

抗Claudin18.2的抗体及其应用

5 技术领域

本发明属于免疫学领域，更具体地，本发明涉及抗Claudin18.2的抗体及其应用。

背景技术

密蛋白 18(Claudin 18, CLD18)是位于上皮和内皮的紧密连接中的内在膜蛋白，
10 分子量约为 27.9KD。GenBank 登记号为剪接变体 1(称为 CLD18A1、CLD18.1 或
Claudin 18.1): NP_057453、NM016369，以及剪接变体 2(称为 CLD18A2、CLD18.2
或 Claudin 18.2): NM_001002026、NP_001002026。CLD18A1 在正常肺中选择性表达，
而 CLD18A2 则在正常胃中表达，且表达局限于已分化的胃上皮短寿细胞中。但在多
种肿瘤细胞中，CLD18A2 呈现强烈表达。已发现，CLAUDIN18.2 在胃癌、食管癌、
15 胰腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、卵巢癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌、头颈
癌、和胆道系统肿瘤(如胆囊癌、胆管癌)及其转移癌中表达，胃癌转移例如库肯勃
瘤、腹膜转移和淋巴结转移。

CLDN18 为四次跨膜蛋白，有两个胞外段，称为环 1 和环 2。人
CLDN18A2(SEQ ID NO:2)与人 CLDN18A1(SEQ ID NO:1)高度同源，两者的同源性比
20 较结果如图 1 所示，仅在 N 端的第一个跨膜(TM)区和环 1 存在部分差异，而其余部
分的氨基酸序列相同。

发明内容

本发明利用 CLDN18A2 的 C 端多肽免疫小鼠，虽然该肽段在两个剪切变体中的
25 序列中完全相同，但是我们得到多个具有明显的组织特异性的抗体，可用于
CLDN18A2 阳性肿瘤的临床诊断。

在第一方面，本发明提供一种抗体或抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或抗
原结合片段能够识别包含 SEQ ID NO: 7(KNKKIYDGG)所示的序列的抗原肽；或者
所述抗体或抗原结合片段能够识别 claudin18.2 中包含 SEQ ID NO: 7 所示的序列的表
30 位。

在进一步优选的方案中，所述抗体或抗原结合片段能够识别包含 SEQ ID NO: 6(KNKKIYDGGART)所示的序列的肽；或者所述抗体或抗原结合片段能够识别 claudin18.2 中包含 SEQ ID NO: 6 所示的序列的表位。

在进一步优选的方案中，所述抗体或抗原结合片段能够识别包含 SEQ ID NO: 8(GFGSNTKNKKIYDGG)、9(SNTKNKKIYDGGART)或 10(KNKKIYDGGARTEDE)所示的序列的抗原肽；或者所述抗体或抗原结合片段能够识别 claudin18.2 中包含 SEQ ID NO: 8、9 或 10 所示的序列的表位；

优选的，所述抗体或抗原结合片段能够识别包含 SEQ ID NO: 9 或 10 所示的序列的抗原肽；或者所述抗体或抗原结合片段能够识别 claudin18.2 中包含 SEQ ID NO: 9 或 10 所示的序列的表位。

在进一步优选的方案中，所述抗体为由登记号为 CCTCCNO.C202007 或 CCTCCNO.C202008 的保藏的杂交瘤细胞株产生的抗体，其中 CCTCCNO.C202007 杂交瘤细胞株产生的抗体为抗体 9，CCTCCNO.C202008 杂交瘤细胞株产生的抗体为抗体 7。

在进一步优选的方案中，所述抗体或抗原结合片段是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化的抗体、或全人抗体。

在进一步优选的方案中，所述抗体或抗原结合片段是由登记号为 CCTCCNO.C202007（抗体 9）或 CCTCCNO.C202008（抗体 7）的保藏的杂交瘤细胞株产生的抗体的人源化抗体或嵌合抗体。

在进一步优选的方案中，所述抗体或抗原结合片段是由登记号为 CCTCCNO.C202007 或 CCTCCNO.C202008 的保藏的杂交瘤细胞株产生的抗体的突变体；其中 CCTCCNO.C202007 杂交瘤细胞株产生的抗体为抗体 9，CCTCCNO.C202008 杂交瘤细胞株产生的抗体为抗体 7

优选的，所述突变体与由登记号为 CCTCCNO.C202007 或 CCTCCNO.C202008 的保藏的杂交瘤细胞株产生的抗体具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%的同源性。

在进一步优选的方案中，所述抗体片段为由登记号为 CCTCCNO.C202007 或 CCTCCNO.C202008 的保藏的杂交瘤细胞株产生的抗体的抗体片段；

优选的，所述抗体片段是 scFv、Fab 片段，Fd 片段，Fv 片段，F(ab')₂ 片段、或单域抗体，

其中 CCTCCNO.C202007 杂交瘤细胞株产生的抗体为抗体 9, CCTCCNO.C202008 杂交瘤细胞株产生的抗体为抗体 7。

在进一步优选的方案中, 所述抗体或抗原结合片段与表达 claudin18.2 的细胞相结合; 优选的, 所述 claudin18.2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, SEQ ID NO:

5 2 为:

MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRS
CVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSME
DSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQT
VQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSV
10 AYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV。

在进一步优选的方案中, 所述抗体或抗原结合片段特异性结合胃组织;

优选的, 所述抗体或抗原结合片段特异性结合胃组织, 不结合肺组织。

在本发明的第二方面, 提供一种缀合物, 其特征在于, 所述缀合物包含权利要求 1-9 任一项所述的抗体或抗原结合片段, 以及至少一个可检测标记物;

15 优选的, 所述的可检测标记物为荧光标记物、显色标记物、发光标记物、发色团标记物、放射性同位素标记物、同位素标记物、同量异位素标记物(isobaric label)、酶标记物、颗粒标记物、通过使用结合剂检测的核酸或蛋白。

在本发明的第三方面, 提供一种杂交瘤, 其能够产生上述本发明的抗体。

在进一步优选的方案中, 所述杂交瘤的保藏登记号为 CCTCCNO.C202007 或
20 CCTCCNO.C202008。

在本发明的第四方面, 提供一种检测待测样品 claudin18.2 表达情况的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 使待测样品与上述本发明的任一所述的抗体或抗原结合片段, 或者与上述本发明所述的缀合物相接触; 检测所述抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物与 claudin18.2 形成的复合物的情况。

25 在本发明的第四方面, 提供一种用于诊断、检测或监测癌症的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

将待检测样品与上述本发明所述的抗体或抗原结合片段, 或者与上述本发明所述的缀合物相接触; 检测所述抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物与 claudin18.2 形成的复合物的量。

在本发明的第四方面，提供一种用于分析肿瘤是否能够通过靶向 claudin18.2 的肿瘤疗法来治疗的方法，其特征在于，所述方法包括：

(i)使包含肿瘤细胞的样品与上述本发明所述的抗体或抗原结合片段，或者与上述本发明所述的缀合物相接触；

5 (ii) 检测所述抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物与 claudin18.2 形成的复合物的量；

优选的，所述肿瘤细胞为胃癌细胞、食管癌细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、头颈癌细胞、或胆道系统肿瘤细胞（如胆囊癌、胆管癌细胞）；

10 更优选的，所述肿瘤细胞为胃癌细胞、食管癌细胞、胰腺癌细胞、或胆道系统肿瘤细胞。

在本发明的第五方面，提供一种检测试剂盒，其包含上述本发明所述的抗体或抗原结合片段，或者与上述本发明所述的缀合物。

在进一步优选的方案中，其中所述 claudin18.2 包含序列表的 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其变体。

在本发明的第六方面，提供一种产生靶向 claudin18.2 的单克隆抗体的方法，其特征在于，所述方法包括采用含有 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 所示的序列的多肽为免疫原，或者用与 SEQ ID NO: 6、7、8、9 或 10 所示的序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%同源性的多肽为免疫原，对动物进行免疫后，取动物的 B 细胞与骨髓瘤细胞进行融合，得到杂交瘤细胞，以产生单克隆抗体；

优选的，所述动物为鼠；

优选的，所述 B 细胞来源于脾细胞。

在进一步优选的方案中，还包括从所述杂交瘤细胞中分离所述单克隆抗体。

25 在进一步优选的方案中，用 SEQ ID NO: 3(MMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV)所示的多肽为免疫原。

