



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202302153 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：111106264

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 02 月 21 日

(51)Int. Cl.：

*A61K47/68 (2017.01)**C07K16/28 (2006.01)**A61K51/10 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/02/19

世界智慧財產權組織

PCT/CN2021/076910

2022/01/28

世界智慧財產權組織

PCT/CN2022/074750

(71)申請人：中國大陸商蘇州創勝醫藥集團有限公司 (中國大陸) SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD. (CN)

中國大陸

中國北京腫瘤醫院 (中國大陸) BEIJING CANCER HOSPITAL (CN)

中國大陸

(72)發明人：錢 雪明 QIAN, XUEMING (US)；朱華 ZHU, HUA (CN)；滕菲 TENG, FEI (CN)；李紅俊 LI, HONGJUN (CN)；楊志 YANG, ZHI (CN)；顧 怡 GU, YI (US)；丁縉 DING, JIN (CN)；王風 WANG, FENG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：8 共 168 頁

(54)名稱

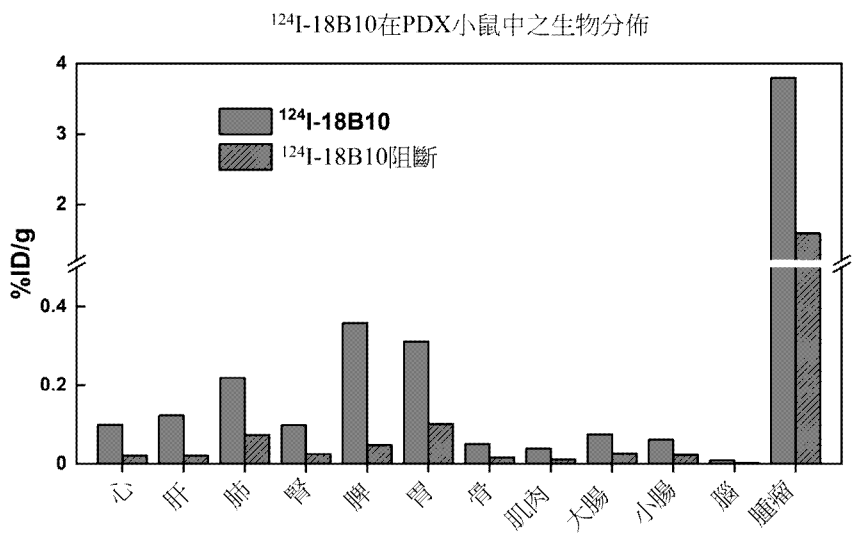
抗 CLDN 18 · 2 抗體結合物

(57)摘要

本發明在本文中提供抗 CLDN18.2 抗體或其抗原結合片段與放射性核種之結合物、含有其之醫藥組合物及其在成像、患者篩選、治療過程監測及功效評價中之用途。

The present disclosure provides herein conjugates of anti-CLDN18.2 antibodies or antigen-binding fragments thereof with radionuclides, the pharmaceutical composition containing the same and the uses thereof in imaging, patient screening, treatment process monitoring and efficacy evaluation.

指定代表圖：



【圖6】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗CLDN18.2抗體結合物

【英文發明名稱】

ANTI-CLDN18.2 ANTIBODY CONJUGATES

【中文】

本發明在本文中提供抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段與放射性核種之結合物、含有其之醫藥組合物及其在成像、患者篩選、治療過程監測及功效評價中之用途。

【英文】

The present disclosure provides herein conjugates of anti-CLDN18.2 antibodies or antigen-binding fragments thereof with radionuclides, the pharmaceutical composition containing the same and the uses thereof in imaging, patient screening, treatment process monitoring and efficacy evaluation.

【指定代表圖】

圖6

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗CLDN18.2抗體結合物

【英文發明名稱】

ANTI-CLDN18.2 ANTIBODY CONJUGATES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於核醫學，且特別是放射性標記之CLDN18.2抗體結合物之製備及應用。

【先前技術】

【0002】 在世界範圍內，胃癌之發病率及死亡率分別排在第五位及第三位。在中國，胃癌之發病率排名第二。目前，作為靶向人類表皮生長因子受體2 (HER2)之單株抗體之曲妥珠單抗(trastuzumab)為晚期胃癌一線治療中唯一具有生存益處之藥物。近年來，雖然靶向HER2之新藥(抗體-藥物結合物、雙特異性抗體、小分子抑制劑等)喜報頻傳，但仍無法擺脫HER2陽性胃癌患者比例低(僅10-12%)、大部分患者在一年內出現耐藥性且耐藥性後缺乏精準及有效之靶向藥物之尷尬局面。因此，探索胃癌治療之新靶點係突破晚期胃癌治療瓶頸之關鍵。

【0003】 2016年之FAST研究藉由針對靶向CLDN18.2之單株抗體IMAB362之一系列實驗，驗證胃癌之「新星」靶點Claudin18.2 (claudin 18 剪接變異體2，CLDN18.2)。然而，到目前為止，尚無關於抗CLDN18.2核素探針之報導發表。

【0004】 利用現代分子成像技術全面、無創、即時及動態之特點，開發具有高特異性之分子探針對CLDN18.2之診斷具有重要意義。因此，

對新型抗CLDN18.2核素探針及治療藥物存在重大需求。

【發明內容】

【0005】 在整個本發明中，冠詞「一(a/an)」及「上述(the)」在本文中用於指一個(種)或多於一個(種) (亦即，至少一個(種))上述冠詞之語法對象。舉例而言，「一抗體」意謂一種抗體或多於一種抗體。

【0006】 在一個態樣中，本發明提供一種抗CLDN18.2抗體結合物，其包含與放射性核種結合之抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段，其中上述放射性核種包含治療性放射性核種或診斷性放射性核種。

【0007】 在一些實施例中，上述治療性放射性核種係選自由以下組成之群： ^{111}In 、 $^{111\text{m}}\text{In}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 及 ^{211}Pb 。

【0008】 在一些實施例中，上述診斷性放射性核種係選自由以下組成之群： ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{154}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 及 ^{225}Ac 。

【0009】 在一些實施例中，上述診斷性放射性核種可藉由正電子發射斷層掃描(PET)或單光子發射計算機斷層掃描(SPECT)偵測。

【0010】 在一些實施例中，上述放射性核種係選自由以下組成之群： ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 $^{123/131}\text{I}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{41}Ca 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{44}Sc 、 ^{18}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 及 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 。

【0011】 在一些實施例中，上述放射性核種為 ^{124}I 或 ^{123}I 或 ^{131}I 。

【0012】 在一些實施例中，上述放射性核種為 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 或 ^{89}Zr 。

【0013】 在一些實施例中，上述 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 或 ^{89}Zr 經由螯合劑標記至上述抗體或其抗原結合片段。

【0014】 在一些實施例中，上述螯合劑包含三個或更多個用於螯合之原子，其中每個原子係選自由氮、硫、氧及磷組成之群。

【0015】 在一些實施例中，上述螯合劑包含DFO (去鐵胺)、DOTA (1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DTPA (NR-二伸乙基三胺五乙酸)、NOTA (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-乙酸)、1,4,7,10-四氮雜環十三烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(本文縮寫為TRITA)；1,4,8,11-四氮雜環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(本文縮寫為TETA)；及1,5,9,13-四氮雜環十六烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(本文縮寫為HETA)、乙二胺四乙酸(本文縮寫為EDTA)或二伸乙基三胺五乙酸(DTPA)。

【0016】 在一些實施例中，上述放射性核種為 ^{64}Cu 或 ^{67}Cu 且上述螯合劑包含TETA、NOTA、NODA或NODGA，或者其中上述放射性核種為 ^{89}Zr 且上述螯合劑包含DFO。

【0017】 在一些實施例中，上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段包含重鏈HCDR1、HCDR2及HCDR3及/或輕鏈LCDR1、LCDR2及LCDR3序列，其中：

上述HCDR1序列包含GYNMN (SEQ ID NO: 1)或TYFIGVG (SEQ

ID NO: 13)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述HCDR2序列包含**X₁IDPYYX₂X₃TX₄YNQKFX₅G** (SEQ ID NO: 32)，或HIWWNDNKYYNTALKS (SEQ ID NO: 15)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述HCDR3序列包含**X₆X₇X₈GNAFDY** (SEQ ID NO: 33) 或MGSGAWFTY (SEQ ID NO: 17)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述LCDR1序列包含**KSSQX₉LX₁₀NX₁₁GNX₁₂KNYLT** (SEQ ID NO: 34)或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述LCDR2序列包含**WASTRX₁₃S** (SEQ ID NO: 35)或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述LCDR3序列包含**QNDYX₁₄X₁₅PX₁₆T** (SEQ ID NO: 36)或其至少80%序列一致性之同源序列；

其中X₁為N或Y或H，X₂為G或V，X₃為A或G或T，X₄為R或T或S，X₅為K或R，X₆為S或M，X₇為Y或F，X₈為Y或H，X₉為S或N，X₁₀為L或F，X₁₁為S或N，X₁₂為Q或L，X₁₃為E或K，X₁₄為S或Y，X₁₅為F或Y，且X₁₆為F或L。

【0018】 在一些實施例中，上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段包含：

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 3序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 7序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 8序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 9序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 11序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 10序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 13序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 15序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 17序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 12序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 19序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 21序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 14序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 16序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 18序列之LCDR3；或者

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 22序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 20序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3。

【0019】 在一些實施例中，上述重鏈可變區進一步包含重鏈HFR1、HFR2、HFR3及HFR4中之一或多者，及/或上述輕鏈可變區進一步包含輕鏈LFR1、LFR2、LFR3及LFR4中之一或多者，其中：

上述 HFR1 包含 **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₁₇FT** (SEQ ID NO: 54)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述 HFR2 包含 **WVX₁₈QAPGQGLEWX₁₉G** (SEQ ID NO: 55)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述 HFR3 序列包含 **RVTX₂₀TIDKSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAR** (SEQ ID NO: 56)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述 HFR4 包含 **WGQGTTVTVSS** (SEQ ID NO: 57)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述 LFR1 包含 **DIVMTQSPDSLAVSLGERATX₂₁NC** (SEQ ID NO: 58)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述 LFR2 包含 **WYQQKPGQPPKLLIY** (SEQ ID NO: 59)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述 LFR3 包含 **GVPDRFX₂₂GSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYC** (SEQ ID NO: 60)或其至少80%序列一致性之同源序列，且

上述 LFR4 包含 **FGGGTKVEIK** (SEQ ID NO: 61)或其至少80%序列一致性之同源序列，

其中 X₁₇ 為 T 或 S，X₁₈ 為 R 或 K，X₁₉ 為 M 或 I，X₂₀ 為 M 或 L，X₂₁ 為 I 或 M，且 X₂₂ 為 S 或 T。

【0020】 在一些實施例中，上述 HFR1 包含選自由 SEQ ID NO: 62 及 SEQ ID NO: 63 組成之群之序列，

上述 HFR2 包含選自由 SEQ ID NO: 64 及 SEQ ID NO: 65 組成之群之序列，

上述 HFR3 包含選自由 SEQ ID NO: 66 及 SEQ ID NO: 67 組成之群之

序列，

上述HFR4包含SEQ ID NO: 57序列，

上述LFR1包含選自由SEQ ID NO: 68及SEQ ID NO: 69組成之群之序列，

上述LFR2包含SEQ ID NO: 59序列，

上述LFR3包含選自由SEQ ID NO: 70及SEQ ID NO: 71組成之群之序列，且

上述LFR4包含SEQ ID NO: 61序列。

【0021】 在一些實施例中，上述重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45及SEQ ID NO: 47，以及其具有至少80%序列一致性但仍保留與CLDN18.2之特異性結合親和力之同源序列。

【0022】 在一些實施例中，上述輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48，以及其具有至少80%序列一致性但仍保留與CLDN18.2之特異性結合親和力之同源序列。

【0023】 在一些實施例中，

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 23序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 24序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 25序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 26序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 27序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 28序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 29序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 26或28序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 37序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 38序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 39序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 40序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 41序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 42序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 43序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 44序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 45序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 46序列；或者

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 47序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 48序列。

【0024】 在一些實施例中，上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段進一步包含一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但仍保留與人類CLDN18.2之特異性結合親和力。

【0025】 在一些實施例中，上述取代或修飾中之至少一者在上述CDR序列之一或多個中，及/或在上述VH或VL序列之非CDR區之一或多個中。

【0026】 在一些實施例中，上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片

段進一步包含免疫球蛋白恆定區、視情況人類Ig之恆定區或視情況人類IgG之恆定區。

【0027】 在一些實施例中，上述恆定區包含人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。

【0028】 在一些實施例中，上述人類IgG1之恆定區包含SEQ ID NO: 49，或其具有至少80%序列一致性之同源序列。

【0029】 在一些實施例中，上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段為人類化的。

【0030】 在一些實施例中，上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段為雙特異抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫鍵穩定化Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、雙特異性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定化雙特異抗體(ds雙特異抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙特異抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0031】 在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含本文提供之抗體結合物，以及一或多種醫藥學上可接受之載劑。

【0032】 在一些實施例中，放射化學純度為至少95% (例如97%、98%、99%)。

【0033】 在另一態樣中，本發明提供一種獲取個體中感興趣部位圖像之方法，上述方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及

b)使上述個體之上述感興趣部位經歷正電子發射斷層掃描(PET)或

SPECT；

c)識別上述個體中來自放射性核種之可偵測信號；

d)生成上述可偵測信號之圖像，從而獲得上述個體中上述感興趣部位之圖像。

【0034】 在一些實施例中，上述感興趣部位為表現或懷疑表現 claudin 18.2之部位。

【0035】 在一些實施例中，上述感興趣部位患有或懷疑患有腫瘤。

【0036】 在另一態樣中，本發明提供一種以無創方式偵測或可視化個體中 claudin 18.2表現之方法，上述方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及

b)使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；

c)識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號；

d)基於所識別之可偵測信號確定或可視化上述個體之上述感興趣部位中之 claudin18.2表現。

【0037】 在一些實施例中，上述方法進一步包含向被識別為在上述感興趣部位具有 claudin18.2表現之個體投與治療有效量之抗 claudin 18.2療法。

【0038】 在一些實施例中，上述方法進一步包含基於所識別之可偵測信號確定在上述個體之上述感興趣部位中 claudin18.2表現之分佈。

【0039】 在一些實施例中，上述方法進一步包含確定在上述個體之上述感興趣部位中 claudin18.2表現之異質性。

【0040】 在一些實施例中，上述感興趣部位為腫瘤。

【0041】 在另一態樣中，本發明提供一種以無創方式監測個體之治療功效、對治療之反應性或抗性或復發或轉移之發展的方法，其中上述個體已接受一個治療期之治療，上述方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及

b)使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；

c)識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號；

d)基於所識別之可偵測信號確定上述個體之感興趣部位中之治療後claudin18.2表現；

e)將治療後claudin18.2表現量或分佈分別與在上述治療期之前自上述個體獲得之基線claudin18.2表現量或分佈進行比較以確定上述個體中claudin18.2表現量或分佈之治療後變化；以及

f)基於步驟(e)中確定之變化確定治療功效、對治療之反應性或抗性或復發或轉移之發展。

【0042】 在一些實施例中，基線claudin18.2表現量或分佈使用類似方法確定。

【0043】 在一些實施例中，基線claudin18.2表現量或分佈在治療期之前(亦即治療前)藉由以下來確定：向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT，識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號，且基於所識別之可偵測信號確定上述個體之感興趣部位中基線claudin18.2表現。在一些實施例中，用於確定基線claudin 18.2表現之感興趣部位與用於確定治療後claudin 18.2表現之感興

趣部位相同或至少相當。

【0044】 在一些實施例中，claudin 18.2表現量或擴散之增加表明治療功效降低、對治療之反應性降低或存在抗性或存在復發。

【0045】 在一些實施例中，上述個體患有癌症。

【0046】 在另一態樣中，本發明提供一種治療有此需要之個體中之CLDN18.2相關疾病或病症的方法，其包含向上述個體投與治療有效量之本文提供之上述抗CLDN18.2抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物。

【0047】 在一些實施例中，上述疾病或病症為癌症，視情況為表現CLDN18.2之癌症。

【0048】 在一些實施例中，上述個體被識別為患有表現CLDN18.2之癌症。

【0049】 在另一態樣中，本發明提供一種套組，其包含本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物或本文提供之組合物。

【0050】 在另一態樣中，本發明提供一種套組，其包含本文提供之第一抗CLDN18.2抗體結合物及本文提供之第二抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述第一抗CLDN18.2抗體結合物包含診斷性放射性核種，且上述第二抗CLDN18.2抗體結合物包含治療性放射性核種。

【0051】 在一些實施例中，上述套組用於本文提供之方法。

【0052】 在另一態樣中，本發明提供本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物或本文提供之組合物在製備藥物中之用途，上述藥物用於本文提供之獲得個體中感興趣部位圖像之方法，或用於本文提供之以無創方式偵測或可視化個體中claudin 18.2表現之方法，或用於本文提供之以無創方式

監測個體之治療功效、對治療之反應性或抗性或復發或轉移之發展的方法，其中上述抗CLDN18.2抗體結合物包含診斷性放射性核種。

【0053】 在另一態樣中，本發明提供本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物或本文提供之組合物在製備藥物中之用途，上述藥物用於本文提供之治療有此需要之個體之CLDN18.2相關疾病或病症的方法，其中上述抗CLDN18.2抗體結合物包含治療性放射性核種。

【0054】 在另一態樣中，本發明提供一種製備本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物之方法，其包含使抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段與用 ^{124}I 、 ^{123}I 或 ^{131}I 標記之碘化物在酶促或化學氧化劑之存在下反應。

【0055】 在一些實施例中，上述化學氧化劑為N-溴琥珀醯亞胺、氯甘脲(Iodogen)或氯胺-T。

【0056】 在另一態樣中，本發明提供一種製備本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物之方法，其包含使抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段與螯合劑結合以獲得螯合劑-抗體結合物，並使上述螯合劑-抗體結合物與 ^{64}Cu 或 ^{89}Zr 反應。

【0057】 在一些實施例中，上述螯合劑包含DFO (去鐵胺)、DOTA (1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DTPA (NR-二仲乙基三胺五乙酸)、NOTA (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-乙酸)、TRITA (1,4,7,10-四氮雜環十三烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)；TETA (1,4,8,11-四氮雜環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)；及HETA (1,5,9,13-四氮雜環十六烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、EDTA (乙二胺四乙酸)、NETA ({4-[2-(雙-羧甲基胺基)-乙基]-7-羧甲基-[1,4,7]三氮雜環壬烷-1-基}-乙酸)、TACN-TM (N,N',N'',三(2-

巯基乙基)1,4,7-三氮雜環壬烷)、TRAP (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-三[甲基(2-羧基乙基)次膦酸])、CP256,PCTA (3,6,9,15-四氮雜雙環[9.3.1]十五烷-1(15),11,13-三烯-3,6,9,-三乙酸)、吡啶、多胺、冠醚、雙縮胺基硫脲、多肟及其衍生物。

【圖式簡單說明】

【0058】

圖1顯示 ^{124}I -18B10探針之放射性標記率及放射化學純度：A)純化後之放射化學純度；B)純化後之放射化學純度；C)在PBS中1小時後之放射化學純度；D)在PBS中48小時後之放射化學純度。

圖2顯示 ^{124}I -18B10及其對照組在MKN45-CLND18.2高/MKN45細胞中之攝取。

圖3顯示 ^{124}I -18B10在正常昆明小鼠中之生物分佈。

圖4顯示本發明實例5中 ^{124}I -18B10及其對照組及 ^{18}F -FDG在CLDN18.2陽性/陰性PDX模型中之Micro-PET成像比較。

圖5A-B是柱狀圖，其使用抗原決定基作圖顯示嵌合抗體與突變之hCLDN 18.2變異體之結合信號。當E56突變為Q時，18B10-C之結合完全喪失。此變化亦適用於IMAB362及其他嵌合抗體，除59A9-C以外。其他胺基酸如A42、N45亦在一定程度上促進IMAB362及其他抗體之結合，但對18B10-C而言並非如此。

圖6顯示 ^{124}I -18B10在PDX小鼠中之生物分佈。

圖7顯示源自前五名患者圖像之 ^{124}I -18B10在患者中之生物分佈。

圖8顯示 ^{124}I -18B10在患者卵巢病變中之累積。

【實施方式】

【0059】 以下對本發明之描述僅意欲說明本發明之各種實施例。因此，所論述之具體修改不應被解釋為對本發明範疇之限制。熟習此項技術者將顯而易見，可在不脫離本發明範疇之情況下作出各種等效物、變化及修改，且應理解，此等等效實施例將包括在本文中。本文引用之所有參考文獻，包括出版物、專利及專利申請案，均以全文引用之方式併入本文中。

【0060】

定義

如本文所用，在本發明之上下文中(尤其是在申請專利範圍之上下文中)使用之術語「一(a/an)」、「上述(the)」及類似術語應解釋為涵蓋單數及複數兩者，除非本文另有說明或與上下文明顯相悖。

【0061】 如本文所用，術語「抗體」包括與特異性抗原結合之任何免疫球蛋白、單株抗體、多株抗體、多價抗體、二價抗體、單價抗體、多特異性抗體或雙特異性抗體。天然完整抗體包含兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈。哺乳動物之重鏈分為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ ，每條重鏈由可變區(V_H)以及第一、第二及第三恆定區(分別為 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})組成；哺乳動物之輕鏈分為 λ 或 κ ，而每條輕鏈由可變區(V_L)及恆定區組成。抗體呈「Y」形，其中Y之主幹由經由二硫鍵結合在一起之兩條重鏈之第二及第三恆定區組成。Y之每個臂包括與單條輕鏈之可變區及恆定區結合之單條重鏈之可變區及第一恆定區。輕鏈及重鏈之可變區負責抗原結合。兩條鏈之可變區一般含有三個高度可變之環，稱為互補決定區(CDR) (輕鏈CDR包括LCDR1、LCDR2及LCDR3，重鏈CDR包括HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文所揭示之抗體及抗原結合域之CDR邊界可藉由Kabat、IMGT、AbM、

Chothia或Al-Lazikani之慣例來定義或識別(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997) ; Chothia, C.等人, J. Mol. Biol. 12月5日;186(3):651-63 (1985) ; Chothia, C.及Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196,901 (1987) ; N. R. Whitelegg 等人, Protein Engineering, v13(12), 819-824 (2000) ; Chothia, C. 等人, Nature 12月21-28日;342(6252):877-83 (1989) ; Kabat E.A.等人, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) ; Marie-Paule Lefranc 等人, Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003) ; Marie-Paule Lefranc 等人, Immunome Research, 1(3), (2005) ; Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (第二版), 第26章, 481-514, (2015))。三個CDR插入於稱為構架區(FR)之側翼片段之間, 上述構架區比CDR更高度保守, 且形成支撐高變環之支架。上述重鏈及輕鏈之恆定區不參與抗原結合, 但表現出各種效應功能。基於抗體重鏈恆定區之胺基酸序列, 將抗體分類。抗體之五種主要類別或同型為IgA、IgD、IgE、IgG及IgM, 其特徵在於分別存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 重鏈。將若干主要抗體類別劃分為子類, 如IgG1 (γ 1重鏈)、IgG2 (γ 2重鏈)、IgG3 (γ 3重鏈)、IgG4 (γ 4重鏈)、IgA1 (α 1重鏈)或IgA2 (α 2重鏈)。在某些實施例中, 本文提供之抗體涵蓋任何其抗原結合片段。

【0062】 如本文所用, 術語「抗原結合片段」係指由包含一或多個CDR之抗體片段, 或任何其他與抗原結合但不包含完整之原生抗體結構之抗體部分形成的抗體片段。抗原結合片段之實例包括但不限於雙特異抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫鍵穩定化Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、雙特異性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定化雙特異抗體(ds雙特

異抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙特異抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。抗原結合片段能夠與親本抗體所結合之相同抗原結合。在某些實施例中,抗原結合片段可包含來自特定人類抗體之一或多個CDR。

【0063】關於抗體之「Fab」係指抗體之單價抗原結合片段,其由單條輕鏈(可變區及恆定區)藉由二硫鍵與單條重鏈之可變區及第一恆定區結合而成。Fab可藉由在接近鉸鏈區之重鏈之間二硫鍵之N端之殘基處木瓜蛋白酶消化抗體來獲得。

【0064】「Fab'」係指包括部分鉸鏈區之Fab片段,其可藉由在接近鉸鏈區之重鏈之間二硫鍵之C端之殘基處胃蛋白酶消化抗體來獲得,且因此在鉸鏈區之少量殘基(包括一或多個半胱胺酸)中與Fab不同。

【0065】「F(ab')₂」係指包含兩條輕鏈及兩條重鏈之一部分之Fab'的二聚體。

【0066】關於抗體之「Fc」係指由經由二硫鍵與第二重鏈之第二及第三恆定區結合之第一重鏈之第二及第三恆定區組成之抗體部分。IgG及IgM Fc區含有三個重鏈恆定區(每條鏈中之第二、第三及第四重鏈恆定區)。其可藉由木瓜蛋白酶消化抗體獲得。抗體之Fc部分負責各種效應功能,如ADCC、ADCP及CDC,但不在抗原結合中起作用。

【0067】關於抗體之「Fv」係指最小之帶有完整抗原結合位點之抗體片段。Fv片段由結合於單條重鏈之可變區的單條輕鏈之可變區組成。

「dsFv」係指二硫鍵穩定化Fv片段,其中在單條輕鏈之可變區與單條重鏈之可變區之間的鏈聯為二硫鍵。

【0068】「單鏈Fv抗體」或「scFv」係指由輕鏈可變區及重鏈可變

區直接或經由肽連接子序列相互連接組成之經工程改造之抗體(Huston JS 等人 Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988))。「scFv二聚體」係指包含具有連接子之兩個重鏈可變區及兩個輕鏈可變區之單鏈。在某些實施例中，「scFv二聚體」為包含與另一個 V_H - V_L 部分二聚化之 V_H - V_L (藉由肽連接子連接)的二價雙特異抗體或二價ScFv (BsFv)，使得一個部分之 V_H 與另一個部分之 V_L 配位且形成兩個結合位點，其可靶向相同抗原(或抗原決定基)或不同抗原(或抗原決定基)。在其他實施例中，「scFv二聚體」為雙特異性雙特異抗體，其包含 V_{H1} - V_{L2} (由肽連接子連接)與 V_{L1} - V_{H2} (亦由肽連接子連接)結合，使得 V_{H1} 與 V_{L1} 配位且 V_{H2} 與 V_{L2} 配位且每個配位對具有不同抗原特異性。

