



(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 201922792 A

(43) 公開日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 16 日

(21) 申請案號：107139907 (22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 09 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/00 (2006.01)
C12Q1/68 (2018.01)

(30) 優先權：2017/11/10 中國大陸 201711107331.5

(71) 申請人：大陸商江蘇恒瑞醫藥股份有限公司 (中國大陸) JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)
中國大陸
大陸商上海恒瑞醫藥有限公司 (中國大陸) SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD (CN)
中國大陸

(72) 發明人：曹卓曉 CAO, ZHUOXIAO (CN)；付雅媛 FU, YAYUAN (CN)；于存靜 YU, CUNJING (CN)；胡齊悅 HU, QIYUE (CN)；陶維康 TAO, WEIKANG (CN)

(74) 代理人：洪蘭心

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：5 共 83 頁

(54) 名稱

CD96 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途

CD96 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

(57) 摘要

本發明關於一種 CD96 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途。進一步地，本發明關於包含所述 CD96 抗體 CDR 區的鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體，以及包含 CD96 抗體及其抗原結合片段的醫藥組成物，以及其作為藥物的用途。特別地，本發明關於一種人源化的 CD96 抗體在製備用於治療 CD96 相關的疾病或病症的藥物中的用途。

The present invention relates to a CD96 antibody, an antigen-binding fragment, and a pharmaceutical use thereof. Further, the present invention relates to a murine antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody comprising the CDR region of the CD96 antibody, and a pharmaceutical composition comprising the CD96 antibody and antigen-binding fragment thereof, and the use thereof as a medicament. In particular, the invention relates to the use of a humanized CD96 antibody for the manufacture of a medicament for the treatment of a disease or disorder associated with CD96.

指定代表圖：

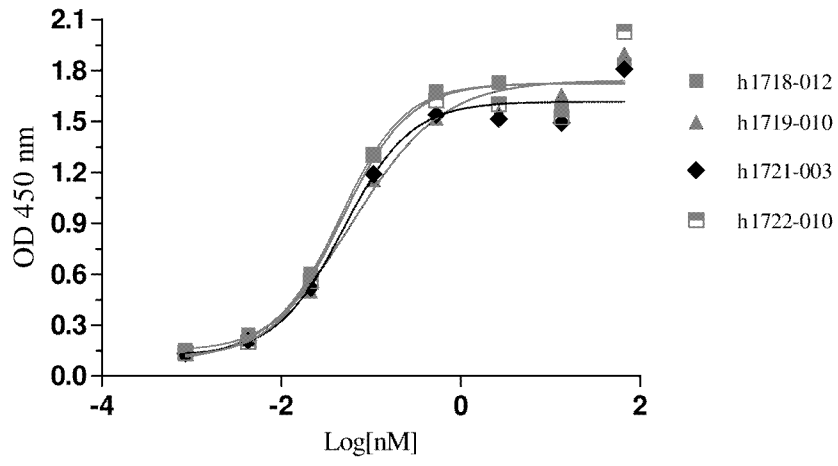


圖 1

【發明說明書】

【中文發明名稱】 CD96 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途

【英文發明名稱】 CD96 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

【技術領域】

【0001】本申請要求申請日為2017年11月10日的中國專利申請CN201711107331.5的優先權。本申請引用上述中國專利申請的全文。

【0002】本發明是關於一種CD96抗體以及其抗原結合片段，進一步地，本發明還關於包含所述CD96抗體CDR區的嵌合抗體、人源化抗體，本發明還關於包含所述CD96抗體及其抗原結合片段的醫藥組成物，以及其作為CD96相關疾病診斷劑和治療藥物的用途。

【先前技術】

【0003】這裡的陳述僅提供與本發明有關的背景訊息，而不必然地構成現有技術。

【0004】1992年，Wang及其同事發現並且複製了一種新的細胞膜型分子，當時將其命名為Tactile（T cell activation increased late expression）。隨後，在人類白細胞分化抗原協作組會議上將該分子命名為CD96。CD96分子表現於正常T細胞、T細胞複製以及某些轉化的T細胞上。外周血T細胞表現低程度的CD96分子，活化後其表現明顯上調，並在刺激後第6~9天表現達到高峰值。在同種異體抗原刺激的條件下，NK細胞上CD96的表現也發生上調。CD96屬於免疫球蛋白超家族，胞膜外區包含3個免疫球蛋白樣結構域，共有15個N-連接糖基化位點，還有1個高度O-連接糖基化富含絲/蘇/脯胺酸