在进一步优选的方案中，其中所述单克隆抗体特异性结合所述抗原。

在进一步优选的方案中，还包括产生保留与所述抗原特异性结合的所述单克隆抗体的修饰形式。

在进一步优选的方案中，其中所述单克隆抗体的修饰形式是人源化抗体。

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。

5

附图说明

- 图1: Claudin18.2和Claudin 18.1的序列同源性比较结果;
- 图2A: 抗体与293T-Claudin18.1细胞裂解物结合的Western Blot鉴定结果;
- 图2B: 抗体与293T-Claudin18.2细胞裂解物结合的Western Blot鉴定结果;
- 图3: 抗体7和抗体9对胃癌样本F163060A1的染色结果;
- 图4: 抗体7和抗体9对胃癌样本2018-50829E的染色结果;
- 图5: 抗体7和抗体9对肺癌样本2018-55164F的染色结果;
- 图6: 显示表位ELISA分析结果。

10

15 具体实施方式

以下具体说明详尽地展示了本文所公开的实施方案。应当理解，本说明书并非旨在仅限于此处所公开的具体的实施方案，而是可以发生改变。本领域技术人员将理解，本说明书中所公开的内容可以有多种改变或变化，而均涵盖于所公开的范围和原则之内。除非另有说明，每个实施方案均可与任何其他实施方案任意组合。

20

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。例如，从1至6的范围的描述应当被认为具体公开了从1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等的子范围，以及在这些范围内的具体的数值点，例如1、2、3、4、5、6。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。

25

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± 20 %、或在某些情况下±10%、或在某些情况下±5%、或在某些情况下±1%、或在某些情况下± 0.1%的变化。

30

术语“抗体”在本文中包括完整的抗体和抗原结合片段。天然存在的“抗体”是包含通过二硫键链间连接的至少 2 个重(H) 链和 2 个轻(L)链的糖蛋白。每一条重链由重链可变区(在本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每一条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。

5 轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可被进一步细分为称为互补决定区(CDR)的具有高可变性的区域，其间隔以更保守的称为框架区(FR)的区域。每一个 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体可来自不同物种，包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠
10 和人。抗体还包括嵌合抗体，具有来自一个物种(优选人)的抗体恒定区与来自另一物种的抗原结合位点。抗体还包括人源化的抗体，具有来自非人物种的抗体的抗原结合位点与人来源的恒定区和构架区。本文所述的抗体可以是单克隆抗体，即具有单分子组成的抗体分子制备物。用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的系统优选小鼠系统。分离用于融合的免疫化的脾细胞的免疫操作和技术为本领域所已知。小鼠骨髓瘤细胞和
15 小鼠脾细胞融合方案也是已知的。用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的其他系统优选大鼠和兔系统(例如 Spieker-Polet 等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92: 9348(1995)所述。本文所述的抗体可以是重组抗体，即通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有抗体，例如(a)从免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤分离的抗体，(b)从经转化以表达所述抗体的宿主细胞(例如转染瘤)分离的抗体，
20 (c)从重组的组合抗体文库分离的抗体，和(d)通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接成其他 DNA 序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。抗体可通过多种技术产生，例如 Kohler 等，Nature 256: 495(1975)的杂交瘤技术，也可以采用其他产生单克隆抗体的技术，例如噬菌体展示技术。

使用来自杂交瘤的重链和轻链转录本的核苷酸序列来设计合成寡核苷酸的重叠
25 组，以产生与天然序列的氨基酸编码能力相同的合成 V 序列。合成的重链和 κ 链序列可以以三种方式不同于天然序列：中断了重复的核苷酸碱基串，以便于寡核苷酸合成和 PCR 扩增；根据 Kozak 规则掺入了最佳翻译起始位点(Kozak, 1991, J.Biol.Chem.266: 19867-19870)；以及翻译起始位点上游的经改造 HindIII 位点。

对于重链和轻链可变区而言，经优化的编码链及相应非编码链的序列在相应非
30 编码寡核苷酸的约中点处打断成 30-50 个核苷酸。因此，对于每条链，可将所述寡核

核苷酸装配成跨越 150-400 个核苷酸的区段的重叠双链组。接着将该库用作模板产生 150-400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。通常将单个可变区寡核苷酸组分为两个库，将它们各自扩增以产生两个重叠的 PCR 产物。接着通过 PCR 扩增来组合这些重叠产物，以形成完整的可变区。在 PCR 扩增中还可能包括重链或轻链恒定区的重叠片段，以产生易克隆进表达载体的构建体片段。接着将重建的嵌合或人源化重链及轻链可变区与克隆的启动子序列、前导序列、翻译起始序列、恒定区序列、3'非翻译序列、多聚腺苷酸化序列和转录终止序列组合，以形成表达载体构建体。可将重链及轻链表达构建体组合进单个载体，共转染、连续转染或分别转染进宿主细胞中，接着将其融合形成表达这两种链的宿主细胞。构建人 IgGκ 表达载体的质粒使得 PCR 扩增的 V 重链及 Vκ 轻链 cDNA 序列可用于重建完整的重链及轻链小基因(minigene)。这些质粒可用于表达全人抗体或者嵌合 IgG1κ 或 IgG4κ 抗体。可以构建类似的质粒用于表达其他重链同种型，或者表达包含 λ 轻链的抗体。

术语“抗原结合片段”指抗体中保留特异性抗原结合能力的一个或更多个片段，所涵盖的结合片段的包括(i)Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH 结构域组成的一价片段；(ii)F(ab')₂ 片段，包含通过铰链区处的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii)由 VH 和 CH 结构域组成的 Fd 片段；(iv)由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；(v)由 VH 结构域组成的单域抗体片段；(vi)分离的互补决定区(CDR)，和(vii)可任选地通过合成接头连接的两个或更多个分离的 CDR 的组合。还包括用重组方法将 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 通过合成接头连接在一起，形成为单链抗体（或称单链 Fv(scFv)）。

本发明的抗体或抗原结合片段与靶抗原 Claudin18.2 的结合可通过本领域已知的任何方法表征或表达，例如，结合可以通过结合亲和力来表征。结合亲和力可以通过本领域已知的任何方法测定，例如 ELISA、Western 印迹、免疫荧光和流式细胞术分析。流式细胞术可证明经免疫接种小鼠的血清中存在抗体或者证明单克隆抗体结合活细胞。将天然表达或在转染后表达抗原的细胞系以及缺乏抗原表达的阴性对照(在标准生长条件下生长)与杂交瘤上清液中含 1%FBS 的 PBS 中多种浓度的单克隆抗体混合，4℃下孵育 30 分钟。洗涤后，在与第一抗体染色相同的条件下使 APC 或 Alexa647 标记的抗 IgG 抗体与结合了抗原的单克隆抗体结合。用 FACS 仪器分析样品，其中使用光散射和侧散射特性对单个活细胞设置门控(gate)。使用共转染法可以在单个测量中区分抗原特异性单克隆抗体与非特异性结合物。按照上述对用编码抗原和荧光标记

物的质粒瞬时转染的细胞进行染色。可在与抗体染色细胞不同的荧光通道中检测到经转染的细胞。由于大部分转染细胞同时表达两种转基因，因此抗原特异性单克隆抗体优先与表达荧光标记的细胞结合，非特异性抗体以相当的比率与未转染细胞结合。可以完全如上所述对细胞进行染色，也可以通过荧光显微术来检查细胞。

- 5 当使用表达 Claudin18.2 的细胞的体外结合测定中测定时，可以确定本文公开的抗原结合部分的结合亲和力。受试抗原结合部分的结合亲和力可以用 K_d 表示， K_d 是抗体与其各自抗原之间的平衡解离常数。