【0069】「單鏈Fv-Fc抗體」或「scFv-Fc」係指由連接至抗體Fc區之scFv組成的經工程改造之抗體。

【0070】「駱駝化單域抗體」、「重鏈抗體」、「奈米抗體」或「HCAb」係指含有兩個 V_H 域且不含輕鏈之抗體(Riechmann L. 及 Muyldermans S., J Immunol Methods. 12月10日;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol 6月;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; 美國專利第6,005,079號)。重鏈抗體最初自駱駝科(Camelidae) (駱駝、單峰駝及美洲駝)獲得。儘管無輕鏈，但駱駝化抗體具有真正之抗原結合庫(Hamers-Casterman C.等人, Nature 6月3日;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK.等人 Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation, Immunogenetics. 4月;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK.等人 Immunology. 5月;109(1):93-101 (2003))。重鏈抗體之可變域(VHH域)代表由適應性免疫反應產生之

最小之已知抗原結合單位 (Koch-Nolte F. 等人, FASEB J. 11月;21(13):3490-8. Epub 2007年6月15日(2007))。「雙特異抗體」包括具有兩個抗原結合位點之小抗體片段, 其中上述片段包含在單條多肽鏈(V_H - V_L 或 V_L - V_H)中與 V_L 域連接之 V_H 域(參見例如, Holliger P.等人, Proc Natl Acad Sci USA 7月15日;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161)。因為連接子太短, 所以同一條鏈上之兩個域無法配對, 因此, 迫使上述域與另一條鏈之互補域配對, 從而產生兩個抗原結合位點。抗原結合位點可靶向相同之不同抗原(或抗原決定基)。

【0071】「域抗體」係指僅含重鏈可變區或輕鏈可變區之抗體片段。在某些實施例中, 兩個或更多個 V_H 域藉由肽連接子共價接合以形成二價或多價域抗體。二價域抗體之兩個 V_H 域可靶向相同或不同抗原。

【0072】在某些實施例中, 「 $(dsFv)_2$ 」包含三個肽鏈: 兩個 V_H 部分藉由肽連接子連接且藉由二硫橋與兩個 V_L 部分結合。

【0073】在某些實施例中, 「雙特異性 ds 雙特異抗體」包含經由 V_{H1} 與 V_{L1} 之間的二硫橋與 V_{L1} - V_{H2} (由肽連接子連接)結合之 V_{H1} - V_{L2} (亦由肽連接子連接)。

【0074】在某些實施例中, 「雙特異性 $dsFv$ 」或「 $dsFv$ - $dsFv'$ 」包含三個肽鏈: V_{H1} - V_{H2} 部分, 其中重鏈由肽連接子(例如, 長的可撓性連接子)結合且經由二硫橋分別與 V_{L1} 及 V_{L2} 部分配對。每個二硫鍵配對之重鏈及輕鏈具有不同抗原特異性。

【0075】如本文所用, 術語「人類化」意謂抗體或抗原結合片段包含來源於非人類動物之CDR、來源於人類之FR區, 及當適用時, 來源於人類之恆定區。在某些實施例中, 人類化CLDN18.2抗體之可變區構架之

胺基酸殘基經替換以進行序列優化。在某些實施例中，人類化CLDN18.2抗體鏈之可變區構架序列與相應人類可變區構架序列具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性。

【0076】如本文所用，術語「嵌合」係指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於一個物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同物種之抗體或抗原結合片段。在一說明性實例中，嵌合抗體可包含來源於人類之恆定區及來源於非人類物種(如小鼠)之可變區。

【0077】術語「生殖系序列」係指編碼可變區胺基酸序列或子序列之核酸序列，與所有其他已知之由生殖系免疫球蛋白可變區序列編碼之可變區胺基酸序列相比，上述序列與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高之確定胺基酸序列一致性。生殖系序列亦可指與所有其他評估之可變區胺基酸序列相比，與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高胺基酸序列一致性之可變區胺基酸序列或子序列。生殖系序列可為僅構架區、僅互補決定區、構架及互補決定區、可變區段(如上文所定義)或包含可變區之序列或子序列之其他組合。序列一致性可使用本文上述之方法確定，例如，使用BLAST、ALIGN或此項技術中已知之另一種聯配演算法比對兩個序列。生殖系核酸或胺基酸序列可與參考可變區核酸或胺基酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列一致性。例如，可藉由可公開獲得之國際ImMunoGeneTics資料庫(IMG)及V-base確定生殖系序列。

【0078】如本文所用，「抗CLDN18.2抗體」或「抗CLDN18.2抗體」係指能夠以足夠親和力特異性結合CLDN18.2(例如人類或非人類CLDN18.2)例如以提供診斷及/或治療用途之抗體。

【0079】如本文所用，術語「親和力」係指免疫球蛋白分子(亦即抗體)或其片段與抗原之間的非共價相互作用之強度。

【0080】如本文所用，術語「特異性結合 (specific binding/specifically binds)」係指兩個分子之間例如抗體與抗原之間的非隨機結合反應。在某些實施例中，本文提供之抗體或抗原結合片段以 $\leq 10^{-6}$ M (例如， $\leq 5 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 4 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 3 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-9}$ M或 $\leq 10^{-9}$ M)之結合親和力(K_D)特異性結合人類及/或非人類CLDN18.2。本文使用之 K_D 係指解離速率相對於締合速率之比率(k_{off}/k_{on})，其可藉由使用所屬領域中已知之任何常規方法來確定，上述方法包括但不限於表面電漿子共振方法、微尺度熱泳方法、HPLC-MS方法及流動式細胞測量術(如FACS)方法。在某些實施例中， K_D 值可藉由使用流動式細胞測量術法適當地確定。可使用各種免疫分析格式來選擇與特定蛋白質特異性免疫反應之抗體。例如，固相ELISA免疫分析常規地用於選擇與蛋白質特異性免疫反應之抗體(關於可用於確定特異性免疫反應之免疫分析格式及條件之描述，參見例如 Harlow 及 Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998))。通常，特異性或選擇性結合反應將產生至少兩倍於背景信號，更通常是至少10至100倍於背景信號之信號。

【0081】關於胺基酸序列(或核酸序列)之「序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列且在必要時引入間隙以實現最大對應性之後，與參考序列中之胺基酸(或核酸)殘基相同之候選序列中之胺基酸(或核酸)殘基之百分比。可例如使用公開可用之工具實現用於確定胺基酸(或核酸)序列一致性百分比之目的之比對，該工具如BLASTN、BLASTp (可在美國國家生

物技術資訊中心(NCBI)之網站上獲得，亦參見Altschul S.F.等人, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)；Stephen F. 等人, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997))、ClustalW2 (可在歐洲生物資訊學研究所網站上獲得，亦參見Higgins D.G.等人, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996)；Larkin M.A.等人, Bioinformatics (英國牛津), 23(21): 2947-8 (2007))及ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可使用上述工具提供之預設參數，或可自定義適於比對之參數，例如藉由選擇合適演算法進行。在某些實施例中，不相同之殘基位置可藉由保守胺基酸取代而不同。「保守胺基酸取代」係其中一個胺基酸殘基經具有化學特性(例如，電荷或疏水性)類似之側鏈(R基團)之另一個胺基酸殘基取代之胺基酸取代。通常，保守胺基酸取代不會基本上改變蛋白質之功能特性。在兩個或更多個胺基酸序列因保守取代而彼此不同之情況下，百分比或類似性程度可向上調整以校正取代之保守性質。用於進行此類調整之方式對於熟習此項技術者而言為熟知的。參見例如，Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331，其藉由引用併入本文中。

【0082】如本文所用，「同源序列(homologue sequence)」及「同源序列(homologous sequence)」可互換使用，且係指視情況比對時與另一序列具有至少80% (例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)之序列一致性之多核苷酸序列(或其互補鏈)或胺基酸序列。

【0083】「分離」之物質已藉由人工方式自天然狀態改變。若「分離」之組合物或物質存在於自然界中，則上述組合物或物質已自其原始環境改變或自其原始環境移出，或此兩種情況皆有。例如，天然地存在於活

動物體內之多核苷酸或多肽並非「分離」的，但若相同多核苷酸或多肽與其天然狀態之共存材料充分地分離，由此以實質上純之狀態存在，則上述多核苷酸或多肽為「分離」的。經分離之「核酸」或「多核苷酸」可互換使用，且係指經分離核酸分子之序列。在某些實施例中，「分離之抗體或其抗原結合片段」係指具有至少60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%之純度之抗體或抗原結合片段，該純度藉由電泳方法(如SDS-PAGE、等電聚焦、毛細管電泳)或層析方法(如離子交換層析法或反相HPLC)確定。

【0084】如本文所用，「阻斷結合」或「競爭相同抗原決定基」之能力係指抗體或抗原結合片段將兩個分子(例如人類CLDN18.2及抗CLDN18.2抗體)之間的結合相互作用抑制至任何可偵測程度之能力。在某些實施例中，阻斷兩個分子之間結合的抗體或抗原結合片段將兩個分子之間的結合相互作用抑制至少50%。在某些實施例中，此類抑制可大於60%、大於70%、大於80%或大於90%。

【0085】如本文所用，術語「抗體結合物」係指抗體或其抗原結合片段與另一種試劑如放射性核種之連接。

【0086】術語「個體」包括人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，如非人類靈長類動物、小鼠、大鼠、貓、兔、羊、狗、牛、雞、兩棲動物及爬行動物。除非註明時，否則術語「患者」或「個體」在本文中可互換使用。

【0087】術語「抗腫瘤活性」意謂腫瘤細胞增殖、活力或轉移活性之降低。例如，抗腫瘤活性可藉由在治療期間出現之異常細胞之生長速率

下降或腫瘤大小穩定或減小，或與未治療之對照相比由於治療而導致之更長存活來顯示。可使用公認之活體外或活體內腫瘤模型評估此類活性，上述模型包括但不限於異種移植模型、同種異體移植模型、小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)模型及此項技術已知研究抗腫瘤活性之其他已知模型。

【0088】如本文所用，病症之「治療(treating/treatment)」包括預防或減輕病症，減緩病症之發作或發展速率，降低罹患病症之風險，預防或延遲與病症相關之症狀之發展，減少或結束與病症相關之症狀，引起病症之完全或部分消退，治癒病症或其某一組合。

【0089】術語「CLDN18.2」係指源自哺乳動物，如靈長類動物(例如人類、猴)及啮齒動物(例如小鼠)之Claudin-18剪接變異體2。在某些實施例中，CLDN18.2為人類CLDN18.2。人類CLDN18.2之示例性序列包括人類CLDN18.2蛋白(NCBI參考序列號NP_001002026.1或SEQ ID NO: 30)。CLDN18.2之示例性序列包括小鼠(Mus musculus, mice) CLDN18.2蛋白(NCBI參考序列號NP_001181852.1)、食蟹猴(Macaca fascicularis, crab-eating macaque) CLDN18.2蛋白(NCBI參考序列號XP_015300615.1)。CLDN18.2在癌細胞中表現。在一個實施例中，上述CLDN18.2在癌細胞表面上表現。

【0090】術語「CLDN18.1」係指源自哺乳動物如靈長類動物(例如人類、猴)及啮齒動物(例如小鼠)之Claudin-18剪接變異體1。在某些實施例中，CLDN18.1為人類CLDN18.1。人類CLDN18.1之示例性序列包括人類CLDN18.1蛋白(NCBI參考序列號NP_057453.1或SEQ ID NO: 31)、小鼠 CLDN18.2 蛋白 (NCBI 參考序列號 NP_001181851.1)、食蟹猴 CLDN18.2蛋白(NCBI參考序列號XP_005545920.1)。

【0091】如本文所用，「CLDN18.2 相關」疾病或病症係指由 CLDN18.2 之表現或活性增加或減少引起、惡化或以其他方式相關之任何疾病或病症。在一些實施例中，CLDN18.2 相關病症為例如癌症。

【0092】如本文所用，「癌症」係指以惡性細胞生長或贅生物、異常增殖、浸潤或轉移為特徵之任何醫學病症，且包括實體腫瘤及非實體癌(例如惡性血液病)如白血病。如本文所用，「實體腫瘤」係指贅生性及/或惡性細胞之實體塊。

【0093】術語「醫藥學上可接受之」表示指定之載劑、媒劑、稀釋劑、賦形劑及/或鹽通常與包含製劑之其他成分在化學上及/或物理上相容，且與接受者在生理上相容。

【0094】本文提及「約」某個值或參數包括(且描述)針對該值或參數本身之實施例。例如，提及「約X」之描述包括「X」之描述。數字範圍包括定義該範圍之數字。一般而言，術語「約」係指變數之指示值以及在指示值之實驗誤差內(例如，在平均值之95%信賴區間內)或在指示值之10%內(以較大者為準)之變數之所有值。若在時間段(年、月、週、天等)之上下文中使用術語「約」，則術語「約」意謂該時間段加上或減去下一個從屬時間段之一個量(例如，約1年意謂11-13個月；約6個月意謂6個月加或減1週；約1週意謂6-8天；等等)，或在指示值之10%以內，以較大者為準。

【0095】

抗CLDN18.2抗體結合物

本發明提供抗CLDN18.2抗體放射性核種結合物。

【0096】 Claudin-18 (CLDN18)分子(Genbank登錄號：剪接變異體

1 (CLDN18A1或CLDN18.1)：NP_057453、NM_016369及剪接變異體2 (CLDN18A2或CLDN18.2)：NM_001002026、NP_001002026)為完整跨膜蛋白，分子量為約27.9/27.72 kD。CLDN18蛋白位於上皮及內皮之緊密連接(tight junction)內，其在鄰近細胞之間組織膜內粒子之互連股之網絡。CLDN18及閉合蛋白(occludin)是緊密連接中最主要之跨膜蛋白組分。歸因於其強細胞間黏合特性，此等緊密連接蛋白質產生初級障壁以防止及控制溶質之細胞旁運輸，且亦限制膜脂質及蛋白質之橫向擴散以維持細胞極性。

【0097】 CLDN18顯示出幾種不同之構象，此等構象可經抗體選擇性地處理(參見Sahin U, Koslowski M, Dhaene K等人, Claudin-18剪接變異體2是一種適用於治療性抗體開發之泛癌目標[J]. *Clinical Cancer Research* 2008, 14(23): 7624-7634)。CLDN18-構象-1具有作為跨膜域(TM)之所有四個疏水區域，且形成兩個細胞外環(環1由疏水區1及疏水區2包圍；環2由疏水區3及4包圍)，如對絕大多數CLDN家族成員上述。第二構象(CLDN18-構象-2)暗示，如針對PMP22所描述，第二及第三疏水域並不完全穿過質膜，使得第一及第四跨膜域之間的部分(環D3)為胞外的。第三構象(CLDN18-構象-3)展示具有由第一及第四疏水區包圍之兩個內部疏水區之大型胞外域。由於環D3中之經典N-糖基化位點，CLDN-18拓樸變異體CLDN18拓樸-2及CLDN18拓樸-3具有額外之胞外N-糖基化位點。

【0098】 CLDN18具有兩種不同剪接變異體，其存在於小鼠及人類兩者中。剪接變異體CLDN18.1及CLDN18.2在包含第一TM及loop1之N端之前21個胺基酸上不同，而C端之蛋白質序列相同(參見Niimi T, Nagashima K, Ward J M,等人, 作為一種新型之T/EBP/NKX2. 1同源域轉

錄因子之下游靶基因之Claudin-18藉由可變剪接編碼肺及胃特異性亞型[J]. Molecular and cellular biology, 2001, 21(21): 7380-7390)。

【0099】 CLDN18.1在正常肺及胃上皮細胞上選擇性表現，而CLDN18.2僅在胃細胞上表現。最重要地，CLDN18.2表現限於胃上皮之分化之短壽命細胞，而無胃幹細胞區域。使用靈敏RT-PCR，在任何其他正常人體器官中均無法偵測到此兩種變異體。然而，其在幾種癌症類型中高度表現，包括胃腫瘤、食道腫瘤、胰臟腫瘤及肺腫瘤以及人類癌細胞株(參見Matsuda Y, Semba S, Ueda J等人, 胃癌侵襲前沿之胃及腸claudin表現[J]. Cancer science, 2007, 98(7): 1014-1019)。

【0100】 不希望受限於任何理論，據信CLDN18.2之分子及功能特徵使其成為基於抗體之癌症診斷及治療之非常有趣之目標。此等包括(i)大多數與毒性相關之正常組織中缺乏CLDN18，(ii) CLDN18.2變異體表現限制為可有可無之細胞群，作為可由胃之靶陰性幹細胞補充之分化之胃細胞，(iii)正常細胞及腫瘤細胞之間的潛在差異糖基化，以及(iv)不同構象拓撲結構之存在。

【0101】 已發現，CLDN18蛋白之分子量在腫瘤及鄰近之正常組織之間有所不同。在健康組織中觀察到較高分子量之CLDN18蛋白，藉由用脫糖基化化合物PNGase F處理正常組織裂解物，可將該高分子量降低至與腫瘤中觀察到之相同之分子量。此表明與正常組織相對物相比，CLDN18在腫瘤中之N-糖基化程度較低。經典N-糖基化基序在CLDN18分子之環D3域內之胺基酸殘基116處。分子量之差異及推斷之結構差異可能代表抗體結合之改變抗原決定基。

【0102】 此外，CLDN18作為緊密連接蛋白亦可能有助於良好之診

斷特異性及良好之治療之治療窗。由於腫瘤細胞表現CLDN，但通常不會藉由在正常上皮組織中發現之CLDN之同型及異型結合形成經典之緊密連接，因此其可能有相當多之適於細胞外抗體結合及免疫治療之游離CLDN庫。健康上皮中CLDN之結合抗原決定基可能在緊密連接內被屏蔽而無法與抗體結合。

【0103】 本發明提供抗CLDN18.2抗體結合物，其包含與放射性核種結合之抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段。

【0104】

i. 放射性核種

放射性核種為特徵在於能夠經歷放射性衰變之不穩定核之試劑。在本發明中有用之放射性核種包括伽馬發射器、正電子發射器、俄歇電子發射器、X射線發射器及螢光發射器。放射性核種可為治療性的或診斷性的。

【0105】 在某些實施例中，放射性核種為治療性的。由短程高LET發射(如貝塔、阿爾法及俄歇電子)衰變之放射性核種具有高度細胞毒性，且因此可用於標記為放射治療目的而設計之物質。治療性放射性核種可具有在20至6,000 keV範圍內之衰變能量，例如對於俄歇發射器，衰變能量在60至200 keV範圍內，對於貝塔發射器，衰變能量在100-2,500 keV範圍內，且對於阿爾法發射器，衰變能量在4,000-6,000 keV範圍內。熟習此項技術者可根據包括放射性核種半衰期、發射粒子之能量、發射粒子可傳播之最大範圍、足夠之濃度及癌細胞對放射性核種之延長保留等在內之因素，選擇合適治療性放射性核種以用於本文提供之抗體結合物。

【0106】 治療性放射性核種之實例包括但不限於¹¹¹In、^{111m}In、

^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{199}Au 及 ^{211}Pb 。

【0107】 隨著俄歇發射粒子顯著衰變之其他治療性放射性核種之實例包括： Co-58 、 Ga-67 、 Br-80m 、 Tc-99m 、 Rh-103m 、 Pt-109 、 In-111 、 Sb-119 、 I-125 、 Ho-161 、 Os-189m 及 Ir-192 。

【0108】 隨著 α 粒子之產生顯著衰變之其他附加放射性核種之實例包括但不限於： Dy-152 、 At-211 、 Bi-212 、 Ra-223 、 Rn-219 、 Po-215 、 Bi-211 、 Ac-225 、 Fr-221 、 At-217 、 Bi-213 及 Fm-255 。

【0109】 其他潛在之治療性放射性同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb 等。

【0110】 在某些實施例中，放射性核種為診斷性的。

【0111】 診斷性放射性核種可用作成像劑。成像劑可指示放射性核種及其黏附物在動物或人類個體之細胞或組織中或在活體外條件下之細胞或組織中之位置。在某些實施例中，放射性核種為可在活體內投與後以非無創方式自外部偵測到之放射性核種。用於診斷用途之放射性核種如成像劑較佳具有相對低之細胞毒性，但會隨著適合成像之發射而衰減。具有診斷用途之放射性核種可包括例如 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、

^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{154}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 及 ^{225}Ac 。根據本發明之實施例，可用作診斷劑之順磁性離子包括但不限於過渡金屬及鐳系金屬(例如，原子序數為6至9、21-29、42、43、44或57-71之金屬)之離子。此等金屬包括Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb及Lu離子。

【0112】 在某些實施例中，放射性核種為放射性金屬離子、發射伽馬之放射性鹵素及發射正電子之放射性非金屬。在某些實施例中，放射性核種可藉由正電子發射斷層掃描(PET)或單光子發射計算機斷層掃描(SPECT)偵測。例如，隨伽馬發射衰變之放射性核種適用於平面及單光子計算機發射斷層掃描(SPECT)成像，而隨正電子(β)發射及湮滅光子衰變之放射性核種適用於正電子發射斷層掃描(PET)。可藉由如PET或SPECT成像技術偵測之診斷性放射性核種標記物包括例如但不限於 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 $^{123/131}\text{I}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{41}Ca 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{44}Sc 、 ^{18}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 等。

【0113】 如本文所用，術語「正電子發射斷層掃描(PET)」係指在醫學領域中用於使目標組織或器官或活動可視化之核成像技術。PET量測來自放射性核種結合示蹤分子之正電子發射後連續產生之兩個湮滅光子，該示蹤分子被選擇用於在生物化學層面上標記活體內之特定功能。PET提供生物功能之分子成像而非解剖結構。PET允許藉由生成其他成像技術無

法獲得之人體許多功能之圖片來對患者進行檢查。在將短壽命之正電子發射放射性示蹤劑注射至個體後，其可根據與穩定相對物相關之生理途徑在活體內分佈。當示蹤劑為專門針對感興趣目標之靶向分子時，該示蹤劑允許對表現此類目標之組織或器官進行可視化。

【0114】如本文所用，術語「SPECT」係指「單光子發射計算機斷層掃描」，其為一種使用伽馬射線之核醫學斷層掃描成像技術。其類似於使用伽馬相機之傳統核醫學平面成像，且能夠提供真實3D資訊。該資訊通常以穿過患者之橫截面切片之形式呈現，但可根據需要自由重定格式或操作。成像需要將伽馬發射放射性核種或其結合物注射至個體中。

【0115】製備放射性核種結合之抗體及抗原結合片段之方法為此項技術已知的。一般而言，金屬放射性核種及非金屬放射性核種之方法不同。金屬放射性核種之結合通常需要螯合劑進行結合，此對於非金屬放射性核種可能並非必需的。

【0116】將金屬放射性核種與抗體結合之方法為此項技術已知的，例如，經由合適螯合劑結合(參見，WO94/11026; Current Protocols in Immunology 第1及2卷，Coligen等人編輯，Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991))。

【0117】如本文所用，術語「螯合劑」係指能夠以兩個或更多個鍵結合金屬之化學結構。螯合劑可具有一或多個可結合金屬離子之螯合基團。例如，螯合劑可包含至少一個適合與金屬離子配位之雜原子，且自水溶液中隔離金屬離子。

【0118】在一些實施例中，上述螯合劑包含三個或更多個用於螯合之原子，其中每個原子係選自由氮、硫、氧及磷組成之群。

【0119】可根據本發明使用之螯合劑之實例包括但不限於DFO (去鐵胺)、DOTA (1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DTPA (NR-二仲乙基三胺五乙酸)、NOTA (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-乙酸)、TRITA (1,4,7,10-四氮雜環十三烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)；TETA (1,4,8,11-四氮雜環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)；及HETA (1,5,9,13-四氮雜環十六烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、EDTA (乙二胺四乙酸)、NETA ({4-[2-(雙-羧甲基胺基)-乙基]-7-羧甲基-[1,4,7]三氮雜環壬烷-1-基}-乙酸)、TACN-TM (N,N',N'',三(2-巰基乙基)1,4,7-三氮雜環壬烷)、TRAP (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-三[甲基(2-羧基乙基)次膦酸])、CP256,PCTA (3,6,9,15-四氮雜雙環[9.3.1]十五烷-1(15),11,13-三烯-3,6,9,-三乙酸)、卟啉、多胺、冠醚、雙縮胺基硫脲、多胍及其衍生物。

【0120】在一些實施例中，本文提供之抗體結合物包含經由螯合劑與本文提供之抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段結合之金屬放射性核種。熟習此項技術者可基於此項技術已知之知識選擇放射性核種之合適螯合劑，例如，如Price E. W等人, Chem. Soc. Rev. 2014, **43**, 260-290上述。

【0121】在一些實施例中，金屬放射性核種可為⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁸⁹Zr、⁸⁶Y、⁹⁰Y、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、⁶⁷Ga、⁴⁴Sc或^{99m}Tc。在一些實施例中，放射性核種為⁶⁴Cu、⁶⁷Cu或⁸⁹Zr。在一些實施例中，上述⁶⁴Cu、⁶⁷Cu或⁸⁹Zr經由螯合劑標記至上述抗體或其抗原結合片段。

【0122】在一些實施例中，螯合劑進一步包含用於結合抗體之反應性官能基。螯合物可直接連接至抗體或肽，例如如美國專利號4,824,659所揭示，該專利藉由引用以其整體併入本文中。此類反應性基團允許螯合

劑與抗體之一或多個胺基酸殘基(例如游離半胱胺酸、離胺酸等)中之官能基反應。反應性基團之實例包括馬來醯亞胺、胺基苄基、N-羥基琥珀醯亞胺酯等。

【0123】 在某些實施例中，螯合劑藉由雙官能連接子試劑與本文提供之抗體或其抗原結合片段結合。此類雙官能連接子之實例包括但不限於N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(如己二亞胺二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(如辛二酸二琥珀醯亞胺)、醛(如戊二醛)、雙疊氮化合物(如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮鎘衍生物(如雙-(對重氮鎘苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(如甲苯2,6-二異氰酸酯)、雙活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPRH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB以及SVSG (琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)。那些連接子試劑為可商購的(例如，來自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., U.S.A, 參見第467-498頁, 2003-2004, Applications Handbook and Catalog)。

【0124】 在一些實施例中，放射性核種為 ^{64}Cu 或 ^{67}Cu ，且螯合劑包含TETA、NOTA、NODA或NODGA。在一些實施例中，放射性核種為 ^{89}Zr 且螯合劑包含DFO。