殘基的莖狀結構域，跨膜區有24個胺基酸殘基，胞質區含44個胺基酸殘基，並有一個富含鹼性/脯胺酸的區域。自複製CD96分子後的十多年間，由於不清楚其配體，該分子的研究無明顯進展。CD96在造血和非造血細胞系中表現十分廣泛。CD96也表現於正常人CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、單核細胞和NK細胞。在PHA刺激後，CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞和NK細胞上CD96表現明顯上調，證實CD96是一種活化表現增加的分子。但PHA對單核細胞CD96的表現上調作用不十分明顯，提示不同細胞上CD96分子的表現調節具有不同特點。直到2004年，Fuchs及其同事發現NK細胞可通過CD96識別PVR（CD155），促進NK細胞對表現CD155靶細胞的黏附，促進NK細胞的細胞殺傷活性並可介導靶細胞表面上CD155的內化。由於PVR（CD155）高表現於某些腫瘤細胞，這一受體系統可能在NK細胞對腫瘤的識別和殺傷中起重要作用。然而，迄今為止對CD96表現和功能的認識還十分有限。相信隨著對該分子功能的不斷認識，CD96必將會引起人們更多的關注。

【0005】 CD96分子胞質區帶有一個免疫受體酪胺酸抑制模體（ITIM），其在種屬間具有很高的保守性。一般認為ITIM參與抑制訊號傳遞，近來研究發現某些分子可通過ITIM傳遞活化訊號，包含ITIM模體的受體在活化訊號傳遞中，SHP-2的募集起著關鍵性的作用，因此CD96可能會介導抑制NK細胞活性的作用。此外，CD96與CD226序列上有一定的同源性，根據目前的研究認為兩者分別通過與CD155的結合來抑制或活化NK細胞，以達到調節NK細胞功能的作用。

【0006】 截止目前，僅有如CN105636983，CN105636985等報導CD96抗體分子可在動物體內減緩免疫抑制，或EP2097535報導用CD96抗體分子清除CD96⁺的AMLSC細胞，尚未發現有具體的CD96抗體分子報導，也沒有CD96

抗體分子進入臨床研究。因此，有必要開發具有高親和力，針對特定表位的CD96抗體，以研究CD96及CD96抗體藥物的作用。

【發明內容】

【0007】本發明提供與CD96的胺基酸序列或三維結構特異性結合的單株抗體或抗原結合片段（也可稱CD96結合分子）。

【0008】一方面，本發明提供一種單株抗體或其抗原結合片段，所述單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD96，所述單株抗體包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中：

(i) 重鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：16、17和18所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區基礎上分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的HCDR變體，輕鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：19、20和21所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區基礎上分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的LCDR變體；
或

(ii) 重鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：22、23和24所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區基礎上分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的HCDR變體，輕鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：25、26和27所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區基礎上分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的LCDR變體；
或

(iii) 重鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：28、29和30所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區基礎上分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的HCDR變體，輕鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：31、32和33所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的LCDR變體；或

(iv) 重鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：34、35和36所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的HCDR變體，輕鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：37、38和39所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的LCDR變體；或

(v) 重鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：40、41和42所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的HCDR變體，輕鏈可變區包含選自在分別如SEQ ID NO：43、44和45所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區分別具有3，2，1或0個胺基酸突變的LCDR變體。所述胺基酸突變優選胺基酸替代，更優選胺基酸的保守替代。

【0009】 在一些實施方式中，所述單株抗體或抗原結合片段的CDR（包括3個重鏈CDR和3個輕鏈CDR）具有3，2或1個胺基酸突變的CDR變體是經親和力成熟方法篩選獲得的具有3，2或1個胺基酸突變的CDR變體。

【0010】 在一些實施方式中，所述單株抗體或抗原結合片段與CD96的親和力（KD）小於 10^{-7} M、小於 10^{-8} M、小於 10^{-9} M、小於 10^{-10} M或小於 10^{-11} M。

【0011】 在一些實施方式中，所述單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD96，所述單株抗體包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中：

(vi) 重鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：16、17和18胺基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區，輕鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：52、20和21胺基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區，其中所述LCDR1優選如SEQ ID NO：19、108、109或110任一所示LCDR1；或

(vii) 重鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：22、23和64胺基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區，輕鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：25、26和27胺基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區，其中所述HCDR3

優選如SEQ ID NO：24、111、112、113、114、115和116任一所示HCDR3；
或

(viii) 重鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：28、29和30胺基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區，輕鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：31、32和33胺基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區；或