- 在一些实施例中，针对 CLAUDIN18.2 的人单克隆抗体可使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠来产生，这些转基因和转染色体小鼠包括
10 分别称为 HuMAb 小鼠和 KM 小鼠的小鼠。在一些实施例中，用来自 CLAUDIN18.2 序列的载体缀合肽、重组表达的 CLAUDIN18.2 抗原或其片段的富集制备物和/或表达 CLAUDIN18.2 或其片段的细胞来免疫接种小鼠。也可以用编码全长人 CLAUDIN18.2 或其片段的 DNA 免疫接种小鼠。当使用纯化或富集的 CLAUDIN18.2 抗原制备物进行免疫接种而未产生抗体时，可以用表达 CLAUDIN18.2 的细胞(例如细胞系)免疫接
15 种小鼠，以促进免疫应答。可以用由尾静脉或眶后取血获得的血浆和血清样品在免疫全程中监测免疫应答。可将效价足够的抗 CLAUDIN18.2 免疫球蛋白小鼠用于融合。可在小鼠处死并摘除脾之前 3 至 5 天用表达 CLAUDIN18.2 的细胞进行腹腔内或静脉来加强免疫，以提高分泌特异性抗体的杂交瘤的比率。在一些实施例中，为了制备 CLAUDIN18.2 单克隆抗体的杂交瘤，可从免疫接种小鼠的淋巴结、脾或骨髓分离细
20 胞，并与适当的无限增殖细胞系(如小鼠骨髓瘤细胞系)融合，然后筛选针对抗原的特异性抗体来得到杂交瘤。接着通过 ELISA 筛选分泌抗体的杂交瘤。通过免疫荧光或 FACS 分析，鉴定出特异性结合 CLAUDIN18.2 的抗体。可将分泌该抗体的杂交瘤重新铺板，再次筛选，如果抗 CLAUDIN18.2 单克隆抗体仍为阳性则可以通过有限稀释进行亚克隆。体外培养稳定的亚克隆，以在组织培养基中产生抗体用于表征。在一些
25 实施例中，抗体在宿主细胞转染瘤中产生，例如使用本领域公知的重组 DNA 技术与基因转染方法的组合来进行(Morrison, S.(1985)Science 229: 1202)。

- 在一些实施例中，可将目的基因(如抗体基因)连接进表达载体(例如真核表达质粒)中。可将带有所克隆抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞中，例如 CHO 细胞、NS/O 细胞、HEK293T 细胞或 HEK293 细胞，或者其他真核细胞，例如来自植物的细
30 胞、真菌或酵母细胞。用于引入这些基因的方法可以是本领域已描述过的方法，例如

电穿孔、lipofectine、lipofectamine 或其他。将这些抗体基因引入宿主细胞后，可以鉴定并选择表达该抗体的细胞。重组抗体可从这些培养物上清液和/或细胞中分离和纯化。抗体基因也可以在其他表达系统中表达，包括原核细胞例如微生物，例如大肠杆菌(E.coli)。此外，抗体也可以在非人转基因动物中产生，例如在绵羊和兔的乳汁中或在鸡蛋中产生，或者在转基因植物中产生，参阅例如 Verma, R., 等 (1998)J.Immunol.Meth.216: 165-181; Pollock, 等(1999)J.Immunol.Meth.231: 147-157 以及 Fischer, R., 等(1999)Biol.Chem.380: 825-839。

本文所用的“抗原”指包含表位，并且针对所述表位可引起和/或产生免疫应答的物质。抗原可以包括肽、蛋白质、糖蛋白、多糖和脂质，其部分及其组合。非限制性示例性抗原包括肿瘤抗原或病原体抗原。“抗原”也可以指引发免疫反应的分子。这种免疫反应可能涉及抗体产生或特定免疫活性细胞的活化，或两者兼有。本领域技术人员将理解，任何大分子，包括实际上所有的蛋白质或肽，都可以作为抗原。

术语“表位”指分子中的抗原决定簇，即分子中被免疫系统识别(例如被抗体识别)的部分。

密蛋白是紧密连接中最重要组分的一个蛋白质家族，在紧密连接中，密蛋白构成了细胞旁屏障，控制着上皮细胞之间的细胞间隙中的分子流动。密蛋白是四次跨膜的跨膜蛋白，其 N 端和 C 端均位于细胞质中。在一些实施方案中，术语“密蛋白 18”或“CLDN18”或“Claudin 18”或“CLD18”是指人 CLDN18 并且包括任何剪接变体，例如 CLDN18 的 Claudin18.1 和 Claudin 18.2。在一些实施方案中，Claudin 18.1 是具有 GenBank 登记号 NP_057453 的肽 (mRNA: NM_016369)。在一些实施方案中，所述 Claudin 18.1 是包含 SEQ ID NO:

1(MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLRSCV
RQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDS
AKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQ
TRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAY
KPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV)的氨基酸序列的肽或
所述氨基酸序列变体的蛋白质/肽。所述 Claudin 18.2 是具有 GenBank 登记号
NP_001002026 的肽 (mRNA: NM_001002026)。在一些实施方案中，所述 claudin18.2
是包含 SEQ ID

NO:2(MAVTACQGLGFVVSLIGIAGHIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWR
SCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSM

EDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQ
TVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSV
AYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV)的氨基酸序列的

- 肽或所述氨基酸序列变体的蛋白质/肽。术语“变体”是指突变体、剪接变体、构象、
5 同种型、等位基因变体、种变体(species variant)和种同源物(species homolog),特别是天然存在的变体。等位基因变体涉及基因正常序列中的改变,其显著性通常不明显。全基因组测序通常鉴定出给定基因的大量等位基因变体。种间同源物是与给定核酸或氨基酸序列具有不同物种起源的核酸或氨基酸序列。术语“CLDN”、“CLDN18”、“Claudin18.1”和“Claudin 18.2”应涵盖任何翻译后修饰的变体和构象变体。Claudin18.1
10 和 Claudin 18.2 在包含第一个跨膜(TM)区和环 1 的 N 端部分存在差异,而 C 端的蛋白质一级序列相同。

- CLAUDIN18.2 在正常胃粘膜上皮细胞中选择性表达。CLAUDIN18.2 表达仅局限于已分化的胃上皮短寿细胞,在多种肿瘤细胞中表达。在一些实施例中,原发性肿瘤是指胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌例如非小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈
15 癌和胆道系统癌症等。在一些实施例中,表达 CLAUDIN18.2 的细胞是指肿瘤细胞,并且特别地选自胃癌细胞、食管癌细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、头颈癌细胞、和胆道系统癌症细胞。在一些实施例中,表达 CLAUDIN18.2 的细胞是指 CLAUDIN18.2 位于或结合于细胞膜的细胞。

- 免疫组化(IHC)是检测组织切片的细胞中的抗原(例如,蛋白质)的方法,广泛用于
20 于检测异常细胞,例如肿瘤细胞。所用的检测抗体可结合酶,例如可催化产生颜色反应的过氧化物酶。也可以用荧光基团标记检测抗体,例如荧光素或罗丹明。在本发明中,用免疫组化测定细胞中 CLAUDIN18.2 表达。使用取自肿瘤患者常规手术中的非癌组织或癌组织样品的多聚甲醛或丙酮固定冷冻切片或多聚甲醛固定的石蜡包埋组织切片,或者切片取自表达 CLAUDIN18.2 的异种移植瘤小鼠。所述切片先与
25 CLAUDIN18.2 抗体进行孵育,再与缀合了辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠或山羊抗兔抗体孵育,来进行免疫染色。在这个检测中,样品的制备对于维持细胞形态、组织结构和靶抗原表位的抗原性是至关重要的。通常使用多聚甲醛来固定组织。根据实验目的和实验样品的厚度,从固定后的组织切取薄(约 4 至 40 μ m)的切片,或者如果组织不是非常厚并且可穿透,则可整体使用。通常通过使用显微切片机切片,并且将切片
30 封片于载片上。样品可能需要优化处理,包括脱石蜡化和抗原修复。通常,在免疫组

化中使用去污剂(例如 Triton X-100)来降低表面张力, 相关试剂可更好且更均匀的覆盖样品。免疫组化染色可使用一种直接与所染抗原相结合标记抗体。免疫组化染色更常用的是间接方法, 使用针对待检测抗原的抗体和针对第一抗体的第二标记抗体。用封闭缓冲液(例如, 正常血清、非脂奶粉、BSA 或明胶以及市售封闭缓冲剂)孵育样品, 封闭反应位点以减少 IHC 中的背景染色。第一抗体针对靶抗原并且通常未标记的, 第二抗体针对第一抗体的免疫球蛋白。第二抗体通常与接头分子(例如, 生物素)相结合, 其然后募集报告分子, 或者第二抗体直接与报告分子本身相结合。最常用的检测方法分别是用酶介导的呈色检测和荧光团介导的荧光检测。酶标记物与底物反应产生可以用普通光学显微镜进行分析的强烈着色的产物。碱性磷酸酶(AP)和辣根过氧化物酶(HRP)是最广泛地用作蛋白质检测标记物的两种酶。多种呈色底物、荧光底物和化学致发光底物可与酶一起使用, 包括 DAB 或 BCIP/NBT。荧光报告分子是用于 IHC 检测的小的有机分子。对于生色和荧光检测方法, 信号的光密度分析可分别提供半定量和全定量数据, 将报告分子信号的水平与蛋白表达水平或定位水平相关联。在对靶抗原进行免疫组化染色后, 通常进行第二染色(例如, 苏木精、Hoechst 染色剂和 DAPI)以提供帮助凸显第一染色的反差。

