的方法, 包括: 在适合条件下培养本发明的宿主细胞, 并从所述细胞中纯化获得表达产物。

在一些实施方案中, 本发明提供了所述双特异性抗体的用途, 其用于制备特异性靶向表达 CLDN18.2 的肿瘤细胞的药物; 在一些实施方案中, 所述表达 CLDN18.2 的肿瘤包括: 胃癌, 胰腺癌, 食管癌, 肺癌, 卵巢癌, 结肠癌, 直肠癌, 肝癌, 头颈癌和胆囊癌及其转移, 所述胃癌转移例如库肯勃氏瘤。

在一些实施方案中, 本发明提供了一种药物组合物, 其包含有效量的本发明的双特异性抗体、或包含有效量的编码所述双特异性抗体的核酸、或包含有效量的含有编码核酸的重组载体、或包含有效量的含有编码核酸的宿主细胞。在一些实施方案中, 所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

在一些优选的实施方案中, 所述药物组合物还包含一种或多种额外的其他治疗剂。所述额外的治疗剂包括: 细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、抗血管生成剂、减瘤剂、化学治疗剂、放射性治疗剂、靶向性抗癌剂、生物反应修饰剂、癌症疫苗、细胞因子、激素、抗转移剂和免疫治疗剂。

在一些实施方案中, 本发明提供了一种药盒或试剂盒, 其包括容器, 以及位于容器中的本发明的药物组合物。

在一些实施方案中, 本发明提供诱导表达 CLDN18.2 的细胞死亡的方法, 包括使所述细胞与本发明的药物组合物接触。在一些实施方案中, 使所述细胞与药物组合物在体外接触。在一些实施方案中, 使所述细胞与药物组合物在体内接触。在一些实施方案中, 所述细胞是癌细胞。在一些实施方案中, 所述细胞是实体瘤细胞。在一些实施方案中, 所述细胞选自: 胃癌细胞、食道癌细胞、肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾母细胞瘤细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、肝癌细胞、头颈癌细胞、慢性骨髓性白血病细胞和胆囊癌细胞。

在一些实施方案中, 本发明提供治疗受试者中与表达 CLDN18.2 相关的疾病的方法, 所述方法包括向有此需要的受试者施用本发明的药物组合物。在一些实施方案中, 所述疾病是肿瘤。在一些实施方案中, 所述肿瘤优选胃癌、食道癌、肠癌、胰腺癌、肾母瘤、肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、头颈癌、慢性骨髓性白血病或胆囊癌。在一些实施方案中, 所述方法还包括向所述受试者给予额外的治疗剂。

本发明的抗体可以与另一额外的治疗剂联合给药, 包括但不限于化学治疗剂、细胞毒性剂、放射性治疗剂、癌症疫苗、减瘤剂、靶向性抗癌剂、抗血管生成剂、生物反应修饰剂、细胞因子、激素、抗转移剂和免疫治疗剂。

在一些优选的实施方案中, 可以与本发明的抗体或其抗原结合片段联合应用的化学治疗剂包括但不限于有丝分裂抑制剂, 包括长春新碱、长春花碱、长春地辛和诺维宾; 拓扑异构酶 I 抑制剂, 例如喜树碱化合物, 包括伊立替康、托泊替康和衍生自喜树碱及其类似物的其它化合物; 鬼臼毒素衍生物, 例如依托泊苷、替尼泊苷和米多昔佐兹; 烷基化剂, 例如顺铂、卡铂、环磷酰胺、氮芥、三亚甲基硫代磷酰胺、卡莫司汀、白消安、苯丁酸氮芥、布列喹嗪、尿嘧啶芥末、氯洛芬和达卡巴嗪; 抗代谢物, 包括阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、甲氧蝶呤、巯嘌呤、硫唑嘌呤和丙卡巴肼; 抗生素, 包括但不限于多柔比星、博来霉素、更生霉素、柔红霉素、丝裂霉素、肉瘤霉素 C、放线菌素 D、罗红霉素、阿霉素、雷帕霉素及其衍生物和道诺霉素; 以及其它

化疗药物，包括但不限于紫杉醇、多西他赛、达卡巴嗪、氮胞苷、阿莫沙康、美法仑、异环磷酰胺和米托蒽醌。在一些优选的实施方案中，所述额外的治疗剂选自表柔比星、奥沙利铂和 5-氟尿嘧啶中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述靶向性抗癌剂包括但不限于大分子靶向药物和小分子靶向药物等。

在一些优选的实施方案中，大分子靶向药物包括但不限于靶向表皮生长因子药物，包括西妥昔单抗、帕尼单抗和尼妥珠单抗等；HER-2 或 HER-3 信号通路抑制剂，包括曲妥珠单抗、帕妥珠单抗和 T-DM1 等；抗血管内皮生长因子药物，包括 VEGF-TRAP、贝伐珠单抗和雷莫芦单抗等；以及，靶向其他靶点的药物，包括但不限于 PI3K、PARP、PI3K α 、PKB/AKT 和 STAT3 等靶点。

在一些实施方案中，小分子靶向药物包括但不限于靶向表皮生长因子的药物，包括厄洛替尼或吉非替尼等；HER-2 或 HER-3 信号通路抑制剂，包括拉帕替尼或阿法替尼等；酪氨酸激酶抑制剂，包括伊马替尼或舒尼替尼等；抗血管内皮生长因子药物，包括索拉非尼、瑞戈替尼、帕唑替尼、重组人血管内皮抑制素和阿帕替尼等；靶向 c-Met/ROS1 药物，包括克唑替尼等；以及，其他靶向药物，包括但不限于伏立诺他和马马司他等；靶向 mTOR 药物，包括依维莫司等；以及其他靶点的药物，包括但不限于 PI3K α 、PKB/AKT 和 STAT3 等靶点。

在一些实施方案中，所述免疫治疗药物包括但不限于免疫抑制剂和激动剂，靶点包括 PD-1/PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、IDO、TIM3、TIGIT、CD47、SIRP α 、4-1BB、CSF-1/CSF1R、GITR、OX40、CD40、CD27、CD28、B7H4、B7H3、TGF β 、BTLA、VISTA、ICOS、CD39、CD73、A2AR、KIR 和 NKG2A 等；以及与免疫治疗相关的细胞疗法。

在一些实施方案中，靶向 PD-1/PD-L1 的免疫检查点抑制剂包括但不限于大分子药物，例如帕姆单抗、纳武单抗、阿特珠单抗、阿维单抗和信迪利单抗、Cemiplimab 和 Durvalumab 等；以及，小分子药物。

在一些实施方案中，靶向 CTLA-4 的免疫检查点抑制剂包括但不限于伊匹单抗等；细胞因子包括但不限于 IL-10、IL-15、IL4 和 IL13 等；靶向 BRAF 的抑制剂包括但不限于 Binimetinib 等。

在一些实施方案中，另一治疗剂选自溶瘤病毒，例如细小病毒、腺病毒、疱疹病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒、呼肠弧病毒、甲病毒、马拉巴病毒、逆转录病毒和科萨基病毒等；或，另一治疗剂选自癌症疫苗或蛋白酶抑制剂，例如硼替佐米等。

附图说明

附图更进一步说明了本说明书所公开的新特性。参照这些附图将能更好地理解本说明书中所公开的特性和优点，但应当理解，这些附图仅用于说明本文所公开原理的具体的实施方案，而非意欲对所附权利要求的范围加以限制。

图 1 显示了本发明的 2 个双特异性抗体的结构。

图 2 显示了本发明的 2 个双特异性抗体及参照抗体分别与稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的结合情况。

图 3 显示了本发明的 2 个双特异性抗体及参照抗体分别与天然表达 hCD3 的 Jurkat 细胞的结合情况。

图 4 显示了本发明的 2 个双特异性抗体及参照抗体分别与稳转表达 hCLDN18.1 的 HEK293 细胞的结合情况。

图 5 显示了本发明的 2 个双特异性抗体及参照抗体分别与稳转表达 mCLDN18.2 的 HEK293 细胞的结合情况。

图 6 显示了本发明的 2 个双特异性抗体及参照抗体分别与稳转表达 mCLDN18.1 的 HEK293 细胞的结合情况。

图 7 显示了本发明的 2 个双特异性抗体及参照抗体分别与稳转表达 cynoCLDN18 的 HEK293 细胞的结合情况。

图 8 显示了本发明的 2 个双特异性抗体介导的 CD3⁺T 细胞对稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的细胞毒性实验结果 (TDCC)。

图 9 显示了本发明的 2 个双特异性抗体对稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的 T 细胞活化结果。

图 10 显示了本发明的 2 个双特异性抗体对稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的 INF- γ 分泌结果。

图 11 显示了本发明的 2 个双特异性抗体对稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的 IL-2 分泌结果。

图 12 显示了本发明的 2 个双特异性抗体对稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的 IL-6 分泌结果。

图 13 显示了本发明的 2 个双特异性抗体对稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的 TNF- α 分泌结果。

图 14 显示了本发明的 2 个双特异性抗体对 Jurkat-NFAT 报告基因的荧光素酶表达水平的结果。

图 15 显示了本发明的 2 个双特异性抗体介导的 NK 细胞对稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞的细胞毒性实验结果 (ADCC)。

图 16 显示了本发明的双特异性抗体 31905-44AA 对人源化 HEK293- hCLDN18.2 模型肿瘤生长的影响。

图 17 显示了本发明的双特异性抗体 31905-44AA 对人源化 HEK293- hCLDN18.2 模型荷瘤小鼠体重的影响。

发明详述

本说明书中提及的所有公布、专利和专利申请都以引用的方式并入本文，所述引用的程度就如同已特定地和个别地指示将各个别公布、专利或专利申请以引用的方式并入一般。

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

本文所公开的某些实施方案包含了数值范围，并且本发明的某些方面可采用范围的方式描述。除非另有说明，应当理解数值范围或者以范围描述的方式仅是出于简洁、便利的目的，并不应当认为是对本发明的范围的严格限定。因此，采用范围方式的描述应当被认为具体地公开了所有可能的子范围以及在该范围内的所有可能的具体数值点，正如这些子范围和数值点在本文中已经明确写出。不论所述数值的宽窄，上述原则均同等适用。当采用范围描述时，该范围包括范围的端点。

当涉及可测量值比如量、暂时持续时间等时，术语“约”是指包括指定值的 $\pm 20\%$ 、或在某些情况下 $\pm 10\%$ 、或在某些情况下 $\pm 5\%$ 、或在某些情况下 $\pm 1\%$ 、或在某些情况下 $\pm 0.1\%$ 的变化。

本文所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.Biol.Chem., 243, p3558 (1968) 中所述。