(ix) 重鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：34、35和36胺基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區，輕鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：37、38和39胺基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區；或

(x) 重鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：40、119和42胺基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區，輕鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：43、44和45胺基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區，其中所述的HCDR2優選如SEQ ID NO：41、120和121所示。

【0012】 在一些實施方式中，所述單株抗體或其抗原結合片段是重組抗體，優選選自鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體。

【0013】 在一些實施方式中，所述的單株抗體或其抗原結合片段，其包含選自如下輕鏈可變區、重鏈可變區或輕鏈可變區和重鏈可變區：

a. 序列為SEQ ID NO:6、46、49、50和51任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO：7、47、48、53、54、55、56、57和58任一所示的輕鏈可變區或其變體；或

b. 序列為SEQ ID NO:8、59、62、63、65、66、67、68、69和70任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO：9、60和61任一所示的輕鏈可變區或其變體；或

c. 序列為SEQ ID NO:10所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO:11所示的輕鏈可變區或其變體；

d. 序列為SEQ ID NO:12、71、75、76和77任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO:13、72、73和74任一所示的輕鏈可變區或其變體；
或

e. 序列為SEQ ID NO:14、78、82、83、84、122和123任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO:15、79、80和81任一所示的輕鏈可變區或其變體；

其中a至e中所述變體是在所述輕鏈可變區或重鏈可變區的框架區序列上具有1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸突變。

【0014】 在一些實施方式中，其中所述的單株抗體或其抗原結合片段，其包含選自如下重鏈可變區：

(a) 胺基酸序列如SEQ ID NO:6、46、49、50和51任一所示的重鏈可變區或其變體；

(b) 胺基酸序列如SEQ ID NO:8、59、62、63、65、66、67、68、69和70任一所示的重鏈可變區或其變體；

(c) 胺基酸序列如SEQ ID NO:10所示的重鏈可變區或其變體；

(d) 胺基酸序列如SEQ ID NO:12、71、75、76和77任一所示的重鏈可變區或其變體；

(e) 胺基酸序列如SEQ ID NO:14、78、82、83、84、122和123任一所示的重鏈可變區或其變體；

其中，a至e中所述變體是在所述輕鏈可變區或重鏈可變區的框架區序列上具有1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸突變。

【0015】 在一些實施方式中，所述的單株抗體或其抗原結合片段包含選自如下輕鏈可變區：

- (a) 胺基酸序列如SEQ ID NO：7、47、48、53、54、55、56、57和58任一所示的輕鏈可變區或其變體；
- (b) 胺基酸序列如SEQ ID NO：9、60和61任一所示的輕鏈可變區或其變體；
- (c) 胺基酸序列如SEQ ID NO:11所示的輕鏈可變區或其變體；
- (d) 胺基酸序列如SEQ ID NO：13、72、73和74任一所示的輕鏈可變區或其變體；
- (e) 胺基酸序列如SEQ ID NO:15、79、80和81任一所示的輕鏈可變區或其變體；

其中，a至e中所述變體是在所述輕鏈可變區或重鏈可變區的框架區序列上具有1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸突變，所述胺基酸突變優選框架區胺基酸的回復突變。

【0016】 在一些實施方式中，其中所述抗體或其抗原結合片段包含：

- f. 選自序列為SEQ ID NO:6、46、49、50和51任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO：7、47、48、53、54、55、56、57和58任一所示的輕鏈可變區；或
- g. 選自序列為SEQ ID NO:8、59、62、63、65、66、67、68、69和70任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO：9、60和61任一所示的輕鏈可變區；或
- h. 序列為SEQ ID NO:10所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO:11所示的輕鏈可變區；
- i. 選自序列為SEQ ID NO:12、71、75、76和77任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO：13、72、73和74任一所示的輕鏈可變區；或

j. 選自序列為SEQ ID NO:14、78、82、83、84、122和123任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO:15、79、80和81任一所示的輕鏈可變區。

【0017】在一些實施方式中，所述抗體為全長抗體，進一步包括人抗體恆定區，優選包含SEQ ID NO:117所示的人抗體重鏈恆定區和/或SEQ ID NO:118所示的人輕鏈恆定區。

【0018】在一些實施方式中，所述抗原結合片段是選自Fab、Fab'、F(ab')₂、單鏈抗體（scFv）、二聚化的V區（雙抗體）、二硫鍵穩定化的V區（dsFv）和包含CDR的肽的抗原結合片段。