本发明提供用于检测样品中 CLAUDIN18.2 抗原的存在或者测量样品中 CLAUDIN18.2 抗原量的方法, 在抗体与 CLAUDIN18.2 抗原形成复合物时, 使所述样品(或对照样品)与结合 CLAUDIN18.2 抗原的本发明抗体相接触。随后检测复合物的形成, 通过对比样品中形成的复合物与对照品中形成复合物的差异来判断所述样品中是否存在 CLAUDIN18.2 抗原。本发明的检测方法可特别地用于诊断 CLAUDIN18.2 相关疾病, 例如肿瘤。在一些实施例中, 样品中 CLAUDIN18.2 抗原的量高于参照或对照样品中 CLAUDIN18.2 抗原的量指示所述样品来源的个体(特别是人)患有 CLAUDIN18.2 相关疾病, 例如肿瘤。在一些实施例中, 所述测量样品是细胞样品, 例如包含细胞(如肿瘤细胞)的样品。所述复合物是由本发明的抗体、抗原结合片段或缀合物与上述样品中的细胞所表达的 CLAUDIN18.2 之间形成的。

本发明中“参照”(例如参照样品或参照生物体)可用于与通过本发明方法获得的来自受试样品或受试生物体的结果进行关联和比较。所述参照生物体一般是健康生物体, 尤其是未患有疾病(例如, 肿瘤)的生物体。“参照值”或“参照水平”可通过测量足够大量的参照物而根据参照物来经验性地确定。优选地, 通过测量至少 2 个、优选至

少 3 个、优选至少 5 个、优选至少 8 个、优选至少 12 个、优选至少 20 个、优选至少 30 个、优选至少 50 个或优选至少 100 个参照物来确定参照值。

术语“核酸”，是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)，包括基因组DNA、cDNA、mRNA、重组制备的或化学合成的分子。核酸可以是单链或双链分子形式，
5 也可以是线性的或者共价闭合成环。RNA包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA(例如，部分纯化的RNA)、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA以及通过添加、缺失、替换和/或改变一个或更多个核苷酸而不同于天然RNA的经改变RNA。RNA可通过稳定化序列、加帽和多聚腺苷酸化来修饰。术语“转录”是指其中将DNA序列中的遗传密码转录成RNA的过程。“核酸分子编码”、“编码DNA序列”和“编码DNA”是指
10 沿着脱氧核糖核酸链的脱氧核糖核苷酸的顺序或顺序。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。术语“同源”指核酸功能性地天然连接，而术语“异源”指所述核酸不是功能性地天然连接。在一些实施例中，核酸可以与同源或异源的表达控制序列功能性连接。

术语“表达”，包括生成RNA或者RNA和蛋白质/肽。就RNA而言，术语“表达”
15 或“翻译”特别指产生肽或蛋白质。表达可以是瞬时的或稳定的。表达还包括异常表达或不正常表达，即与参照相比(例如未患有与某些蛋白质(例如，肿瘤相关抗原)的异常表达或不正常表达相关的疾病之个体)，表达改变(比如，升高)。表达的升高指升高至少 10%，特别是至少 20%，至少 50%或至少 100%或者更多。在一个实施方案中，表达仅见于患病的组织，而健康组织中的表达被抑制。特异性表达是指蛋白质基本上
20 只在特定组织或器官中表达。例如，特异性地在胃粘膜中表达的肿瘤相关抗原，指所述蛋白质主要在胃粘膜中表达而在其他组织中不表达或者在其他组织或器官类型中不显著表达。在一些实施方案中，肿瘤相关抗原在多于一种正常组织类型或器官中(例如，在不多于 3 种不同的组织或器官类型中)特异性表达，那么可以认为肿瘤相关抗原在这些器官中特异性表达。

25 如本文所用，术语“分离的”是指与细胞成分或其他成分相分离，在这些成分中，多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在自然状态通常是相关联的。非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”以将其与天然存在的对应物区分开。分离的核酸指该核酸是(i)在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应(PCR)扩增，(ii)通过克隆重组产生的，(iii)纯化的，例如通过切割和凝胶电泳分级纯化的，或者(iv)合成的，例如通过化学合成。分离的核酸是可通过重组DNA技术操作
30

的核酸。分离的蛋白质或分离的肽是指从其天然环境中被分离出来的蛋白质或肽，基本上不含与其在自然界中或在体内相结合的其它物质。此外，“浓缩”、“分离”或“稀释”的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段可与其天然存在的对应物区分开，因为每体积分子的浓度或数量大于（“浓缩”）或小于（“稀释”）其天然存在的配对物的浓度。在5 一些实施方案中，本发明的技术方案优选的富集程度更高。因此，例如，优选 2 倍富集、更优选 10 倍富集、更优选 100 倍富集、更优选 1000 倍富集。也可以通过人工组装的方法，例如通过化学合成或重组表达，从而提供“分离的”物质。

术语“变体”，包括突变体、剪接变体、构象、同种型、等位基因变体、种变体和种同源物，特别是天然存在。等位基因变体指基因正常序列中的改变，其显著性通常不明显。全基因测序通常鉴定出指定基因的大量等位基因变体。种间同源物是指有10 不同物种来源的指定核酸或氨基酸序列。

术语“氨基酸修饰”（或修饰的氨基酸、氨基酸序列的变体）包括对特定氨基酸序列的氨基酸取代、插入和/或缺失，产生与所述特定序列功能相当的序列。在一些实施例中，氨基酸修饰后的抗体仍与其靶抗原结合。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。15 优选地，修饰抗体的 CDR 序列、高变区和可变区的序列而不丧失结合靶抗原的能力。本领域技术人员可通过重组 RNA 操作容易地制备氨基酸变体。例如，Sambrook 等(1989)中详细描述了用于制备具有替换、添加、插入或缺失的蛋白质和肽的 DNA 序列操作。此外，本文所述的肽和氨基酸变体可以借助于已知的肽合成技术(例如，固相合成和类似方法)容易地制备。例如仅替换 1 至 5、1 至 4、1 至 3、或 1 或 2 被认为是高度同源。在蛋白质的 N 端和/或 C 端包含缺失的氨基酸缺失变体称为 N 端和/或 C 端截短变体。氨基酸添加变体包含氨基和/或羧基端融合一个或更多个氨基酸，例如 1、2、3、5、10、20、30、50 或更多个氨基酸。氨基酸缺失变体是从序列中除去一个或更多个氨基酸(例如，除去 1、2、3、5、10、20、30、50 或更多个氨基酸)。氨基酸替换变25 体是序列中至少一个氨基酸残基被除去并在其位置中插入另一个氨基酸残基。在一个实施例中，将同源的蛋白质或肽之间非保守的氨基酸残基进行修饰和/或置换为相似特性的氨基酸残基。优选地，氨基酸序列与其氨基酸序列变体的氨基酸序列之间的相似度同一性，优选为至少约 60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%。30 优选地相似度或同一性针对的氨基酸区域为参照氨基酸序列全长

的至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90% 或约 100%。例如，如果参照氨基酸序列由 200 个氨基酸组成，优选地针对至少约 20、至少约 40、至少约 60、至少约 80、至少约 100、至少约 120、至少约 140、至少约 160、至少约 180 或约 200 个氨基酸给出相似性或同一性，优选连续的氨基酸。在一些优选的实施方案中，针对全长的参照氨基酸序列给出相似性或同一性。可用本领域已知的工具进行用于确定序列相似性(优选序列同一性)的比对，优选使用最佳序列比对，例如使用 Align，采用标准设置，优选 EMBOSS: needle; Matrix: Blosum62; Gap Open 10.0; Gap Extend 0.5。序列相似性指相同或表示保守性氨基酸替换的氨基酸的百分比。两条氨基酸序列的同一性指两条序列间相同的氨基酸的百分比，这一百分比完全是统计学意义上的，且两序列之间的差异随机分布在其全长上。序列比对可通过以下方式: Smith 和 Waterman, 1981, *Ads App.Math.*2, 482 的局部同源性算法, Needleman 和 Wunsch, 1970, *J.Mol.Biol.*48, 443 的局部同源性算法, Pearson 和 Lipman, 1988, *Proc.Natl Acad.Sci.USA* 85, 2444 的相似性检索法或者使用这些算法的计算机程序(在 Wisconsin Genetics 软件包中的 GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575ScienceDrive, Madison, Wis.)。