本文所用的术语“Claudin18.2”或“CLDN18.2”或“CLDN18A2”的含义如下。紧密连接蛋白 18 (又称为密蛋白 18, 简称为 CLDN18) 分子为具有四个跨膜疏水区 and 两个细胞外环 (环 1 被疏水区 1 和疏水区 2 所包围; 环 2 被疏水区 3 和 4 所包围) 的膜内在蛋白 (四跨膜蛋白)。CLDN18 以两种不同的剪接变体存在, 在小鼠和人类中对其进行了描述 (Niimi, Mol.Cell.Biol. 21:7380-90, 2001)。剪接变体 1 (Claudin18.1, CLDN18.1, CLDN18A1) 的 GenBank 登记号为 NP_057453, NM_016369; 剪接变体 2 (Claudin18.2, CLDN18.2, CLDN18A2) 的 GenBank 登记号为 NP_001002026, NM_001002026。剪接变体 CLDN18.1 和 CLDN18.2 在包含第一跨膜 (TM) 区和环 1 的 N 末端部分不同, 而 C 末端的一级蛋白序列是相同的。

本文所用的术语“抗 Claudin18.2 的抗体”、“抗 CLDN18A2 的抗体”、“抗 CLDN18.2 的抗体”、“针对 CLDN18.2 的抗体”是指这样的抗体, 所述抗体能够以足够的亲和力结合 CLDN18.2 蛋白或其片段, 并且不显著结合 CLDN18.1, 以致所述抗体可以用作靶向 CLDN18.2 的诊断剂和/或治疗剂。人来源的 CLDN18.2 蛋白表示为 hCLDN18.2, 因此, “抗人 Claudin18.2 的抗体”、“抗人 CLDN18A2 的抗体”、“抗 hCLDN18.2 的抗体”、“针对 hCLDN18.2 的抗体”是特指能够以足够的亲和力结合人 CLDN18.2 蛋白或其片段以致所述抗体可以用作靶向人 CLDN18.2 的诊断剂和/或治疗剂。

以及, 除了人来源的 CLDN18.2 蛋白以外, 鼠来源的 CLDN18.2 蛋白表示为 mCLDN18.2, 食蟹猴来源的 CLDN18 蛋白表示为 cynoCLDN18。与此同理, 人来源的 CLDN18.1 蛋白表示为 hCLDN18.1, 鼠来源的 CLDN18.1 蛋白表示为 mCLDN18.1。

“CD3”在本领域已知为六条链的多蛋白复合物 (参见 Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., p172 和 178, 1999)。在哺乳动物中, 该复合物包含 CD3 (γ) 链、CD3 (δ) 链、两条 CD3 (ϵ) 链和 CD3 (ζ) 链的

同源二聚体。CD3 (γ) 链、CD3 (δ) 链和 CD3 (ϵ) 链为包含单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3 (γ) 链、CD3 (δ) 链和 CD3 (ϵ) 链的跨膜区是带负电的, 这是允许这些链与带正电的 T 细胞受体链结合的特征。CD3 (γ) 链、CD3 (δ) 链和 CD3 (ϵ) 链的胞内尾各自均包含一个被称作基于免疫受体酪氨酸活化基序或 ITAM 的保守基序, 而每条 CD3 (ζ) 链均含有三个。不希望受到理论的限制, 认为 ITAM 对 TCR 复合物的信号转导能力是很重要的。当本文仅使用“CD3”的表述时, 其可来自不同的动物物种, 包括人、小鼠、大鼠或其他的哺乳动物。

本文所用“抗 CD3 的抗体”, 是指能特异性结合单独的 CD3 链 (例如 CD3 (γ) 链、CD3 (δ) 链或 CD3 (ϵ) 链) 或由两条或更多条单独的 CD3 链形成的复合物 (例如一条以上 CD3 (ϵ) 链的复合物、CD3 (γ) 链和 CD3 (ϵ) 链的复合物、CD3 (δ) 链 CD3 (ϵ) 链的复合物) 的抗体。在某些实施方案中, 抗 CD3 抗体能特异性结合 CD3 (γ)、CD3 (δ) 或 CD3 (ϵ) 或其任何组合, 更优选地, 能特异性结合 CD3 (ϵ)。人来源的 CD3 表示为 hCD3, 因此, “抗人 CD3 的抗体”和“抗 hCD3 的抗体”是指能特异性结合人来源的 CD3 的抗体。

本文所用的术语“抗体”, 典型是指包含通过共价二硫键和非共价相互作用保持在一起的两条重 (H) 多肽链 (HC) 和两条轻 (L) 多肽链 (LC) 的 Y 型四聚蛋白。天然 IgG 抗体即具有这样的结构。每条轻链由一个可变结构域 (VL) 和一个恒定结构域 (CL) 组成。每条重链包含一个可变结构域 (VH) 和恒定区 (CH)。

本领域已知五个主要类别的抗体: IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM, 对应的重链恒定结构域分别被称为 α , δ , ϵ , γ 和 μ , IgG 和 IgA 可以进一步分为不同的亚类, 例如 IgG 可分为 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 可分为 IgA1 和 IgA2。来自任何脊椎动物物种的抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列可以被分配到两种明显相异的类型之一, 称为 κ 和 λ 。

在 IgG、IgA 和 IgD 抗体的情形中, 该恒定区包含称为 CH1、CH2 和 CH3 的三个结构域 (IgM 和 IgE 具有第四结构域 CH4)。在 IgG、IgA 和 IgD 类别中, CH1 和 CH2 结构域被柔性铰链区分离, 该铰链区是可变长度的富含脯氨酸和半胱氨酸的区段。每类抗体进一步包含由配对半胱氨酸残基形成的链间和链内二硫键。

术语“可变区”或“可变结构域”显示出从一种抗体到另一种抗体的氨基酸组成的显著变化, 并且主要负责抗原识别和结合。每个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点, 使得完整的 IgG 抗体具有两个结合位点 (即它是二价的)。重链的可变区 (VH) 和轻链的可变区 (VL) 结构域各包含具有极端变异性的三个区域, 被称为高变区 (HVR), 或更通常地, 被称为互补决定区 (CDR), VH 和 VL 各有 4 个骨架区 FR (或称为框架区), 分别用 FR1, FR2, FR3, FR4 表示。因此, CDR 和 FR 序列通常出现在重链可变结构域 (VH) (或轻链可变结构域 (VL)) 的以下序列中: FR1-HCDR1 (LCDR1)-FR2-HCDR2 (LCDR2)-FR3-HCDR3 (LCDR3)-FR4。

术语“Fc”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域, 即包含免疫球蛋白重链中能够稳定自身联合的 C 端恒定区的形成二聚体的两条多肽链。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然 IgG 重链的 Fc 区的边界可以略微变化, 但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为自 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端, 例如, IgG Fc 域包含 IgG CH2 和 IgG CH3 恒定域。除非本文中另外指定, Fc 区或恒定区中氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统, 也称作 EU 索引, 如记载于 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991。

然而, 由宿主细胞生成的抗体可能经历翻译后切割, 自重链的 C 端切除一个或多个, 特别是一个或两个氨基酸。通过表达编码全长重链的特定核酸分子由宿主细胞生成的抗体可包括全长重链, 或者它可包括全长重链的切割变体。当重链的最终两个 C 端氨基酸是甘氨酸 (G446) 和赖氨酸 (K447) 时可能就是这种情况。因此, Fc 区的 C 端赖氨酸 (K447), 或 C 端甘氨酸 (G446) 和赖氨酸 (K447) 可以存在或不存在。为防止 Fc 区的 C 末端切割导致融合在此处的其他抗原结合结构域发生丢失, 在本发明的一个实施方案中, K447 需经氨基酸取代替换为 A, 即 K447A。

如在此使用的, 广义上的“抗体”的类型可包括如多克隆抗体 (polyclonal antibodies)、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体及灵长类化抗体、CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody)、人类抗体 (包括重组产生

的人类抗体)、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、抗个体基因型抗体、合成抗体(包括突变蛋白及其变体)等等。

术语“全长抗体”、“完整的抗体”和“完整抗体”在本文中可以被交换地替代使用,指结构与天然抗体结构基本相似或具有包含Fc区的抗体。

术语“单克隆抗体”(或称“单抗”)指由单一细胞克隆产生的基本均质、仅针对某一特定抗原表位的抗体。单克隆抗体可以使用本领域中已知的多种技术制备,包括杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、转基因动物、合成技术或上述技术的组合等。

术语“嵌合抗体”是一种构建体,其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种的或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而这个或这些链的剩余部分与来自另一物种的或属于另一个抗体类别或亚类的抗体、以及这类抗体的片段中的相应序列相同或同源。狭义的,嵌合抗体包含与人类轻链和重链恒定区可操作地连接的全部或大多数的所选鼠类重链和轻链可变区。恒定区序列或其变体或衍生物可以使用标准分子生物学技术可操作地与所披露的重链和轻链可变区缔合,以提供本身可以使用或可以掺入本发明的抗CLDN18.2的全长抗体。

术语“人源化抗体”是含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的杂合免疫球蛋白,免疫球蛋白链或其片段。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的CDR的残基被来自具有所需的特异性、亲和力和性能的非人物种(供体抗体)的CDR的残基替代,例如小鼠、大鼠、兔子或灵长类动物。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区残基被相应的非人残基代替。在某些情况下,“回复突变”可以引入到人源化抗体中,其中受体人类抗体的可变区的一个或多个FR中的残基被来自非人类物种供体抗体的相应残基替换。这样的回复突变可以有助于保持一种或多种嫁接CDR的适当三维构型并因此改进亲和性和抗体稳定性。可以使用来自各种供体物种的抗体,这些供体物种包括但不限于小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物。另外,人源化抗体可以包含在受体抗体中或在供体抗体中未发现的新残基,以为进一步改善抗体性能。

需说明的是,本发明的抗体可变区的CDR和FR的划分是根据Kabat定义确定的。而其他命名和编号系统,例如Chothia、IMGT或AHO等,也是本领域技术人员已知的。因此,以本发明的抗体序列为基础,包含任何命名系统衍生的一种或多种CDR的人源化抗体均明确地保持在本发明的范围内。

术语“序列同一性”或“序列相似性”或“序列同源性”,是指在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的相同氨基酸残基的百分比。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比氨基酸序列同一性,例如,使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。

术语“抗体片段”包含完整抗体的至少一部分。如在此所使用,抗体分子的“片段”包括抗体的“抗原结合片段”,并且术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体中与所选抗原或其抗原表位特异性结合或反应的多肽片段,或由此片段进一步衍生的融合蛋白产物,例如单链抗体,嵌合抗原受体中的胞外结合区等。示例性的抗体片段或其抗原结合片段包括但不限于:可变轻链片段(VL)、可变重链片段(VH)、Fab片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段、单域抗体、线性抗体、单链抗体(scFv)及由抗体片段形成的双特异性抗体或多特异性抗体等。