【0125】 在一些實施例中，放射性核種為非金屬的。在一些實施例中，放射性核種包含放射性鹵素。在一些實施例中，上述放射性核種為

^{124}I 或 ^{123}I 或 ^{131}I 。製備放射性碘化抗體之方法為此項技術已知的，參見例如Grassi, J.等人(1987) Radioiodination and Other Labeling Techniques, Handbook of Experimental Pharmacology, 91-141, Eclelman, W.C.等人, Cancer Research, 40, 3036-3042, 1998，其藉由引用以其整體併入本文。

【0126】 在一些實施例中， ^{124}I 或 ^{123}I 或 ^{131}I 標記至抗體或其抗原結合片段之至少一個苯基羥基上。

【0127】 在某些實施例中，在如 Na^{124}I 之放射性碘存在下，抗體或其抗原結合片段藉由親電取代成酪胺酸殘基而直接碘化。在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段藉由預標記化合物或能夠鍵後標記之化合物如用於肽之Bolton及Hunter試劑之共價鍵間接碘化。

【0128】 在一些實施例中， ^{124}I 或 ^{123}I 或 ^{131}I 在氧化劑存在下標記至抗體或其抗原結合片段。可使用任何合適氧化劑，包括化學氧化劑及酶促氧化劑。示例性氧化劑包括但不限於N-溴琥珀醯亞胺、氯胺T、氯氣或乳過氧化物酶。

【0129】 在一些實施例中， ^{124}I 或 ^{123}I 或 ^{131}I 藉由N-溴琥珀醯亞胺(NBS)反應標記至抗體或其抗原結合片段。

【0130】 在一些實施例中，本文提供之抗體結合物可進一步與奈米粒子結合。例如，奈米粒子可在治療應用中用作藥物載體，當與本發明之CLDN18.2特異性抗體或片段結合時，其遞送對在細胞表面過度表現CLDN18.2之癌細胞之化學治療劑、放療劑、毒素或任何其他此項技術已知之細胞毒性劑或抗癌劑。

【0131】 在一些實施例中，本文提供之抗體結合物可進一步與藥物結合(例如，在離胺酸殘基之 ϵ 胺基處)，且載體可併入額外之治療劑或診

斷劑。

【0132】

i. 抗體序列

在某些實施例中，本文提供之抗體結合物包含抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈HCDR1、HCDR2及HCDR3及/或輕鏈LCDR1、LCDR2及LCDR3序列，其中

【0133】上述HCDR1序列包含GYNMN (SEQ ID NO: 1) 或TYFIGVG (SEQ ID NO: 13)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

HCDR2序列包含X₁IDPYYX₂X₃TX₄YNQKFX₅G (SEQ ID NO: 32)，或HIWWNDNKYYNTALKS (SEQ ID NO: 15)，或其至少80% (或至少85%、90%、95%)序列一致性之同源序列；

上述HCDR3序列包含X₆X₇X₈GNAFDY (SEQ ID NO: 33) 或MGSGAWFTY (SEQ ID NO: 17)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

LCDR1序列包含KSSQX₉LX₁₀NX₁₁GNX₁₂KNYLT (SEQ ID NO: 34)或其至少80% (或至少85%、90%、95%)序列一致性之同源序列；

LCDR2序列包含WASTRX₁₃S (SEQ ID NO: 35)或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述LCDR3序列包含QNDYX₁₄X₁₅PX₁₆T (SEQ ID NO: 36)或其至少80%序列一致性之同源序列；

其中X₁為N或Y或H，X₂為G或V，X₃為A或G或T，X₄為R或T或S，X₅為K或R，X₆為S或M，X₇為Y或F，X₈為Y或H，X₉為S或N，X₁₀為L或F，X₁₁為S或N，X₁₂為Q或L，X₁₃為E或K，X₁₄為S或Y，X₁₅為F或Y，且

X₁₆為F或L。

【0134】在某些實施例中，本文提供之抗體結合物包含抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段，其中重鏈可變區包含：

- a) HCDR1包含選自SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 13之序列，
- b) HCDR2包含選自SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 19及SEQ ID NO: 22之序列，且
- c) HCDR3包含選自SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 21之序列，及/或
包含以下之輕鏈可變區：
- d) LCDR1包含SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14及SEQ ID NO: 20之序列，
- e) LCDR2包含SEQ ID NO: 4及SEQ ID NO: 16之序列，且
- f) LCDR3包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO: 18之序列。

【0135】在某些實施例中，重鏈可變區係選自由以下組成之群：

- a)重鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 3序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；
- b)重鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 7序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；
- c)重鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 9序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 11序列之HCDR3；
- d)重鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 13序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 15序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 17序列之HCDR3；

e)重鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 19序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 21序列之HCDR3；及

f)重鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 22序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3。

【0136】 在某些實施例中，輕鏈可變區係選自由以下組成之群：

a)輕鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

b)輕鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 8序列之LCDR3；

c)輕鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 10序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

d)輕鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 12序列之LCDR3；

e)輕鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 14序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 16序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 18序列之LCDR3；及

f)輕鏈可變區，其包括包含SEQ ID NO: 20序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3。

【0137】 在某些實施例中，在本文提供之抗體結合物中：

a)重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 3序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

b)重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID

NO: 7序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 8序列之LCDR3；

c)重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 9序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 11序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 10序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

d)重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 13序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 15序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 17序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 12序列之LCDR3；

e)重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 19序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 21序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 14序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 16序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 18序列之LCDR3；或者

f)重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 22序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 20序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3。

【0138】 在某些實施例中，本文提供之抗體結合物包含CLDN18.2抗體7C12、11F12、26G6、59A9、18B10及12E9之一或多個(例如1、2、3、4、5或6個) CDR序列。

【0139】 如本文所用，「7C12」係指具有SEQ ID NO: 37之重鏈可

變區及SEQ ID NO: 38之輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0140】 如本文所用，「11F12」係指具有SEQ ID NO: 39之重鏈可變區及SEQ ID NO: 40之輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0141】 如本文所用，「26G6」係指具有SEQ ID NO: 41之重鏈可變區及SEQ ID NO: 42之輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0142】 如本文所用，「59A9」係指具有SEQ ID NO: 43之重鏈可變區及SEQ ID NO: 44之輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0143】 如本文所用，「18B10」係指具有SEQ ID NO: 45之重鏈可變區及SEQ ID NO: 46之輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0144】 如本文所用，「12E9」係指具有SEQ ID NO: 47之重鏈可變區及SEQ ID NO: 48之輕鏈可變區之小鼠抗體。

【0145】 表1顯示此等CLDN18.2抗體之CDR序列。重鏈及輕鏈可變區序列亦提供於下表2中。

表1. CLDN18.2抗體CDR區之序列

抗體	區域	CDR1	CDR2	CDR3
7C12	HCDR	SEQ ID NO: 1 GYNMN	SEQ ID NO: 3 NIDPYYGATRYNQKFKG	SEQ ID NO: 5 SYYGNAFDY
	LCDR	SEQ ID NO: 2 KSSQSLLNSGNQKNYLT	SEQ ID NO: 4 WASTRES	SEQ ID NO: 6 QNDYSFPFT
11F12	HCDR	SEQ ID NO: 1 GYNMN	SEQ ID NO: 7 YIDPYYGGTRYNQKFKG	SEQ ID NO: 5 SYYGNAFDY
	LCDR	SEQ ID NO: 2 KSSQSLLNSGNQKNYLT	SEQ ID NO: 4 WASTRES	SEQ ID NO: 8 QNDYSPFT
26G6	HCDR	SEQ ID NO: 1 GYNMN	SEQ ID NO: 9 HIDPYYVTTTYNQKFRG	SEQ ID NO: 11 SFYGNADFY
	LCDR	SEQ ID NO: 10 KSSQSFLNSGNQKNYLT	SEQ ID NO: 4 WASTRES	SEQ ID NO: 6 QNDYSFPFT
59A9	HCDR	SEQ ID NO: 13 TYFIGVG	SEQ ID NO: 15 HIWWDNKKYYNTALKS	SEQ ID NO: 17 MSGGAWFTY
	LCDR	SEQ ID NO: 2 KSSQSLLNSGNQKNYLT	SEQ ID NO: 4 WASTRES	SEQ ID NO: 12 QNDYYYPLT
18B10	HCDR	SEQ ID NO: 1 GYNMN	SEQ ID NO: 19 NIDPYYGGTSYNQKFKG	SEQ ID NO: 21 MYHGNAFDY

	LCDR	SEQ ID NO: 14 KSSQSLLNSGNLKNYLT	SEQ ID NO: 16 WASTRKS	SEQ ID NO: 18 QNDYSYPLT
12E9	HCDR	SEQ ID NO: 1 GYNMN	SEQ ID NO: 22 NIDPYYGGTRYNQKFKG	SEQ ID NO: 5 SYYGNAFDY
	LCDR	SEQ ID NO: 20 KSSQNLLNNGNQKNYLT	SEQ ID NO: 4 WASTRES	SEQ ID NO: 6 QNDYSFPFT

表2. 小鼠/嵌合抗體VH/VL之序列

	VH	VL
7C12	SEQ ID NO: 37 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKTSGY SFTGYNMNWWVKQSNGESLEWIGNIDP YYGATRYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMLKSLTSEDSAVYYCARSYYGNAF DYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 38 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNDYSFPFTFGSG TKLEIK
11F12	SEQ ID NO: 39 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKTSGY SFTGYNMNWWVKQSNGESLEWIGYIDP YYGGTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMLKSLTSEDSAVYYCARSYYGNAF DYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 40 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSG TKLEIK
26G6	SEQ ID NO:41 EFQLQQSGPELEKPGASVKISCKTSGY SFTGYNMNWWVKQSNQGSLEWIGHIDP YYVTTTYNQKFRGKATLTVDKSSSTA YMLKSLTSEDSAVYYCARSFYGNAF DYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 42 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQ SLFNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNDYSFPFTFGSG TKLEIK
59A9	SEQ ID NO:43 QITQKESGPGILQPSQTLSTCSLSGFSL STYFIGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWW NDNKYYNTALKSRLTISKDTSNNQVF LKIASVDTADTATYYCARMGSGAWFT YWGQGTTLTVSA	SEQ ID NO: 44 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNDYYYPLTFGSG TKLEIK
18B10	SEQ ID NO:45 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKTSGY SFTGYNMNWWVKQSNGESLEWIGNIDP YYGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMLKSLTSEDSAVYYCARMYHGNA FDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 46 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQ SLLNSGNLKNYLTWYQQKPGQPPKLL IYWASTRKS GVPDRFTGSGSGTDFTLT LSSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGA GTKLELK
12E9	SEQ ID NO:47 EFQLQQSGPELEKPGASVRISCKTSGY SFTGYNMNWWVKQSNGESLEWIGNIDP YYGGTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMLKSLTSEDSAVYYCARSYYGNAF DYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 48 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQ NLLNNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFILT ISSVQAEDLAVYYCQNDYSFPFTFGAG TKLELK

【0146】 本文提供之抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段可為單株抗體、人類化抗體、嵌合抗體、重組抗體、雙特異性抗體、標記抗體、二

價抗體或抗獨特型抗體。重組抗體為使用重組方法在活體外而非在動物中製備之抗體。

【0147】 已知CDR負責抗原結合，然而，已發現並非所有6個CDR均一定為必不可少的或不可改變的。換言之，可替換或改變或修飾抗CLDN18.2抗體7C12、11F12、26G6、59A9、18B10或12E9中之1、2或3個CDR（對應於SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 22中之任一個），但基本上保留對CLDN18.2之特異性結合親和力。

【0148】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物包含抗CLDN18.2抗體7C12、11F12、26G6、59A9、18B10或12E9之一之重鏈CDR3序列。在某些實施例中，本文提供之抗體結合物包含SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 21之重鏈CDR3序列。重鏈CDR3區位於抗原結合位點之中心，且因此被認為與抗原接觸最多且為抗體與抗原之親和力提供最多之自由能。亦認為重鏈CDR3為迄今為止就長度、胺基酸組成及構象而言由多種多樣化機制導致之最多樣化之抗原結合位點的CDR (Tonegawa S. Nature. 302:575-81)。重鏈CDR3之多樣性足以產生大多數抗體特異性(Xu JL, Davis MM. Immunity 13:37-45)以及期望之抗原結合親和力(Schier R等, J. Mol. Biol. 263:551-67)。

【0149】 在一些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物包含全部或部分重鏈可變域及/或全部或部分輕鏈可變域。在一個實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體及抗原結合片段為由全部或部分本文提供之重鏈可變域組成之單域抗體。此項技術可獲得此類單域抗體之更多資訊(參見例如，美國專利第6,248,516號)。

【0150】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物包含合適構架區(FR)序列，只要抗體及其抗原結合片段可特異性結合CLDN18.2即可。表1中提供之CDR序列獲自小鼠抗體，但其可使用此項技術已知之合適方法如重組技術移植至任何合適物種如小鼠、人類、大鼠、兔等之任何合適之FR序列。

【0151】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物為人類化的。人類化抗體或抗原結合片段因其在人類中之免疫原性降低而為合乎需要的。人類化抗體在其可變區中為嵌合的，因為非人類CDR序列移植至人類或實質上人類FR序列。抗體或抗原結合片段之人類化基本上可藉由用非人類(如鼠) CDR基因替換人類免疫球蛋白基因中之相應人類CDR基因來進行(參見例如，Jones等人(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323-327；Verhoeyen等人(1988) *Science* 239:1534-1536)。

【0152】 可使用此項技術中已知之方法選擇合適人類重鏈及輕鏈可變域以實現此目的。在一說明性實例中，可使用「最佳擬合」方法，其中針對已知人可變域生殖系序列之資料庫篩選或BLAST非人類(例如嚙齒動物)抗體可變域序列，且最接近於非人類查詢序列之人類序列經識別且用作移植非人類CDR序列之人類支架(參見例如Sims等人，(1993) *J. Immunol.* 151:2296；Chothia等人(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901)。可替代地，源自所有人類抗體之共有序列之構架可用於移植非人類CDR (參見例如，Carter等人(1992) *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:4285；Presta等人(1993) *J. Immunol.*, 151:2623)。

【0153】 在某些實施例中，本文提供之人類化抗體結合物由除非人

類CDR序列之外的基本上所有人類序列構成。在一些實施例中，可變區FR及恆定區(若存在恆定區)則完全或基本上來自人類免疫球蛋白序列。人類FR序列及人類恆定區序列可來源於不同人類免疫球蛋白基因，例如來源於一種人類抗體之FR序列，以及來源於另一人類抗體之恆定區。在一些實施例中，人類化抗體或抗原結合片段包含人類重/輕鏈FR1-4。

【0154】 在一些實施例中，來源於人類之FR區可包含與其來源之人類免疫球蛋白相同之胺基酸序列。在一些實施例中，人類FR之一或多個胺基酸殘基由來自親本非人類抗體之相應殘基取代。在某些實施例中，此可能為合乎需要的，以使人類化抗體或其片段緊密地接近非人類親本抗體結構，以減少或避免免疫原性及/或改善或保留結合活性或結合親和力。

【0155】 在某些實施例中，本文提供之人類化抗體結合物在每個人類FR序列中包含不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基取代，或在重鏈或輕鏈可變域之所有FR中包含不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基取代。在一些實施例中，此類胺基酸殘基之變化可僅存在於重鏈FR區，僅存在於輕鏈FR區，或存在於兩條鏈中。在某些實施例中，一或多個胺基酸殘基發生突變，例如回復突變為在得到CDR序列之非人類親本抗體(例如在小鼠構架區中)中發現之相應殘基。合適突變位置可由技術人員按照此項技術中已知之原則選擇。例如，可選擇突變位置，其中：1)人類生殖系序列構架中之殘基為稀有的(例如在人類可變區序列中少於20%或少於10%)；2)該位置緊鄰人類生殖繫鏈一級序列中3個CDR中之一或多個，因為其可能與CDR中之殘基相互作用；或者3)在3維模型中，該位置接近CDR，且因此與CDR中之胺基酸相互作用之概率可為良好的。所選位置之殘基可突變回親本抗體中之相應殘基，或突變

為既非人類生殖系序列中之相應殘基亦非親本抗體中之相應殘基之殘基，而為人類序列之典型殘基，亦即在與人類生殖系序列屬於同一亞組之已知人類序列中之該位置更頻繁地出現之殘基(參見美國專利第5,693,762號)。

【0156】 在某些實施例中，本發明之人類化輕鏈及重鏈在人類中基本上為非免疫原性的且保持與針對CLDN18.2之親本抗體基本上相同或甚至更高之親和力。

【0157】 在某些實施例中，本文提供之其人類化抗體結合物包含人類生殖系構架序列VK/4-1之一或多個輕鏈FR序列，及/或人類生殖系構架序列VH/1-46之一或多個重鏈FR序列，其中沒有或沒有回復突變。若需要，可將回復突變引入人類生殖系構架序列中。在某些實施例中，人類化抗體18B10可在重鏈構架序列VH/1-46中含一或多個選自由以下組成之群之回復突變：R71I、T73K、T28S、M69L、R38K及M48I，均基於Kabat編號。人類化抗體18B10可在輕鏈構架序列VK/4-1中含一或多個選自由以下組成之群之回復突變：S63T及I21M，均基於Kabat編號。

【0158】 在某些實施例中，在本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物中，抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45及SEQ ID NO: 47及其具有至少80% (例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性但仍保留對CLDN18.2、特別是人類CLDN18.2之特異性結合親和力之同源序列。

【0159】 在某些實施例中，在本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物

中，抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48，及其具有至少80%（例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列一致性但仍保留對CLDN18.2、特別是人類CLDN18.2之特異性結合親和力之同源序列。

【0160】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物包含：

包含SEQ ID NO: 25序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 26序列之輕鏈可變區；

包含SEQ ID NO: 27序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 28序列之輕鏈可變區；

包含SEQ ID NO: 29序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 26或28序列之輕鏈可變區；

包含SEQ ID NO: 37序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 38序列之輕鏈可變區；

包含SEQ ID NO: 39序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 40序列之輕鏈可變區；

包含SEQ ID NO: 41序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 42序列之輕鏈可變區；

包含SEQ ID NO: 43序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 44序列之輕鏈可變區；

包含SEQ ID NO: 45序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 46序列之

輕鏈可變區；或者

包含SEQ ID NO: 47序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 48序列之輕鏈可變區。

【0161】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物進一步包含重鏈HFR1、HFR2、HFR3及HFR4中之一或多種，及/或輕鏈LFR1、LFR2、LFR3及LFR4中之一或多種，其中：

上述HFR1包含**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₁₇FT** (SEQ ID NO: 54)或其至少80% (或至少85%、90%、95%)序列一致性之同源序列，

上述HFR2包含**WVX₁₈QAPGQGLEWX₁₉G** (SEQ ID NO: 55)或其至少80% (或至少90%)序列一致性之同源序列，

上述HFR3序列包含**RVTX₂₀TIDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR** (SEQ ID NO: 56)或其至少80% (或至少85%、90%、95%)序列一致性之同源序列，

上述HFR4包含**WGQGTTVTVSS** (SEQ ID NO: 57)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述LFR1包含**DIVMTQSPDSLAVSLGERATX₂₁NC** (SEQ ID NO: 58)或其至少80% (或至少85%、90%、95%)序列一致性之同源序列，

上述LFR2包含**WYQQKPGQPPKLLIY** (SEQ ID NO: 59)或其至少80% (或至少85%、90%)序列一致性之同源序列，

上述LFR3包含**GVPDRFX₂₂GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC** (SEQ ID NO: 60)或其至少80% (或至少85%、90%、95%)序列一致性之同源序列，且

上述LFR4包含**FGGGTKVEIK** (SEQ ID NO: 61)或其至少80% (或至少90%)序列一致性之同源序列，

其中X₁₇為T或S，X₁₈為R或K，X₁₉為M或I，X₂₀為M或L，X₂₁為I或M，且X₂₂為S或T。

【0162】 在某些實施例中，HFR1包含選自由SEQ ID NO: 62及SEQ ID NO: 63組成之群之序列，HFR2包含選自由SEQ ID NO: 64及SEQ ID NO: 65組成之群之序列，HFR3包含選自由SEQ ID NO: 66及SEQ ID NO: 67組成之群之序列，HFR4包含SEQ ID NO: 57之序列，LFR1包含選自由SEQ ID NO: 68及SEQ ID NO: 69組成之群之序列，LFR2包含SEQ ID NO: 59之序列，LFR3包含選自由SEQ ID NO: 70及SEQ ID NO: 71組成之群之序列，且LFR4包含SEQ ID NO: 61之序列。

表3-1. 人類化CLDN18.2抗體18B10之構架(FR)序列

抗體鏈	FR1	FR2	FR3	FR4
Hu18B10-Ha	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 57
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	WVRQAPGQGLEWMG	RVTMTIDKSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAR	WGQGTTVT VSS
Hu18B10-Hb	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 57
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT	WVRQAPGQGLEWMG	RVTLTIDKSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAR	WGQGTTVT VSS
Hu18B10-Hc	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 57
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT	WVKQAPGQGLEWIG	RVTLTIDKSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAR	WGQGTTVT VSS
Hu18B10-La	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 61
	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	WYQQKPGQPPKLLIY	GVPDRFSGSGSGTDFT LTISLQAEDVAVYYC	FGGGTKVEIK
Hu18B10-Lb	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 61
	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMNC	WYQQKPGQPPKLLIY	GVPDRFSGSGSGTDFT LTISLQAEDVAVYYC	FGGGTKVEIK

【0163】 表3-2說明人類化18B10抗體之可變區序列。

表3-2. 人類化18B10之序列

抗體鏈	序列
18B10 HC生殖系	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO: 23)
Hu18B10-Ha	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYNMNWVRQAPGQG LEWMGNIDPYYGGTSYNQKFKGRVTMTIDKSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARMYHGNAFDYWQGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
Hu18B10-Hb	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQG LEWMGNIDPYYGGTSYNQKFKGRVTLTIDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARMYHGNAFDYWQGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 27)
Hu18B10-Hc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNWVKQAPGQG LEWIGNIDPYYGGTSYNQKFKGRVTLTIDKSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCARMYHGNAFDYWQGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 29)
18B10-LC生殖系	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP (SEQ ID NO: 24)
Hu18B10_La	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNLKNYLTWYQQKP GQPPKLLIYWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQNDYSYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 26)
Hu18B10_Lb	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMNCKSSQSLNLSGNLKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRKSVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQNDYSYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 28)

【0164】 在某些實施例中，本文提供之人類化抗體可包含與人類IgG1同型之恆定區融合之重鏈可變區及與人κ鏈之恆定區融合之輕鏈可變區。

【0165】 本文提供之人類化抗CLDN18.2抗體結合物保留對表現CLDN18.2之細胞之特異性結合親和力，且在該方面與親本抗體至少相當或甚至更好。本文提供之人類化抗體亦可保留其與表現CLDN18.2之細胞(如NUGC4細胞、SNU-620細胞、SNU-601細胞或KATOIII細胞)之功能相互作用，因為所有抗體均可藉由ADCC、CDC及藉由在腫瘤細胞表面交聯目標誘導之細胞凋亡之誘導以及增殖之直接抑制來介導細胞殺滅。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體及其片段進一步包含免疫球蛋白恆定區，視情況人類Ig之恆定區，或視情況人類IgG之恆定區。在一些實施例中，免疫球蛋白恆定區包含重鏈及/或輕鏈恆定區。重鏈恆定區包

含CH1、鉸鏈及/或CH2-CH3區。在某些實施例中，重鏈恆定區包含Fc區。在某些實施例中，輕鏈恆定區包含C κ 或C λ 。

【0166】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體及其片段進一步包含人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體及其抗原結合片段包含IgG1同型之恆定區。在某些實施例中，人類IgG1之恆定區包含SEQ ID NO: 49，或具有至少80%（例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列一致性之同源序列。

【0167】 IgG1同型之恆定區可誘導效應子功能，如ADCC或CDC。本文提供之抗CLDN18.2抗體及其抗原結合片段之效應子功能可導致對表現CLDN18.2之細胞之細胞毒性。效應子功能可使用各種測定來評估，如Fc受體結合測定、C1q結合測定及細胞裂解測定，以及上述用於確定ADCC或CDC之任何測定。

【0168】 本發明人驚奇地發現，本文提供之抗CLDN18.2抗體及其片段對人類CLDN18.2中表現細胞株（例如NUGC4細胞）、低表現細胞株（例如SNU-620、SNU-601及KATOIII細胞）具有高親和力。此與現有抗體如IMAB362不同，上述IMAB362未能顯示與人類CLDN18.2低表現細胞之特異性或相當之結合。嵌合IgG1抗體IMAB362為由Ganymed Pharmaceuticals AG開發之抗人類CLDN18.2抗體，具有美國專利申請案US2009169547A1中揭示之胺基酸序列(IMB362之重鏈及輕鏈可變區序列在本文中作為SEQ ID NO: 72及SEQ ID NO: 73包括)及CAS號1496553-00-4。IMAB362識別CLDN18.2之第一個胞外域(ECD1)，且不與任何其他claudin家族成員結合，包括密切相關之Claudin18剪接變異體1

(CLDN18.1)。

【0169】 NUGC4細胞為自癌症患者之胃旁淋巴結建立之細胞株(參見Akiyama S等人, Jpn J Surg. 1988年7月 ; 18(4):438-46)。NUGC4細胞株可自JCRB細胞庫以登錄號JCRB0834獲得。

【0170】 SNU-601細胞及SNU-620細胞均為由首爾國立大學(SNU)自癌症患者之腹水中建立之人類胃癌細胞株(KU JL等人, Cancer Res Treat. 2005年2月 ; 37(1): 1-19 ; Park等人, Int J Cancer. 1997年2月7日 ; 70(4):443-449)。SNU-601細胞及SNU-620細胞可自韓國細胞株庫獲得，登錄號分別為00601及00620。

【0171】 KATO III細胞為源自胃癌患者轉移部位之細胞株(參見Sekiguchi M等人 Jpn. J. Exp. Med. 48: 61-68, 1978)。KATO III細胞株可自ATCC以登錄號ATCC HTB-103獲得。

【0172】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物以不超過2.5 nM (或不超過2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4 nM)之 K_D 值特異性結合表現人類CLDN18.2之細胞(例如NUGC4細胞株或KATOIII細胞株)，如藉由KinExA測定測量。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物以不超過IMAB362之 K_d 值之80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、15%的 K_d 值特異性結合表現人類CLDN18.2之細胞，如藉由KinExA測定測量。在某些實施例中， K_D 值用NUGC4細胞、KATOIII細胞、SNU-601細胞、SNU-620細胞或其相當細胞確定，該相當細胞之人類CLDN18.2蛋白表現量與NUGC4細