术语“肽”包括寡肽和多肽，指包含通过肽键共价连接的两个或更多个、优选 3 个或更多个、优选 4 个或更多个、优选 6 个或更多个、优选 8 个或更多个、优选 9 个或更多个、优选 10 个或更多个、优选 13 个或更多个、优选 16 个或更多个、优选 21 个或更多个以及高达优选 8、10、20、30、40 或 50 个(尤其是 100 个)氨基酸的物质。术语“蛋白质”指大的肽，优选指具有超过 100 个氨基酸残基的肽，一般来说，术语“肽”和“蛋白质”是同义词，并可在本文中可互换使用。

蛋白质和肽的“衍生物”为蛋白质和肽的经修饰形式。这样的修饰包括任何化学修饰并且包括与蛋白质或肽相关的任何分子(例如碳水化合物、脂质和/或蛋白质或肽)的单个或多个替换、缺失和/或添加。蛋白质或肽的“衍生物”包括经糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、棕榈酰化、豆蔻酰化、异戊二烯化、脂化、烷化、衍生化、引入保护/封闭基团、蛋白质水解切割或与抗体或者其他细胞配体相结合的经修饰的类似物及全部功能性化学等同物。在一些实施例，经修饰的肽的稳定性和/或免疫原性得到提高。

术语“细胞”指具有完整膜的尚未释放其正常的细胞内组分(例如，酶、细胞器或

遗传物质)的细胞,优选地是有活力的细胞(viable cell),即能够进行其正常代谢功能的活细胞(living cell)。包括原核细胞(例如,大肠杆菌(E.coli))或真核细胞(例如,树突细胞、B细胞、CHO细胞、COS细胞、K562细胞、HEK293细胞、HELA细胞、酵母细胞和昆虫细胞)。优选为哺乳动物的细胞,例如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊和灵长类的细胞。所述细胞可以源自大量组织类型,并且包括原代细胞和细胞系。在一些实施例中,细胞包括非癌细胞和癌细胞。靶细胞是指作为免疫应答靶向的细胞,例如本专利所述的肿瘤细胞。在一些实施例中,靶细胞是表达CLAUDIN18.2的细胞。在一些实施例中,表达CLAUDIN18.2的细胞通常包括癌细胞。

本专利中试剂、组合物和方法可用于诊断个体是否患病。可被诊断的疾病涵盖所有表达CLAUDIN18.2的疾病,优选的,是指肿瘤,例如胃癌、胰腺癌、食道癌、卵巢癌、胆道系统癌等。

术语“疾病”指任何病理状态,包括肿瘤,特别是本文所述的那些类型的肿瘤。

术语“正常组织”或“正常条件”中所用的术语“正常”指健康组织或者健康个体中的条件,即,非病理条件,其中“健康”优选地意为非肿瘤的。

本文中“CLAUDIN18.2 相关的疾病”,是指与健康组织或器官相比,患病后的组织或器官中的细胞的CLAUDIN18.2的表达升高。所述升高指升高至少10%,特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或者甚至更高。在本发明中,CLAUDIN18.2相关的疾病包括肿瘤,特别是本文所述的那些类型的肿瘤。

在本文中,“降低”是指与之前检测时的细胞的CLAUDIN18.2的表达降低,降低至少5%或更高,10%或更高,20%或更高,更优选50%或更高并且最优选75%或更高的能力。术语“抑制”是指完全或基本完全的抑制,即降低至0或基本降低至0。

在本文中,术语“癌症”和“肿瘤”可互换,指其中细胞表现出不受控生长、和/或侵袭、和/或转移的疾病。例如白血病、黑色素瘤、淋巴瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾上腺癌、甲状腺癌、血液癌症、皮肤癌、脑癌、宫颈癌、肠癌、肝癌、结肠癌、胃癌、肠癌、头颈癌、胃肠癌、淋巴结癌、食管癌、结肠直肠癌、胰腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌和肺癌,及其转移。

术语“转移”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。在一个实施例中，转移是指远端转移，即远离原发肿瘤和/或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。

术语“再发”或“复发”，是指当个体再次被过去所患病症影响。例如，个体曾经患有某疾病，且已接受治疗痊愈，而再次发生所述疾病，则所述新发疾病可被认为是再发或复发。肿瘤的再发或复发，包括所述肿瘤发生在不同于原始肿瘤的部位以及发生在原始肿瘤的部位的情况。

术语“治疗”，是指向个体施用化合物或组合物以预防或消除疾病，包括降低个体中的疾病尺寸或疾病数目；阻滞或减缓个体中的疾病进程；抑制或减缓个体中新疾病的发展；降低目前患有或先前曾患有疾病的个体的症状和/或复发的频率或严重程度；和/或延长(即，提高)个体的寿命。在一些实施例中，疾病的治疗包括疾病或其症状的治愈、缩短持续时间、减轻、预防、减缓或抑制进展或恶化，或者预防或延缓发病。

在文本中，术语“对象”、“个体”、“生物体”或“患者”可互换，包括脊椎动物，优选哺乳动物。本发明中，哺乳动物是人、非人灵长类、家养动物(例如，犬、猫、绵羊、牛、山羊、猪、马等)、实验动物(例如，小鼠、大鼠、兔、豚鼠等)以及圈养的动物(例如，动物园的动物)。本文使用的术语“动物”还包括人。术语“对象”、“个体”包括患者，即，患病的动物，优选人。。

术语“样品”可以是根据本发明可用的任何样品，包括生物样品，例如组织样品(包括体液)和/或细胞样品，可以以常规方式获得，例如通过手术或组织活检(包括钻孔活检)和通过采集血液、支气管抽出物、痰、尿、排泄物或其他体液。根据本发明，术语“样品”还包括经加工的样品，例如生物样品或分离物，例如核酸和肽/蛋白质分离物以及福尔马林处理石蜡包埋组织等。优选地，样品包含待检测(例如，待进行癌症诊断)器官的细胞或组织。例如，如果待诊断癌症为肺癌，则样品可包含从肺获得的细胞或组织。样品可以是来自含有肿瘤细胞或癌细胞或者怀疑含有肿瘤细胞或癌细胞的患者的组织样品，包括血液、体液、原发肿瘤或从肿瘤转移获得的组织样品、或者任何其他包含肿瘤细胞或癌细胞的样品。

在一个方面，本发明提供了能够识别包含 SEQ ID NO: 7(KNKKIYDGG)所示的序列的抗原肽的抗体或抗原结合片段；还能够识别 claudin18.2 中包含 SEQ ID NO: 7 所示的序列的表位的抗体或抗原结合片段。

5 在一个方面，本发明提供了能够识别包含 SEQ ID NO: 6(KNKKIYDGGART)所示的序列的抗原肽的抗体或抗原结合片段；还能够识别 claudin18.2 中包含 SEQ ID NO: 6 所示的序列的表位的抗体或抗原结合片段。

在一个方面，本发明提供了由登记号为 CCTCCNO.C202007 或 CCTCCNO.C202008 的保藏的杂交瘤细胞株（也称为杂交瘤细胞株 9G5）产生的抗体。其中，CCTCCNO.C202007 保藏的杂交瘤细胞株（也称为杂交瘤细胞株 14F8）产生的
10 抗体称为抗体 9，CCTCCNO.C202008 保藏的杂交瘤细胞株产生的抗体称为抗体 7，保藏日期均为：2020 年 1 月 3 日，保藏地点为中国典型培养物保藏中心，地址为中国武汉，武汉大学，邮编 430072。

在一个方面，本发明提供了组合物(例如，诊断组合物)或检测试剂盒，其包含本文所述的抗体或抗原结合片段，或者抗体和/或抗原结合片段的组合。该诊断组合物
15 或检测试剂盒可用于本发明的方法，例如本发明的用于诊断、检测或监测的方法。这些试剂盒可任选地包含可检测标记物，例如指示酶、放射性标记物、荧光团或顺磁性颗粒。所述试剂盒可包含信息手册，例如，用于说明如何使用试剂来实施本文所公开的方法的手册。