术语“抗原结合结构域”或“结合结构域”是指特异性地与靶分子(抗原)上的给定靶表位结合/相互作用/识别该给定靶表位的结构域。“抗原结合结构域”可以就是单独的“抗原结合片段”,也可以是“抗原结合片段”的组合,相较于“抗原结合片段”而言,“抗原结合结构域”是一个更大范围的概念。

术语“Fab片段”包括重链可变区和轻链可变区,并且还包括轻链的恒定区和重链的第一恒定区CH1,其为单价的抗体片段。术语“F(ab')₂片段”包含2个Fab片段以及铰链区,其为二价的抗体片段。

术语“Fd片段”一般包含重链可变区和恒定区CH1;术语“Fv片段”含有抗体重链可变区和轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。

术语“单域抗体”又称为纳米抗体，在羊驼外周血液中存在一种天然缺失轻链的抗体，该抗体只包含一个重链可变区（VHH）和两个常规的CH2与CH3区。单独克隆并表达出来的VHH结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及抗原的结合活性，是已知的可结合目标抗原的最小单位，也因此被称作纳米抗体（Nanobody, Nb）。

术语“scFv”是指包含至少一个包括轻链的可变区抗体片段和至少一个包括重链的可变区的抗体片段的融合蛋白，其中所述轻链和重链可变区是邻接的（例如经由合成接头例如短的柔性多肽接头），并且能够以单链多肽形式表达，且其中所述scFv保留其所来源的完整抗体的特异性。除非指定，scFv可以以任何顺序（例如相对于多肽的N-末端和C末端）具有所述的VL和VH可变区，scFv可以包括VL-接头-VH或可以包括VH-接头-VL。

天然存在的抗体通常是单特异性的，即它们与单一抗原结合。本发明提供了与细胞毒性细胞（例如T细胞上的CD3）和靶细胞（例如癌细胞上的CLDN18.2）同时结合的分子。所述分子与至少两种不同类型的抗原结合，并且至少是双特异性或多特异性的。本发明的结合分子可以是至少三价的。如本文中所用，“价”意指分子中抗原结合位点的数目，例如典型的天然IgG抗体为双价的。与相同抗原结合的抗原结合位点可识别相同的表位或不同的表位。三价双特异性抗体和四价双特异性抗体是本领域中已知的。

术语“多特异性抗体”是指，将抗体或抗体片段通过功能连接（例如化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方法）至一个或多个其他结合分子（包括抗体或抗体片段或其他具有结合能力的分子）上，从而形成与两个以上不同位点和/或靶点结合的新的抗体构建体。因此，“双特异性抗体”（或称为“双特异性抗原结合分子”或“双抗”），其特指针对两种不同抗原和/或表位具有特异性的抗体构建体。通常，双特异性抗体或多特异性抗体至少包括2个不同的抗原（或表位）结合结构域。

在本发明的上下文中，术语“重组”意指“通过遗传改造制备”。一般而言，重组的不是天然存在的。

用于生成多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两对免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达（见Milstein and Cuello, Nature 305:537(1983)），WO93/08829, 和 Traunecker et al., EMBO J. 10:3655(1991)，和“节-入-穴”（knob-into-hole）工程化（见例如美国专利 No. 5,731,168）。也可以通过用于生成抗体Fc-异二聚体分子的工程化静电操纵效应（WO2009/089004A1）；交联两个或更多个抗体或片段（见例如美国专利 No. 4,676,980, 和 Brennan et al., Science, 229:81(1985)）；使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体（见例如 Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)）；使用用于生成双特异性抗体片段的“双抗体”技术（见例如 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)）；和使用单链Fv(sFv)二聚体（见例如 Gruber et al., J. Immunol., 152:5368, 1994)）；以及，例如 Tutt et al., J. Immunol. 147:60(1991)中所描述的，制备三特异性抗体来生成多特异性抗体。

本发明的双特异性抗体可以以全长抗体或完整抗体作为在其上添加多种scFv的支架，例如在重链CH3结构域的C末端或轻链CL结构域的C末端融合scFv。

术语“融合”或“连接”意味着各组件（例如抗原结合片段或抗原结合结构域）通过肽键，直接地或是经由一个或多个肽接头组合在一起。

本文所使用的“同源”和“异源”是一组相对的概念，既可以指构建体中不同要素的来源相同或不同，也可以指构建体构建完成以后，原本来源相同即“同源”的多个要素之间，有的要素进行了改造，与未进行改造的其他原要素相比发生了改变，从而变成“异源”。

在一个实施方案中，当在全长抗体或完整抗体的轻链CL结构域的C末端融合scFv时，则本发明的双特异性抗体包含四条多肽链，分别是两条同源的轻链和两条同源的重链。其中，同源的轻链多肽从N端至C端包含以下结构域：VL-CL-scFv，同源的重链多肽从N端至C端包含以下结构域：VH-CH。

在一个实施方案中，当在全长抗体或完整抗体的一条重链CH3结构域的C末端融合scFv时，则本发明的双特异性抗体包含四条多肽链，分别是两条同源的轻链和两条异源的重链。其中，同源的轻链多肽从N端至C端包含以下结构域：VL-CL，异源的重链多肽之一从N端至C端包含以下结构域：VH-CH，异源的重链多肽之另一从N端至C端包含以下结构域：VH-CH-scFv。

术语“接头”是指用于连接两个不同功能单元（例如抗原结合片段）的任何工具。接头的类型包括但不限于

于化学接头和多肽接头。多肽接头的序列不受限制。多肽接头优选是非免疫原性和柔性的，例如包含丝氨酸和甘氨酸序列的那些。取决于具体的构建体，接头可以长或短。

根据本发明，连接不同功能单元的接头优选包含柔性肽接头，例如甘氨酸-丝氨酸肽接头。在一个实施方案中，接头包含氨基酸序列(G4S)_x，其中 x 是 1-6 中的任意整数选择，优选包含氨基酸序列(G4S)₁ 或 (G4S)₃。连接 VH 和 VL 结构域以形成 VH-VL 或 VL-VH 的 scFv 结构域的接头优选包含柔性肽接头，例如甘氨酸-丝氨酸肽接头。在一个实施方案中，接头包含氨基酸序列(G4S)_x，其中 x 是 1-6 中的任意整数选择，优选包含氨基酸序列(G4S)₃。

术语“抗原”是指被抗体或抗体结合片段识别并特异性结合的物质，广义上，抗原可以包括所选靶标的任何免疫原性片段或决定簇，包括单表位、多表位、单结构域、多结构域、或完整的胞外结构域 (ECD) 或蛋白质。肽、蛋白质、糖蛋白、多糖和脂质，其部分及其组合均可构成抗原。非限制性示例性抗原包括肿瘤抗原或病原体抗原等。“抗原”也可以指引发免疫反应的分子。任何形式的抗原或含有该抗原的细胞或制剂都可以用于生成对抗原决定簇具有特异性的抗体。抗原可以是分离的全长蛋白质、细胞表面蛋白（例如，用在其表面上表达至少一部分抗原的细胞进行免疫的）、或可溶性蛋白质（例如，仅用该蛋白质的 ECD 部分进行免疫的）或蛋白质构建体（例如，Fc 抗原）。该抗原可以在基因修饰的细胞中产生。前述任何抗原可以单独或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强佐剂组合使用。编码该抗原的 DNA 可以是基因组的或非基因组的（例如，cDNA），并且可以编码足以引起免疫原性应答的至少一部分 ECD。可以使用任何载体来转化其中表达抗原的细胞，所述载体包括但不限于腺病毒载体、慢病毒载体、质粒以及非病毒载体如阳离子脂质。

术语“表位”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象存在并且包括至少 3-15 个氨基酸。由给定的抗体确定其结合的表位的方法是本领域熟知的，包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文所述的技术，例如 X 射线晶体分析法和二维核磁共振等。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链、环状或支链的，它可以包含修饰的氨基酸，特别是保守修饰的氨基酸，并且它可以被非氨基酸中断。该术语还包括改性的氨基酸聚合物例如已经通过硫酸化、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、碘化、甲基化、氧化、蛋白水解加工、异戊二烯化、外消旋化、硒酰化、转移-RNA 介导的氨基加成如精氨酸化、泛在化、或任何其他操作如与标记组分缀合等改性的氨基酸聚合物。如本文所用，术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成氨基酸，包括甘氨酸以及 D 或 L 光学异构体，以及氨基酸类似物和肽模拟物。“衍生自”指定的蛋白质的多肽或氨基酸序列是指多肽的来源。该术语还包括由指定的核酸序列表达的多肽。

术语“氨基酸修饰”（或“修饰的氨基酸”）包括在多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失。本文中的“氨基酸取代”或“取代”或“替代”意指用另一种氨基酸替换亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。例如，取代 S32A 指第 32 位的丝氨酸被丙氨酸替换。

人源化抗体可变区与人类受体可变区的序列同一性或同源性可以如在此所论述的进行测定，并且当这样测量时，将优选地共享至少 60% 或 65% 的序列同一性，更优选至少 70%、75%、80%、85% 或 90% 的序列同一性，甚至更优选至少 93%、95%、98% 或 99% 的序列同一性。优选地，不相同的残基位置因保守性氨基酸置换而不同。“保守取代”是一个氨基酸残基被具有类似化学特性（例如，电荷或疏水性）的侧链（R 基团）的另一个氨基酸残基替换的氨基酸取代。一般而言，保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括含碱性侧链的氨基酸（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、不带电的极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、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）。因而，可以用其他相似侧链的氨基酸残基替换本发明抗体的 CDR 区

中或框架区中的一个或多个氨基酸残基。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情形中，序列同一性百分比或相似性程度可以向上调整以校正该取代的保守性质。

在抗体生产过程中，不同的理化因素易产生各种翻译后修饰（post-translational modification, PTM）变体，如糖基化、氧化、糖化、脱酰胺、异构化及端基环化等，这些 PTM 可能引起抗体理化性质变化，改变与抗体 Fc 受体的相互反应，影响与目标抗原的结合活性；一些 PTM 的发生甚至可能降低抗体稳定性、引起免疫原性等（JARASCH 等，JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2015）。可以通过对 PTM 位点的氨基酸修饰，例如保守取代，来消除其所带来的负面影响。基于改造 PTM 的目的对抗体 CDR 进行氨基酸取代，也均明确地保持在本发明的范围内。

术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”（ADCC）指抗体结合病毒感染的细胞或肿瘤细胞的抗原表位，其 Fc 段与杀伤细胞（NK 细胞、巨噬细胞等）表面的 Fc 受体（FcR）结合，介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞。

术语“补体依赖的细胞毒性”（CDC）指补体参与的细胞毒作用，即通过特异性抗体与细胞膜表面相应抗原结合，形成复合物而激活补体经典途径，所形成的攻膜复合物对靶细胞发挥裂解效应。