胞、KATOIII細胞、SNU-601細胞或SNU-620細胞之人類CLDN18.2蛋白表現量相當或不超過NUGC4細胞、KATOIII細胞、SNU-601細胞或SNU-620細胞之人類CLDN18.2蛋白表現量。在某些實施例中， K_D 值用人類CLDN18.2高表現細胞株或人類CLDN18.2中表現細胞株確定。

【0173】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物與表現人類CLDN18.2（或小鼠CLDN18.2）細胞之結合的EC50值不超過70 $\mu\text{g/ml}$ （或不超過65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、12或10、9、8、7、6、5、4、3、2或1 $\mu\text{g/ml}$ ），如藉由流動式細胞測量術測定測量。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物以不超過IMAB362之EC50值之80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、15%、10%、1%或0.1%的EC50值特異性結合表現人類CLDN18.2之細胞，如藉由流動式細胞測量術測定測量。在某些實施例中，EC50用NUGC4細胞株、KATOIII細胞株、SNU-601細胞株、SNU-620細胞株或其相當細胞確定，該相當細胞之人類CLDN18.2蛋白表現量與NUGC4細胞株、KATOIII細胞株、SNU-601細胞株或SNU-620細胞株之人類CLDN18.2蛋白表現量相當或不超過NUGC4細胞株、KATOIII細胞株、SNU-601細胞株或SNU-620細胞株之人類CLDN18.2蛋白表現量，例如人類CLDN18.2低表現細胞株或人類CLDN18.2中表現細胞株。在某些實施例中，EC50用人類CLDN18.2高表現細胞株確定。

【0174】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物與人類CLDN18.2高表現細胞株或人類CLDN18.2中表現細胞株之結合的EC50值不超過5、4、3或2 $\mu\text{g/ml}$ 。

【0175】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物與NUGC4細胞結合之EC50值不超過70 $\mu\text{g/ml}$ (或不超過65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、12或10、9、8、7、6、5、4、3、2或1 $\mu\text{g/ml}$)，如藉由流動式細胞測量術測定測量。

【0176】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物不與CLDN18.1 (例如人類CLDN18.1或小鼠CLDN18.1)結合。

【0177】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物能夠以不超過1.5 $\mu\text{g/ml}$ 之EC50值特异性結合小鼠CLDN18.2 (例如表現小鼠CLDN18.2之細胞)，如藉由流動式細胞測量術測量。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物以0.1 $\mu\text{g/ml}$ -1.5 $\mu\text{g/ml}$ (例如0.1 $\mu\text{g/ml}$ -1.2 $\mu\text{g/ml}$ 、0.2 $\mu\text{g/ml}$ -1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ -1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.6 $\mu\text{g/ml}$ -1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.6 $\mu\text{g/ml}$ -0.8 $\mu\text{g/ml}$ 或0.67 $\mu\text{g/ml}$)之EC50結合小鼠CLDN18.2，如藉由流動式細胞測量術測量。

【0178】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體及本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物能夠在表現不同量之人類CLDN18.2之細胞中誘導抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)活性及/或CDC活性。

【0179】 如本文所用，「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指細胞介導之反應，其中表現Fc受體(FcR)之非特异性細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性球及巨噬細胞)識別在目標細胞上結合之抗體且隨後導致目標細胞裂解。目標細胞之裂解係細胞外的，需要直接細胞間接觸，且不涉及補體。ADCC可視為直接誘導不同程度之即

刻腫瘤破壞之機制，其導致抗原呈遞及誘導腫瘤導向之T細胞反應。ADCC之活體內誘導被認為會導致腫瘤導向之T細胞反應及宿主衍生之抗體反應。

【0180】 進行ADCC之方法為此項技術已知的。通常，目標細胞如表現CLDN18.2之細胞與一系列濃度之抗CLDN18.2抗體一起培育，且在洗滌後，添加效應細胞如表現Fc受體之細胞以使ADCC發生。在目標細胞與效應細胞混合後數小時之某一時間點確定細胞毒性或細胞活力以量化ADCC程度。細胞毒性可藉由自裂解之目標細胞中釋放標記物(例如，放射性受質、螢光染料或天然細胞內蛋白質如乳酸去氫酶(LDH))來偵測。在另一個實施例中，細胞活力使用螢光素酶報導基因藉由代謝活性細胞之指示物(如ATP)來確定(參見例如Crouch, S.P.等人(1993) J Immunol Methods.160, 81-8)，該基因產生與培養物中活細胞數量成比例之發光信號(亦即ADCC報導基因測定)。效應細胞之實例為NK細胞、PBMC或表現FcγRIII之細胞。

【0181】 「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」為另一種細胞殺傷方法，可藉由抗體在補體存在下裂解目標來指導。IgM為補體活化最有效之同型。IgG1及IgG3在經由經典補體活化途徑指導CDC方面亦均非常有效。在此級聯中，抗原-抗體複合物之形成導致揭開與同源抗原複合之參與抗體分子如IgG分子(C1q為補體C1之三個亞組分之一)之CH2域上緊鄰的多個C1q結合位點。此等揭開之C1q結合位點將先前低親和力之C1q-IgG相互作用轉化為高親合力之相互作用，這引發涉及一系列其他補體蛋白之級聯事件，且導致效應細胞趨化/活化劑C3a及C5a之蛋白水解釋放。補體級聯以膜攻擊複合物(MAC)之形成結束，該複合物在細胞膜上產生促進水

及溶質自由進出細胞之孔。

【0182】 CDC活性可藉由類似於如上所論述之ADCC活性之方法來確定，除不使用效應細胞，需要存在源自人類血清之補體之外。簡而言之，將抗體樣品在測定培養基中連續稀釋，且在人類血清補體存在下與表現CLDN18.2之目標細胞一起培育。培育後，細胞毒性或細胞活力由裂解之目標細胞釋放標記物或代謝活性細胞之指示物(如ATP)確定。可使用測定代謝活性細胞中之ATP之CellTiter-Glo試劑，且可藉由使用合適之讀取器測量發光強度來量化細胞裂解之程度。

【0183】 在某些實施例中，ADCC或CDC經由本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物誘導之細胞死亡可藉由膜完整性之喪失來確定，該喪失藉由碘化丙啶(PI)、台盼藍(參見Moore等人, Cytotechnology 17:1-11 (1995))之攝取評價，或者可相對於未處理細胞評估7AAD。

【0184】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物能夠以不超過1 $\mu\text{g/ml}$ (或不超過0.9、0.8、0.7、0.6、0.5 $\mu\text{g/ml}$)之EC50值在表現人類CLDN18.2之細胞上誘導補體依賴性細胞毒性(CDC)，如藉由細胞毒性測定測量。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體及其片段能夠以不超過IMAB362之EC50值之80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%的EC50值在表現人類CLDN18.2之細胞上誘導CDC，如藉由細胞毒性測定測量。在某些實施例中，CDC用人類CLDN18.2中表現細胞株或人類CLDN18.2高表現細胞株確定。

【0185】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原

結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物能夠以不超過2 µg/ml (或不超過1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2或0.1 µg/ml)之EC50值在表現人類CLDN18.2之細胞上誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，如藉由ADCC報導基因測定測量。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物以不超過IMAB362之EC50值之80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或1%的EC50值或以IMAB362之總ADCC能力之至少120%、150%、180%或200%的總ADCC能力(例如，由在抗體濃度與ADCC活性程度之圖中觀察到之最大ADCC活性程度表示)在表現人類CLDN18.2之細胞上誘導ADCC，如藉由ADCC報導基因測定測量。在某些實施例中，ADCC用NUGC4細胞株、KATOIII細胞株、SNU-601細胞株、SNU-620細胞株或其相當細胞確定，該相當細胞之人類CLDN18.2蛋白表現量與NUGC4細胞株、KATOIII細胞株、SNU-601細胞株或SNU-620細胞株之人類CLDN18.2蛋白表現量相當或不超過NUGC4細胞株、KATOIII細胞株、SNU-601細胞株或SNU-620細胞株之人類CLDN18.2蛋白表現量，例如人類CLDN18.2中表現細胞株或人類CLDN18.2低表現細胞株。

【0186】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物能夠以不超過2 µg/ml (或不超過1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2或0.1 µg/ml)之EC50值在NUGC4細胞上誘導ADCC，如藉由ADCC報導基因測定測量。

【0187】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原

結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物與在具有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之人類CLDN18.2的位置D28、W30、V43、N45、Y46、L49、W50、R51、R55、E56、F60、E62、Y66、L72、L76、V79及R80處包含至少一或多個(例如，一個、兩個、三個或更多個)胺基酸殘基之抗原決定基結合。

【0188】如本文所用，術語「抗原決定基」係指抗體所結合之抗原上特定之一組原子或胺基酸。抗原決定基可包括直接接觸抗體之特定胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基。熟習此項技術者將認識到，無需過度實驗即可藉由確定抗體與本發明之抗體(例如融合瘤/嵌合或人類化抗體7C12、11F12、26G6、59A9、18B10及本文提供之任何嵌合及人類化變異體)是否競爭結合CLDN18.2抗原多肽來確定二者是否結合相同或重疊或相鄰之抗原決定基。

【0189】如本文所用，關於兩種抗原結合蛋白(例如抗體)之術語「競爭結合」係指一種抗原結合蛋白阻斷或減少另一種抗原結合蛋白與抗原(例如人類/小鼠CLDN18.2)之結合，如藉由競爭性結合測定確定。競爭性結合測定在此項技術中熟知，包括例如直接或間接放射免疫測定(RIA)、直接或間接酶免疫測定(EIA)及夾心競爭測定(參見例如Stahli等人, 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253)。通常，此類測定涉及使用與固體表面結合之純化抗原或帶有抗原之細胞、未標記之測試抗體及標記之參考抗體。競爭性抑制藉由確定在測試抗體存在下結合於固體表面或細胞之標記物之量來測量。通常測試抗體過量存在。若兩種抗體競爭結合於CLDN18.2，則兩種抗體結合於同一或重疊抗原決定基，或足夠接近於由另一抗體結合之抗原決定基之鄰近抗原決定基而發生位阻。通常，當競爭

性抗體過量存在時，其將測試抗體與共同抗原之特異性結合抑制(例如，降低)至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%、75-80%、80-85%、85-90%或更多。

【0190】 在某些實施例中，抗原決定基或抗體結合之抗原決定基中之胺基酸殘基可藉由突變抗原中之特定殘基，亦即CLDN18.2來確定。若抗體以相對於其與野生型CLDN18.2之結合顯著降低之程度結合具有突變之胺基酸殘基(例如突變為丙胺酸)之突變體CLDN18.2，則此將表明突變殘基直接參與抗體與CLDN18.2抗原之結合，或者當其與抗原結合時與抗體非常接近。此類突變殘基被認為在抗原決定基內，且抗體被認為與包含該殘基之抗原決定基特異性結合。如本文所用，結合水平顯著降低意謂，相對於抗體與野生型CLDN18.2之間的結合，抗體與突變體CLDN18.2之間的結合親和力(例如EC50、Kd或結合能力)降低大於10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。此類結合測量可使用此項技術已知及本文揭示之任何合適方法進行，例如但不限於KinExA測定及流動式細胞測量術。

【0191】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物對其中野生型CLDN18.2中之殘基經丙胺酸取代之突變體CLDN18.2表現出顯著較低之結合，且該殘基係選自由以下組成之群：人類CLDN18.2之D28、W30、V43、N45、Y46、L49、W50、R51、R55、E56、F60、E62、Y66、L72、L76、V79及R80。在某些實施例中，殘基為E56。在某些實施例中，殘基係選自由以下組成之群：W30、L49、W50、R55及E56。在某些實施例中，殘基係選自由以下組成之群：T41、N45、Y46、R51、F60、E62及R80。在某

些實施例中，殘基係選自由以下組成之群：D28、V43、N45、Y46、Y66、L72、L76及V79。

【0192】 在某些實施例中，相對於抗體與野生型CLDN18.2之間的結合，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物對包含人類CLDN18.2之E56A之突變體CLDN18.2表現出至少80%、90%、95%或99%或更多之結合降低。

【0193】 在某些實施例中，相對於抗體與野生型CLDN18.2之間的結合，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物對包含一或多個突變殘基之突變體CLDN18.2表現出至少50%、60%、70%、80%或90%之結合降低，該殘基係選自由以下組成之群：人類CLDN18.2之W30A、L49A、W50A、R55A及E56A。

【0194】 在某些實施例中，相對於抗體與野生型CLDN18.2之間的結合，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物對包含一或多個突變殘基之突變體CLDN18.2表現出至少30%、35%、40%、45%或50%之結合降低，該殘基係選自由以下組成之群：人類CLDN18.2之D28、V43、N45、Y46、Y66、L72、L76及V79。

【0195】 在某些實施例中，相對於抗體與野生型CLDN18.2之間的結合，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物對包含一或多個突變殘基之突變體CLDN18.2表現出至少10%、15%、20%、25%或30%之結合降低，該殘基係選自由以下組成之群：人類CLDN18.2之T41A、N45A、Y46A、R51A、F60A、E62A及R80A。

【0196】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物不結合A42及/或N45。

【0197】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體、其抗原結合片段及抗CLDN18.2抗體結合物能夠結合本文提供之抗原決定基，且在人類CLDN18.2中表現細胞株或人類CLDN18.2低表現細胞株中誘導ADCC或CDC活性。

【0198】

ii. 抗體變異體

本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物中之抗CLDN18.2抗體及其抗原結合片段亦涵蓋本文提供之抗體序列的各種類型之變異體。

【0199】 在某些實施例中，變異體包含表1中提供之1、2或3個CDR序列中之、一或多個FR序列中之、本文提供之重鏈或輕鏈可變區序列中之及/或恆定區(例如Fc區)中之一或多個修飾或取代。此類抗體變異體保留其親本抗體對CLDN18.2之特異性結合親和力，但具有由修飾或取代賦予之一或多種所需特性。例如，抗體變異體可具有提高之抗原結合親和力、提高之糖基化模式、降低之糖基化風險、降低之脫胺基作用、降低或增加之效應子功能、提高之FcRn受體結合、增加之藥代動力學半衰期、pH敏感性及/或與結合之相容性(例如，一或多個引入之半胱胺酸殘基)，僅舉幾例。

【0200】 可使用此項技術已知之方法，例如「丙胺酸掃描誘變」(參見例如Cunningham及Wells (1989) Science, 244:1081-1085)篩選親本抗體序列，以識別合適或較佳殘基進行修飾或取代。簡而言之，可識別目標殘基(例如，帶電殘基，如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且用中性或帶負電之胺基酸(例如，丙胺酸或聚丙胺酸)取代，且產生經修飾之抗體且篩選其感興趣之特性。若在特定胺基酸位置之取代顯示出感興趣之功能變化，則

上述位置可被識別為進行修飾或取代之潛在殘基。可藉由用不同類型之殘基(例如，半胱胺酸殘基、帶正電之殘基等)取代來進一步評估潛在之殘基。

【0201】

a)親和力變異體

親和力變異體保持親本抗體之CLDN18.2特異性結合親和力，或甚至具有優於親本抗體之提高之CLDN18.2特異性結合親和力。此項技術中已知之各種方法可用於實現此目的。例如，可使用噬菌體展示技術生成及表現抗體變異體(如Fab或scFv變異體)文庫，然後篩選其與人類CLDN18.2之結合親和力。亦如，計算機軟體可用於虛擬模擬抗體與人類CLDN18.2之結合，且識別抗體上形成結合界面之胺基酸殘基。此類殘基可避免進行取代以便防止結合親和力之降低，或作為取代之目標以實現較強結合。

【0202】 在某些實施例中，CDR序列、FR序列或可變區序列中之取代中之至少一個(或全部)包含保守取代。關於胺基酸序列之「保守取代」係指用具有類似生理化學特性之側鏈的不同胺基酸殘基置換胺基酸殘基。例如，可在具有疏水側鏈之胺基酸殘基(例如，Met、Ala、Val、Leu及Ile)之間，在具有中性親水側鏈之殘基(例如，Cys、Ser、Thr、Asn及Gln)之間，在具有酸性側鏈之殘基(例如，Asp、Glu)之間，在具有鹼性側鏈之胺基酸(例如，His、Lys及Arg)之間，或在具有芳族側鏈之殘基(例如，Trp、Tyr及Phe)之間進行保守取代。如此項技術中已知，保守取代通常不會引起蛋白質構象結構之顯著變化，且因此可保留蛋白質之生物活性。

【0203】 在某些實施例中，本文所提供之抗體或抗原結合片段包含

一或多個CDR序列及/或一或多個FR序列中之一或多個胺基酸殘基取代。
在某些實施例中，親和力變異體包含在一或多個CDR序列及/或FR序列中
總共不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個取代。

【0204】 在某些實施例中，抗CLDN18.2抗體及其抗原結合片段包
含1、2或3個CDR序列，其與表1中列出之一或多種CDR序列具有至少
80%（例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、
96%、97%、98%、99%）序列一致性，且同時以類似或甚至高於其親本抗
體之程度保持與CLDN18.2之結合親和力。

【0205】 在某些實施例中，抗CLDN18.2抗體及其抗原結合片段包
含一或多個可變區序列，該序列與SEQ ID NO: 23至SEQ ID NO: 29以及
SEQ ID NO: 37至SEQ ID NO: 48之一或多種可變區序列具有至少80%
（例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、
97%、98%、99%）序列一致性，且同時以類似或甚至高於其親本抗體之程
度保持與CLDN18.2之結合親和力。在一些實施例中，在選自SEQ ID
NO: 25至SEQ ID NO: 29以及SEQ ID NO: 37至SEQ ID NO: 48之序列中
總共有1至10個胺基酸經取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插
入或缺失發生在CDR之外之區域中（亦即，在FR中）。

【0206】

b)糖基化變異體

本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物中之抗CLDN18.2抗體及抗原結
合片段亦涵蓋糖基化變異體，可獲得其以增加或降低抗體或抗原結合片段
之糖基化程度。如本文所用，術語「糖基化」係指將聚糖如岩藻糖、木
糖、甘露糖或GlcNAc磷酸絲胺酸聚糖連接至蛋白質、脂質或其他有機分

子上之酶促過程。根據與聚糖連接之碳，糖基化可分為五類，包括：N-連接糖基化、O-連接糖基化、磷酸-糖基化、C-連接糖基化及糖基磷脂醯肌醇化。

【0207】 抗體之糖基化通常為N-連接或O-連接的。N-連接型係指碳水化合物化合物部分與天冬醯胺殘基(例如三肽序列如天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸中之天冬醯胺殘基，其中X為除脯胺酸外之任何胺基酸)之側鏈的連接。O-連接型糖基化係指糖N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中之一種與羥基胺基酸之連接，最常見地與絲胺酸或蘇胺酸之連接。

【0208】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體及抗原結合片段涵蓋具有改善之效應子功能之糖基化變異體，如ADCC或CDC。

【0209】 在某些實施例中，本文提供之抗體或其抗原結合片段為無岩藻糖基化的。術語「無岩藻糖基化」或「無岩藻糖基化的」係指連接至抗體之N-聚糖上之核心岩藻糖減少或消除。人類IgG抗體之大多數聚糖稱為G0、G1及G2，其為複雜雙觸角分子，其中核心岩藻糖殘基帶有零個、一個或兩個末端半乳糖。

【0210】 可使用此項技術已知之方法製備無岩藻糖基化抗體變異體，例如，描述於 US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki 等人 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki 等人 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。

【0211】 在某些實施例中，抗體糖基化變異體在抗體Fc中CH2區之Asn297位點為無岩藻糖基化的。Asn297係指位於Fc區中約297位之天冬醯胺殘基(Fc區殘基之EU編號)；然而，由於抗體中之微小序列變異，Asn297亦可能位於297位上游或下游約 ± 3 個胺基酸，亦即294位及300位之間。

【0212】 在某些實施例中，抗體糖基化變異體可藉由例如去除天然糖基化位點(例如藉由N297A取代)來獲得，使得N-連接糖基化位點之三肽序列或O-連接糖基化位點之絲胺酸或蘇胺酸殘基不再存在於抗體或Fc序列中。可替代地，在某些實施例中，抗體糖基化變異體可藉由在宿主細胞株中產生抗體而獲得，該宿主細胞株在將所選糖基團添加至抗體中成熟核心碳水化合物結構方面存在缺陷。

【0213】

c) 半胱胺酸工程改造變異體

本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物中之抗CLDN18.2抗體及抗原結合片段亦涵蓋半胱胺酸工程改造之變異體，其包含一或多個引入之游離半胱胺酸胺基酸殘基。

【0214】 游離半胱胺酸殘基係不為二硫橋鍵之一部分之半胱胺酸殘基。半胱胺酸工程改造之變異體可用於藉由例如馬來醯亞胺或鹵代乙醯基在工程改造之半胱胺酸位點處與例如細胞毒性及/或成像化合物、標記物或放射性同位素等結合。用於對經工程改造之抗體或抗原結合片段引入游離半胱胺酸殘基之方法為此項技術已知的，參見例如WO2006/034488。

【0215】

d) Fc變異體

本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物中之抗CLDN18.2抗體及抗原結合片段亦涵蓋Fc變異體，其在Fc區及/或鉸鏈區包含一或多個胺基酸殘基修飾或取代。

【0216】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物包含恆定區，該恆定區包含一或多個相對於野生型恆定區賦予增加之CDC或ADCC的胺基酸殘基取代或修飾。Fc區之CH2域中之某些胺基酸殘基可經取代以提供增強之ADCC活性，例如藉由增強Fc域對FcγRIIIA之親和力來提供增強之ADCC活性。藉由抗體工程改造改變ADCC活性之方法已在此項技術中描述，參見例如Shields RL.等人, J Biol Chem. 2001. 276(9): 6591-604；Idusogie EE.等人, J. Immunol. 2000. 164(8):4178-84；Steurer W.等人, J. Immunol. 1995, 155(3): 1165-74；Idusogie EE.等人, J. Immunol. 2001, 166(4): 2571-5；Lazar GA.等人, PNAS, 2006, 103(11): 4005-4010；Ryan MC.等人, Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 3009-3018；Richards JO等人, Mol. Cancer Ther. 2008, 7(8): 2517-27；Shields R. L.等人, J Biol Chem., 2002, 277: 26733-26740；Shinkawa T.等人, J Biol Chem., 2003, 278: 3466-3473。

【0217】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物包含一或多個胺基酸取代，其例如藉由改善或減少Clq結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)來改變補體依賴性細胞毒性(CDC)（參見例如，WO99/51642; Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO94/29351，其涉及Fc區變異體之其他實例）。

【0218】 在某些實施例中，本文提供之抗體或其抗原結合片段之恆

定區包含一或多個相對於SEQ ID NO: 49 (亦即野生型序列)之胺基酸殘基取代，其係選自由以下組成之群：L235V、F243L、R292P、Y300L、P396L或其任意組合。在某些實施例中，恆定區包含SEQ ID NO: 51之序列。

【0219】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物包含一或多個胺基酸取代，其改善與新生兒Fc受體(FcRn)之pH依賴性結合。此類變異體可具有延長之藥物動力學半衰期，因為其在酸性pH下與FcRn結合，使其避免在溶酶體中降解，且接著轉位且自細胞釋放出來。工程改造抗體及其抗原結合片段以提高與FcRn之結合親和力之方法為此項技術熟知的，參見例如Vaughn, D.等人, Structure, 6(1): 63-73, 1998；Kontermann, R.等人, Antibody Engineering, 第1卷, 第27章: Engineering of the Fc region for improved PK, 由Springer出版, 2010；Yeung, Y.等人, Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010)；及 Hinton, P. 等人, J. Immunol., 176:346-356 (2006)。

【0220】

iii. 抗原結合片段

本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物亦可包含抗CLDN18.2抗原結合片段。各種類型之抗原結合片段為此項技術中已知的，且可基於本文提供之抗CLDN18.2抗體產生，上述抗體包括例如CDR序列如表1中所示之示範性抗體及其不同變異體(如親和力變異體、糖基化變異體、Fc變異體、半胱胺酸工程改造之變異體等)。

【0221】 在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗原結合片段為雙特異抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫鍵穩定化Fv片段

(dsFv)、(dsFv)₂、雙特異性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定化雙特異抗體(ds雙特異抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙特異抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0222】各種技術可用於產生此類抗原結合片段。示例性方法包括完整抗體之酶促消化(參見例如Morimoto等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); 及Brennan等人, *Science*, 229:81 (1985)), 藉由宿主細胞如大腸桿菌進行重組表現(例如, 對於Fab、Fv及ScFv抗體片段), 自上文論述之噬菌體展示文庫中篩選(例如, 對於ScFv), 以及將兩個Fab'-SH片段化學偶聯以形成F(ab')₂片段(Carter等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。生產抗體片段之其他技術對熟練從業者而言將為顯而易見的。

【0223】在某些實施例中, 抗原結合片段為scFv。scFv之產生描述於例如WO93/16185; 美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。scFv可在胺基或羧基末端與效應蛋白融合以提供融合蛋白(參見例如, *Antibody Engineering* Borrebaeck編輯)。

【0224】在某些實施例中, 本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物中之抗CLDN18.2抗體及其抗原結合片段為二價、四價、六價或多價。如本文所用, 術語「價」係指在給定分子中存在指定數量之抗原結合位點。因此, 術語「二價」、「四價」及「六價」分別表示在抗原結合分子中存在兩個結合位點、四個結合位點及六個結合位點。任何大於二價之分子被視為多價的, 涵蓋例如三價、四價、六價等。

【0225】若兩個結合位點均對與相同抗原或相同抗原決定基之結合具有特異性, 則二價分子可為單特異性的。在某些實施例中, 此提供比單

價對應物更強之與抗原或抗原決定基之結合。類似地，多價分子亦可為單特異性的。在某些實施例中，在二價或多價抗原結合部分中，第一價結合位點及第二價結合位點在結構上相同(亦即具有相同序列)或在結構上不同(亦即儘管具有相同特異性但具有不同序列)。

【0226】 若兩個結合位點對不同之抗原或抗原決定基具有特異性，則二價亦可為雙特異性的。此亦適用於多價分子。例如，當兩個結合位點對第一抗原(或抗原決定基)為單特異性的，而第三結合位點對第二抗原(或抗原決定基)具有特異性時，則三價分子可為雙特異性的。