当用于上文所述的方法中时，可为本文所述的抗体提供发挥以下功能的标记物：
20 (i)提供可检测信号；(ii)与第二标记物相互作用以修饰所述第一或第二标记物所提供的可检测信号，例如FRET(荧光共振能量转移，Fluorescence Resonance Energy Transfer)；(iii)通过电荷、疏水性、形状或其他物理参数影响迁移率(例如，电泳迁移率)，或者(iv)提供捕获部分，例如亲和力和、抗体/抗原或离子络合。

适合作为标记物的为以下结构：例如荧光标记物、发光标记物、发色团标记物、
25 放射性同位素标记物、同位素标记物，优选稳定的同位素标记物、同量异位素标记物(isobaric label)、酶标记物、颗粒标记物(特别是金属颗粒标记物、磁性颗粒标记物、聚合物颗粒标记物)、小有机分子(例如，生物素、受体的配体或结合分子(例如，细胞黏附蛋白或凝集素))、可通过使用结合剂检测的包含核酸和/或氨基酸残基的标记物序列等。标记物非限制性地包括硫酸钡、碘西他酸、碘番酸、胺碘苯丙酸钙(calcium
30 ipodate)、泛影酸钠、泛影葡胺、甲泛葡胺、酪酞酸钠和放射诊断剂(包括正电子发射

体, (例如氟-18和碳-11)、 γ 发射体(例如, 碘-123、钨-99m、碘-131和铟-111)、核磁共振核素(例如, 氟和钆))。

“处于风险”意为被鉴定为与一般人群相比具有高于疾病(如癌症)发生正常几率的对象(即患者)。此外, 已患有或目前患有疾病(特别是癌症)的对象是具有升高的疾病发生风险的对象, 因为该对象可能继续发生疾病。目前已患有或曾患有癌症的对象还具有升高的癌转移风险。

在本文中, 还涉及用于诊断、检测或监测癌症的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 将待检测样品与本发明的抗体或抗原结合片段, 或者缀合物相接触; 检测所述抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物与 claudin18.2 形成的复合物的量。可以使用该方法来检测对象是否患有肿瘤或者是否处于发生肿瘤的风险中, 或者是否患有癌疾病或是否处于发生癌疾病风险中。在一个实施例中, 所述测量样品是组织或细胞样品, 例如包含细胞(如肿瘤细胞)的样品。所述复合物是由本发明的抗体、抗原结合片段或缀合物与上述样品中的细胞所表达的 CLAUDIN18.2 之间形成的。

在本文所述的诊断、检测癌症的方法中, 使用本发明的抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物与取自受试者的细胞样品、正常样品(或对照样品)分别进行反应, 当与受试者的细胞样品反应得到的复合物的量显著高于与正常样品(或对照样品)反应得到的复合物的量时, 提示受试者可能罹患癌症。正常样品和显著升高的定义如上本文所述。

在本文所述的监测癌症的方法中, 针对受试者, 在两个相隔一段时间的两个时间点, 例如第一时间和第二时间, 分别检测来自受试者的第一样品(第一时间获取的)和第二样品(第二时间获取的)中的表达 claudin18.2 的细胞与所述抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物形成的复合物的量, 并通过两次检测的复合物的量之间的差异, 来评估受试者癌疾病的变化, 例如消退、发展等。

例如与第一时间获取的第一样品相比, 检测结果显示第二样品中形成的复合物明显减少, 则可以提示受试者的癌症或肿瘤的消退或患病风险降低。例如与第一时间获取的第一样品相比, 检测结果显示第二样品中形成的复合物明显升高, 则可以提示受试者的癌症或肿瘤的转移、复发或患病风险升高。

在本文中, 还涉及一种用于分析肿瘤是否能够通过靶向 claudin18.2 的肿瘤疗法来治疗的方法, 其特征在于, 所述方法包括: (i)使包含肿瘤细胞的样品与本文的抗体

或抗原结合片段，或者与本文的缀合物相接触；(ii) 检测所述抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物与 claudin18.2 形成的复合物的量。

其中，在一个具体的实施例中，所述肿瘤细胞为胃癌细胞、食管癌细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、头颈癌细胞、或胆道系统癌细胞；优选的，所述肿瘤细胞为胃癌细胞、食管癌细胞、胰腺癌细胞、或者胆道系统癌细胞。在一个实施例中，所述复合物是所述抗体、抗原结合片段或缀合物与来自受试者的样品中的癌细胞所表达的 claudin18.2 之间形成的。

在本文所述的分析方法中，针对同一受试者，在进行治疗之前和进行靶向治疗之后的两个时间点，例如第一时间（进行靶向治疗之前）和第二时间（进行靶向治疗之后），分别检测来自受试者的第一样品（第一时间获取的）和第二样品（第二时间获取的）中的表达 claudin18.2 的细胞与所述抗体或抗原结合片段、或者所述缀合物形成的复合物的量，并通过两次检测的复合物的量之间的差异，来评估受试者是否能够通过靶向 claudin18.2 的肿瘤疗法来治疗。

在一个方面，本发明提供了试剂盒，其包含本文所述的抗体或抗原结合片段或者抗体和/或抗原结合片段的组合。该试剂盒可用于本发明的方法，例如本发明的用于诊断、检测或监测的方法。这些试剂盒可任选地包含可检测标记物，例如指示酶、放射性标记物、荧光团或顺磁性颗粒。所述试剂盒可包含信息手册，例如，用于说明如何使用试剂来实施本文所公开的方法的手册。

20 实施例

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。

25 实施例1. 抗体的筛选

体外合成 Claudin18.2 C 端多肽（第 191 位甲硫氨酸-第 261 位缬氨酸，参见 SEQ ID NO:3）作为免疫原。

SEQ ID NO:3的序列如下所示：

MMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIY
30 DGGARTEDEVQSYPSKHDYV

其次选用6~8周龄的雌性Balb/C小鼠进行免疫：免疫原与弗氏佐剂或Gerbu MM佐剂按1:1混合，免疫剂量为(50-100 μ g)/只，经皮下或腹腔进行免疫，每隔一周或两周免疫一次，共免疫三次或四次。在脾切除术前两天，对小鼠进行加强免疫。分离免疫小鼠的脾细胞，与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0 (ATCC, CRL 1581)按照公开的标准方案进行融合 (Kohler、Milstein, 1975)。经HAT培养基筛选培养后，通过ELISA检测杂交瘤上清，一共得到139个阳性克隆，其中有11个强阳性克隆。

通过无血清培养的方法表达这11个候选抗体，并通过Protein G纯化制备这11个候选抗体用于后续检测分别命名为抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体10、抗体11。将所得的11个抗体进行Western Blot鉴定，检测与293T-Claudin18.2以及293T-Claudin18.1细胞裂解物的结合。Western步骤为：293T-claudin18.1、293T-claudin18.2细胞经RIPA裂解液（强）提取总蛋白（碧云天，P0013B），蛋白定量后以30 μ g/孔进行上样，在12%分离胶中以恒压跑胶，然后200mA恒流转膜1h，5%脱脂奶粉封闭然后顺序加入一抗（10 μ g/mL）Claudin18 Polyclonal Antibody 1:200稀释（Thermo Fisher, CAT 38-8000或者anti-flag-HRP 1:500稀释或者Anti-Claudin18.2 antibody [EPR19202-244] 1:200稀释（Abcam, ab222512）；二抗（羊抗鼠IgG-HRP 1:1000，羊抗兔IgG-HRP 1:1000）孵育，充分洗膜后在化学发光成像仪下进行显像并拍照。B-actin作为内参对照。检测结果如图2A和图2B显示。

根据检测结果，挑取7个候选抗体通过免疫组化的方式进行进一步的筛选。并且挑取抗体7和抗体9两株杂交瘤进行了菌种保藏。保藏信息为：两株杂交瘤细胞保藏于中国典型培养物保藏中心(中国武汉)命名和登记号如下：抗体7（也称为抗体9G5），保藏号：CCTCCNO.C202008，保藏日期：2020年1月3日。抗体9（也称为抗体14F8），保藏号：CCTCCNO.C202007，保藏日期：2020年1月3日。

实施例2.组织学分析

从这11株抗体中筛选出7株抗体（抗体5、抗体6、抗体9、抗体11、抗体4、抗体8和抗体7）通过免疫组化评价这些抗体与福尔马林固定的石蜡包埋组织(FFPE)中的其抗原的结合能力的组织特异性。