本发明的双特异性抗体还可以包括恒定区（例如 Fc）的取代或修饰，包括但不限于氨基酸残基取代、突变和/或修饰，它们产生具有以下优选的特征的化合物，这些优选的特征包括但不限于：改变的药物代谢动力学、增加的血清半衰期、增加的结合亲和力、降低的免疫原性、增加的产量、与 Fc 受体（FcR）的改变的 Fc 配体结合、增强或减弱的 ADCC 或 CDC、改变的糖基化和/或二硫键以及修饰的结合特异性。在某些方面，抗体变体包含具有一处或多处削弱 Fc γ R 结合的氨基酸替代（例如 Fc 区的位置 234 和 235 处的替代）的 Fc 区。在一个方面，该替代是 L234A 和 L235A。

依照本发明的双特异性抗体包含 scFv 片段，其融合至全长抗体的 Fc 域的 C 末端之中的一个或另一个，如此形成了两条异源的包含 Fc 域的多肽链。这些多肽的重组共表达和随后二聚化导致两种多肽的数种可能组合。为了改进重组生产中双特异性抗体的产量和纯度，在双特异性抗体的 Fc 域中引入促进期望多肽联合的修饰会是有利的。因而，在具体的实施方案中，依照本发明的双特异性抗体的 Fc 域包含促进 Fc 域的第一多肽链和第二多肽链联合的修饰。人 IgG Fc 域的两个多肽链之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的位点在 Fc 域的 CH3 域中。如此，在一个实施方案中，所述修饰在 Fc 域的 CH3 域中。

有数种办法来修饰 Fc 域的 CH3 域以加强异二聚化，它们详细记载于例如 WO96/27011, WO98/050431, EP1870459, WO2007/110205, WO2007/147901, WO2009/089004, WO2010/129304, WO2011/90754, WO2011/143545, WO2012/058768, WO2013/157954, WO2013/096291。典型地，在所有此类办法中，Fc 域的第一多肽链的 CH3 域和 Fc 域的第二多肽链的 CH3 域二者以互补方式进行工程化改造使得每个 CH3 域（或包含它的重链）不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它 CH3 域异二聚化（使得第一和第二 CH3 域异二聚化且两个第一 CH3 域或两个第二 CH3 域之间不形成同二聚体）。

在一个特定的实施方案中，所述促进 Fc 域的第一多肽链和第二多肽链联合的修饰是所谓的“节-入-穴”（knob-into-hole）修饰，其包含在 Fc 域的两个多肽链之一中的“节”修饰和在 Fc 域的两个多肽链之另一中的“穴”修饰。

节-入-穴技术记载于例如 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway 等, Prot Eng 9, 617-621(1996)和 Carter, J Immunol Meth 248,7-15(2001)。一般地，该方法牵涉在第一多肽链的界面处引入隆起（“节”）并在第二多肽链的界面中引入相应的空腔（“穴”），使得隆起可以置于空腔中从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过将来自第一多肽链界面的小氨基酸侧链用更大的侧链（例如酪氨酸或色氨酸）替换来构建隆起。在第二多肽链的界面中创建具有与隆起相同或相似大小的互补性空腔，其通过将大氨基酸侧链用更小的氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）替换进行。

因而，在一个具体的实施方案中，在本发明的双特异性抗体的 Fc 域的第一多肽链的 CH3 域中，一个氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换，由此在第一多肽链的 CH3 域内生成隆起，其可安置于第二多肽链的 CH3 域内的空腔中，而且在 Fc 域的第二多肽链的 CH3 域中，一个氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换，由此在第二多肽链的 CH3 域内生成空腔，其中可安置第一多肽链的 CH3 域内的隆起。

优选地,所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自下组:精氨酸(R),苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),和色氨酸(W)。优选地,所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自下组:丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T),和缬氨酸(V)。

可以通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成来生成隆起和空腔。

在一个特定的实施方案中,在Fc域第一多肽链的CH3域(“节”多肽链)中,第366位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),而在Fc域第二多肽链的CH3域(“穴”多肽链)中,第407位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)。在一个实施方案中,在Fc域第二多肽链中,另外,第366位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第368位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)。

在另一个实施方案中,在Fc域的第一多肽链中,另外,第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或第356位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C),而在Fc域的第二多肽链中,另外,第349位的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)。这两个半胱氨酸残基的引入导致在Fc域的两个多肽链之间形成二硫桥,进一步稳定了二聚体(Carter, J Immunol Methods 248,7-15(2001))。

在一个具体的实施方案中,Fc域的第一多肽链包含氨基酸替代S354C和T366W,且Fc域的第二多肽链包含氨基酸替代Y349C, T366S, L368A和Y407V。

为了有助于从最终的双特异性异源二聚体的含Fc结构域的分子中纯化带有“穴”的多肽链同源二聚体,可以对CH3结构域进行的其他取代包括影响与蛋白A结合的那些。此类取代的非限制性实例包括H435R、H435R、和/或Y436F(美国专利号:US 8,586,713 B2)。多肽链的带有“穴”的CH2和CH3结构域的蛋白A结合结构域优选地通过在位置435处的氨基酸置换(H435R)而突变。因此,带有“穴”的多肽链同源二聚体将不会结合蛋白A,而双特异性异源二聚体将保留其经由蛋白A结合结构域结合蛋白A的能力。

术语“特异性”意指抗体对于抗原的结合是选择性的,并且能与不想要的或非特异性的相互作用区别开来。

术语“亲和力”或“结合亲和力”指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。术语“ K_D ”是指特定的抗体-抗原相互作用的解离常数。可以使用本领域已知的各种技术来确定结合亲和力,例如表面等离子体共振、生物层干涉法、双极化干涉法、静态光散射、动态光散射、等温滴定热法、ELISA、分析超速离心和流式细胞术等。

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

术语“药用载体”或“药学上可接受的载体”指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂或媒介物。

术语“有效量”指包含本发明的活性成分的药物制剂的剂量,其以单一或多次剂量施用患者后,在治疗的患者中产生预期效果。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定:诸如人种差异;体重、年龄和健康状况;涉及的具体疾病;疾病的严重程度;个体患者的应答;施用的具体抗体;施用模式;施用制剂的生物利用率特征;选择的给药方案;和任何伴随疗法的使用。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括初级转化的细胞和来源于其的后代,而不考虑传代的数目。后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同,而是可以包含突变。本文中包括与在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

本文所用的术语“转染”是指将外源核酸引入真核细胞。转染可以通过本领域已知的各种手段来实现,包括磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂质转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和生物弹道技术(biolistics)。

术语“稳定转染”或“稳转”是指将外源核酸、DNA或RNA引入和整合到转染细胞的基因组中。术语“稳定转染体”(stable transfectant)是指将外来DNA稳定地整合到基因组DNA中的细胞。

术语“核酸分子编码”、“编码DNA序列”和“编码DNA”是指沿着脱氧核糖核酸链的脱氧核糖核苷酸的顺序。这些脱氧核糖核苷酸的顺序决定了沿着多肽(蛋白质)链的氨基酸的顺序。因此,核酸序列编码氨基酸

序列。

生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8章和15章。发明所述的抗体或其抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个FR区。人FR种系序列可以从ImMunoGeneTics (IMGT)的网站<http://imgt.cines.fr>得到，或者从免疫球蛋白杂志，(2001) ISBN: 012441351上获得。

本发明工程化的抗体或其抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的cDNA序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在Fc区的高度保守N端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。

本文所用的术语“个体”或“受试者”是指任何动物，例如哺乳动物或有袋动物。本发明的个体包括但不限于人类、非人类灵长类动物（例如食蟹猴或恒河猴或其他类型的猕猴）、小鼠、猪、马、驴、牛、绵羊、大鼠和任何种类的家禽。

本文所用的术语“肿瘤”指的是一种以细胞或组织的病理性增生为特征的疾病，及其随后的迁移或侵袭其他组织或器官。肿瘤生长通常是不受控制的和进行性的，不诱导或抑制正常细胞增殖。肿瘤可影响多种细胞、组织或器官，包括但不限于选自膀胱、骨、脑、乳腺、软骨、神经胶质细胞、食管、输尿管、胆囊、心脏、肠、肾、肝、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、尿道、输尿管、尿道、子宫、阴道器官，或组织或相应的细胞。肿瘤包括癌症，如肉瘤，癌，或浆细胞瘤（浆细胞的恶性肿瘤）。本发明所述的肿瘤，可包括，但不限于白血病（如急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病，急性粒细胞白血病，急性早幼粒细胞白血病、急性粒-单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、慢性白血病、慢性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、真性红细胞增多症），淋巴瘤（霍奇金病、非霍奇金病）、原发性巨球蛋白血症，重链病，实体瘤如肉瘤和癌症（如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、血管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤，间皮瘤，尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、支气管癌、髓样癌、肾细胞癌、肝癌，尼罗河管癌，绒癌、精原细胞瘤、胚胎癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤，颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤，听神经瘤，少突胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤）、食管癌、胆囊癌、肾癌、多发性骨髓瘤。较佳地，所述的“肿瘤”包括但不限于：胰腺癌、肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、淋巴瘤、胆囊癌、肾癌、白血病、多发性骨髓瘤、卵巢癌、宫颈癌和胶质瘤。

本文所用的术语“疾病”或“病症”或“紊乱”等是指任何损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的改变或失调。例如，所述的“疾病”包括但不限于：肿瘤、病原体感染、自身免疫性疾病、T细胞功能障碍性疾病、或免疫耐受能力缺陷（如移植排斥）。

本文所用的术语“治疗”是指在试图改变个人或处理细胞引起的疾病过程中的临床干预，既可以进行预防也可以在临床病理过程干预。治疗效果包括但不限于，防止疾病的发生或复发、减轻症状、减少任何疾病直接或间接的病理后果、防止转移、减慢疾病的进展速度、改善或缓解病情、缓解或改善预后等。

术语“药盒”或“试剂盒”包括有效量的一种或多种单位剂型的本发明的药物组合物。在一些实施方案中，药盒可含有无菌容器；这样的容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、泡罩包装或本领域已知的其它合适的容器形式。这种容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其他适合于保持药物的材料制成。此外，药盒还包括将本发明的药物组合物给予个体的说明书。说明书中通常包含使用本发明的药物组合物来治疗疾病的方法。

具体实施方式

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不适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，通常按照常规条件如 J. 萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，科学出版社，2002 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的构建和表达

本发明的双特异性抗体的结构是在抗人 CLDN18.2 全长抗体的重链 C 末端或轻链 C 末端连接人 T 细胞受体亚基 CD3 ϵ 的结合结构域。其中，抗人 CLDN18.2 全长抗体为 6#AA，其重链序列如 SEQ ID NO:1 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:5 所示。CD3 ϵ 结合结构域来自于全长抗体 h160C9AA，其重链序列如 SEQ ID NO:9 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:10 所示。为降低抗体的 ADCC 活性，6# AA 和 h160C9AA 的 Fc 段均已进行了 L234A 和 L235A 的氨基酸取代。