【0227】

雙特異性抗體

在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物為雙特異性的。如本文所用，術語「雙特異性」涵蓋具有多於兩種特異性之分子及具有多於兩種特異性之分子，亦即多特異性。在某些實施例中，本文提供之雙特異性抗體及其抗原結合片段能夠特異性結合CLDN18.2之第一及第二抗原決定基，或能夠特異性結合CLDN18.2及第二抗原。在某些實施例中，CLDN18.2之第一抗原決定基及第二抗原決定基彼此不同或不重疊。在某些實施例中，雙特異性抗體及其抗原結合片段可同時與第一抗原決定基及第二抗原決定基結合。在某些實施例中，第二抗原不同於CLDN18.2。

【0228】 在某些實施例中，第二抗原包含腫瘤抗原。如本文所用，「腫瘤抗原」係指腫瘤特異性抗原(例如為腫瘤細胞所特有且通常不在非腫瘤細胞上發現之抗原)、腫瘤相關抗原(例如在腫瘤及非腫瘤細胞中均發現但在腫瘤細胞中不同表現)及腫瘤新抗原(例如，由於改變蛋白質序列或

在兩個不相關序列之間產生融合蛋白之體細胞突變而在癌細胞中表現之抗原)。

【0229】

製備方法

在另一態樣中，本發明提供一種製備本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物之方法，其包含使抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段與用 ^{124}I 、 ^{123}I 或 ^{131}I 標記之碘化物在酶促或化學氧化劑之存在下反應。

【0230】 在一些實施例中，化學氧化劑為N-溴琥珀醯亞胺、氯甘脲或氯胺-T。

【0231】 在另一態樣中，本發明提供一種製備本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物之方法，其包含使抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段與螯合劑結合以獲得螯合劑-抗體結合物，以及使螯合劑-抗體結合物與金屬放射性核種如 ^{64}Cu 或 ^{89}Zr 反應。

【0232】 在一些實施例中，上述螯合劑包含DFO (去鐵胺)、DOTA (1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DTPA (NR-二仲乙基三胺五乙酸)、NOTA (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-乙酸)、TRITA (1,4,7,10-四氮雜環十三烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)；TETA (1,4,8,11-四氮雜環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)；及HETA (1,5,9,13-四氮雜環十六烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、EDTA (乙二胺四乙酸)、NETA ({4-[2-(雙-羧甲基胺基)-乙基]-7-羧甲基-[1,4,7]三氮雜環壬烷-1-基}-乙酸)、TACN-TM (N,N',N'',三(2-巰基乙基)1,4,7-三氮雜環壬烷)、TRAP (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-三[甲基(2-羧基乙基)次膦酸])、CP256,PCTA (3,6,9,15-四氮雜雙環[9.3.1]十五烷-1(15),11,13-三烯-3,6,9,-三乙酸)、卟啉、多胺、冠醚、雙縮胺基硫

脲、多肽及其衍生物。

【0233】

醫藥組合物

本發明進一步提供包含抗CLDN18.2抗體結合物及一或多種醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在某些實施例中，本文提供之醫藥組合物適用於非經腸投與，例如適用於推注、靜脈內注射或腫瘤內注射。在某些實施例中，醫藥組合物為單位劑量可注射形式。

【0234】 用於本文揭示之醫藥組合物的醫藥學上可接受之載劑可包括例如醫藥學上可接受之液體、凝膠或固體載劑、水性媒劑、非水性媒劑、抗微生物劑、等滲劑、緩衝液、抗氧化劑、麻醉劑、懸浮/分散劑、掩蔽劑或螯合劑、稀釋劑、佐劑、賦形劑或無毒輔助物質、此項技術中已知之其他組分或其各種組合。

【0235】 合適組分可包括例如抗氧化劑、填充劑、黏合劑、崩解劑、緩衝液、防腐劑、潤滑劑、調味劑、增稠劑、著色劑、乳化劑或穩定劑，如糖及環糊精。適合抗氧化劑可包括例如甲硫胺酸、抗壞血酸、EDTA、硫代硫酸鈉、鉑、過氧化氫酶、檸檬酸、半胱胺酸、硫代甘油、硫代乙醇酸、硫代山梨糖醇、丁基化羥基苯甲醚、丁基化羥基甲苯及/或沒食子酸丙酯。如本文所揭示，在包含如本文提供之抗體或抗原結合片段及結合物之組合物中包含一或多種抗氧化劑如甲硫胺酸，降低抗體或抗原結合片段之氧化。此氧化減少將防止或減少結合親和力之損失，由此提高抗體穩定性且使儲存壽命最大化。因此，在某些實施例中，提供包含一或多種本文揭示之抗體結合物及一或多種抗氧化劑如甲硫胺酸之組合物。

【0236】 為進一步說明，醫藥學上可接受之載劑可包括例如水性媒

劑如氯化鈉注射液、林格注射液、等滲葡萄糖注射液、無菌水注射液或葡萄糖及乳酸林格注射液，非水性媒劑如植物來源之不揮發油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油，抑菌或抑真菌濃度之抗微生物劑，等滲劑如氯化鈉或葡萄糖，緩衝液如磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液，抗氧化劑如硫酸氫鈉，局部麻醉劑如鹽酸普魯卡因，懸浮劑及分散劑如羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素或聚乙烯吡咯啉酮，乳化劑如聚山梨醇酯80 (TWEEN-80)，掩蔽劑或螯合劑如EDTA (乙二胺四乙酸)或EGTA (乙二醇四乙酸)、乙醇，聚乙二醇、丙二醇、氫氧化鈉、鹽酸、檸檬酸或乳酸。用作載劑之抗微生物劑可添加至多劑量容器中之醫藥組合物中，上述抗微生物劑包括苯酚或甲酚、汞劑、苯甲醇、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯及對羥基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯紫氯銨及苄索氯銨。適合賦形劑可包括例如水、生理鹽水、右旋糖、甘油或乙醇。適合無毒輔助物質可包括例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝劑、穩定劑、溶解性增強劑或如乙酸钠、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或環糊精之試劑。

【0237】 在某些實施例中，醫藥組合物調配成可注射組合物。可注射之醫藥組合物可以任何常規形式製備，例如液體溶液、懸浮液、乳液或適合產生之液體溶液、懸浮液或乳液之固體形式。注射用製劑可包括準備好用於注射之無菌及/或無熱原質溶液；準備好臨在使用之前與溶劑組合之無菌乾燥可溶性產品，如凍乾粉末，包括皮下片劑；準備好用於注射之無菌懸浮液；準備好臨在使用之前與媒劑組合之無菌乾燥不溶性產品；及無菌及/或無熱原質乳液。溶液可為水性或非水性的。

【0238】 在某些實施例中，單位劑量之非經腸製劑包裝在安瓿、小瓶或帶針頭之注射器中。所有用於非經腸投與之製劑均應無菌且無熱原

質，正如此項技術中已知及實踐的。

【0239】 在某些實施例中，藉由將本文揭示之抗體或抗原結合片段溶解在合適溶劑中來製備無菌凍乾粉末。溶劑可含有提高粉末或由粉末製備之復原溶液之穩定性的賦形劑或其他藥理學組分。可使用之賦形劑包括但不限於水、右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖漿、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他適合試劑。溶劑可含有緩衝液，如檸檬酸鹽、磷酸鈉或磷酸鉀或熟習此項技術者已知之其他此類緩衝液，在一個實施例中，pH值為約中性。隨後無菌過濾溶液，接著在熟習此項技術者已知之標準條件下凍乾，得到所需製劑。在一個實施例中，將所得溶液分配至小瓶中以凍乾。每個小瓶可含單劑量或多劑量之抗CLDN18.2抗體結合物或其組合物。用少量高於一個劑量或一組劑量所需之量(例如，約10%)過量填充小瓶為可接受的以促進準確之樣品提取及準確之給藥。凍乾粉末可在適當條件下儲存，如在約4°C至室溫下。

【0240】 用注射用水重構凍乾粉提供用於非經腸投與之製劑。在一個實施例中，為重構，將無菌及/或無熱原質水或其他合適液體載劑添加至凍乾粉中。精確量視給定之所選療法而定，且可憑經驗確定。

【0241】

治療及診斷CLDN18.2相關病症之方法

本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物可用於診斷或治療CLDN18.2相關病症之方法。在某些實施例中，CLDN18.2相關病症為癌症。在某些實施例中，CLDN18.2相關病症為表現CLDN18.2之癌症。

【0242】 在某些實施例中，癌症係選自胃癌、肺癌、支氣管癌、骨癌、肝癌及膽管癌、胰臟癌、乳癌、肝癌、卵巢癌、睪丸癌、腎癌、膀胱

癌、頭頸癌、脊柱癌、腦癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、結腸癌、結直腸癌、直腸癌、肛門癌、食道癌、胃腸癌、皮膚癌、前列腺癌、垂體癌、胃癌、陰道癌、甲狀腺癌、膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生異常症候群、肉瘤、畸胎瘤及腺癌。

【0243】 癌症之實例包括但不限於非小細胞肺癌(鱗狀/非鱗狀)、小細胞肺癌、腎細胞癌、結直腸癌、結腸癌、卵巢癌、乳癌(包括基底乳癌、導管癌及小葉乳癌)、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、黑色素瘤、骨髓瘤、蕈樣真菌病、默克爾細胞癌、肝細胞癌(HCC)、纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、成骨肉瘤及其他肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、淋巴惡性腫瘤、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲狀腺髓樣癌、甲狀腺乳頭狀癌、嗜鉻細胞瘤、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、髓樣癌、支氣管癌、肝癌、膽管癌、絨毛膜癌、維爾姆斯瘤、子宮頸癌、睪丸腫瘤、精原細胞瘤、經典霍奇金氏淋巴瘤(CHL)、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、富含T細胞/組織細胞之B-細胞淋巴瘤、急性淋巴細胞白血病、急性髓細胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性髓細胞(粒細胞)白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴細胞白血病、真性紅細胞增多症、肥大細胞源性腫瘤、EBV陽性及陰性PTLD及瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、漿母細胞淋巴瘤、結外NK/T細胞淋巴瘤、鼻咽癌、HHV8相關原發性滲出性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、華氏巨球蛋白血症、重鏈病、骨髓增生異常症候群、毛細胞白血病及骨髓增生異常、原發性CNS淋巴瘤、脊髓軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、

成血管細胞瘤、聽神經瘤、少突膠質細胞瘤、腦膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤。

【0244】如本文所用，「表現CLDN18.2之癌症」係指涉及表現CLDN18.2之癌細胞之任何癌症或腫瘤。表現CLDN18.2之癌症之實例包括胃癌、食道癌、胰臟癌、肺癌如非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌(SCLC)、卵巢癌、結腸癌、結直腸癌、胃腸道間質瘤(GIST)、胃腸道類癌瘤、直腸癌、肛門癌、膽管癌、小腸癌、闌尾癌；前列腺癌、腎癌(例如腎細胞癌)、肝癌、頭頸癌及膽囊癌及其轉移，例如胃癌轉移如克魯肯伯格腫瘤、腹膜轉移及淋巴結轉移。

【0245】在某些實施例中，表現CLDN18.2之癌症可為腺癌，例如晚期腺癌。在某些實施例中，癌症係選自胃、食道、胰管、膽管、肺及卵巢之腺癌。在某些實施例中，表現CLDN18.2之癌症包含胃癌，食道癌，特別是食管下端癌，食管-胃結合部癌及胃食管癌。

【0246】

偵測、可視化、診斷、分期及監測CLDN18.2相關病症之方法

本文提供之抗體結合物可用於偵測CLDN18.2表現，特別是以無創方式進行活體內偵測。

【0247】本文提供之抗體結合物亦可用於可視化、診斷、分期及監測CLDN18.2相關病症。在某些實施例中，CLDN18.2相關病症為癌症。在某些實施例中，CLDN18.2相關病症為表現CLDN18.2之癌症。

【0248】本文提供之抗體放射性核種結合物可活體內使用以提供關於(i) CLDN18.2之表現，(ii) CLDN18.2之分佈及(iii) CLDN18.2之表現或分佈之變化的資訊。與目前可用之CLDN18.2診斷方法如免疫組織化學

(IHC)相比，本文提供之抗體放射性核種結合物在無創治療、可量化全身評估以及多個時間點之重複給藥及評估方面具有優勢。

【0249】 本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物可與活體內核成像模式一起使用，以使個體身體之形貌內之目標細胞可視化。除診斷與CLDN18.2表現相關之癌症外，本文提供之抗CLDN18.2抗體放射性核種結合物亦可用於根據本文提供之方法分期及監測癌症進展。

【0250】 可根據本文描述之方法使用之合適活體內核成像方法包括但不限於正電子發射斷層掃描(PET)、PET/CT組合成像儀及單光子發射計算機斷層掃描(SPECT)。

【0251】 在一個態樣中，本發明提供一種獲取個體中感興趣部位之圖像之方法，該方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及

b)使上述個體之上述感興趣部位經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；

c)識別上述個體中來自放射性核種之可偵測信號；

d)生成上述可偵測信號之圖像，從而獲得上述個體中上述感興趣部位之圖像。

【0252】 在一些實施例中，上述感興趣部位為表現或懷疑表現claudin 18.2之部位。

【0253】 在一些實施例中，上述感興趣部位患有或懷疑患有腫瘤。在一些實施例中，感興趣部位可為全身、軀幹、頭部或四肢。

【0254】 在另一態樣中，本發明提供一種以無創方式偵測或可視化

個體中claudin 18.2表現之方法，上述方法包含以下步驟：

- a)向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及
- b)使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；
- c)識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號；
- d)基於所識別之可偵測信號確定或可視化上述個體之上述感興趣部位中之claudin18.2表現。

【0255】 在一些實施例中，本文提供之CLDN18.2抗體結合物可經靜脈內注射至個體中。在注射後某個時間段後，可藉由PET掃描個體。

【0256】 在某些實施例中，該方法亦包含使個體經歷X射線計算機斷層掃描(CT)，以獲得所研究之身體部位之切片的圖像。在某些實施例中，可獲得CT及PET之合併圖像以顯示CLDN18.2在身體參考框架頂部之表現及分佈。

【0257】 在一些實施例中，上述方法進一步包含向被識別為在上述感興趣部位具有claudin18.2表現之個體投與治療有效量之抗claudin 18.2療法。

【0258】 抗claudin 18.2療法可為任何靶向CLDN18.2之治療劑，包括但不限於抗CLDN18.2抗體、抗CLDN18.2抗體-藥物結合物、靶向CLDN18.2之小分子化合物、靶向CLDN18.2之核酸或靶向CLDN18.2之細胞療法。

【0259】 在一些實施例中，上述方法進一步包含基於所識別之可偵測信號確定在上述個體之上述感興趣部位中claudin18.2表現之分佈。

【0260】 在一些實施例中，上述方法進一步包含確定在上述個體之

上述感興趣部位中claudin18.2表現之異質性。

【0261】 在一些實施例中，上述感興趣部位為腫瘤。

【0262】 在另一態樣中，本發明提供一種以無創方式監測個體之治療功效、對治療之反應性或抗性或復發或轉移之發展的方法，其中上述個體已接受一個治療期之治療，上述方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及

b)使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；

c)識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號；

d)基於所識別之可偵測信號確定上述個體之感興趣部位中之治療後claudin18.2表現；

e)將治療後claudin18.2表現量或分佈分別與在上述治療期之前自上述個體獲得之基線claudin18.2表現量或分佈進行比較以確定上述個體中claudin18.2表現量或分佈之治療後變化；以及

f)基於步驟(e)中確定之變化確定治療功效、對治療之反應性或抗性或復發或轉移之發展。

【0263】 在一些實施例中，基線claudin18.2表現量或分佈使用類似方法確定。

【0264】 在一些實施例中，基線claudin18.2表現量或分佈在治療期之前(亦即治療前)藉由以下來確定：向上述個體投與有效量之本文提供之上述抗體結合物及/或本文提供之上述醫藥組合物；以及使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT，識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號，且基於所識別之可偵測信號確定上述個體之感

興趣部位中基線claudin18.2表現。

【0265】 在一些實施例中，claudin 18.2表現量或擴散之增加表明治療功效降低、對治療之反應性降低或存在抗性或存在復發。在一些實施例中，轉移可藉由claudin 18.2表現擴散至claudin 18.2表現先前不可偵測之部位來指示。

【0266】 在一些實施例中，上述個體患有癌症。

【0267】 在一些實施例中，用於確定基線claudin 18.2表現之感興趣部位與用於確定治療後claudin 18.2表現之感興趣部位相同或至少相當。當感興趣部位與另一個感興趣部位屬於相同類型之組織或位於相同之病變內時，其為可比的。

【0268】 在一些實施例中，用於確定基線claudin 18.2表現之感興趣部位亦可不同於用於確定治療後claudin 18.2表現之感興趣部位。

【0269】

治療方法

在另一態樣中，提供治療個體中將受益於調節CLDN18.2活性之疾病或病症之方法，該方法包含將治療有效量之本文提供之CLDN18.2抗體結合物及/或醫藥組合物投與於有此需要之個體。

【0270】 在某些實施例中，疾病或病症為CLDN18.2相關疾病或病症。在一些實施例中，CLDN18.2相關疾病或病狀為癌症。在一些實施例中，CLDN18.2相關疾病或病症為表現CLDN18.2之癌症。

【0271】 在某些實施例中，CLDN18.2抗體結合物包含治療性放射性核種。

【0272】 在某些實施例中，治療性放射性核種係選自由以下組成之

群： ^{111}In 、 $^{111\text{m}}\text{In}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{199}Au 及 ^{211}Pb 。

【0273】在某些實施例中，治療性放射性核種係選自由以下組成之群： ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{153}Sm 、 ^{223}Ra 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{166}Ho 。

【0274】本文提供之CLDN18.2抗體結合物之治療有效量將視此項技術已知之各種因素而定，例如個體之體重、年齡、既往病史、當前藥物、健康狀況及交叉反應之可能性、過敏、敏感性和不良副作用，以及投與途徑及疾病發展程度。如由此等及其他情況或要求所指示，此項技術之一般技術人員(例如，醫生或獸醫)可按比例減少或增加劑量。本文揭示之CLDN18.2抗體結合物可藉由此項技術已知之任何途徑投與，例如非經腸(例如，皮下、腹膜內、包括靜脈內輸注在內之靜脈內、肌肉內或皮內注射)。

【0275】在一些實施例中，該方法進一步包含向個體投與治療有效量之本文提供之CLDN18.2抗體結合物。

【0276】在某些實施例中，個體被識別為具有表現CLDN18.2之癌細胞。CLDN18.2在癌細胞上之存在及/或表現量可藉由此項技術已知之各種方法來確定，如定量螢光細胞術、免疫組織化學(IHC)、qPCR、逆轉錄酶PCR、微陣列、SAGE、FISH等。亦可基於本文提供之方法確定個體中CLDN18.2之存在及/或表現量。

【0277】在某些實施例中，已使用本文提供之方法將個體診斷為患

有表現CLDN18.2之癌症。

【0278】 在某些實施例中，已使用本文提供的包含本文提供之診斷性放射性核種之抗體結合物將個體診斷為患有表現CLDN18.2之癌症。

【0279】 在一些實施例中，本文揭示之CLDN18.2抗體結合物可單獨投與或與一或多種另外之治療手段或藥劑組合投與。例如，本文揭示之CLDN18.2抗體結合物可與第二治療劑組合投與，例如化學治療劑、抗癌藥、放射療法、免疫療法、抗血管生成劑、靶向療法、細胞療法、基因療法、激素療法、姑息治療、用於治療癌症之手術(例如，腫瘤切除術)或一或多種止吐藥或其他針對化學治療引起之併發症之治療。

【0280】 在此等實施例之某些中，本文揭示之CLDN18.2抗體結合物與一或多種另外之治療劑組合投與，且在此等實施例之某些中，CLDN18.2抗體結合物及另外之治療劑可作為相同醫藥組合物之一部分投與。然而，與另一種治療劑「組合」投與之CLDN18.2抗體結合物不必與該藥劑同時投與或在與該藥劑相同之組合物中投與。本文使用短語「組合」時，在另一種藥劑之前或之後投與之CLDN18.2抗體結合物被視為與該藥劑「組合」投與，即使CLDN18.2抗體結合物及第二藥劑經由不同途徑投與。在可能之情況下，與本文揭示之抗體或抗原結合片段組合投與之另外之治療劑根據另外之治療劑之產品資訊表中列出的時間表投與，或根據Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 第57版; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 第57版(2002年11月))或此項技術熟知之方案投與。

【0281】

套組

在另一態樣中，本發明提供包含本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物或本文提供之組合物的套組。

【0282】 在一些實施例中，套組可用於偵測個體中CLDN18.2之存在或量或分佈，或可用於本文提供之診斷方法。

【0283】 在一些實施例中，套組可用於治療個體中表現CLDN18.2之癌症，或可用於本文提供之治療方法。

【0284】 在一些實施例中，套組包含第一組合物及第二組合物，上述第一組合物包含本文提供之第一抗CLDN18.2抗體結合物，上述第一抗CLDN18.2抗體結合物包含本文揭示之治療性放射性核種，上述第二組合物包含本文提供之第二抗CLDN18.2抗體結合物，上述第二抗CLDN18.2抗體結合物包含本文揭示之診斷性放射性核種。在一些實施例中，治療性放射性核種係選自由以下組成之群： ^{111}In 、 $^{111\text{m}}\text{In}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{199}Au 及 ^{211}Pb ，及/或診斷性放射性核種係選自由以下組成之群： ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{154}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 及 ^{225}Ac 。在一些實施例中，第一抗CLDN18.2抗體及第二抗CLDN18.2抗體相同或不

同。在一些實施例中，第一及第二抗CLDN18.2抗體均包含重鏈可變區及輕鏈可變區，該重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 19序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 21序列之HCDR3，該輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 14序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 16序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 18序列之LCDR3。

【0285】 在一些實施例中，套組用於本文提供之方法中。

【0286】 在一些實施例中，本發明提供包含本文提供之抗體或其抗原結合片段及第二治療劑之套組。該套組可用於治療、預防及/或改善CLDN18.2相關疾病。

【0287】 在另一態樣中，本發明提供本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物或本文提供之組合物在製備用於本文提供之方法之藥物或診斷產品中的用途。

【0288】 在某些實施例中，套組可進一步包含能夠藉由一些其他途徑遞送套組組分之裝置，例如，用於如非經腸遞送之應用之注射器為用於將組合物注射至個體體內之注射器。在某些實施例中，本文提供之抗CLDN18.2抗體結合物可以預填充注射器或自動注射筆之形式提供，上述預填充注射器或自動注射筆含有抗體之無菌、液體製劑或凍乾製劑(例如，Kivitz等人, Clin. Ther. 2006, 28:1619-29)。

【0289】 套組組分可包裝在一起或分成兩個或更多個容器。在一些實施例中，容器可為含適合重構之組合物之無菌、凍乾製劑之小瓶。套組亦可含有一或多種適用於重構及/或稀釋其他試劑之緩衝液。可使用之其他容器包括但不限於袋、托盤、盒、管等。套組組件可在容器內無菌包裝及保持。可包括之另一個組件為該套組之使用說明。

【0290】**實例**

雖然本發明已參照特定實施例(其中一些為較佳實施例)具體地顯示及描述，但熟習此項技術者應理解，可在其中進行形式及細節上之各種改變而不背離如本文揭示之本發明之精神及範圍。

【0291】**實例1 介紹**

一系列研究表明，CLDN18.2作為胃癌靶向治療之新目標具有廣闊之應用前景。以精準治療為目標，如何最大化潛在受益者以及如何快速及全面地評價CLDN18.2陽性胃癌患者之分子病理特徵係亟待解決之問題。

【0292】 解決問題意味著對CLDN18.2之偵測技術提出更高之要求。然而，CLDN18.2之偵測仍然存在很多侷限性。

【0293】 (1)單一偵測方法。目前，商業抗體僅用於組織石蠟切片、冰凍組織切片免疫組織化學(IHC)偵測。由於辨別力差及靈敏度低，其無法區分CLDN18.2或CLDN18.1 (Claudin18之另一種剪接變異體)，因為CLDN18.2及CLDN18.1之胺基酸序列高度同源(91%之胺基酸序列相同)。

【0294】 (2)偵測方法為侵入性的。單一偵測方式導致CLDN18.2偵測樣本僅限於組織切片，且樣本採集具有侵入性且繁瑣，對患者之要求較高。

【0295】 (3)偵測樣本異質性：晚期胃癌異質性顯著。吾人發現CLDN18.2之組織表現空間及強度可能存在異質性，且其組織及液體生檢樣本可能存在異質性。晚期患者常規病理分子診斷樣本以內鏡生檢樣本為主，組織含量較少且採樣部位有限；因此，由於CLDN18.2表現之異質

性，單個內鏡組織樣本偵測可能錯過一些潛在受益者。

【0296】 (4)靜態試驗結果：研究表明，在藥物治療之前及之後，目標表現強度及空間分佈，腫瘤組織免疫微環境狀態存在顯著差異，影響後續治療功效。由於採樣及偵測方法之限制，難以支持CLDN18.2動態監測之探索。因此，針對此等問題，最佳解決方案係探索及整合CLDN18.2無創、全面、即時動態偵測技術以實現對所有病灶之全面評價，及結合療效總結潛在受益者特徵，且指導診斷及治療。

【0297】 因此，利用現代分子成像技術全面、無創、即時及動態之特點，開發高特異性之分子探針對CLDN18.2之診斷及後續免疫檢查點抗體反應之評價具有重要意義。雖然聚焦HER2陽性胃癌之核素分子探針很多，且技術相對成熟，但目前國內外對CLDN18.2核素探針之報導仍屬空白。本發明以CLDN18.2靶向單株抗體18B10為例，使用下一代核素 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 標記18B10抗體，且活體內研究表明其在CLDN18.2高表現腫瘤中具有顯著之高攝取，此表明核素標記之18B10抗體作為靶向CLDN18.2之特異性探針係一種潛在之腫瘤免疫治療篩選、治療過程監測及功效評價之成像劑。

【0298】 本發明至少部分提供標記CLDN18.2靶向單株抗體(以18B10為例)之新一代核素 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 及其製備方法及應用。

【0299】 本發明構思如下： ^{124}I ($T_{1/2}=4.2$ d)、 ^{64}Cu ($T_{1/2}=12.7$ h)、 ^{89}Zr ($T_{1/2}=78.4$ h)係新型固體靶PET核素，臨床應用前景廣泛。與 ^{18}F ($T_{1/2}=110$ 分鐘)及 ^{11}C ($T_{1/2}=20.4$ 分鐘)相比， $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 之半衰期相對長，有利於放射性核種之長期成像研究及運輸，且肝攝取低，有利於偵測肝病變。僅與抗原分子上之一個抗原決定基(抗原決定簇)結合之單株抗體