对照抗体 H-43-14A_2（在本文中也称 43-14A2）的序列来源于专利 CN104321345A，轻链可变区的序列如 SEQ ID NO：4
(divmtqaafsipvtlgtssasiscrsknllhdsdgitlywylqrpgqspqllirvsnlasgvpnrfsgsesgtdftlrisrveae

dvgvyycvqvlelpftfgggtkleikr) 所示, 重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 5 (iqlvqsgpelkkfgetvkisckasgytftdysihwvkqapgkglkwmgwintetgvptyaddfkgrfafsletsastaylq innlknedtatyfcarrtgfdywgqgttlvtss) 所示, 通过体外重组表达的方式制备了含有该抗体轻重链可变区的鼠单克隆抗体。对照抗体 EPR19202-244 自 Abcam。

5 免疫组化方法: 在福尔马林固定的石蜡包埋样品载片上进行免疫组化 (IHC)。在载片脱蜡后, 用3%过氧化氢室温孵育后置于煮沸的pH9.0的Tris缓冲液中用微波炉加热10min进行抗原修复, 然后用0.2 – 2 µg/mL的Claudin18.2抗体 (抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、和抗体11) 以及43-14A2在4℃孵育过夜。使用基于聚合物的抗体 (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, 10 Rabbit/Mouse) 和底物显色液 (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+) 用辣根过氧化物酶结合的第二抗体对抗体结合进行可视化。然后用苏木素复染, 再由评价者进行评价。

用抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、抗体11、和43-14A2对恒河猴 (恒河猴GenBank登记号XP_001114708.1, 与人CLDN18.2的序列 (NP_001002026.1) 15 同源性是98.85%) 的胃及肺组织切片进行染色, 对染色结果特异性进行评价; 用正常人组织芯片进行免疫组化染色, 确认抗体对正常人组织染色结果的特异性; 用人胃癌和肺癌切片进行免疫组化反应, 确认抗体对人肿瘤组织的特异性和灵敏度; 用人胃癌组织芯片进行免疫组化染色, 评价抗体的灵敏度。

组织学评价: 染色结果从染色强度和染色阳性肿瘤细胞%两个方面进行评价。 20 染色强度: 任何强度的细胞膜或细胞浆染色均认为阳性染色, 染色强度分为阴性 (-)、弱阳性 (1+)、阳性 (2+) 和强阳性 (3+)。

1. 抗体对恒河猴的胃及肺组织切片的染色 抗体对恒河猴胃及肺组织染色的结果如表1所示, 抗体4、抗体5、抗体6、抗体7、抗体8、抗体9、和抗体11对恒河猴胃黏膜上皮细胞有不同程度的染色, 染色强度从1+ 25 到3+不等, 个别抗体会产生非特异性染色/背景染色; 对恒河猴肺组织有阴性及阳性反应。抗体4、抗体5、抗体7、抗体8和抗体9对胃组织特异性染色, 且对肺组织没有染色; 而对照抗体43-14A2在肺组织有非特异性染色; 对照抗体EPR19202-244在说明书推荐的工作浓度0.37µg/mL下对胃组织特异性染色强度高, 且对肺组织没有染色。

表 1. Claudin18.2 抗体对恒河猴胃及肺组织染色

组	染色情况	抗体 (工作浓度为2µg/mL)	Abcam
---	------	------------------	-------

组织		抗体5	抗体6	抗体9	抗体11	抗体4	抗体8	抗体7	43-14A2	EPR19202-244
胃	特异性染色强度	1+	2+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	2+~3+
	非特异性/背景染色	无	有	无	有	无	无	无	无	无
肺	特异性染色强度	1+	1+	0	0	0	0	0	0	0
	非特异性/背景染色	无	有	无	有	无	无	无	有	无

2.抗体 9 对正常人组织的染色

抗体 9 在工作浓度 0.2μg/mL 下，与对照抗体 EPR19202-244 在工作浓度 0.37μg/mL 下，分别对来源于 7 例正常人的正常器官共计 24 种，每种 2—6 例，每例 5 1 点的组织芯片（上海芯超，芯片编号：HorgN090PT02）进行染色，抗体 9 仅在胃粘膜上皮细胞呈现阳性染色，其他组织均为阴性染色，但是 EPR19202-244 在骨骼肌和心肌组织呈现较明显的背景染色。6 例胃粘膜中的胃粘膜上皮细胞，抗体 9 和 EPR19202-244 均呈强阳性染色；EPR19202-244 抗体在 3 例心肌中的 1 例、7 例骨骼肌中的 1 例中有背景染色，而抗体 9 均为阴性染色。其余 4 例甲状腺、3 例舌、4 例食管上皮、2 例十二指肠粘膜、6 例空肠粘膜、3 例回肠粘膜、5 例阑尾、4 例结肠粘膜、2 例直肠粘膜、2 例肝脏、2 例胰腺、3 例气管、5 例肺、3 例皮肤、1 例精囊、3 例前列腺、7 例睾丸、4 例膀胱、1 例延脑、2 例端脑、2 例小脑、1 例脑干、2 例脾中，2 个抗体均呈阴性染色。

3.抗体对人胃癌/肺癌组织染色

抗体 7、抗体 9、对照抗体 43-14A2 在工作浓度 0.2μg/mL，与对照抗体 Abcam EPR19202-244 在说明书推荐工作浓度 0.37μg/mL 下对人胃癌或肺癌的组织样本进行染色，染色主要步骤为：将组织切片经过脱石蜡化和抗原修复，然后用 CLDN18A2 抗体孵育，接着用封闭缓冲液孵育样品，然后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗进行孵育，最后加入显色底物进行显色。

对胃癌样本 F163060A1（购自桂林泛谱）的染色结果如图 3 所示。对胃癌样本 2018-50829E（购自桂林泛谱）的染色结果如图 4 所示。对肺癌样本 2018-55164F（购自桂林泛谱）的染色结果如图 5 所示。染色的统计结果见表 2。

表 2. Claudin18.2 抗体对人胃癌/肺癌组织染色

组织	染色情况	Claudin18.2 诊断抗体			Abcam EPR19202-244
		抗体 9	抗体 7	43-14A2	
胃癌 (F163060A1)	肿瘤组织特异性染色强度	1+	1+	1+	0
	非特异性/背景染色	无	无	有	无
胃癌 (2018-50829E)	肿瘤组织特异性染色强度	3+	2+	2+	2+
	非特异性/背景染色	无	无	有	无
肺癌 (2018-55164F)	特异性染色强度	0	1+	0	0
	非特异性/背景染色	无	无	有	无

4. 抗体 9 对胃癌组织芯片的染色

- 选择抗体 9 对胃癌及癌旁组织芯片染色分析。抗体 9 在工作浓度 0.2 μ g/mL 与
- 5 Abcam EPR19202-244 在说明书推荐工作浓度 0.37 μ g/mL 下, 分别对 75 例胃癌及癌旁组织芯片(上海芯超, 芯片编号: HStm-Ade150CS4-01) 进行染色。具体数据见表 3, 染色结果统计见表 4。

对于癌组织, 抗体 9 检出率为 60.0%(45/75), $\geq 2+$ 染色程度的有 41.3%(31/75); Abcam EPR19202-244 检出率为 41.3%(31/75), $\geq 2+$ 染色程度的仅有 17.3%(13/75)。

- 10 对于癌旁组织, 抗体 9 检出率为 100%(75/75), $\geq 2+$ 染色程度的有 90.6%(68/75); Abcam EPR19202-244 检出率为 98.6%(74/75), $\geq 2+$ 染色程度的有 89.3%(67/75)。

由此可见在特异性和灵敏度上, 抗体 9 均优于 Abcam EPR19202-244。表 3. 抗体 9 对胃癌组织芯片的染色

点位置	蜡块编号	组织类型	病理分型	抗体 9	Abcam EPR19202-244
A1	D09A0001-B30-C1	癌	腺癌	0	0
A3	D09A0007-B30-C1	癌	腺癌	0	0
A7	D09A0136-B30-C1	癌	腺癌	0	0
A11	D09A0430-B30-C1	癌	腺癌	0	0
A13	D09A0477-B30-C1	癌	腺癌	0	0
A15	D09A0792-B30-C1	癌	腺癌	0	0
B1	D09A0793-B30-C1	癌	腺癌	0	0
B5	D09A1314-B30-C1	癌	腺癌	0	0
B15	D09A2557-B30-C1	癌	腺癌	0	0
C3	D09A2751-B30-C1	癌	腺癌	0	0
C7	D09A3150-B30-C1	癌	腺癌	0	0