【0019】在一些實施方式中，所述抗體或抗原結合片段以如通過表面等離子共振（BIAcore）技術所測定的 1×10^{-7} M至 1×10^{-12} M的KD值的親和力結合人CD96。

【0020】另一方面，本發明還提供一種分離的單株抗體或其抗原結合片段，其與前述（i）-（x）或a-j的單株抗體或其抗原結合片段競爭結合人CD96。

【0021】在一些實施方式中，所述的單株抗體或其抗原結合片段，具有以下特徵中的至少一種：

- i. 以如通過表面等離子共振（BIAcore）技術所測定的 1×10^{-7} M至 1×10^{-12} M的KD值的親和力結合人CD96；
- ii. 與食蟹猴或恆河猴CD96交叉反應；
- iii. 阻斷人CD96與人CD155的結合；
- iv. 增加NK細胞和/或T細胞的活化；
- v. 阻斷由CD96與CD155結合所誘導的NK細胞活化抑制。

【0022】在一些實施方式中，所述單株抗體或其抗原結合片段結合人CD96胞外區（SEQ ID NO：3）中如IAVYHPQYGFYCA YGRPCES所示的區域。

【0023】在另一方面，本發明還提供一種多特異性抗體，其含有如上所述的抗CD96抗體或其抗原結合片段的輕鏈可變區和/或重鏈可變區。

【0024】在另一方面，本發明還提供一種單鏈抗體，其含有如上所述的抗CD96抗體或其抗原結合片段的輕鏈可變區和/或重鏈可變區。

【0025】在另一方面，本發明還提供一種藥物組合物，其含有治療有效量的根據如上所述的單株抗體或其抗原結合片段、所述的多特異性抗體或所述的單鏈抗體以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑、緩衝劑或賦形劑，優選地，所述藥物組合物單位計量中可含有0.01至99重量%的抗CD96抗體或其抗原結合片段或藥物組合物單位劑量中含單株抗體或其抗原結合片段的量為0.1-2000mg，更優選為1-1000mg。

【0026】在另一方面，本發明還提供一種分離的核酸分子，其編碼前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體。

【0027】在另一方面，本發明還提供一種重組載體，其包含上述的分離的核酸分子。

【0028】在另一方面，本發明還提供一種用上述的重組載體轉化的宿主細胞，所述宿主細胞選自原核細胞和真核細胞，優選為真核細胞，更優選哺乳動物細胞。

【0029】在另一方面，本發明還提供用於生產前述任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段的方法，所述方法包括將前述的宿主細胞在培養基中進行培養以形成並積累前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體，以及從培養物回收所述單株抗體或其抗原結合片段。

【0030】在另一方面，本發明還提供用於體外檢測或測定人CD96的方法，所述方法包括使用前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體。

【0031】在另一方面，本發明還提供前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體在製備用於檢測或測定人CD96的試劑中的用途。

【0032】在另一方面，本發明還提供一種減少或緩解免疫抑制的方法，所述方法包括向受試者施用治療有效量的前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體，或包含前述的藥物組合物，或前述的分離的核酸分子。

【0033】在另一方面，本發明還提供一種增強NK細胞活性的方法，所述方法包括使用前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體，或包含前述的藥物組合物，或前述的分離的核酸分子降低CD96活性的步驟。

【0034】在另一方面，本發明還提供一種利用前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體，或包含前述的藥物組合物，或前述的分離的核酸分子製備增強NK細胞活性的藥物的用途。

【0035】在另一方面，本發明還提供一種治療與人CD96相關的疾病的方法，所述方法包括向受試者施用治療有效量的前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體，或包含前述的藥物組合物，或前述的分離的核酸分子，以治療人CD96相關的疾病，所述疾病優選腫瘤、癌症或感染性疾病。

【0036】在另一方面，本發明還提供如前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或單鏈抗體，或包含前述的藥物組合物，或前述的分離的核酸分子或其組合在製備治療或預防疾病或病症的藥物中的用途，其中所述疾病或病症是人CD96相關疾病，所述疾病或病症優選腫瘤、癌症或感染性疾病。

【0037】在另一方面，本發明還提供作為藥物的如前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、前述的多特異性抗體或前述的單鏈抗體，或如前所述的藥物組合物，或如前所述的分離的核酸分子。

【0038】在另一方面，本發明還提供作為藥物的如前述任一項的單株抗體或其抗原結合片段、前述的多特異性抗體或前述的單鏈抗體，或如前所述的藥物組合物，或如前所述的分離的核酸分子，其中所述的藥物用於人CD96相關的疾病的治療，所述疾病優選腫瘤、癌症或感染性疾病。