可用作研究抗原結構及功能且闡明機制之分子探針。使用核素標記之單株抗體容易確定生物大分子(蛋白質、核酸、酶等)在活體內之位置及分佈。

【0300】 為實現本發明之目的，在第一態樣中，本發明提供一種新一代核素標記之CLDN18.2靶向單株抗體，其為放射性核種 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 標記之CLDN18.2靶向單株抗體。

【0301】 在第二態樣中，本發明提供一種 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2靶向單株抗體(以18B10為例)之製備方法。NBS法將 ^{124}I 標記至單株抗體分子結構中苯基羥基基團之鄰對位，該方法包括：將0.5-1.5 mL 0.1 M pH 7.2 PB緩衝液、0.5-10 mg 18B10及6-120 μg N-溴琥珀醯亞胺添加至0.5-1.0 mL 25-90 KBq/ μL Na^{124}I 溶液中，且在37°C下培養60秒，然後添加0.05-0.2 mL 10%人類血清白蛋白終止反應；最終反應溶液藉由PD-10管柱純化以得到目標產物。

【0302】 $^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 標記之CLDN18.2靶向單株抗體採用雙官能螯合劑實現(以18B10為例)：向濃度為2-5 mg/mL之18B10溶液中添加相當於6莫耳單株抗體之DFO，且用去離子0.1 M碳酸氫鈉溶液調節反應體系pH值至8.5；藉由在4-37°C下反應4-24小時得到DFO-18B10。將15 μg -2 mg標記前驅體添加至0.1-1.0 mL 0.1 M pH 5.5之乙酸鈉溶液中，然後添加25-100 MBq新鮮 $^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 溶液，且將pH值調至7.0；將溫度控制在40°C，持續30分鐘；最終反應溶液藉由PD-10管柱純化以得到目標產物。

【0303】 當標記率大於95%且藉由PD-10管柱純化後，目標產物之放射化學純度為98.76%。

【0304】 使用前，先用0.01 M pH 7.4 PBS溶液平衡PD-10管柱，每次添加5 mL PBS，以重力流速乾燥管柱，重複5次；然後用0.01 M pH

7.4 PBS溶液純化目標產物。

【0305】 ^{124}I -18B10之活體外穩定性分析表明，其可在0.01 M pH 7.4 PBS溶液中於25℃下保持良好之穩定性48小時，且放射化學純度為97.89±0.05%。

【0306】 在第三態樣中，本發明提供 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2靶向單株抗體(以18B10為例)在製備靶向CLDN18.2之腫瘤成像劑及治療藥物中之應用。

【0307】 在第四態樣中，本發明提供 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2靶向單株抗體(以18B10為例)在製備PET/CT分子成像探針中之應用。

【0308】 在第五態樣中，本發明提供一種靶向CLDN18.2之腫瘤顯像劑，其包含核素標記之CLDN18.2靶向單株抗體。

【0309】 新一代核素標記單株抗體(^{124}I -18B10)可特異性結合腫瘤細胞表面上之CLDN18.2；正常小鼠除血液外無特異性器官及組織分佈；在攜帶PDX之小鼠之PET成像研究中， ^{18}F -FDG攝取在CLDN18.2陽性及CLDN18.2陰性荷瘤模型中均非常低，如圖4所示。 ^{124}I -18B10在CLDN18.2陽性之攜帶PDX之小鼠中的分佈隨時間動態變化：60小時之腫瘤部位攝取信號較2小時顯著增加；在120小時時，心臟血池中之攝取信號消失，且僅能觀察到腫瘤中之信號。在CLDN18.2陰性之攜帶PDX之小鼠中， ^{124}I -18B10在腫瘤部位無特異性積累，且在CLDN18.2陽性之攜帶PDX之小鼠中， ^{124}I -IgG無特異性積累。此等結果表明 ^{124}I -18B10探針在CLDN18.2陽性腫瘤中特異性積累，且具有高靈敏度及特異性之特點。其未來可用作成像劑以無創偵測患者腫瘤中CLDN18.2之表現。

【0310】 總之，本發明至少具有以下優點及有益效果：本發明提供

之新型PET分子探針 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ -CLDN18.2靶向單株抗體具有穩定之特性，良好之成像效果，高親和力，及對CLDN18.2之功能活性，且有望用於即時及無創監測全身病變中CLDN18.2之表現，監測同一病變及不同病變中CLDN18.2表現之異質性，以及觀察治療期間CLDN18.2表現之變化，以便篩選患者，監測療效，預警耐藥性及/或復發及轉移，且實現靶向腫瘤藥物之個體化及精準治療。

【0311】 在本發明中，使用下一代PET核素 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ ，此可實現對單株抗體之標記，且對單株抗體之活性影響很小；此外，肝非特異性攝取低，此有利於肝病變之偵測；且全身背景低，此具有良好之腫瘤與非腫瘤比例且有利於腫瘤病變之觀察。

【0312】

實例2 靶向CLDN18.2之新一代核素標記單株抗體(以 ^{124}I -18B10為例)之製備

研究中使用之CLDN18.2靶向單株抗體18B10由MabSpace Biosciences (Suzhou) Co., Ltd.提供，其與人類及小鼠CLDN18.2均有交叉反應，且可在小鼠中測試以進行臨床前研究。PD-10預裝凝膠管柱購自GE (美國)。

【0313】 藉由NBS反應製備 ^{124}I -18B10：將0.8 mL 0.1 M pH 7.2 PB緩衝液、0.1 mL (29.2 mg/mL) 18B10單株抗體溶液(用 H_2O 製備)及36 μg NBS依次添加至1.0 mL 59.2 KBq/ μL Na^{124}I 溶液中，且在37°C下培養60秒，然後添加0.1 mL 10%人類血清白蛋白終止反應；最終反應溶液藉由PD-10管柱純化以得到目標產物。

【0314】 使用前，先用0.01 M pH 7.4 PBS溶液平衡PD-10管柱，每

次添加5 mL PBS，以重力流速乾燥管柱，重複5次；然後用0.01 M pH 7.4 PBS溶液純化目標產物。

【0315】 Radio-TLC及Radio-HPLC用於確定放射性標記率及放射化學純度。Radio-TLC偵測：將2 μ L放射性為37-74 kBq(1-2 μ Ci)之游離Na¹²⁴I及純化之¹²⁴I-18B10添加至20 μ L飽和EDTA中。將上述溶液2 μ L自新華1號濾紙底部1 cm處滴下且置於生理鹽水顯影系統中。完全顯影後，取出濾紙且乾燥以用於Radio-TLC偵測。Radio-HPLC偵測：將放射性為37-74 kBq(1-2 μ Ci)之2 μ L游離Na¹²⁴I及純化之¹²⁴I-18B10稀釋至50 μ L 0.01 M pH 7.4 PBS中以用於Radio-HPLC分析。分析條件：Agilent Bio SEC-3凝膠過濾/體積排阻層析管柱，流速1 mL/min，移動相0.01 M pH 7.4 PBS。

【0316】 目標產物¹²⁴I-18B10之放射性標記率及放射化學純度分別為97.94%及98.76%。目標產物¹²⁴I-18B10在PBS中48小時後放射化學純度保持在約98% (圖1)。

【0317】

實例3 靶向CLDN18.2之新一代核素標記單株抗體(以¹²⁴I-18B10為例)之攝取

藉由將CLDN18.2轉染至MKN45細胞且篩選，獲得高CLDN18.2表現之MKN45-CLDN18.2高細胞株。MKN45細胞用作陰性對照細胞。將接種細胞在24孔盤中均勻培養隔夜以使其完全貼壁。第二天，添加1 mCi ¹²⁴I-18B10或¹²⁴I-hIgG，且分別培養10分鐘、30分鐘、60分鐘及120分鐘。在阻斷組中添加0.5 mg/孔冷前驅體18B10以阻斷攝取信號。培養後，用PBS洗滌細胞三次，且收集裂解物。用 γ 計數器偵測及分析攝取信號。

【0318】 結果(圖2)表明，MKN45-CLDN18.2高細胞在10分鐘時顯示出隨時間增加之高 ^{124}I -18B10攝取率。當添加冷前驅體進行阻斷時，攝取率顯著下降，此表明攝取信號係CLDN18.2特異性的。MKN45-CLDN18.2高細胞對 ^{124}I -hIgG之攝取及MKN45細胞對 ^{124}I -18B10之攝取均低。

【0319】

實例4 靶向CLDN18.2之新一代核素標記單株抗體(以 ^{124}I -18B10為例)在正常小鼠中之生物分佈

經由尾靜脈將 ^{124}I -18B10 (0.74 MBq，200 μL)注射至正常昆明小鼠中。注射後2小時、24小時、60小時、120小時分離小鼠之心、肝、肺、腎、脾、胃、骨、肌肉、大腸、小腸、腦、血液及其他器官及組織。研磨後，藉由 γ 計數器偵測及分析攝取信號，且得到 ^{124}I -18B10探針之ID%/g。

【0320】 在正常小鼠中(圖3)，血液攝取在所有時間點均最高。除血液外，2小時時肝、腎、肺、脾之攝取高於其他器官及組織之攝取。所有器官之攝取隨著時間之推移而減少。與血液相比，其他器官之攝取往往較低。

【0321】

實例5 靶向CLDN18.2之新一代核素標記單株抗體(以 ^{124}I -18B10為例)在攜帶PDX腫瘤之小鼠中之PET成像

藉由免疫組織化學(IHC)方法，選擇CLDN18.2陽性PDX (陽性強度3+)及CLDN18.2陰性PDX進行接種。將所有腫瘤組織皮下注射至裸鼠右下肢。當PDX腫瘤直徑為0.8 cm時，將荷瘤小鼠分組。將CLDN18.2陽性之攜帶PDX之小鼠分為三組： ^{18}F -FDG組、 ^{124}I -18B10組及 ^{124}I -hIgG組。

此三組分別經由尾靜脈注射 ^{18}F -FDG、18.5 MBq ^{124}I -18B10及18.5 MBq ^{124}I -hIgG。CLDN18.2陰性之攜帶PDX腫瘤之小鼠亦分為相同之三組。在注射後2小時、60小時及120小時，用異氟醚(2%異氟醚-30%氧氣/空氣)麻醉動物，且在Micro PET/CT上進行成像。

【0322】 ^{18}F -FDG攝取在CLDN18.2陽性及CLDN18.2陰性荷瘤模型中均非常低，如圖4所示。 ^{124}I -18B10在CLDN18.2陽性之攜帶PDX之小鼠中之分佈隨時間動態變化：在2小時時，在心臟血池及CLDN18.2陽性腫瘤部位偵測到攝取信號；在60小時時，心臟血池中之攝取信號顯著減少，而在腫瘤中攝取信號增加；在120小時時，心臟血池中之攝取信號消失，且僅能觀察到腫瘤中之信號。 ^{124}I -18B10在CLDN18.2陰性之攜帶PDX之小鼠之所有組織及腫瘤中在不同時間點之攝取信號非常相似，此說明在CLDN18.2陰性腫瘤中無特異性積累。作為陰性對照，在每個時間點，發現 ^{124}I -IgG在CLDN18.2陽性之攜帶PDX之小鼠中之攝取信號在心臟血池中而非在腫瘤中高。此等結果表明 ^{124}I -18B10探針在CLDN18.2陽性腫瘤中特異性積累，且在長時間(120小時)成像後仍有顯著信號。其具有高靈敏度及特異性之特點，且未來可用作成像劑以無創偵測患者腫瘤中CLDN18.2之表現。

【0323】 本發明提供之新一代核素 $^{124}\text{I}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}$ 標記之CLDN18.2靶向單株抗體具有穩定之特性，良好之成像效果，高親和力，及對CLDN18.2之功能活性，且有利於CLDN18.2陽性腫瘤病變之診斷及準確分期。臨床前動物研究證實，其具有成為應用前景良好之靶向CLDN18.2成像劑之潛力。

【0324】

實例6：經由定點誘變對與CLDN18.1不同之CLDN18.2胺基酸進行選定抗體之抗原決定基作圖

1. 人類CLDN18.2-mRFP及人類CLDN18.1-mRFP構築體之生成

編碼人類CLDN18.1 (胺基酸1-261，SEQ ID NO: 31)-mRFP1 (胺基酸1-225)及人類CLDN18.2 (胺基酸1-261，SEQ ID NO: 30)-mRFP1 (胺基酸1-225)之cDNA在活體外合成(SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 53分別是胺基酸序列)。然後按照製造商之說明，使用Syno組裝混合試劑(Synbio)藉由同源重組方法將PCR產物選殖至pcDNA3.1 (+)載體中。使用QIAGEN Plasmid Mega套組(QIAGEN)純化質體。

【0325】根據人類CLDN18.1及CLDN18.2之序列(Genbank登錄號：剪接變異體1 (CLDN18.1)：NP_057453，NM_016369，及剪接變異體2 (CLDN18.2)：NM_001002026，NP_001002026)，8個不同之胺基酸位於28-70之間，此可能為與人類CLDN18.2而非CLDN18.1特異性結合之決定因素。使用上面產生之野生型人類CLDN18.2-mRFP質體作為模板，用引子產生整合序列之兩個片段。使用引子藉由重疊PCR擴增在指定位置處單個胺基酸變為人類CLDN18.1之胺基酸的人類CLDN18.2-mRFP變異體。特定突變位於Q29M、N37D、A42S、N45Q、Q47E、E56Q、G65P及L69I。使用引子藉由重疊PCR擴增在指定位置處單個胺基酸改變之人類CLDN18.1-mRFP變異體。特定突變位於M29Q、D37N、S42A、Q45N、E47Q、Q56E、P65G、I69L。然後藉由同源重組之方法將PCR產物選殖至pcDNA3.1(+)載體中。藉由對單個陽性選殖進行定序來識別及確認人類CLDN18.2-mRFP變異體。

【0326】隨後，將此等突變體及野生型人類CLDN18.2-mRFP或人

類CLDN18.1-mRFP之質體轉染至HEK293細胞株中。首先，將 5×10^6 個HEK293細胞以60%~80%之比率接種至60 mm培養皿中進行轉染。將400 μ l 1×HBS中之10 μ g DNA及10 μ l 25 kDa線性PEI轉染試劑(溶解在1×HBS中，1 mg/ml原液)混合以達到1:2.5之DNA/PEI比率。接著將混合物逐滴添加至HEK293細胞培養物中。6-8小時後，用完全DMEM替換轉染之細胞隔夜。在轉染後24小時，收集細胞用於使用嵌合抗體進行FACS分析。

[(0327)| 人類CLDN18.1之胺基酸序列(SEQ ID NO: 31)

MSITTCQVVAITJSLGLAGCIAATGMDMWSTQDIYDNPVTSVYQYIGLWRSCVR
QSSGFTICRPYFTILGLPAMIQAVRAIMIVGIVLGAIGLJVSIFAIKCRIGSMIDSAKAN
MITTSGIMFTVSGLCALAGVSVIANMIVTNIWMSIANMYTGMGGMVQITVQITRYITGA
ALJFVGWVAGGLITJGGVMMCIACRGLAPIETINYKAVSYHASGHISVAYKPGGFKASTGFG
GSNTKNNKKIYDGGARKITDIIVQSYPSKIDYV

[(0328)| 人類CLDN18.1-mRFP1之胺基酸序列(SEQ ID NO:

52):

MSITTCQVVAITJSLGLAGCIAATGMDMWSTQDIYDNPVTSVYQYIGLWRSCVR
QSSGFTICRPYFTILGLPAMIQAVRAIMIVGIVLGAIGLJVSIFAIKCRIGSMIDSAKAN
MITTSGIMFTVSGLCALAGVSVIANMIVTNIWMSIANMYTGMGGMVQITVQITRYITGA
ALJFVGWVAGGLITJGGVMMCIACRGLAPIETINYKAVSYHASGHISVAYKPGGFKASTGFG
GSNTKNNKKIYDGGARKITDIIVQSYPSKIDYVMASSIDVVKITMRTKVRMDISVNGHIDT
IDGIGIGICRPYFTGTQITAKIKVTKGGPLPFAWDILSPQIQYGSKAYVKDPAIDIPDYIKLSIF
EGFKWIERVMNIDGGVVITVTDSSIQDGIETTKVKIKGTINIPSDGPFVMQKKTMGWIEA
SITRMYPIDGAIKGIKMRIKIKIDGGHYDAIVKTIYMAKKPVQIPGAYKITDIKIDITS
HNIDYITVIEQYITRAIGRHSTGA

[(0329)| 人類CLDN18.2之胺基酸序列(SEQ ID NO: 30)

MAVTACQGLGIVVSLGIAAGIAATCMDDQWSTQDIYNNPVTAVINYQGLWRSCVRI
SSGFTICRGYITJGLPAMIQAVRAIMIVGIVLGAIGLJVSIFAIKCRIGSMIDSAKANM
TITSGIMFTVSGLCALAGVSVIANMIVTNIWMSIANMYTGMGGMVQITVQITRYITGAAL
IFVGWVAGGLITJGGVMMCIACRGLAPIETINYKAVSYHASGHISVAYKPGGFKASTGFGS
NTKNNKKIYDGGARKITDIIVQSYPSKIDYV

[(0330)| 人類CLDN18.2-mRFP1之胺基酸序列(SEQ ID NO:

53) :

MAVTAACQGLGIFVVSILGIAGIIAAITCMDQWSTQDIYNNPVIAVINYQGLWRSCVRI
SSGIFTBCRGYFITLJGLPAMLQAVRAIMIVGIVLGAIGLIVSIIFAIKCIRICSMIEDSAKANM
TLTSGIMFITVSGICAIAGVSVIANMIVTNI'FWMSTANMYTGMGGMVQITVQTRYITGAAL
FVGWVAGGILIJGGVMMCIACRGLAFIETINYKAVSYIIASGHSVAYKPGGFKASTGFGS
NITKNKKIYDGGARKITDI'VQSYPSKIIDYVMASSID'VIKID'MRI'KVRMI'GSVNGIID'ID'
GI'GI'GRFYI'GT'QIAKIKV'IKGGPIPI'AWDILSPQI'QYGSKAYVKIIPADID'DYILKI'SI'PI'G
IKWIRVMNIID'GGVVITVITQDSSI.QDGIETIKVKIKRG'IN'PSIDG'PVMQKKIMGWIASI'
IRMYPIID'GAIKGI'IKMRIKIKDGGIYIDAI'VKIT'YMAKKPVQIPGAYKITDIKIDIT'SIN
IDYITVEQYIERAIEGRISTGA

[(0331)]

2. CLDN18.2 嵌合抗體與位點突變之 HEK293-CLDN18.2 或 HEK293-CLDN18.1 細胞之結合

將轉染之 HEK293-CLDN18.2 或 HEK293-CLDN18.1 細胞以 10⁵/孔、100 μl/孔之密度重新懸浮於含 2% BSA 之 PBS 中。細胞用 FACS 洗滌緩衝液(PBS + 2% FBS)洗滌 3 次，且每孔與 100 μl/孔 10 μg/ml 嵌合抗體及 IMAB362 在 4℃ 下一起培育 30 分鐘。接著，細胞用 FACS 洗滌緩衝液洗滌 3 次，且與 100 μl/孔山羊抗 hIgG (CH-1)-FITC(1:200 稀釋)在 4℃ 下一起培育另外 30 分鐘。最後，細胞用 FACS 洗滌緩衝液洗滌 3 次，且藉由流動式細胞測量術分析。為分析與 CLDN18.2 轉染細胞之結合，RFP 陽性細胞用於控制閘控。

[(0332)] IMAB362 按照 US2009169547A1 中揭示之序列表現。選擇且擴增具有最高信號之單細胞純系用於細胞庫。

[(0333)] IMAB362 之重鏈可變區(SEQ ID NO: 72)

QVQIQQPGAIIVRPGASVKISCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLI'WIGNIYPSIDS
YITNYNQIKPKDKAITVIDKSSSTAYMQISSPTSIDSAVYYCTRSWRGNSIDYWGQGTL
TVSS

[(0334)] IMAB362 之輕鏈可變區(SEQ ID NO: 73)

DIIVMTQSPSSITIVTAGEIKVITMSCKSSQSIJNSGNQKNYITWYQQKPGQPPIKIJYW
ASTRIESGVFDRITGSGSGITDIPIITSSVQAIEDLAVYYCQNDYSYPITGSGITKIIGK

[0335] 計算此等嵌合抗體與突變之CLDN18.2變異體之結合信號相對於野生型的百分比且總結在表4中。如同5A-5B所示，當E56突變為Q時，18B10-C (亦即與人類IgG1恆定區融合之18B10之嵌合抗體)之結合完全喪失。此種變化亦適用於IMAB362及其他嵌合抗體，但59A9-C除外。此外，吾人發現其他胺基酸如A42、N45在一定程度上亦有助於IMAB362及其他抗體之結合，但對於18B10-C則不然。

表4

與野生型CLDN18.2相比，突變之人類CLDN18.2之結合百分比(%)							
CLDN18.2 上之突變	IMAB362	7C12-C	11B12-C	12B39-C	26G6-C	59A9-C	18B10-C
野生型	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Q29M	113.89	83.52	107.78	106.33	106.53	90.37	83.50
N37D	121.11	80.20	102.19	102.71	117.72	92.66	105.63
A42S	15.76	38.69	56.86	55.10	82.23	90.02	69.23
N45Q	18.87	52.10	57.38	50.77	88.69	65.04	91.97
Q47E	108.17	74.74	86.13	89.07	116.12	87.47	109.00
E56Q	0.83	0.48	0.27	0.35	0.34	52.74	6.57
G65P	119.26	79.44	92.67	96.73	118.87	85.55	118.11
L69I	89.27	90.38	74.28	58.10	79.74	105.74	111.70

[0336]

實例7：人類化抗體之產生及表徵

1. 人類化抗體之產生、表現及純化

18B10

人類生殖系構架序列VK/4-1之輕鏈及VH/1-46之重鏈分別用於CDR移植。

[0337] 重鏈(HC)變異體1、2及3分別藉由將三個CDR直接移植至生殖系序列(18B10-HC生殖系，SEQ ID NO: 23)，以及HC變異體1(Hu18B10-H1a，SEQ ID NO: 25)之R71H、T73K回復突變，HC變異體2

(Hu18B10 Hb, SEQ ID NO: 27)之R71H、T73K、T28S、M69L回復突變及HC變異體3 (Hu18B10 Hc, SEQ ID NO: 29)之R71H、T73K、T28S、M69L、R38K、M48I回復突變來獲得。

[(0338)] (1) 18B10 HC之生殖系序列：

VCU/1-46(18B10 生殖系, SEQ ID NO: 23)：

QVQLVQSGAEYKKPGASVKVSCKASGYITTSYYMTWVRQAPGQGLFWMGINPS
GGSTSYAQKIQGRVITMDTSISTVYMISSIRSDTAVYYCAR

VCU/1-46變異體1(Hu18B10 Ha, SEQ ID NO: 25)：

QVQLVQSGAEYKKPGASVKVSCKASGYITFGYNMNVWRQAPGQGLFWMGNIIDP
YYGGISYNQKIKGRVITMDKSIISTVYMISSIRSDTAVYYCARMYIIGNAIDYWGQ
GITVTVSS

VCU/1-46變異體2(Hu18B10 Hb, SEQ ID NO: 27)：

QVQLVQSGAEYKKPGASVKVSCKASGYITFGYNMNVWRQAPGQGLFWMGNIIDP
YYGGISYNQKIKGRVITMDKSIISTVYMISSIRSDTAVYYCARMYIIGNAIDYWGQ
GITVTVSS

VCU/1-46變異體3(Hu18B10 Hc, SEQ ID NO: 29)：

QVQLVQSGAEYKKPGASVKVSCKASGYITFGYNMNVWRQAPGQGLFWIGNIDPY
YGGISYNQKIKGRVITMDKSIISTVYMISSIRSDTAVYYCARMYIIGNAIDYWGQ
GITVTVSS

[(0339)] 輕鏈(LC)變異體1及2分別藉由將三個CDR直接移植至生殖系序列(18B10 LC生殖系, SEQ ID NO: 24), 以及變異體1 (Hu18B10 La, SEQ ID NO: 26)及LC變異體2 (Hu18B10 Lb, SEQ ID NO: 28)之S63T、I21M無回復突變來獲得。

[(0340)] (2) 18B10 LC之生殖系序列：

VK/4-1(18B10 LC生殖系, SEQ ID NO: 24)

DIVMTQSPDSIAVSI.GI.RA.TNCKSSQNNKNYI.AWYQQKPGQPPIIJYWA.SIRIS
GVPDRFSGSGSGTDFTITSSIQAIQDVAVYYCQQYYSIP

VK/4-1變異體1(Hu18B10 La, SEQ ID NO: 26)

DIVMTQSPDSIAVSI.GI.RA.TNCKSSQSI.I.NSGNI.KNYI.TWYQQKPGQPPIIJYWA
SIRKSGVPDRFSGSGSGTDFTITSSIQAIQDVAVYYCQNDYSYPIITGGGTRKVIQK

VK/4-1變異體2(Ch18B10 Jb, SEQ ID NO: 28)

DIVMTQSPDSI AVSI.GIRATMNCKSSQSIJNSGNI.KNYI.TWYQQKPGQPPKIJYYW
ASTRKSGVPDRITGSGSGITDITITSSIQAIIDVAVYYCQNDYSYPIITGGGTRKVIQK

[0341] 上述重鏈可變區及輕鏈可變區之組合產生以下人類化18B10抗體：18B10-HaLa (具有SEQ ID NO: 25之VH及SEQ ID NO: 26之VL)、18B10-HbLa (具有SEQ ID NO: 27之VH及SEQ ID NO: 26之VL)、18B10-HcLa (具有SEQ ID NO: 29之VH及SEQ ID NO: 26之VL)、18B10-HaLb (具有SEQ ID NO: 25之VH及SEQ ID NO: 28之VL)、18B10-HbLb (具有SEQ ID NO: 27之VH及SEQ ID NO: 28之VL)、18B10-HcLb (具有SEQ ID NO: 29之VH及SEQ ID NO: 28之VL)。

[0342] 將18B10之重鏈及輕鏈之人類化變異體連接至人類IgG1重鏈恆定區及κ輕鏈恆定區，如下所示：

人類IgG1重鏈恆定區(SEQ ID NO: 49)：

ASTKGPSVITPPKPKDITMISRTPIVITCVVVIDVSIIDPIVKITNWYVIDGVIIVINAKITKPRH
EQYNSTYKVVSVITVLIQDWLNGKIKYKCKVSNKALPAPIKITSKAKGQPRIPQVYITLP
PSRIDITKNQVSIITCIYKGIYPSDIIVIEWISNGQPIINNYKTITPPVIDSDGSIITLYSKITV
DKSRWQQGNVIFCSVMIDIALIINIIYTQKSLISLSPGK