D3	D09A3965-B30-C1	癌	腺癌	0	0
D7	D09A4002-B30-C1	癌	腺癌	0	0
E1	D09A0352-B30-C1	癌	腺癌	0	0
E5	D09A0490-B30-C1	癌	腺癌	0	0
E11	D09A1120-B30-C1	癌	腺癌	0	0
E13	D09A1352-B30-C1	癌	腺癌	0	0
F15	D09A4027-B30-C1	癌	腺癌	0	0
G5	D09A2365-B30-C1	癌	腺癌（粘液癌）	0	0
H9	D09A0397-B30-C1	癌	腺癌	0	0
H11	D09A2689-B30-C1	癌	腺癌	0	0
I11	D09A0420-B30-C1	癌	腺癌	0	0
I9	D09A0341-B30-C1	癌	腺癌（粘液癌， 部分癌细胞呈印 戒样）	0	0
I5	D09A0242-B30-C1	癌	腺癌，部分以粘 液癌方式生长	0	0
C15	D09A3828-B30-C1	癌	腺癌，大部分以 粘液癌方式生长	0	0
E9	D09A1091-B30-C1	癌	腺癌，部分为粘 液腺癌	0	0
F9	D09A2345-B30-C1	癌	腺癌	0	0
F5	D09A0247-B30-C1	癌	腺癌，部分癌细 胞呈印戒样	3+	2+
G1	D09A0117-B30-C1	癌	腺癌，大部分癌 细胞呈印戒样	3+	3+
H5	D09A1695-B30-C1	癌	腺癌，小部分癌 细胞呈印戒样	2+	1+
H3	D09A1328-B30-C1	癌	腺癌，部分癌细 胞呈印戒样	3+	3+
D9	D09A4024-B30-C1	癌	腺癌，以粘液癌 方式生长，部分 癌细胞呈印戒样	2+	1+
E7	D09A0613-B30-C1	癌	腺癌（大部分为 粘液癌，部分癌 细胞呈印戒样）	2+	1+
C5	D09A2972-B30-C1	癌	腺癌	3+	1+
B3	D09A1009-B30-C1	癌	腺癌	3+	2+
A9	D09A0268-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+
B7	D09A1516-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+
C9	D09A3365-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+
C11	D09A3399-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+
D1	D09A3912-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+
D11	D09A4085-B30-P1	癌	腺癌	2+	1+
D13	D09A4088-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+

D15	D09A0267-B30-C1	癌	腺癌	1+	1+
E15	D09A1545-B30-C1	癌	腺癌	3+	2+
F3	D09A1544-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+
F7	D09A0664-B30-C1	癌	腺癌	3+	2+
F11	D09A3777-B30-C1	癌	腺癌	3+	2+
F13	D09A4025-B30-C1	癌	腺癌	2+	1+
G7	D09A3436-B30-C1	癌	腺癌	2+	2+
G11	D09A3822-B30-C1	癌	腺癌	2+	2+
H1	D09A0571-B30-C1	癌	腺癌	3+	2+
I1	D09A0107-B30-C1	癌	腺癌	1+	1+
I13	D09A0992-B30-C1	癌	腺癌	1+	1+
I15	D09A1276-B30-C1	癌	腺癌	1+	1+
J1	D09A1421-B30-C1	癌	腺癌	2+	2+
J3	D09A3769-B30-C1	癌	腺癌	3+	2+
I7	D09A0292-B30-C1	癌	腺癌	3+	1+
J5	D09A4015-B30-C1	癌	腺癌	2+	2+
G3	D09A2212-B30-C1	癌	腺癌，部分以粘液癌方式生长	1+	0
B9	D09A1781-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
B11	D09A1969-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
B13	D09A2187-B30-C1	癌	腺癌	2+	0
C1	D09A2583-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
A5	D09A0021-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
C13	D09A3698-B30-P1	癌	腺癌	1+	0
D5	D09A3970-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
E3	D09A0369-B30-C1	癌	腺癌	0	0
F1	D09A3833-B30-C1	癌	腺癌	2+	0
G9	D09A3441-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
G13	D09A0121-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
H7	D09A3181-B30-C1	癌	腺癌	2+	0
H13	D09A0552-B30-C1	癌	腺癌	0	0
H15	D09A0410-B30-C1	癌	腺癌	1+	0
G15	D09A0471-B30-C1	癌	腺癌，大部分癌细胞呈印戒样	1+	0
I3	D09A0137-B30-C1	癌	印戒细胞癌	0	0
A6	D09A0021-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
A8	D09A0136-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	3+
A2	D09A0001-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
A12	D09A0430-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
A14	D09A0477-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	1+	1+
B2	D09A0793-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
B4	D09A1009-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
B6	D09A1314-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+

B12	D09A1969-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
B14	D09A2187-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
C4	D09A2751-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
C8	D09A3150-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
C10	D09A3365-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	3+
C14	D09A3698-B30-C1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
D2	D09A3912-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
D4	D09A3965-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
D6	D09A3970-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
D8	D09A4002-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
D14	D09A4088-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
D16	D09A0267-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
E4	D09A0369-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
E6	D09A0490-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	1+
E8	D09A0613-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
E10	D09A1091-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
E14	D09A1352-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
E16	D09A1545-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
F4	D09A1544-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
F6	D09A0247-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	1+
F8	D09A0664-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
F10	D09A2345-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
F14	D09A4025-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	1+	1+
F16	D09A4027-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
G4	D09A2212-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
G6	D09A2365-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
G8	D09A3436-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
G10	D09A3441-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
G12	D09A3822-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
G14	D09A0121-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
H2	D09A0571-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
D12	D09A4085-B30-C1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
H4	D09A1328-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
H6	D09A1695-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
H8	D09A3181-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
H10	D09A0397-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
H12	D09A2689-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
J2	D09A1421-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
H16	D09A0410-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	2+
I2	D09A0107-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
I6	D09A0242-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	2+	2+
I14	D09A0992-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+
I16	D09A1276-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜	3+	3+

A16	D09A0792-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
A10	D09A0268-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化	2+	2+
B16	D09A2557-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化生（小肠化生）	2+	2+
C2	D09A2583-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴小肠化生	3+	2+
C6	D09A2972-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
C12	D09A3399-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化生	3+	2+
D10	D09A4024-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
F12	D09A3777-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化生	3+	2+
H14	D09A0552-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜，伴肠化生	1+	1+
E12	D09A1120-B30-P1	癌旁	胃底腺粘膜及幽门腺伴肠化生	2+	2+
A4	D09A0007-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
B8	D09A1516-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
B10	D09A1781-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
J6	D09A4015-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	1+	1+
E2	D09A0352-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	1+	0
I12	D09A0420-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
J4	D09A3769-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
I4	D09A0137-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	2+	2+
I10	D09A0341-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜，伴肠化生	1+	1+
C16	D09A3828-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜	2+	2+
F2	D09A3833-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜	3+	2+
G2	D09A0117-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜	2+	2+
G16	D09A0471-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜	2+	2+
I8	D09A0292-B30-P1	癌旁	幽门腺粘膜	1+	2+

表 4. Claudin18.2 诊断抗体对胃癌组织芯片的染色结果统计

组织类型	染色强度	抗体9	Abcam EPR19202-244
癌组织	0	30	44
	1+	15	18
	2+	19	11
	3+	11	2
癌旁组织	0	0	1
	1+	7	7
	2+	31	49
	3+	37	18
总计		150	150

实施例4. 表位分析

5 ELISA方法：通过检测抗体7和抗体9与抗原的不同肽段的结合情况，分析抗体结合的表位。

基于免疫原（Claudin18.2 C端多肽）序列，按照长度15aa、重叠12aa的原则分成21个肽段，化学合成相应肽段并在N端加生物素修饰。用Neutravidin plate(CAT:15128 Invitrogen)捕获各肽段，然后用10μg/mL的Claudin18.2抗体（抗体7和抗体9）孵育。

10 二抗使用HRP标记羊抗鼠(CAT:A0168 SIGMA)，底物显色液显色5分钟，然后加2M H2SO4终止显色，通过测定OD450nm吸光度定性抗体和各个肽段的结合情况

ELISA结果见图6，抗体9的结合肽段序列特征如SEQ ID NO：6所示：KNKKIYDGGART；抗体7的结合肽段序列特征如SEQ ID NO：7所示：KNKKIYDGG。

15 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。