将 h160C9AA 的轻链可变区和重链可变区经由柔性接头连接形成单链抗体 scFv，其结构为：VL-(G₄S)₃-VH，序列如 SEQ ID NO:8 所示。所述 scFv 再通过 (G₄S)₃ 融合到 CLDN18.2 全长抗体 6#AA 的一条重链或两条轻链的 C 末端。

当 scFv 融合至 6# AA 的两条轻链的 C 末端时，则所形成的双特异性抗体被命名为 31905-38AA，包含同源的两条轻链和同源的两条重链，其中，融合后的轻链的序列如 SEQ ID NO:2 所示，重链的序列如 SEQ ID NO:1 所示。

当 scFv 融合至 6#AA 的一条重链的 C 末端时，则所形成的双特异性抗体被命名为 31905-44AA，包含同源的两条轻链和异源的两条重链。异源的两条重链中，含有 scFv 的重链被设计为“节”（knob）结构，包括 S354C 和 T366W 两个位点的氨基酸取代。以及，为防止 scFv 与重链 C 末端处发生断裂，将重链 C 末端最后一位的 K 突变为 A，进行 K447A 的氨基酸取代。异源的两条重链中，不含有 scFv 的重链被设计为“穴”（hole）结构，包括 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V 四个位点的氨基酸取代。以及，为便于双特异性抗体的纯化，“穴”结构的重链还要进行 H435R 的取代。改造后的同源轻链序列如 SEQ ID NO:5 所示，“节”（knob）结构重链的序列如 SEQ ID NO:3 所示，“穴”（hole）结构重链的序列如 SEQ ID NO:4 所示。

本发明的双特异性抗体的结构以及相关的分子序列分别总结于表 1 和表 2 中。

表 1 双特异性抗体的结构

分子名称	分子结构描述	SEQ ID NO:
31905-38AA	CLDN18.2 HC (包含 IgG1 Fc)	1
	CLDN18.2 LC-(G ₄ S)-CD3VL-(G ₄ S) ₃ -CD3VH	2
31905-44AA	CLDN18.2 HC(包含 IgG1 Fc, knob)-(G ₄ S) ₃ -CD3VL-(G ₄ S) ₃ -CD3VH	3
	CLDN18.2 HC (包含 IgG1 Fc, hole)	4
	CLDN18.2 LC	5
6# AA	CLDN18.2 HC	1
	CLDN18.2 LC	5
h160C9AA scFv	CD3VL-(G ₄ S) ₃ -CD3VH	8
h160C9AA	CD3 HC	9
	CD3 LC	10

表 2 双特异性抗体的氨基酸序列

名称	SEQ ID NO:	氨基酸序列
31905-38AA 重链	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTNYWIHWVRQAPGQGLE WMGRIYPGTGNTYYNEKFTGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY YCAREGYGKGNSMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
31905-38AA 轻链	2	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNAGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLFYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYHCQN AYYYPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY BREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSAQAVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGG GGSGGGSGGGGSEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTL YLQMNNLRTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
31905-44AA 的 “节”结构重链	3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTNYWIHWVRQAPGQGLE WMGRIYPGTGNTYYNEKFTGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY YCAREGYGKGNSMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSAQAVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTV LGGGGSGGGGSGGGGSEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKN TLYLQMNNLRTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
31905-44AA 的 “穴”结构重链	4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTNYWIHWVRQAPGQGLE WMGRIYPGTGNTYYNEKFTGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY YCAREGYGKGNSMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV

		HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNRYTQKSLSLSPGK
31905-44AA 轻 链	5	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNAGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLFYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYHCQN AYYYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
6# AA 重链	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTNYWIHWVRQAPGGGLE WMGRIYPGTGNTYYNEKFTGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVY YCAREGYGKGNSMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
6# AA 轻链	5	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNAGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLFYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYHCQN AYYYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
h160C9AA 重链 可变区 VH	6	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTLYLQMNNLRTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
h160C9AA 轻链 可变区 VL	7	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSN LWVFGGGTKLTVL
h160C9AA 的 scFv	8	AQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVKLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDAKNTLYLQMNNLRTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWF AYWGQGLTVTVSS
h160C9AA 重链	9	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTLYLQMNNLRTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

		SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
h160C9AA 轻链	10	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
6# AA 重链 HCDR1	11	NYWIH
6# AA 重链 HCDR2	12	RIYPGTGNTYYNEKFTG
6# AA 重链 HCDR3	13	EGYGKGNMSMDY
6# AA 轻链 LCDR1	14	KSSQSLLNAGNQKNYLT
6# AA 轻链 LCDR2	15	WASTRES
6# AA 轻链 LCDR3	16	QNAYYYPYT
h160C9AA 重链 HCDR1	17	TYAMN
h160C9AA 重链 HCDR1	18	RIRSKYNNYATYYADSVKD
h160C9AA 重链 HCDR1	19	HGNFGNSYVSWFAY
h160C9AA 轻链 LCDR1	20	RSSTGAVTTSNYAN
h160C9AA 轻链 LCDR2	21	GTNKRAP
h160C9AA 轻链 LCDR3	22	ALWYSNLWV
6# AA 重链可变区 VH	23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTNYWIHWVRQAPGQGLE WMGRIYPGTGNTYYNEKFTGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVY YCAREGYGKGNMSMDYWGQGTTVTVSS
6# AA 轻链可变区 VL	24	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNAGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLFYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYHCQN AYYYPYTFGGGTKLEIK

实施例 2 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体构建及其在真核细胞中的瞬转表达

将前述双特异性抗体分子的重链和轻链的目的基因片段分别克隆到 PTT5 表达载体中，制备转染级别的表达质粒。将质粒接种在无血清培养基中培养 HEK293E 或 Expi293 细胞，并在 37°C，8% CO₂ 的环境中置于摇床上培养。细胞培养 6 天后收集上清纯化，对最终纯化的双特异性抗体进行 SDS-PAGE 纯度分析和 A280 浓度测定。

实施例 3 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的亲和力检测试验

A. 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体与表达 hCLDN18.2 和 hCD3 的细胞亲和力检测

使用 FACS 检测抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体与稳转表达 hCLDN18.2 的 HEK293 细胞（HEK293-hCLDN18.2）、天然表达 hCD3 的 T 淋巴细胞（Jurkat）的结合情况。

收集 HEK293-hCLDN18.2 或 Jurkat 细胞，用 FACS buffer（PBS+1% BSA+0.5 mM EDTA）重悬，调整细胞浓度后按照每孔 1E5 的细胞数量加入到 96 孔板中，然后按照事先设定好的浓度，加入梯度稀释后的抗体，其中，阴性对照为人 IgG1AA（Negative-IgG1AA），CLDN18.2 阳性对照为 6#AA 抗体，CD3 阳性对照为 h160C9AA 抗体。4°C 摇床孵育 2h 后，用 FACS buffer 离心洗涤 2 次，然后加入荧光标记的抗人 IgG 二抗，每孔 100 μL，4°C 摇床孵育 1h 后，用 FACS buffer 离心洗涤 2 次后过滤细胞于新的 96 孔板中，然后将制备好的样品在流式细胞仪上进行检测，通过软件计算每个浓度的平均荧光强度（以下简称 MFI），然后通过 GraphPad 软件计算半数结合浓度（以下简称 EC₅₀）和最高平均荧光强度（Top MFI），结果如表 3 所示。

表 3 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体分别与 hCLDN18.2 和 hCD3 的亲和力

分子编号	HEK293-hCLDN18.2		Jurkat	
	EC ₅₀ (nM)	最高平均荧光强度 (Top MFI)	EC ₅₀ (nM)	最高平均荧光强度 (Top MFI)
31905-38AA	0.98	24200	14.08	2025
31905-44AA	1.18	31000	9.3	1698
6#AA	0.95	18600	N/A	26
h160C9AA	0	897	0.13	2020
Negative-IgG1AA	0	359	0	110

表 3 与附图 2-3 展示的是本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体和参比抗体（6#AA 和 h160C9AA）分别与 HEK293-hCLDN18.2 细胞和 Jurkat 细胞的亲和力结果。实验结果显示：本发明的双特异性抗体与 HEK293-hCLDN18.2 细胞的结合最高平均荧光强度在 24200-31000 之间，而抗 CLDN18.2 参比抗体 6#AA 在同样的反应条件下与 HEK293-hCLDN18.2 结合的最高平均荧光强度为 18600，抗 CD3 参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下与 HEK293-hCLDN18.2 结合的最高平均荧光强度仅为 897。本发明的双抗与 HEK293-hCLDN18.2 结合的半数结合浓度（EC₅₀）在 0.98-1.18 之间，抗 CLDN18.2 参比抗体 6#AA 在同样的反应条件下与 HEK293-hCLDN18.2 半数结合浓度（EC₅₀）为 0.95 nM，抗 CD3 参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下与 HEK293-hCLDN18.2 半数结合浓度（EC₅₀）为 0 nM。

本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体与 CD3 高表达的 Jurkat 细胞的结合最高平均荧光强度在 1698-2025 之间，而抗 CD3 参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下与 Jurkat 结合的最高平均荧光强度为 2020。本发明的双抗与 Jurkat 结合的半数结合浓度（EC₅₀）在 9.3-14.08 之间，抗 CD3 参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下与 Jurkat 半数结合浓度（EC₅₀）为 0.13 nM。由此可见，本发明的双特异性抗体与 hCLDN18.2 抗原的结合能力均与 CLDN18.2 参比单抗 6#AA 基本上保持一致，没有显著性差异；与 hCD3 抗原的结合能力弱于 CD3 参比抗体 h160C9AA。

B. 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的体外结合亲和力和动力学

本实验采用表面等离子共振 (SPR) 方法测定, 使用 Biacore 8K 仪器分析双特异性抗体与人源 CD3 E&D 蛋白的亲和力和动力学性质。将人源 CD3E&D 蛋白通过氨基偶联的方式固定在 CM5 芯片的实验通道上, 然后将待测抗体经倍比稀释成系列浓度后, 依次流过实验通道和参比通道表面发生结合, 随后进行解离, 从而得到各样品的结合解离曲线, 最后用 Biacore Insight Evaluation 软件对其结果进行分析与评估。