【0039】適當地，癌症可以是任何對至少部分封閉CD96介導的免疫抑制、抑制或外周耐受反應的癌症。癌症的例子包括但不限於癌瘤，淋巴瘤，胚細胞瘤（blastoma），肉瘤，和白血病或淋巴樣惡性。這種癌症的更具體的例子包括鱗狀細胞癌、骨髓瘤、小細胞肺癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、頭和頸鱗狀細胞癌（HNSCC）、神經膠質瘤、何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、彌漫性大B-細胞淋巴瘤（DLBCL）、濾泡性淋巴瘤、急性成淋巴細胞性白血病（ALL）、急性髓細胞性白血病（AML）、慢性淋巴細胞性白血病（CLL）、慢性髓細胞性白血病（CML）、原發性縱隔大B-細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴細胞性淋巴瘤（SLL）、富含T-細胞/組織細胞的大B-細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、髓樣細胞白血病-1蛋白（Mcl-1）、骨髓異常增生症候群（MDS）、胃腸（道）癌、腎癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴細胞性白血病、淋巴細胞白血病、結腸直腸癌、子宮內膜癌、腎癌、前列腺癌、甲狀腺癌、黑素瘤、軟骨肉瘤、神經母細胞瘤、胰腺癌、多形性成膠質細胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宮頸癌、腦癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳腺癌、結腸癌、肝細胞癌（HCC）、透明細胞腎細胞癌（RCC）、頭和頸癌、肝膽癌（hepatobiliary cancer）、中樞神經系統癌、食管癌、惡性胸膜間皮瘤、全身性輕鏈澱粉樣變性、淋巴漿細胞性淋

巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓異常增生症候群、骨髓增生性腫瘤、神經內分泌腫瘤、梅克爾細胞癌、睪丸癌和皮膚癌。在一些實施方案中，癌症是轉移性癌症，其有能力遷移到機體內的另一位點、組織或器官，並且在該位點形成腫瘤。

【0040】典型地，對至少部分封閉CD96介導的免疫抑制、壓制或外周耐受反應的疾病或病症是提高或恢復免疫監視能夠使患有疾病或病症的受試者受益的任何疾病或病症。該疾病和病症可能包括那些能夠被細胞介導的免疫所控制或壓制的持久性疾病或病症。非限制性的實施例包括腫瘤、癌症或感染性疾病。具體地，本發明所關於癌症的例子包括但不限於癌瘤，淋巴瘤，胚細胞瘤（blastoma），肉瘤，和白血病或淋巴樣惡性。這種癌症的更具體的例子包括鱗狀細胞癌、骨髓瘤、小細胞肺癌、非小細胞肺癌

（NSCLC）、頭和頸鱗狀細胞癌（HNSCC）、神經膠質瘤、何傑金淋巴瘤、非何傑金淋巴瘤、彌漫性大B-細胞淋巴瘤（DLBCL）、濾泡性淋巴瘤、急性成淋巴細胞性白血病（ALL）、急性髓細胞性白血病（AML）、慢性淋巴細胞性白血病（CLL）、慢性髓細胞性白血病（CML）、原發性縱隔大B-細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴細胞性淋巴瘤（SLL）、富含T-細胞/組織細胞的大B-細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、髓樣細胞白血病-1蛋白（Mcl-1）、骨髓異常增生症候群（MDS）、胃腸（道）癌、腎癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴細胞性白血病、淋巴細胞白血病、結腸直腸癌、子宮內膜癌、腎癌、前列腺癌、甲狀腺癌、黑素瘤、軟骨肉瘤、神經母細胞瘤、胰腺癌、多形性成膠質細胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宮頸癌、腦癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳腺癌、結腸癌、肝細胞癌（HCC）、透明細胞腎細胞癌（RCC）、頭和頸癌、肝膽癌（hepatobiliary cancer）、中樞神經系統癌、食管癌、惡性胸膜間皮瘤、全身性輕鏈澱粉樣變性、淋

巴釐細胞性淋巴瘤 (lymphoplasmacytic lymphoma)、骨髓異常增生症候群、骨髓增生性腫瘤、神經內分泌腫瘤、梅克爾細胞癌、睪丸癌和皮膚癌。在一些實施方案中，癌症是轉移性癌症，其有能力遷移到機體內的另一位點、組織或器官，並且在該位點形成腫瘤。