人κ輕鏈恆定區(SEQ ID NO: 50)：

KIVAAPSVITITPPSDIQIKSGTASVVCILNNITYPRIAKVQWKVDNALQSGNSQISV
TITQDSKIDSTYSLSSITITLSKAIDYIKDKVYACIIVTHQGLSSPVTKSFIRNGEC

[0343] 合成上述重鏈及輕鏈cDNA之可變區，且與人類IgG1及人κ之恆定區融合。將所選抗體基因之重鏈及輕鏈選殖至表現載體中，且使用來自QIAGEN之Plasmid Maxiprep System製備大規模DNA。根據製造商之方案，使用來自Invitrogen之ExpiFectamine™ CHO試劑進行轉染。當細胞活力為約60%時收集上清液。藉由0.22 μm過濾囊過濾細胞培養上

清液以去除細胞碎片。將上清液加載至預平衡之蛋白A親和管柱上。然後用平衡緩衝液(PBS)洗滌管柱內之蛋白A樹脂，且使用25 mM檸檬酸鹽(pH 3.5)溶離抗體。用1 M Tris-鹼(pH 9.0)將pH調節至約6.0-7.0。內毒素控制在1 EU/mg以下。然後藉由SDS-PAGE及SEC-HPLC表徵純化之抗體。

【0344】

2. 與人類及小鼠CLDN18.2之結合

將對數期HEK293-CLDN18.2及NUGC4細胞重新懸浮在PBS中。使用FACS洗滌緩衝液(PBS + 2% FBS)洗滌3次細胞後，將100 µl/孔稀釋之400 nM至0.002 nM範圍之人類化抗體添加每個孔中，以在4°C下培育30分鐘。再次，使用FACS洗滌緩衝液洗滌細胞3次，然後與100 µl/孔山羊抗mIgG-FITC (1:400稀釋)在4°C下一起培育另外30分鐘。在使用FACS洗滌緩衝液進行最後3次洗滌後，藉由流動式細胞測量術分析細胞。

【0345】 所有人類化抗體變異體均與嵌合抗體進行頭對頭測試，以篩選出最佳。所有變異體均完全保留其結合。接著，測試僅一個回復突變之18B10-HaLa與HEK293-小鼠CLDN18.2細胞之結合。18B10-HaLa與小鼠CLDN18.2之結合能力比IMAB362更強，且MFI更高，此表明18B10-HaLa對小鼠具有良好之交叉反應性。

【0346】

3. KinExA對人類化CLDN18.2抗體之親和力分析

藉由KinExA頭對頭地評價18B10-HaLa及IMAB362與表現CLDN18.2之細胞之結合親和力。按照KinExA 4000 (Sapidyne Instruments Inc.)之說明，用30 µg山羊抗人類IgG Fc抗體包被200 mg PMMA硬珠(Sapidyne, #440176) 2小時，然後用10 mg/ml BSA阻斷1小

時。在對數期收集兩種胃細胞株NUGC4及KATOIII (ATCC，目錄號HTB-103)，且與0.2 nM 18B10-HaLa或IMAB362混合。使用0.2 nM 18B10-HaLa或IMAB362將細胞-抗體混合物稀釋2倍，且在室溫下培育3小時。游離抗體之量隨稀釋度增加。此等游離抗體由山羊抗人類IgG Fc包被之珠捕獲，隨後用1 µg/ml Alexa Fluor 647-抗人類IgG標記以用於讀數。

【0347】 每種抗體之結合親和力總結在表5中。18B10-HaLa與NUGC4細胞及KATOIII結合之Kd為約0.3 nM，超過IMAB362之8倍。此與上述FACS結合結果一致。

表5. CLDN18.2抗體對胃細胞株之Kd

Kd (nM)	18B10-HaLa	IMAB362
NUGC4	0.303	2.58
KATOIII	0.315	ND

【0348】

4. HEK293-CLDN18.2細胞之CDC測定

【0349】 在CDC活性測定中，18B10-HaLa與IMAB362進行頭對頭測試。18B10-HaLa之CDC活性超過IMAB362之20倍。18B10-HaLa依賴性特異性細胞殺傷百分比在0.3 µg/ml濃度下達到86%，而IMAB362在相同濃度下無細胞殺傷。

【0350】

5. 對MKN45-CLDN18.2細胞之結合及細胞毒性作用

細胞結合測定與上述相同。18B10之所有人類化變異體以與嵌合18B10相當之親和力與細胞結合。選擇僅一個回復突變之18B10-HaLa用於進一步之ADCC活性研究。

【0351】 使用Jurkat-NFAT-luc-FcγRIIIA-V176細胞作為效應細胞

及MKN45-CLDN18.2細胞作為目標細胞測試ADCC活性。18B10-HaLa具有比IMAB362低得多之EC50 (0.05 µg/ml)，與嵌合18B10之EC50一致。

【0352】

6. 對NUGC4細胞之結合及細胞毒性作用

細胞結合及ADCC測定與上述相同。與IMAB362相比，18B10-HaLa顯示出更佳ADCC效力(EC50約0.59 µg/ml)。

【0353】

7. 使用NUGC4作為目標細胞及PBMC作為效應細胞之ADCC測定

將對數期NUGC4細胞重新懸浮於含10% FBS之RPMI1640中。將細胞以每孔 1×10^4 個細胞預接種至96孔U底盤中。將抗CLDN18.2抗體及IMAB362在含10% FBS之RPMI1640中梯度稀釋，且以200至0.2 µg/ml之最終濃度添加至上述盤中，且在37°C下培育30分鐘。將來自Miao Shun (Shanghai) Biological & Technology Co., Ltd之冷凍PBMC自液氮中取出，且立即置於37°C水浴中。離心後，將細胞重新懸浮於RPMI1640加10% FBS中，且以每孔 40×10^4 個細胞接種至上述96孔U底盤中。然後將盤置於37°C之培育箱中5小時。

【0354】 培育後，將盤平衡至22°C。使用Promega CytoTox-ONE均質膜完整性測定套組(G7892)或CytoTox 96®非放射性細胞毒性測定(G1780)偵測LDH。按照製造商之說明添加裂解液、試劑及終止溶液後，在560 nm之激發波長及590 nm之發射波長(G7892)或490 nm或492 nm(G1780)之吸光度下量測螢光。

【0355】 18B10-HaLa顯示出比IMAB362好得多之ADCC效力。由於未擬合至回歸曲線，EC50可能無法準確計算。

【0356】

8. 使用人類CLDN18.2上之定點誘變對所選抗體進行抗原決定基作圖

使用相同方法及人類CLDN18.2-mRFP質體，將如下所列之人類CLDN18.2 28-80之間的42個胺基酸一次替換為丙胺酸。使用引子藉由重疊PCR擴增此等變異體。特定突變為Q28A、Q29A、W30A、S31A、T32A、Q33A、D34A、L35A、Y36A、N37A、N38A、V40A、T41A、V43A、F44A、N45A、Y46A、Q47A、L49A、W50A、R51A、S52A、V54A、R55A、E56A、E56A、S57A、S58A、F60A、T61A、E62A、R64A、Y66A、F67A、T68A、L69A、L70A、L72A、M75A、L76A、Q77A、V79A、R80A。然後按照製造商之說明，使用Syno組裝混合試劑(Synbio)藉由同源重組方法將PCR產物選殖至pcDNA3.1 (+)載體中。使用QIAGEN Plasmid Mega套組(QIAGEN)純化質體。

【0357】 隨後，將此等突變體及野生型CLDN18.2-mRFP之質體轉染至HEK293細胞中。轉染後24小時藉由流動式細胞測量術分析細胞。

【0358】 當W30、L49、W50、E56突變為A時，18B10-HaLa之結合完全喪失(結合百分比<10%)，此表明此4個胺基酸對於其與人類CLDN18.2之結合至關重要。尤其是E56為構成結合抗原決定基之最重要之胺基酸。除此4個關鍵胺基酸之外，其他幾種胺基酸在經丙胺酸取代後亦影響結合(結合百分比在10%及25%之間)，如R51、F60、E62、R80。59A9-C與位點突變之CLDN18.2之結合僅部分依賴於E56(結合百分比為約22%)。與野生型相比，突變之CLDN18.2與抗體之結合百分比總結在表6中。

表6
與野生型CLDN18.2相比，突變之CLDN18.2之結合百分比(%)

CLDN18.2上之突變	18B10-HaLa	59A9-C
野生型	100.00	100.00
Q28A	28.47	46.38
Q29A	82.85	54.83
W30A	0.38	3.20
S31A	92.24	76.85
T32A	91.56	85.59
Q33A	57.11	59.78
D34A	97.47	96.29
L35A	89.80	75.44
Y36A	79.92	78.03
N37A	61.20	60.72
N38A	66.62	57.63
V40A	103.48	128.07
T41A	60.27	41.63
V43A	36.83	59.41
F44A	59.86	70.03
N45A	36.19	35.16
Y46A	51.55	14.98
Q47A	105.11	57.45
L49A	1.20	2.32
W50A	0.86	5.05
R51A	39.39	22.12
S52A	86.58	98.97
V54A	84.22	87.24
R55A	49.94	49.69
E56A	0.27	21.92
S57A	112.14	77.16
S58A	62.08	39.38
F60A	26.32	64.43
T61A	84.08	51.64
E62A	8.42	23.13
R64A	87.70	51.00
Y66A	53.19	52.45
F67A	76.37	79.89
T68A	70.92	71.30
L69A	88.60	54.83
L70A	75.64	82.08
L72A	56.61	53.03
M75A	75.98	73.58
L76A	43.12	52.06
Q77A	80.06	63.42
V79A	43.72	39.11
R80A	27.27	13.64

【0359】

實例8 靶向CLDN18.2之下一代核素標記單株抗體(以¹²⁴I-18B10為例)在

PDX小鼠中之生物分佈

將 ^{124}I -18B10 (0.74 MBq, 每組200 μL)注射至藉由將來自胃癌患者之腫瘤組織經由尾靜脈移植入嚴重免疫缺陷小鼠(NSG)小鼠中而形成之患者來源異種移植物(PDX)模型(證實claudin 18.2過度表現, 北京大學腫瘤醫院胃腸腫瘤科提供)中。生物分佈實驗分為2組, 包括試驗組及阻斷組, 試驗組中含在PDX小鼠中之 ^{124}I -18B10, 阻斷組中共添加 ^{124}I -18B10與未標記之18B10 (200 mg/小鼠)。注射後240小時分離小鼠之心、肝、肺、腎、脾、胃、骨、肌肉、大腸、小腸、腦及腫瘤。研磨後, 藉由 γ 計數器偵測及分析攝取信號, 且得到 ^{124}I -18B10探針之ID%/g。

【0360】 在PDX小鼠(圖6)中, 與其他組相比, ^{124}I -18B10在腫瘤中之攝取最高。由於來自未標記之18B10之競爭, 阻斷組在正常組織及腫瘤組織中之攝取均顯著降低。結果顯示 ^{124}I -18B10集中在腫瘤細胞上, 此支持其在疾病診斷中之應用。

【0361】

實例9 靶向CLDN18.2之下一代核素標記單株抗體(以 ^{124}I -18B10為例)在患者中之作圖

在一項研究性臨床研究中, 使診斷為表現claudin 18.2之癌症之患者在 ^{124}I -18B10 PET/CT成像之前或之後1週內經歷 ^{124}I -18B10 PET/CT掃描及 ^{18}F -FDG PET/CT (每位患者11.1-18.5 MBq, 藉由靜脈注射)。對於 ^{124}I -18B10 PET成像, 藉由在 ^{124}I -18B10投與之前3天及之後7天服用盧戈氏碘化鉀(每次十滴, 每天3次)阻斷患者之甲狀腺。在投與 ^{124}I -18B10後2小時、24小時、72小時、96小時, 使用Siemens Biograph mCT Flow 64掃描儀(德國Erlangen)獲得 ^{124}I -18B10 PET/CT掃描。自頭至腳或大腿上部

分別在2小時、24小時、48小時、72小時以0.8 mm/s、0.5 mm/s、0.4 mm/s、0.3 mm/s及0.2 mm/s之掃描速度採集PET圖像，且使用有序子集最大期望值法進行重建。

【0362】 ^{124}I -18B10在患者中之生物分佈源自前五名患者之圖像(圖7)。患者之甲狀腺被充分阻塞。示蹤劑在注射後集中在血液中且隨著時間之推移而降低，且在脾及肝中之濃度隨著時間之推移而增加。脾在24小時、48小時及72小時成為最活躍之器官。腎中亦有示蹤劑攝取，且腦、肺及骨中之攝取低。正常胃壁未見明顯示蹤劑攝取。此外，圖8顯示 ^{124}I -18B10在患者之卵巢病變中積累，此為轉移至卵巢之表現claudin 18.2之癌症。與 ^{18}F -FDG PET/CT結果相比，來自 ^{124}I -18B10 PET/CT 24h及 ^{124}I -18B10 PET/CT 48之結果顯示， ^{124}I -18B10在卵巢病變中表現claudin 18.2之癌組織中之攝取較高(^{18}F -FDG PET/CT SUVmax:3(左)，2.9(右)； ^{124}I -18B10 PET/CT 24h SUVmax: 25.1(左)，22.2(右)； ^{124}I -18B10 PET/CT 48h SUVmax: 12.5(左)，17.6(右))。

【序列表】

<110> 中國大陸商蘇州創勝醫藥集團有限公司(SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD.)
中國北京腫瘤醫院(BEIJING CANCER HOSPITAL)

<120> 抗CLDN18.2抗體結合物

<130> 063694-8008TW01

<140> TW 111106264

<141> 2202-02-21

<150> PCT/CN2021/076910

<151> 2021-02-19

<150> PCT/CN2022/074750

<151> 2022-01-28

<160> 73

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Gly Tyr Asn Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 3

<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Ser Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Gln Asn Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 7

Tyr Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 8

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 9

His Ile Asp Pro Tyr Tyr Val Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11

Ser Phe Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Tyr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Thr Tyr Phe Ile Gly Val Gly
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Met Gly Ser Gly Ala Trp Phe Thr Tyr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 19

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Asn Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21

Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 22

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 24
<211> 95
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Asn Lys Asn Tyr
20 25 30

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
35						40						45					
Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly		
50						55						60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala		
65						70						75			80		
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro			
			85						90						95		
<210> 25																	
<211> 118																	
<212> PRT																	
<213> 智人																	
<400> 25																	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala		
1				5						10						15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr		
			20						25						30		
Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
35						40						45					
Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe		
50						55						60					
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr		
65						70						75			80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85						90						95		
Ala	Arg	Met	Tyr	His	Gly	Asn	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100						105						110		

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 261
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
260

<210> 31
<211> 261
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu
1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly
35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
260

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可為天冬醯胺、酪胺酸或組胺酸。

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可為甘胺酸或纈胺酸。

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa可為丙胺酸、甘胺酸或蘇胺酸。

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa可為精胺酸、蘇胺酸或絲胺酸。

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> Xaa可為離胺酸或精胺酸。

<400> 32

Xaa Ile Asp Pro Tyr Tyr Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可為絲胺酸或甲硫胺酸。

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa可為酪胺酸或苯丙胺酸。

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可為酪胺酸或組胺酸。

<400> 33

Xaa Xaa Xaa Gly Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa可為絲胺酸或天冬醯胺。

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可爲白胺酸或苯丙胺酸。

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa可爲絲胺酸或天冬醯胺。

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa可爲麩醯胺酸或白胺酸。

<400> 34

Lys Ser Ser Gln Xaa Leu Xaa Asn Xaa Gly Asn Xaa Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa可爲麩醯胺酸或離胺酸。

<400> 35

Trp Ala Ser Thr Arg Xaa Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_faecture
<222> (5)..(5)
<223> Xaa可爲絲胺酸或酪胺酸。

<220>
<221> misc_faecture
<222> (6)..(6)
<223> Xaa可爲苯丙胺酸或酪胺酸。

<220>
<221> misc_faecture
<222> (8)..(8)
<223> Xaa可爲苯丙胺酸或白胺酸。

<400> 36

Gln Asn Asp Tyr Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 37
<211> 118
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 37

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 38

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 39
<211> 118
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 39

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 41
<211> 118
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 41

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly His Ile Asp Pro Tyr Tyr Val Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 42

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 43

Gln Ile Thr Gln Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Phe Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met Gly Ser Gly Ala Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 44
<211> 113

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 45
<211> 118
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 45

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Tyr His Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 46
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

202302153

65 70 75 80

Leu Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210>	47
<211>	118
<212>	PRT
<213>	小鼠

<400> 47

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 49
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40				45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115						120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
		180						185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 51
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 51

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

859095

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100105110

Pro Ala Pro Glu Leu Val Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Leu Pro Pro
115120125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130135140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145150155160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Pro Glu
165170175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180185190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195200205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210215220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225230235240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245250255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260265270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275280285

Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
290						295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
305					310					315					320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
			325					330								
<210>	52															
<211>	486															
<212>	PRT															
<213>	智人															
<400>	52															
Met	Ser	Thr	Thr	Thr	Cys	Gln	Val	Val	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Ile	Leu	
1				5					10					15		
Gly	Leu	Ala	Gly	Cys	Ile	Ala	Ala	Thr	Gly	Met	Asp	Met	Trp	Ser	Thr	
			20					25					30			
Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Asn	Pro	Val	Thr	Ser	Val	Phe	Gln	Tyr	Glu	Gly	
		35					40					45				
Leu	Trp	Arg	Ser	Cys	Val	Arg	Gln	Ser	Ser	Gly	Phe	Thr	Glu	Cys	Arg	
	50					55					60					
Pro	Tyr	Phe	Thr	Ile	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Met	Leu	Gln	Ala	Val	Arg	
65					70					75					80	
Ala	Leu	Met	Ile	Val	Gly	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Leu	Val	
				85					90					95		
Ser	Ile	Phe	Ala	Leu	Lys	Cys	Ile	Arg	Ile	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ser	
			100					105					110			
Ala	Lys	Ala	Asn	Met	Thr	Leu	Thr	Ser	Gly	Ile	Met	Phe	Ile	Val	Ser	
			115					120				125				

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val Met Ala Ser Ser Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe
260 265 270

Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe
275 280 285

Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr
290 295 300

Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp
305 310 315 320

Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His
325 330 335

Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe
340 345 350

Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val
355 360 365

Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys
370 375 380

Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
385 390 395 400

Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly
405 410 415

Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly
420 425 430

His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val
435 440 445

Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
450 455 460

His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
465 470 475 480

Arg His Ser Thr Gly Ala
485

<210> 53
<211> 486
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Met	Ala	Val	Thr	Ala	Cys	Gln	Gly	Leu	Gly	Phe	Val	Val	Ser	Leu	Ile
1				5					10					15	
Gly	Ile	Ala	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Thr	Cys	Met	Asp	Gln	Trp	Ser	Thr
			20					25					30		
Gln	Asp	Leu	Tyr	Asn	Asn	Pro	Val	Thr	Ala	Val	Phe	Asn	Tyr	Gln	Gly
		35					40					45			
Leu	Trp	Arg	Ser	Cys	Val	Arg	Glu	Ser	Ser	Gly	Phe	Thr	Glu	Cys	Arg
	50					55						60			
Gly	Tyr	Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Met	Leu	Gln	Ala	Val	Arg
65					70					75					80
Ala	Leu	Met	Ile	Val	Gly	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Leu	Val
				85					90					95	
Ser	Ile	Phe	Ala	Leu	Lys	Cys	Ile	Arg	Ile	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ser
			100					105					110		
Ala	Lys	Ala	Asn	Met	Thr	Leu	Thr	Ser	Gly	Ile	Met	Phe	Ile	Val	Ser
		115						120				125			
Gly	Leu	Cys	Ala	Ile	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Met	Leu	Val
	130					135						140			
Thr	Asn	Phe	Trp	Met	Ser	Thr	Ala	Asn	Met	Tyr	Thr	Gly	Met	Gly	Gly
145					150					155					160
Met	Val	Gln	Thr	Val	Gln	Thr	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ala	Leu	Phe
				165					170					175	
Val	Gly	Trp	Val	Ala	Gly	Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Gly	Gly	Val	Met	Met
			180					185					190		
Cys	Ile	Ala	Cys	Arg	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Glu	Thr	Asn	Tyr	Lys	Ala

195200205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210215220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225230235240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245250255

Lys His Asp Tyr Val Met Ala Ser Ser Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe
260265270

Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe
275280285

Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr
290295300

Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp
305310315320

Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His
325330335

Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe
340345350

Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val
355360365

Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys
370375380

Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
385390395400

Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly
405 410 415

Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly
420 425 430

His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val
435 440 445

Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
450 455 460

His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
465 470 475 480

Arg His Ser Thr Gly Ala
485

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> Xaa可為蘇胺酸或絲胺酸。

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr
20 25 30

<210> 55

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_faecture
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可爲精胺酸或離胺酸。

<220>
<221> misc_faecture
<222> (13)..(13)
<223> Xaa可爲甲硫胺酸或異白胺酸。

<400> 55

Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa Gly
1 5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa可爲甲硫胺酸或白胺酸。

<400> 56

Arg Val Thr Xaa Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 57
<211> 11

<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa可爲異白胺酸或甲硫胺酸。

<400> 58

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Xaa Asn Cys
20

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa可爲絲胺酸或蘇胺酸。

<400> 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 63

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
20 25 30

<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 65

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 66
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66

Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 67
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67

Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 68

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 68

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 69

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Asn Cys
20

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 70

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 71
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 72
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 73

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種抗CLDN18.2抗體結合物，其包含與放射性核種結合之抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段，其中上述放射性核種包含治療性放射性核種或診斷性放射性核種。

【請求項2】

上述抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述治療性放射性核種係選自由以下組成之群： ^{111}In 、 $^{111\text{m}}\text{In}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{199}Au 及 ^{211}Pb 。

【請求項3】

上述抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述診斷性放射性核種係選自由以下組成之群： ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{154}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 及 ^{225}Ac 。

【請求項4】

上述抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述診斷性放射性核種可藉由正電子發射斷層掃描(PET)或單光子發射計算機斷層掃描(SPECT)偵測。

【請求項5】

上述抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述放射性核種係選自由以下組成之群： ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 $^{123/131}\text{I}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{41}Ca 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{44}Sc 、 ^{18}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 及 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 。

【請求項6】

如請求項2之抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述放射性核種為 ^{124}I 或 ^{123}I 或 ^{131}I 。

【請求項7】

如請求項2之抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述放射性核種為 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 或 ^{89}Zr 。

【請求項8】

如請求項6之抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 或 ^{89}Zr 標記至螯合劑與上述抗體或其抗原結合片段。

【請求項9】

如請求項7之抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述螯合劑包含三個或更多個用於螯合之原子，其中每個原子係選自由氮、硫、氧及磷組成之群。

【請求項10】

如請求項9之抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述螯合劑包含DFO (去鐵胺)、DOTA (1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DTPA (NR-二仲乙基三胺五乙酸)、NOTA (1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-乙酸)、1,4,7,10-四氮雜環十三烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(本文縮寫為TRITA)；1,4,8,11-四氮雜環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(本文縮寫為TETA)；及

1,5,9,13-四氮雜環十六烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(本文縮寫為HETA)、乙二胺四乙酸(本文縮寫為EDTA)或二伸乙基三胺五乙酸(DTPA)。

【請求項11】

如請求項10之抗體結合物，其中上述放射性核種為⁶⁴Cu或⁶⁷Cu且上述螯合劑包含TETA、NOTA、NODA或NODGA，或者其中上述放射性核種為⁸⁹Zr且上述螯合劑包含DFO。

【請求項12】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段包含重鏈HCDR1、HCDR2及HCDR3及/或輕鏈LCDR1、LCDR2及LCDR3序列，其中：

上述HCDR1序列包含**GYNMN** (SEQ ID NO: 1)或**TYFIGVG** (SEQ ID NO: 13)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述HCDR2序列包含**X₁IDPYYX₂X₃TX₄YNQKFX₅G** (SEQ ID NO: 32)，或**HIWWNDNKYYNTALKS** (SEQ ID NO: 15)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述HCDR3序列包含**X₆X₇X₈GNAFDY** (SEQ ID NO: 33)或**MGSGAWFTY** (SEQ ID NO: 17)，或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述LCDR1序列包含**KSSQX₉LX₁₀NX₁₁GNX₁₂KNYLT** (SEQ ID NO: 34)或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述LCDR2序列包含**WASTRX₁₃S** (SEQ ID NO: 35)或其至少80%序列一致性之同源序列；

上述LCDR3序列包含**QNDYX₁₄X₁₅PX₁₆T** (SEQ ID NO: 36)或其至

少80%序列一致性之同源序列；

其中X₁為N或Y或H，X₂為G或V，X₃為A或G或T，X₄為R或T或S，X₅為K或R，X₆為S或M，X₇為Y或F，X₈為Y或H，X₉為S或N，X₁₀為L或F，X₁₁為S或N，X₁₂為Q或L，X₁₃為E或K，X₁₄為S或Y，X₁₅為F或Y，且X₁₆為F或L。

【請求項13】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段包含：

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 3序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 7序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 8序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 9序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 11序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 10序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 13序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 15序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 17序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 2序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之

LCDR2及包含SEQ ID NO: 12序列之LCDR3；

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 19序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 21序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 14序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 16序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 18序列之LCDR3；或者

重鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 1序列之HCDR1、包含SEQ ID NO: 22序列之HCDR2及包含SEQ ID NO: 5序列之HCDR3；且輕鏈可變區包括包含SEQ ID NO: 20序列之LCDR1、包含SEQ ID NO: 4序列之LCDR2及包含SEQ ID NO: 6序列之LCDR3。

【請求項14】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中上述重鏈可變區進一步包含重鏈HFR1、HFR2、HFR3及HFR4中之一或多者，及/或上述輕鏈可變區進一步包含輕鏈LFR1、LFR2、LFR3及LFR4中之一或多者，其中：

上述HFR1包含**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₁₇FT** (SEQ ID NO: 54)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述HFR2包含**WVX₁₈QAPGQGLEWX₁₉G** (SEQ ID NO: 55)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述HFR3序列包含**RVTX₂₀TIDKSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCAR** (SEQ ID NO: 56)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述HFR4包含**WGQGTTVTVSS** (SEQ ID NO: 57)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述LFR1包含**DIVMTQSPDSLAVSLGERATX₂₁NC** (SEQ ID NO: 58)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述LFR2包含**WYQQKPGQPPKLLIY** (SEQ ID NO: 59)或其至少80%序列一致性之同源序列，