本发明的双抗用 1×HBS-EP+ (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% P20) 运行缓冲液稀释至 400 nM, 之后用该缓冲液倍比稀释至 1.56 nM, 得到 400 nM-1.56 nM 系列浓度的抗体溶液。每一轮实验结束后, 使用 3M MgCl₂ 溶液冲洗, 以 30 μL/min 的流速冲洗 30s, 将捕获的抗体连同抗原一起去除, 完成芯片的再生。原始数据使用 Biacore Insight Evaluation Software (version 2.0.15.12933) 软件进行分析, 拟合模型使用 1:1, 得到的双特异性抗体亲和力和动力学实验数据如表 4 所示。结果显示双特异性抗体对于人源 CD3 E&D 蛋白有很高的亲和力, 31905-44AA 分子对人源 CD3 E&D 蛋白的亲和力比 31905-38AA 分子弱。

表 4 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体与人源 CD3 E&D 蛋白的结合亲和力和动力学

分子编号	抗原	结合速率 k_a (1/M*s)	解离速率 k_d (1/s)	亲和力 K_D (M)
31905-38AA	人源CD3 E&D	7.82E+05	7.66E-04	9.78E-10
31905-44AA	人源CD3 E&D	2.04E+05	3.65E-03	1.79E-08

C. 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的结合选择性

使用 FACS 检测本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体、抗 CLDN18.2 参比抗体 6#AA 和 抗 CD3 参比抗体 h160C9AA 分别与稳转表达 hCLDN18.1 的 HEK293 细胞 (HEK293-hCLDN18.1), mCLDN18.2 的 HEK293 细胞 (HEK293-mCLDN18.2), mCLDN18.1 的 HEK293 细胞 (HEK293-mCLDN18.1) 以及 cynoCLDN18 的 HEK293 细胞 (HEK293-cynoCLDN18) 的结合情况。

准备 HEK293-hCLDN18.1, HEK293-mCLDN18.2, HEK293-mCLDN18.1 以及 HEK293-cynoCLDN18 细胞, 用 FACS buffer (PBS+1% BSA+0.5 mM EDTA) 重悬, 调整细胞浓度后按照每孔 1E5 的细胞数量加入到 96 孔板中, 然后按照事先设定好的浓度, 加入梯度稀释后的抗体, 其中, 阴性对照为 Negative-IgG1AA, CLDN18.2 阳性对照为 6#AA 抗体, CD3 阳性对照为 h160C9AA 抗体。4°C 摇床孵育 2 h 后, 用 FACS buffer 离心洗涤 2 次, 然后加入荧光标记的抗人 IgG 二抗, 每孔 100 μL, 4°C 摇床孵育 1 h 后, 用 FACS buffer 离心洗涤 2 次后过滤细胞于新的 96 孔板中, 然后将制备好的样品在流式细胞仪上进行检测, 通过软件计算每个浓度的平均荧光强度 (以下简称 MFI), 然后通过 GraphPad 软件计算半数结合浓度 (以下简称 EC₅₀) 和最高平均荧光强度 (Top MFI), 结果如表 5 所示。

表 5 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体分别与 hCLDN18.1, mCLDN18.2, mCLDN18.1 和 cynoCLDN18 的结合

分子编号	HEK293-mCLDN18.2		HEK293-cynoCLDN18		HEK293-hCLDN18.1	HEK293-mCLDN18.1
	EC ₅₀ (nM)	MFI(Max)	EC ₅₀ (nM)	MFI(Max)	是否结合(+/-)	是否结合(+/-)
31905-38AA	1.13	37300	0.58	28600	-	-
31905-44AA	1.18	51400	0.84	41800	-	-
6#AA	0.90	36000	0.62	39500	-	-

h160C9AA	0	543	0	1045	-	-
Negative-IgG1AA	0	75	N/A	136	-	-

表 5 与附图 4-7 展示了本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体, 抗 CLDN18.2 参比抗体 6#AA 和抗 CD3 参比抗体 h160C9AA 分别与 HEK293-hCLDN18.1 细胞, HEK293-mCLDN18.2 细胞, HEK293-mCLDN18.1 细胞和 HEK293-cynoCLDN18 细胞的亲和力结果。实验结果显示: 本发明的双抗与参比抗体 6#AA 相同, 均与 mCLDN18.2 和 cynoCLDN18 结合, 双抗与 HEK293-mCLDN18.2 结合的最高平均荧光强度在 37300-51400 之间, 参比抗体 6#AA 在同样的反应条件下与 HEK293-mCLDN18.2 结合的最高平均荧光强度为 36000, 参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下与 HEK293-mCLDN18.2 结合的最高平均荧光强度仅为 543; 本发明的双抗半数结合浓度 (EC₅₀) 在 1.13-1.18 nM 之间; 参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 半数结合浓度 (EC₅₀) 分别为 0.90 nM 和 0 nM。而且, 实验结果表明, 本发明的双抗与 HEK293-cynoCLDN18 结合的最高平均荧光强度在 28600-41800 之间, 参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 在同样的反应条件下与 HEK293-cynoCLDN18 结合的最高平均荧光强度分别为 39500 和 1045; 双抗的半数结合浓度 (EC₅₀) 在 0.58-0.84 nM 之间; 参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 半数结合浓度 (EC₅₀) 分别为 0.62 nM 和 0 nM。进一步研究结果表明, 本发明的双抗和参比抗体均不与 hCLDN18.1 和 mCLDN18.1 结合。由此可见, 本发明的双抗与 mCLDN18.2 和 cynoCLDN18 的结合与参比抗体 6#AA 基本保持一致性; 特异性结合人和鼠的 CLDN18.2 以及 cynoCLDN18, 不结合人和鼠的 CLDN18.1, 具有良好的选择性。

实施例 4 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的体外功能实验

A. T 细胞介导的细胞毒性实验 (TDCC)

以 HEK293-hCLDN18.2 为靶细胞, 以健康人 PBMC 细胞为效应细胞, 使用细胞毒性检测试剂 (Roche) 检测细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量, 并以此作为细胞杀伤作用的指标。

离心收集 HEK293-hCLDN18.2 细胞, 弃上清后, 用细胞缓冲液 (RPMI1640+1%FBS+1%P/S) 重悬并调整细胞密度, 按照每孔 1E4 的细胞数量转移到 96 孔中, 体积为 50 μ L, 过夜, 待细胞贴壁后, 加入 50 μ L 事先配制好的不同浓度梯度的抗体以及对照样品工作液, 然后补充按照效应细胞:靶细胞=20:1 的数量加入 50 μ L 事先准备好的 PBMC 细胞, 即每孔 1E5 的细胞数量。置于细胞培养箱 (37°C, 5%CO₂) 内孵育约 24 h。孵育结束后, 取出 96 孔实验板, 1500 rpm 离心后 10 min 后, 小心吸取 50 μ L 上清, 转移至新的 96 孔实验板中, 加入等体积 LDH 检测工作液后, 于室温孵育 20min, 在酶标仪上检测, 检测波长为 492nm, 参比波长为 650nm。

TDCC 效应引起的细胞裂解百分比采用以下公式进行计算:

%细胞裂解= 100% $\times$ (样品释放-靶细胞/效应细胞释放量) / (最大释放-靶细胞释放), 其中最大释放为 Triton X-100 处理靶细胞的孔产生的吸光度值, 靶细胞/效应细胞混合释放为靶细胞和效应细胞混合孔产生的吸光度值, 靶细胞释放为仅含有靶细胞的孔中产生的吸光度值, 样品释放为抗体与靶细胞、效应细胞混合孔产生的吸光度值, GraphPad 软件计算 EC₅₀ 和最大裂解, 结果如表 6 所示。

B. T 细胞活化实验

T 细胞活化实验主要通过测定细胞活化标记 CD25⁺CD69⁺%进行鉴定, 收集 TDCC 实验后的细胞于 96 孔板中, 用 FACS buffer (PBS+1%BSA+0.5 mM EDTA) 离心洗涤细胞两次, 然后加入一定量的抗人 APC-CD3, 抗人 PE-CD25 和抗人 BV421-CD69 混合液, 4°C 下孵育 1h。用 FACS buffer 离心洗涤 2 次后过滤细胞于新的 96 孔板中, 然后将制备好的样品在流式细胞仪上进行检测, 通过软件计算 CD25⁺CD69⁺在 CD3⁺ T 细胞中的百分比, 然后通过 GraphPad 软件计算半数结合浓度 (以下简称 EC₅₀) 和最高百分比 (CD25⁺CD69⁺%), 结果如表 6 所示。

表 6 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的 TDCC 活性和 T 细胞活化

分子编号	TDCC 活性		T 细胞活化	
	EC ₅₀ (nM)	最大裂解 (%)	EC ₅₀ (nM)	CD25 ⁺ CD69 ⁺ %
31905-38AA	0.13	54.62%	0.022	38.86%
31905-44AA	0.54	30.03%	0.049	33.43%
6#AA	1.45	16.34%	0	3.18%
h160C9AA	0.32	3.12%	0	4.2%
Negative-IgG1AA	0	1.56%	0	0%

表 6 与附图 8-9 展示了本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体对 HEK293-hCLDN18.2 细胞的 TDCC 活性和 T 细胞活化结果。实验结果显示：本发明的双抗对 HEK293-hCLDN18.2 细胞的最大 TDCC 效应在 30.03%-54.62%之间，抗 CLDN18.2 参比抗体 6#AA 在同样的反应条件下对 HEK293-hCLDN18.2 细胞的最大 TDCC 效应分别为 16.34%；双抗产生 50% TDCC 效应的浓度 (EC₅₀) 在 0.13-0.54 nM 之间，参比抗体 6#AA 在同样的反应条件下产生 50% TDCC 效应的浓度 (EC₅₀) 为 1.45 nM。

本发明的双抗对 HEK293-hCLDN18.2 细胞的最大 T 细胞活化效应在 33.43%-38.86%之间，参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 在同样的反应条件下对 HEK293-hCLDN18.2 细胞的最大 T 细胞活化效应分别仅为 3.18% 和 4.2%；双抗产生 50% T 细胞活化的浓度 (EC₅₀) 在 0.022-0.049 nM 之间，参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 在同样的反应条件下产生 50% T 细胞活化的浓度 (EC₅₀) 为 0。上述结果证明了本发明的双抗具有较强的 TDCC 活性和 T 细胞活化效应，这种作用是靶细胞依赖性的。

C. 细胞因子定量实验

细胞因子定量实验 (包括 INF- γ , IL-2, IL-6, TNF- α) 主要通过 Elisa Kit (Biolegend) 进行检测，收集离心后的上清液，按照设定的比例稀释后通过 Kit 进行检测，具体方法参考根据 Kit 说明书 Protocol 进行。在酶标仪上检测，检测波长为 450nm，参比波长为 650nm。GraphPad 软件计算 EC₅₀ 和最大浓度，结果如表 7 和表 8 所示。

表 7 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体诱导 T 细胞的 INF- γ 分泌和 IL-2 分泌