【0041】所關於的感染性疾病指包括由病毒或病原菌感染引起的並且可通過呼吸器官、血液接觸或皮膚接觸感染的所有疾病。這些感染性疾病的非限制性的實例包括但不限於乙型肝炎、丙型肝炎、人乳頭狀瘤病毒 (HPV) 感染、巨細胞病毒感染、病毒性呼吸道疾病、流感、EB病毒 (EBV) 感染、單純皰疹病毒 (HSV包括HSV1和HSV2) 感染、水痘帶狀皰疹病毒 (VSV) 感染以及巨細胞病毒 (CMV) 感染等。

【0042】本發明CD96單株抗體或抗原結合片段具有很高的特異性、與CD96的高親和力，人源化抗體的免疫原性大大降低，同時完全保留了鼠源抗體的特異性，高親和力和活性。

【圖式簡單說明】

【0043】

圖1：CD96人源化抗體阻斷hCD96-CHOs細胞結合實驗。

圖2：CD96人源化抗體阻斷hCD96抗原和hCD155-CHOs細胞結合實驗。

圖3：抗體競爭實驗。圖3A包被抗體 (A抗體) 是h1718-012；圖3B包被抗體是h1719-014；圖3C包被抗體是h1721-003；圖3D包被抗體是ch1720；圖3E包被抗體是h1722-010。

圖4：CD96嵌合抗體/肽段複合物的CD96-CHOs細胞結合實驗 (FACS檢測)，圖4A為ch1718與3#肽段檢測結果，圖4B為ch1719與3#肽段檢測結果，圖4C為ch1720與不同肽段檢測結果，圖4D為ch1721與不同肽段檢測結果。

圖5：ch1718、ch1719、ch1720促進NK細胞對腫瘤細胞的殺傷作用，E:T=1:1。

【實施方式】

【0044】術語

【0045】為了更容易理解本發明，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本發明所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

【0046】本發明所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如J. *biol. chem.*, 243, p3558 (1968)中所述。

【0047】本發明所述的「抗體」指免疫球蛋白，是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈通過鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈、和 ϵ 鏈。同一類Ig根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞類，如IgG可分為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈通過恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五類Ig中每類Ig都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

【0048】在本發明中，本發明所述的抗體輕鏈可進一步包含輕鏈恆定區，所述的輕鏈恆定區包含人源或鼠源的 κ 、 λ 鏈或其變體。

【0049】在本發明中，本發明所述的抗體重鏈可進一步包含重鏈恆定區，所述的重鏈恆定區包含人源或鼠源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其變體。

【0050】抗體重鏈和輕鏈靠近N端的約110個胺基酸的序列變化很大，為可變區（Fv區）；靠近C端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區。可變區包括3個高變區（HVR）和4個序列相對保守的骨架區（FR）。3個高變區

決定抗體的特異性，又稱為互補性決定區(CDR)。每條輕鏈可變區(LCVR)和重鏈可變區(HCVR)由3個CDR區和4個FR區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。輕鏈的3個CDR區指LCDR1、LCDR2、和LCDR3；重鏈的3個CDR區指HCDR1、HCDR2和HCDR3。本發明所述的抗體或抗原結合片段的LCVR區和HCVR區的CDR胺基酸殘基在數量和位置符合已知的Kabat編號規則(LCDR1-3，HCDR1-3)。

【0051】 本發明的抗體包括鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體，優選人源化抗體。

【0052】 術語「鼠源抗體」在本發明中為根據本領域知識和技能製備的對人CD96的單株抗體。製備時用CD96抗原注射試驗對象，然後分離表現具有所需序列或功能特性的抗體的融合瘤。在本發明一個優選的實施方案中，所述的鼠源CD96抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3或其變體的重鏈恆定區。

【0053】 術語「嵌合抗體(chimeric antibody)」，是將鼠源性抗體的可變區與人抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫應答反應。建立嵌合抗體，要先建立分泌鼠源性特異性單抗的融合瘤，然後從鼠融合瘤細胞中複製可變區基因，再根據需要複製人抗體的恆定區基因，將鼠可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入表現載體中，最後在真核系統或原核系統中表現嵌合抗體分子。在本發明一個具體的實施方案中，所述的CD96嵌合抗體的抗體輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。所述的CD96嵌合抗體的抗體重鏈進一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其變體的重鏈恆定區，優選包含人源IgG1、IgG2或IgG4