上述 LFR3 包含 **GVPDRFX₂₂GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC** (SEQ ID NO: 60)或其至少80%序列一致性之同源序列，且

上述LFR4包含**FGGGTKVEIK** (SEQ ID NO: 61)或其至少80%序列一致性之同源序列，

其中X₁₇為T或S，X₁₈為R或K，X₁₉為M或I，X₂₀為M或L，X₂₁為I或M，且X₂₂為S或T。

【請求項15】

如請求項14之抗體結合物，其中：

上述HFR1包含選自由SEQ ID NO: 62及SEQ ID NO: 63組成之群之序列，

上述HFR2包含選自由SEQ ID NO: 64及SEQ ID NO: 65組成之群之序列，

上述HFR3包含選自由SEQ ID NO: 66及SEQ ID NO: 67組成之群之序列，

上述HFR4包含SEQ ID NO: 57序列，

上述LFR1包含選自由SEQ ID NO: 68及SEQ ID NO: 69組成之群之序列，

上述LFR2包含SEQ ID NO: 59序列，

上述LFR3包含選自由SEQ ID NO: 70及SEQ ID NO: 71組成之群之序列，且

上述LFR4包含SEQ ID NO: 61序列。

【請求項16】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中上述重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45及SEQ ID NO: 47，且其具有至少80%序列一致性但仍保留與CLDN18.2之特異性結合親和力之同源序列。

【請求項17】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中上述輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48，且其具有至少80%序列一致性但仍保留與CLDN18.2之特異性結合親和力之同源序列。

【請求項18】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中：

包含SEQ ID NO: 23序列之上述重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 24序列之上述輕鏈可變區；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 25序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 26序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 27序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 28序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 29序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 26或28序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 37序列且上述輕鏈可變區包含SEQ

ID NO: 38序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 39序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 40序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 41序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 42序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 43序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 44序列；

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 45序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 46序列；或者

上述重鏈可變區包含SEQ ID NO: 47序列且上述輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 48序列。

【請求項19】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段進一步包含一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但仍保留與人類CLDN18.2之特異性結合親和力。

【請求項20】

如請求項19之抗體結合物，其中上述取代或修飾中之至少一者在上述CDR序列之一或多個中，及/或在上述VH或VL序列之非CDR區之一或多個中。

【請求項21】

如請求項12至20中任一項之抗體結合物，其中上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段進一步包含免疫球蛋白恆定區、視情況人類Ig之恆定區或視情況人類IgG之恆定區。

【請求項22】

如請求項21之抗體結合物，其中上述恆定區包含人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之恆定區。

【請求項23】

如請求項22之抗體結合物，其中上述人類IgG1之恆定區包含SEQ ID NO: 49，或其具有至少80%序列一致性之同源序列。

【請求項24】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段為人類化的。

【請求項25】

如前述請求項中任一項之抗體結合物，其中上述抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段為雙特異抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫鍵穩定化Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、雙特異性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定化雙特異抗體(ds雙特異抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙特異抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【請求項26】

一種醫藥組合物，其包含如前述請求項中任一項之抗體結合物，以及一或多種醫藥學上可接受之載劑。

【請求項27】

如請求項26之醫藥組合物，其中放射化學純度為至少95% (例如97%、98%、99%)。

【請求項28】

一種獲取個體中感興趣部位圖像之方法，上述方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之如請求項1至25中任一項之抗體結合物及/或如請求項26至27中任一項之醫藥組合物；以及

b)使上述個體之上述感興趣部位經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；

c)識別上述個體中來自放射性核種之可偵測信號；

d)生成上述可偵測信號之圖像，從而獲得上述個體中上述感興趣部位之圖像。

【請求項29】

如請求項28之方法，其中上述感興趣部位為表現或懷疑表現claudin 18.2之部位。

【請求項30】

如請求項28至29中任一項之方法，其中上述感興趣部位患有或懷疑患有腫瘤。

【請求項31】

一種以無創方式偵測或可視化個體中claudin 18.2表現之方法，上述方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之如請求項1至25中任一項之抗體結合物及/或如請求項26至27中任一項之醫藥組合物；以及

b)使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；

c)識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號；

d)基於所識別之可偵測信號確定或可視化上述個體之上述感興趣部位中之claudin18.2表現。

【請求項32】

如請求項31之方法，其進一步包含向被識別為在上述感興趣部位具有claudin18.2表現之個體投與治療有效量之抗claudin 18.2療法。

【請求項33】

如請求項31之方法，其進一步包含基於所識別之可偵測信號確定在上述個體之上述感興趣部位中claudin18.2表現之分佈。

【請求項34】

如請求項33之方法，其進一步包含確定在上述個體之上述感興趣部位中claudin18.2表現之異質性。

【請求項35】

如請求項31至34中任一項之方法，其中上述感興趣部位為腫瘤。

【請求項36】

一種以無創方式監測個體之治療功效、對治療之反應性或抗性或復發或轉移之發展的方法，其中上述個體已接受一個治療期之治療，上述方法包含以下步驟：

a)向上述個體投與有效量之如請求項1至25中任一項之抗體結合物及/或如請求項26至27中任一項之醫藥組合物；以及

b)使上述個體經歷正電子發射斷層掃描(PET)或SPECT；

c)識別上述個體之感興趣部位中來自放射性核種之可偵測信號；

d)基於所識別之可偵測信號確定上述個體之感興趣部位中之治療後claudin18.2表現；

e)將治療後claudin18.2表現量或分佈分別與在上述治療期之前自上述個體獲得之基線claudin18.2表現量或分佈進行比較，以確定上述個體中

claudin18.2表現量或分佈之治療後變化；以及

f)基於步驟(e)中確定之變化來確定治療功效、對治療之反應性或抗性或復發或轉移之發展。

【請求項37】

如請求項36之方法，其中claudin 18.2表現量或擴散之增加表明治療功效降低、對治療之反應性降低或存在抗性或存在復發。

【請求項38】

如請求項37之方法，其中上述個體患有癌症。

【請求項39】

一種治療有此需要之個體中之CLDN18.2相關疾病或病症之方法，其包含向上述個體投與治療有效量之如請求項1至25中任一項之抗CLDN18.2抗體結合物及/或如請求項26至27之醫藥組合物。

【請求項40】

如請求項39之方法，其中上述疾病或病症為癌症，視情況為表現CLDN18.2之癌症。

【請求項41】

如請求項40之方法，其中上述個體被識別為患有表現CLDN18.2之癌症。

【請求項42】

一種套組，其包含如前述請求項1至25中任一項之抗CLDN18.2抗體結合物或如請求項26至27中任一項之組合物。

【請求項43】

一種套組，其包含如請求項1至25中任一項之第一抗CLDN18.2抗體

結合物及如請求項1至25中任一項之第二抗CLDN18.2抗體結合物，其中上述第一抗CLDN18.2抗體結合物包含診斷性放射性核種，且上述第二抗CLDN18.2抗體結合物包含治療性放射性核種。

【請求項44】

如請求項42或43之套組，其中上述套組用於如請求項28至41中任一項之方法。

【請求項45】

一種如前述請求項1至25中任一項之抗CLDN18.2抗體結合物或如請求項26至27中任一項之組合物在製備用於如請求項28至38中任一項之方法之藥物中的用途，其中上述抗CLDN18.2抗體結合物包含診斷性放射性核種。

【請求項46】

一種如前述請求項1至25中任一項之抗CLDN18.2抗體結合物或如請求項26至27中任一項之組合物在製備用於如請求項39至41中任一項之方法之藥物中的用途，其中上述抗CLDN18.2抗體結合物包含治療性放射性核種。

【請求項47】

一種製備如請求項6之抗CLDN18.2抗體結合物之方法，其包含使抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段與用 ^{124}I 、 ^{123}I 或 ^{131}I 標記之碘化物在酶促或化學氧化劑之存在下反應。

【請求項48】

如請求項47之方法，其中上述化學氧化劑為N-溴琥珀醯亞胺、氯甘脲(Iodogen)或氯胺-T。

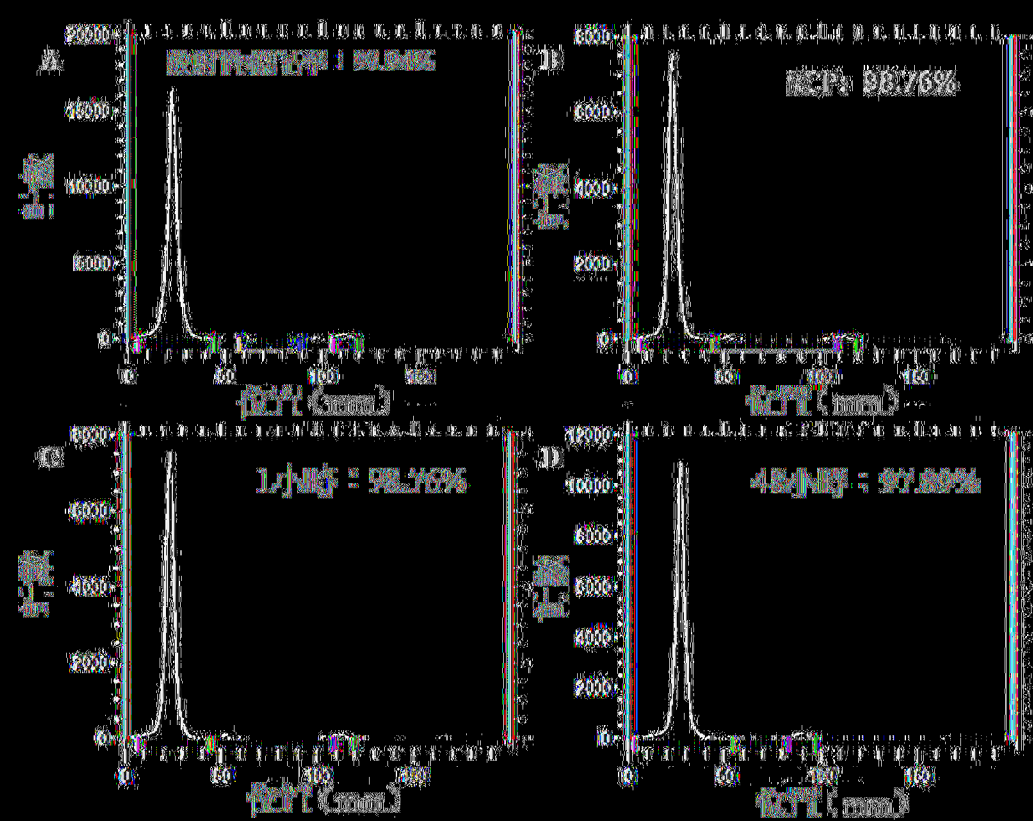
【請求項49】

一種製備如請求項7至10中任一項之抗CLDN18.2抗體結合物之方法，其包含使抗CLDN18.2抗體或其抗原結合片段與螯合劑結合以獲得螯合劑-抗體結合物，且使上述螯合劑-抗體結合物與 ^{64}Cu 或 ^{89}Zr 反應。

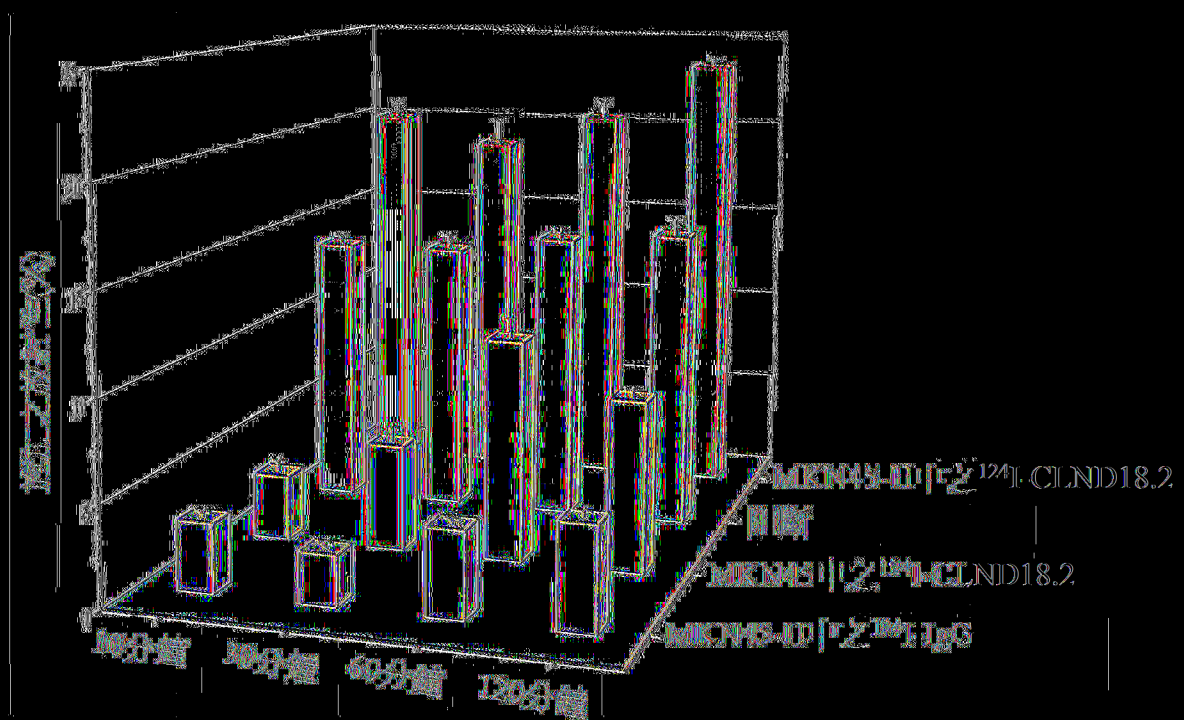
【請求項50】

如請求項49之方法，其中上述螯合劑包含DFO（去鐵胺）、DOTA（1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸）、DTPA（NR-二仲乙基三胺五乙酸）、NOTA（1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-乙酸）、TRITA（1,4,7,10-四氮雜環十三烷-N,N',N'',N'''-四乙酸）；TETA（1,4,8,11-四氮雜環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸）；及HETA（1,5,9,13-四氮雜環十六烷-N,N',N'',N'''-四乙酸）、EDTA（乙二胺四乙酸）、NETA（{4-[2-(雙-羧甲基胺基)-乙基]-7-羧甲基-[1,4,7]三氮雜環壬烷-1-基}-乙酸）、TACN-TM（N,N',N'',三(2-巯基乙基)1,4,7-三氮雜環壬烷）、TRAP（1,4,7-三氮雜環壬烷-1,4,7-三[甲基(2-羧基乙基)次膦酸]）、CP256,PCTA（3,6,9,15-四氮雜雙環[9.3.1]十五烷-1(15),11,13-三烯-3,6,9,-三乙酸）、卟啉、多胺、冠醚、雙縮胺基硫脲、多胍及其衍生物。

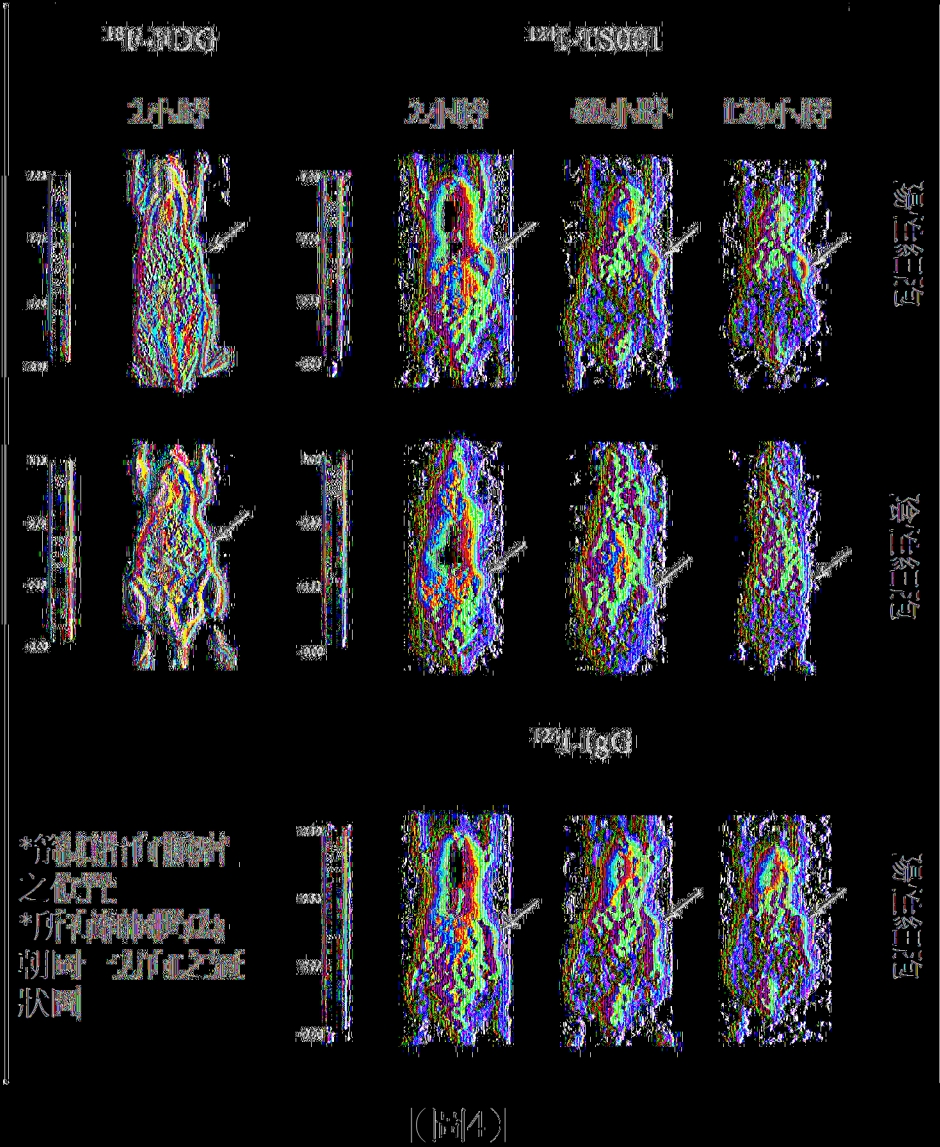
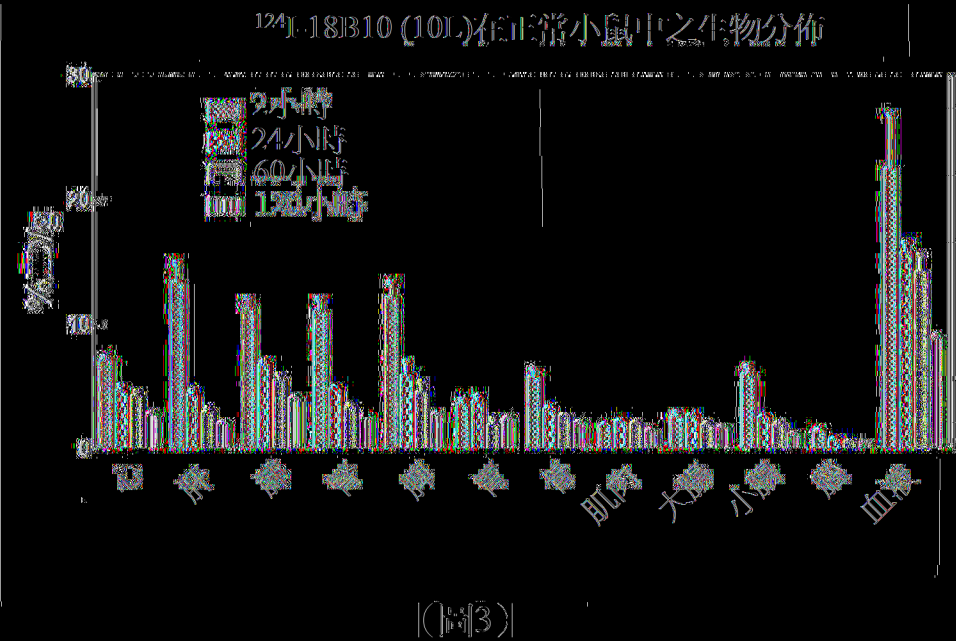
|(發明圖式)|

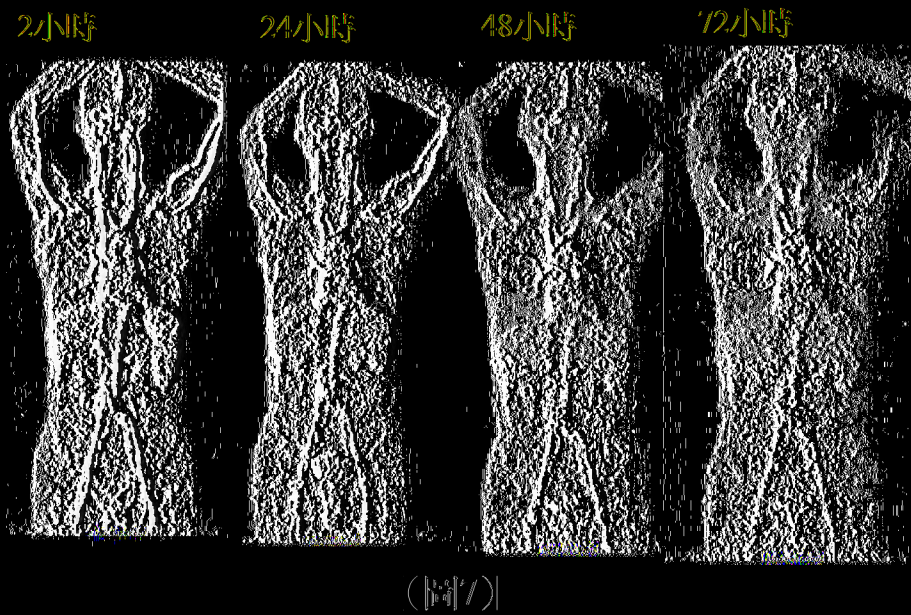
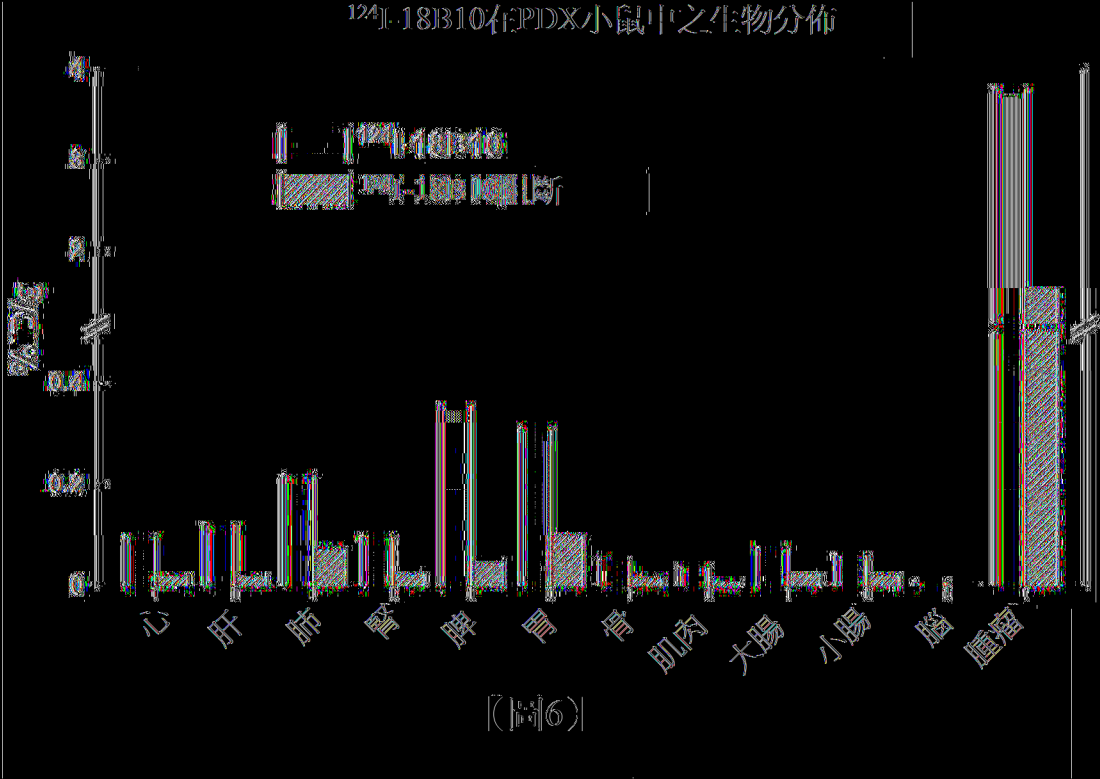


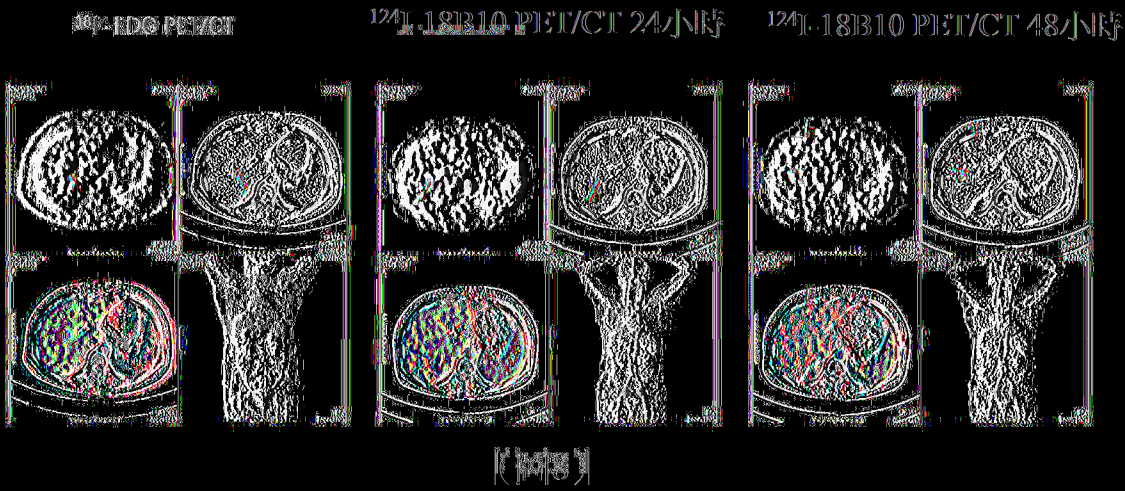
|(圖1)|



|(圖2)|







【圖 10】