分子编号	INF- γ 分泌		IL-2 分泌	
	EC ₅₀ (nM)	浓度 (pg/mL) (Max)	EC ₅₀ (nM)	浓度 (pg/mL) (Max)
31905-38AA	0.012	769.5	0.013	201.9
31905-44AA	0.033	260.5	0.05	60.25
6#AA	0	0	0	0
h160C9AA	0	0	0	0
Negative-IgG1AA	0	0	0	0

表 7 与附图 10-11 展示了在 HEK293-hCLDN18.2 细胞存在的条件下，本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体诱导 T 细胞分泌 INF- γ 和 IL-2 的结果。实验结果显示：本发明的双抗诱导 T 细胞产生的最大 INF- γ 分泌水平在 260.5 pg/mL - 769.5 pg/mL 之间；双抗诱导产生 50% INF- γ 分泌的浓度 (EC₅₀) 在 0.012-0.033 nM 之间。参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 在同样的反应条件下未见明显的诱导 INF- γ 分泌作用。

本发明的双抗诱导 T 细胞产生的最大 IL-2 分泌水平在 60.25 pg/mL – 201.9 pg/mL 之间；双抗诱导产生 50% IL-2 分泌的浓度 (EC_{50}) 在 0.013-0.05 nM 之间。参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 在同样的反应条件下未见明显的诱导 IL-2 分泌作用。

表 8 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体诱导 T 细胞的 IL-6 分泌和 TNF- α 分泌

分子编号	IL-6 分泌		TNF- α 分泌	
	EC_{50} (nM)	浓度 (pg/mL) (Max)	EC_{50} (nM)	浓度 (pg/mL) (Max)
31905-38AA	0.005	21942	0.01	664.6
31905-44AA	0.16	12718	1.3	365.9
6#AA	0	0	0	0
h160C9AA	2.9	84209	5.9	3175
Negative-IgG1AA	0	0	0	0

表 8 与附图 12-13 展示了在 HEK293-hCLDN18.2 细胞存在的条件下，本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体诱导 T 细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 的结果。实验结果显示：本发明的双抗诱导 T 细胞产生的最大 IL-6 分泌水平在 12718 pg/mL – 21942 pg/mL 之间，参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下诱导 T 细胞产生的最大 IL-6 分泌水平为 84209 pg/mL；双抗诱导产生 50% IL-6 分泌的浓度 (EC_{50}) 在 0.005-0.16 nM 之间，参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下诱导产生 50% IL-6 分泌的浓度 (EC_{50}) 为 2.9 nM。然而，参比抗体 6#AA 在同样的反应条件下未见明显的诱导 IL-6 分泌作用。

本发明的抗 CD3-CLDN18.2 抗体诱导 T 细胞产生的最大 TNF- α 分泌水平在 365.9 pg/mL – 664.6 pg/mL 之间，参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下诱导 T 细胞产生的最大 TNF- α 分泌水平为 3175 pg/mL；双抗诱导产生 50% TNF- α 分泌的浓度 (EC_{50}) 在 0.01-1.3 nM 之间，参比抗体 h160C9AA 在同样的反应条件下诱导产生 50% TNF- α 分泌的浓度 (EC_{50}) 为 5.9 nM。然而，参比抗体 6#AA 在同样的反应条件下未见明显的诱导 TNF- α 分泌作用。

上述结果进一步证明了本发明的抗 CD3-CLDN18.2 抗体具有较强的 T 细胞活化作用。在靶细胞存在的条件下，诱导 INF- γ 和 IL-2 分泌的作用强于抗 CD3 参比抗体 h160C9AA，诱导 IL-6 和 TNF- α 分泌的作用弱于 h160C9AA。

D. 荧光素酶报告基因实验

构建 Jurkat-NFAT 细胞株，该细胞株能稳定表达荧光素酶 (luciferase)，荧光素酶基因受 NFAT 元件调控。而 NFAT 反应元件则受 Jurkat 细胞表面的 CD3 受体调控，通过作用刺激 CD3 受体则可激活 NFAT 反应元件，从而表达荧光素酶，故采用此系统在细胞水平模拟 CD3 抗体对 T 细胞的活化效应。

将 Jurkat- NFAT 细胞用培养基稀释混匀 (RMPI1640 +1% FBS +1%P/S)，按照每孔 5×10^4 的细胞数量接种于指定的孔板中，每孔体积为 50 μ L，然后加入 50 μ L 事先用培养基稀释好的测试抗体与细胞共孵育，在 37°C、5%二氧化碳培养箱中培养约 4-6 h，加入 50 μ L 检测试剂 Bright-Glo 荧光素酶测定试剂，常温避光孵育 5 min 后，在 PerkinElmer Envision 上读取化学发光信号值，通过 GraphPad Prism 拟合出信号抑制 EC_{50} 值。

表 9 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体对 Jurkat- NFAT 报告基因的表达情况

分子编号	EC ₅₀ (nM)	荧光值 (Max)
31905-38AA	7.62	116960
31905-44AA	123.6	113700
6#AA	0	0
h160C9AA	0.32	220000
Negative-IgG1AA	0	0

表 9 与附图 14 展示了本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体对 Jurkat-NFAT 报告基因的荧光素酶表达水平的结果。实验结果显示：本发明的双抗对 Jurkat-NFAT 报告基因的最大荧光素酶表达在 113700-116960 之间，参比抗体 h160C9AA 对 Jurkat-NFAT 报告基因的最大荧光素酶表达在 220000，参比抗体 6#AA 对 Jurkat-NFAT 报告基因的最大荧光素酶表达没有影响。

本发明的双抗产生 50% 荧光素酶表达的浓度 (EC₅₀) 在 7.62-123.6nM 之间，参比抗体 h160C9AA 抗体产生 50% 荧光素酶表达的浓度 (EC₅₀) 在 0.32 nM，上述结果证明了本发明的双特异性抗体激活效应低于 CD3 参比抗体，CD3 双价抗体 (31905-38AA) 激活效应高于 CD3 单价抗体 (31905-44AA)。

E. NK 细胞介导的细胞毒性实验 (ADCC)

以 HEK293-hCLDN18.2 为靶细胞，以健康人 PBMC 中分离出的 NK 细胞为效应细胞，使用细胞毒性检测试剂 (Roche) 检测细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量，并以此作为细胞杀伤作用的指标。

离心收集 HEK293-hCLDN18.2 细胞，弃上清后，用 ADCC 缓冲液 (RPMI1640+1%FBS+1%P/S) 重悬并调整细胞密度，按照每孔 1E4 的细胞数量转移到 96 孔中，体积为 50 μ L，过夜，待细胞贴壁后，加入 50 μ L 事先配制好的不同浓度梯度的抗体以及对照样品工作液，然后补充按照效应细胞:靶细胞=5:1 的数量加入 50 μ L 事先分离好的 NK 细胞，即每孔 5E4 的细胞数量。置于细胞培养箱 (37°C, 5%CO₂) 内孵育约 24 h。孵育结束后，取出 96 孔实验板，1500 rpm 离心后 10 min 后，小心吸取 50 μ L 上清，转移至新的 96 孔实验板中，加入等体积 LDH 检测工作液后，于室温孵育 20min，在酶标仪上检测，检测波长为 492nm，参比波长为 650nm。

ADCC 效应引起的细胞裂解百分比采用以下公式进行计算：

%细胞裂解 = $100\% \times (\text{样品释放} - \text{靶细胞释放} / \text{效应细胞释放}) / (\text{最大释放} - \text{靶细胞释放})$ ，其中最大释放为 Triton X-100 处理靶细胞的孔产生的吸光度值，靶细胞/效应细胞混合释放为靶细胞和效应细胞混合孔产生的吸光度值，靶细胞释放为仅含有靶细胞的孔中产生的吸光度值，样品释放为嵌合抗体与靶细胞、效应细胞混合孔产生的吸光度值，GraphPad 软件计算 EC₅₀ 和最大裂解，结果如表 10 所示。

表 10 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的 ADCC 活性

分子编号	ADCC 活性	
	EC ₅₀ (nM)	最大裂解 (%)
31905-38AA	0.501	19.95%
31905-44AA	0.532	7.03%
6#AA	0.771	6.92%
h160C9AA	0	0
Negative-IgG1AA	0	0

表 10 与附图 15 展示了本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体对 HEK293-hCLDN18.2 细胞的 ADCC 活性结果。实验结果显示：本发明的双抗对 HEK293-hCLDN18.2 细胞的最大 ADCC 效应在 7.03%-19.95% 之间，参比抗体 6#AA 和 h160C9AA 在同样的反应条件下 ADCC 效应分别为 6.92% 和 0%。本发明的双抗产生 50% ADCC 效应的浓度 (EC₅₀) 在 0.501-0.532 nM 之间，6#AA 在同样的反应条件下产生 50% ADCC 效应的

浓度 (EC₅₀) 为 0.771 nM。上述结果证明了本发明的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的 ADCC 效应与抗 CLDN18.2 参比抗体 6#AA 相当, 而 CD3 参比抗体 h160C9AA 无 ADCC 效应。

实施例 5 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的体内药效实验

取正常人外周血, 用密度梯度离心法分离人 PBMC, 计数。然后用 RPMI-1640 培养基 (含 IL-2 和 10% FBS) 将分离的 PBMC 加入经 Mitomycin C 处理后的 HEK293-hCLDN18.2 细胞共培养 6 天。6 天后收取 PBMC, 将 PBMC 细胞和新鲜消化下来的 HEK293-hCLDN18.2 细胞 (上海齐鲁制药研究中心) 混合接种于 NCG 小鼠 (江苏集萃药康生物科技有限公司) 皮下, 构建人源化 HEK293-hCLDN18.2 模型。实验动物均饲养于恒温恒湿的独立通风盒内, 饲养室温度 20.0-26.0 °C, 湿度 40-70%, 10-20 次/h 换气, 昼夜明暗交替时间 12h/12h。

实验分为 PBS 对照组, 0.6 mg/kg 31905-44 AA 治疗组, 和 3 mg/kg 31905-44 AA 治疗组。每组 5 只小鼠, 腹腔注射给药, 每周二次, 给药 6 次 (见表 11)。给药后每天监测动物日常行为表现, 共进行 24 天。整个实验过程中, 用游标卡尺每周测量 2 次肿瘤长径和宽径, 肿瘤体积 (mm³) = 0.5 × (肿瘤长径 × 肿瘤短径²) 计算。相对肿瘤抑制率 TGI (%): TGI% = (1-T/C) × 100%。T/C % 为相对肿瘤增值率, 即在某一时间点, 治疗组和 PBS 对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。T 和 C 分别为治疗组和 PBS 对照组在某一特定时间点的肿瘤体积 (TV) 或瘤重 (TW)。所有数据均采用 Mean±SEM 表示, 用 student's t-test 比较治疗组肿瘤体积和瘤重与对照组相比有无显著性差异, p<0.05 为具有显著性差异。