重鏈恆定區，或者包含胺基酸突變（如YTE突變或回復突變）的IgG1、IgG2或IgG4重鏈恆定區變體。

【0054】術語「人源化抗體（humanized antibody）」，是指將鼠的CDR序列移植到人的抗體可變區框架，即不同類型的人種系抗體框架序列中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量鼠蛋白成分，從而誘導的異源性反應。此類構架序列可以從包括種系抗體基因序列的公共DNA數據庫或公開的參考文獻獲得。如人重鏈和輕鏈可變區基因的種系DNA序列可以在「VBase」人種系序列數據庫（www.mrccpe.com.ac.uk/vbase）中獲得，以及在Kabat, E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版中找到。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對所述的人抗體可變區框架序列進行最少反向突變或回復突變，以保持活性。本發明的人源化抗體也包括進一步由噬菌體展示對CDR進行親和力成熟後的人源化抗體。在本發明一個優選的實施方案中，所述的CD96人源化抗體中鼠的CDR序列選自SEQ ID NO:16-21、22-27、28-33、34-39或40-45；人的抗體可變區框架經過設計選擇，其中所述抗體重鏈可變區上的重鏈FR區序列，來源於人種系重鏈序列，和人種系輕鏈序列。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對所述的人抗體可變區可進行最少反向突變（回復突變，即將人抗體來源的FR區胺基酸殘基突變成原始來源抗體對應位置的胺基酸殘基），以保持活性。

【0055】CDR的移植可由於與抗原接觸的構架殘基的變化而導致產生的CD96抗體或其抗原結合片段對抗原的親和力減弱。此類相互作用可以是體細胞高度突變的結果。因此，可能仍然需要將此類供體構架胺基酸移植至人源化抗體的構架。來自非人CD96抗體或其抗原結合片段的參與抗原結合的胺基酸殘基可通過檢查鼠單株抗體可變區序列和結構來鑑定。CDR供體

構架中與種系不同的各殘基可被認為是相關的。如果不能確定最接近的種系，那麼可將序列與亞型共有序列或具有高相似性百分數的鼠序列的共有序列相比較。稀有構架殘基被認為可能是體細胞高度突變的結果，從而在結合中起著重要作用。

【0056】在類似「分別具有3、2、1或0個胺基酸突變的，如SEQ ID NO:X、SEQ ID NO:Y和SEQ ID NO:Z所示的CDR1、CDR2和CDR3的CDR變體」的描述中，示例性的解釋是對CDR的突變可以包含3個、2個、1個或0個胺基酸的突變，CDR1、CDR2和CDR3之間可以任選地選擇相同或不同數目的胺基酸殘基進行突變，例如在如SEQ ID NO:X、SEQ ID NO:Y和SEQ ID NO:Z所示的CDR1、CDR2和CDR3的基礎上，對CDR1進行1個胺基酸的突變，對CDR2和CDR3進行0個胺基酸突變。當對某個CDR進行0個胺基酸突變時，則該具有0個胺基酸突變的CDR變體仍是該CDR本身。

【0057】術語抗體的「抗原結合片段」或「功能片段」是指抗體的保持特異性結合抗原（例如，CD96）的能力的一個或多個片段。已顯示可利用全長抗體的片段來實現抗體的抗原結合功能。術語抗體的「抗原結合片段」中包含的結合片段的實例包括（i）Fab片段，由VL、VH、CL和CH1結構域組成的單價片段；（ii）F(ab')₂片段，包含通過鉸鏈區上的二硫橋連接的兩個Fab片段的二價片段，（iii）由VH和CH1結構域組成的Fd片段；（iv）由抗體的單臂的VH和VL結構域組成的Fv片段；（v）單結構域或dAb片段（Ward等人,(1989)Nature341：544-546），其由VH結構域組成；和（vi）分離的互補決定區（CDR）或（vii）可任選地通過合成的接頭連接的兩個或更多個分離的CDR的組合。此外，雖然Fv片段的兩個結構域VL和VH由分開的基因編碼，但可使用重組方法，通過合成的接頭連接它們，從而使得其能夠產生為其中VL和VH區配對形成單價分子的單個蛋白質鏈（稱為

單鏈Fv(scFv)；參見，例如，Bird等人(1988)Science 242:423-426；和Huston等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci USA85:5879-5883)。此類單鏈抗體也意欲包括在術語抗體的「抗原結合片段」中。使用本領域技術人員已知的常規技術獲得此類抗體片段，並且以與對於完整抗體的方式相同的方式就功用性篩選片段。可通過重組DNA技術或通過酶促或化學斷裂完整免疫球蛋白來產生抗原結合部分。抗體可以是不同同種型的抗體，例如，IgG（例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型）、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗體。