如图 16 和 17 所示, 在人源化 HEK293-hCLDN18.2 模型中, 双抗 31905-44 AA 表现出明显的抗肿瘤作用, 各组 (PBS, 0.6 mg/kg 31905-44 AA, 3 mg/kg 31905-44 AA) 终末平均肿瘤体积分别为: 230.59 mm³、96.98 mm³、97.6 mm³; 0.6 mg/kg 31905-44 AA 组和 3 mg/kg 31905-44 AA 组抑瘤率 (TGI) 分别为 101.8% 和 101.2%。各给药组均没有出现明显的 NCG 小鼠体重下降情况, 表明 NCG 小鼠对该剂量下的抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体耐受性良好。

表 11 实验分组及给药方案

组别	分组	剂量 (mg/kg)	给药方案	给药方式
组 1	PBMC +对照 (PBS)	0	BIW*3	腹腔给药
组 2	PBMC + 31905-44 AA	0.6	BIW*3	腹腔给药
组 3	PBMC + 31905-44 AA	3	BIW*3	腹腔给药

实施例 6 抗 CD3-CLDN18.2 双特异性抗体的药代动力学实验

实验用 naive 食蟹猴两只, 一雌一雄, 自由饮水。双特异性抗体给药剂量为 1mg/kg, 60min 完成静脉输注。采血时间点为 Pre-dose, 1h, 4hr, 6hr, 24hr, 2d, 4d, 7d, 10d, 14d, 21d, 28d, 35d, 42d。采集全血后静置 0.5h, 离心取血清 (4000 转, 10min, 4°C) 收集血清, 离心前血液样品置于室温上, 离心后将血清分装, -80°C 冻存。

采用 ELISA 法检测血清中双特异性抗体的浓度, 检测过程描述如下:

使用人源 CD3 蛋白按 1μg/mL 的浓度包被 96 孔板, 每孔 100μL, 4°C 放置过夜; 每孔 200μL PBST 洗板 3 次, 加入 300μL 封闭试剂 5% 奶粉, 37°C 孵育 1h; 每孔 200μL PBST 洗板 3 次, 加入 100μL 标准品、QC 和待测样品, 37°C 孵育 1h; 每孔 300μL PBST 洗板 6 次, 加入 100μL Anti-Human IgG Fc (HRP), 1:5000 稀释, 37°C 孵育 1h; 每孔 300μL PBST 洗板 6 次, 加入 100μL TMB, 避光放置 10min 后, 加入 100μL 终止液停止显色反应。

MD 公司的 M5 读板仪检测 450nm 波长的吸光度值, 并使用 softmax 软件处理数据。

采用 Phoenix Winnolin 8.2 软件对双特异性抗体 31905-44AA 的猴血清浓度进行计算, 得到药代参数, 如下表 12 所示。

表 12 双特异性抗体 31905-44AA 的猴血清浓度和 PK 参数

Time (h)	雌猴	雄猴	Mean	SD	SEM
0	BLQ	BLQ			
1	23.026	22.576	22.80	3.18	2.25
4	15.951	21.153	18.55	3.68	2.60
6	14.767	16.241	15.50	1.04	0.74
24	7.118	7.692	7.41	0.41	0.29
48	4.303	5.149	4.73	0.60	0.42
96	2.363	2.476	2.42	0.08	0.06
168	1.308	1.359	1.33	0.04	0.03
240	BLQ	BLQ			
336	BLQ	BLQ			
T1/2 (hr)	60.01	57.91	59.46	2.19	1.55
Tmax (hr)	1	1	1	0.0	0.0
Cmax (μg/mL)	23.026	22.567	22.80	3.18	2.25
AUC _{0-336h} (day*μg/mL)	726.872	804.828	765.85	55.12	38.98
AUC _{0-∞} (day*μg/mL)	841.993	918.330	880.16	53.98	38.17
Vd (mL/kg)	104.5	91.0	97.75	9.55	6.75
Cl (mL/day/kg)	1.19	1.09	1.14	0.07	0.05
MRT (hr)	45.78	44.83	45.31	0.67	0.48

上表中浓度的单位均为 μg/mL，BLQ 为低于检测限。

双特异性抗体 31905-44AA 在猴体内的半衰期为 59.46±7.0h，Cmax 为 22.80±2.25 μg/mL，AUC_{0-336h} 为 765.85±38.98 day*μg/mL，因此该双特异性抗体在猴体内性质稳定，不存在明显的脱靶结合，药代性质良好。

上文所述的本发明的实施方案仅为示例性的，任何本领域技术人员都可以认识到或者可以确定无数的特定化合物、材料和操作的等价物，而不需要进行超出常规的试验。所有这些等价物都是在本发明范围内的，并且被权利要求所包含。

权 利 要 求 书

1、一种双特异性抗体,其包含抗CLDN18.2和CD3两个结合结构域,第一结合结构域能与CLDN18.2蛋白结合,第二结合结构域能与CD3结合。

2、如权利要求1所述的双特异性抗体,其中,抗CLDN18.2结合结构域包含:重链可变区,所述重链可变区中的3个CDR,即HCDR1、HCDR2和HCDR3的序列分别如SEQ ID NO:11, 12, 13所示;和,轻链可变区,所述轻链可变区中的3个CDR,即LCDR1、LCDR2和LCDR3的序列分别如SEQ ID NO:14, 15, 16所示。

3、如权利要求1所述的双特异性抗体,其中,抗CD3结合结构域包含:重链可变区,所述重链可变区中的3个CDR,即HCDR1、HCDR2和HCDR3的序列分别如SEQ ID NO:17, 18, 19所示;和,轻链可变区,所述轻链可变区中的3个CDR,即LCDR1、LCDR2和LCDR3的序列分别如SEQ ID NO:20, 21, 22所示。

4、如前述任一所述的双特异性抗体,其中,抗CLDN18.2结合结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO: 23至少80%至100%的序列同一性;和,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO: 24至少80%至100%的序列同一性。

5、如前述任一所述的双特异性抗体,其中,抗CD3结合结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO: 6至少80%至100%的序列同一性;和,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO: 7至少80%至100%的序列同一性。

6、如前述任一所述的双特异性抗体,其中,所述结合结构域为Fab、Fv、scFv、F(ab')₂、线性抗体、单域抗体或全长抗体。

7、如前述任一所述的双特异性抗体,还进一步包括重链恒定区和/或轻链恒定区,优选的,所述重链恒定区包括天然Fc或变体Fc。

8、如前述任一所述的双特异性抗体,其中,抗CLDN18.2结合结构域为全长抗体,抗CD3结合结构域为scFv。

9、如前述任一所述的双特异性抗体,其中,抗CLDN18.2结合结构域为全长抗体,所述全长抗体的重链序列如SEQ ID NO:1所示,轻链序列如SEQ ID NO:5所示;抗CD3结合结构域为scFv, scFv序列如SEQ ID NO:8所示。

10、如前述任一所述的双特异性抗体,其结构为:在抗CLDN18.2全长抗体的重链C端或轻链C端连接抗CD3的scFv。

11、如前述任一所述的双特异性抗体,其结构为:将抗CD3的scFv融合至抗CLDN18.2全长抗体的两条轻链的C端,形成同源的两条轻链和同源的两条重链,其中,融合后的轻链的序列如SEQ ID NO:2所示,重链的序列如SEQ ID NO:1所示。

12、如前述任一所述的双特异性抗体,其结构为:将抗CD3的scFv融合至抗CLDN18.2全长抗体的一条重链的C端,形成同源的两条轻链和异源的两条重链,其中,含有scFv的重链序列如SEQ ID NO:3所示,不含有scFv的重链序列如SEQ ID NO:4所示,轻链的序列如SEQ ID NO:5所示。

13、核酸,其编码前述任一的双特异性抗体。

14、重组载体,其包含权利要求13所述的核酸。

15、宿主细胞,其包含权利要求14的重组载体或含有权利要求13所述的核酸。

16、如权利要求15所述的宿主细胞,其为原核细胞,例如大肠杆菌;或真核细胞,例如酵母或哺乳动物细胞,哺乳动物细胞例如CHO细胞, HEK293细胞, HEK293E细胞或Expi293细胞。

17、制备双特异性抗体的方法,包括:在适合的条件下培养权利要求15或16的宿主细胞,并从所述细胞中纯化获得表达产物。

18、如前述任一双特异性抗体的用途,其用于制备特异性靶向表达CLDN18.2的肿瘤细胞的药物;所述表达CLDN18.2的肿瘤包括:胃癌,胰腺癌,食管癌,肺癌,卵巢癌,结肠癌,直肠癌,肝癌,头颈癌和胆囊癌及其转移,所述胃癌转移例如库肯勃氏瘤。

19、药物组合物,其包含有效量的权利要求1-12任一所述的双特异性抗体、或包含有效量的权利

要求 13 的核酸、或包含有效量的权利要求 14 的重组载体、或包含有效量的权利要求 15 或 16 的宿主细胞。

20、如权利要求 19 所述的药物组合物，还包含药学上可接受的载体。

21、如权利要求 19 或 20 所述的药物组合物，还包含一种或多种额外的其他治疗剂；所述额外的治疗剂包括：细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、抗血管生成剂、减瘤剂、化学治疗剂、放射性治疗剂、靶向性抗癌剂、生物反应修饰剂、癌症疫苗、细胞因子、激素、抗转移剂和免疫治疗剂。

22、药盒或试剂盒，其包括容器，以及位于容器中的权利要求 19-21 任一所述的药物组合物。

23、诱导表达 CLDN18.2 的细胞死亡的方法，包括使所述细胞与权利要求 19-21 任一的药物组合物接触。

24、如权利要求 23 所述的方法，所述细胞是癌细胞，优选实体瘤细胞；更优选地，所述细胞选自：胃癌细胞、食道癌细胞、肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾母细胞瘤细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、肝癌细胞、头颈癌细胞、慢性骨髓性白血病细胞和胆囊癌细胞。

25、治疗受试者中与表达 CLDN18.2 相关的疾病的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用权利要求 19-21 任一的药物组合物。

26、如权利要求 25 所述的方法，所述疾病是肿瘤；优选胃癌、食道癌、肠癌、胰腺癌、肾母瘤、肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、头颈癌、慢性骨髓性白血病或胆囊癌。

27、如权利要求 25 或 26 所述的方法，所述方法还包括向所述受试者给予额外的治疗剂。

28、如权利要求 27 所述的方法，额外的治疗剂包括化学治疗剂、细胞毒性剂、放射性治疗剂、癌症疫苗、减瘤剂、靶向性抗癌剂、抗血管生成剂、生物反应修饰剂、细胞因子、激素、抗转移剂和免疫治疗剂。