【0058】本發明的抗原結合片段包括Fab、F(ab')₂、Fab'、單鏈抗體（scFv）、二聚化的V區（雙抗體）、二硫鍵穩定化的V區（dsFv）、包含CDR的肽等。

【0059】Fab是通過用蛋白酶木瓜蛋白酶（切割H鏈的224位的胺基酸殘基）處理IgG抗體分子所獲得的片段中的具有約50,000的分子量並具有抗原結合活性的抗體片段，其中H鏈N端側的約一半和整個L鏈通過二硫鍵結合在一起。

【0060】本發明的Fab可以通過用木瓜蛋白酶處理本發明的特異性識別人CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體來生產。此外，可以通過將編碼所述抗體的Fab的DNA插入到原核生物表現載體或真核生物表現載體中並將載體導入到原核生物或真核生物中以表現Fab來生產所述Fab。

【0061】F(ab')₂是通過用酶胃蛋白酶消化IgG鉸鏈區中兩個二硫鍵的下方部分而獲得的分子量為約100,000並具有抗原結合活性並包含在鉸鏈位置相連的兩個Fab區的抗體片段。

【0062】本發明的F(ab')₂可以通過用胃蛋白酶處理本發明的特異性識別人CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體來生產。此外，可以通過用硫醚鍵或二硫鍵連接下面描述的Fab'來生產所述F(ab')₂。

【0063】Fab'是通過切割上述F(ab')₂的鉸鏈區的二硫鍵而獲得的分子量為約50,000並具有抗原結合活性的抗體片段。本發明的Fab'可以通過用還原劑例如二硫蘇糖醇處理本發明的特異性識別CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的F(ab')₂來生產。

【0064】此外，可以通過將編碼抗體的Fab'片段的DNA插入到原核生物表現載體或真核生物表現載體中並將載體導入到原核生物或真核生物中以表現Fab'來生產所述Fab'。

【0065】術語「單鏈抗體」、「單鏈Fv」或「scFv」意指包含通過接頭連接的抗體重鏈可變結構域（或區域；VH）和抗體輕鏈可變結構域（或區域；VL）的分子。此類scFv分子可具有一般結構：NH₂-VL-接頭-VH-COOH 或 NH₂-VH-接頭-VL-COOH。合適的現有技術接頭由重複的GGGGGS胺基酸序列或其變體組成，例如使用1-4 個重複的變體（Holliger 等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448）。可用於本發明的其他接頭由Alfthan等人 (1995)，Protein Eng.8:725-731，Choi 等人 (2001)，Eur.J.Immuno 1.31:94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov 等人 (1999)，J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001)，Cancer Immunol. 描述。

【0066】本發明的scFv可以通過以下步驟來生產：獲得本發明的特異性識別CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體的VH和VL的編碼cDNA，構建編碼scFv的DNA，將所述DNA插入到原核生物表現載體或真核生物表現載體中，然後將所述表現載體導入到原核生物或真核生物中以表現scFv。

【0067】雙抗體是其中scFv被二聚體化的抗體片段，是具有二價抗原結合活性的抗體片段。在二價抗原結合活性中，兩個抗原可以是相同或不同的。

【0068】本發明的雙抗體可以通過以下步驟來生產：獲得本發明的特異性識別人CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體的VH和VL的編碼cDNA，構建編碼scFv的DNA以使肽接頭的胺基酸序列長度為8個殘基或更少，將所述DNA插入到原核生物表現載體或真核生物表現載體中，然後將所述表現載體導入到原核生物或真核生物中以表現雙抗體。

【0069】dsFv是通過將其中每個VH和VL中的一個胺基酸殘基被半胱胺酸殘基取代的多肽經由半胱胺酸殘基之間的二硫鍵相連而獲得的。可以按照已知方法（Protein Engineering,7,697(1994)）基於抗體的三維結構預測來選擇被半胱胺酸殘基取代的胺基酸殘基。

【0070】本發明的dsFv可以通過以下步驟來生產：獲得本發明的特異性識別人CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體的VH和VL的編碼cDNA，構建編碼dsFv的DNA，將所述DNA插入到原核生物表現載體或真核生物表現載體中，然後將所述表現載體導入到原核生物或真核生物中以表現dsFv。

【0071】包含CDR的肽是通過包含VH或VL的CDR中的一個或多個區域而構成的。包含多個CDR的肽可以被直接相連或經由適合的肽接頭相連。

【0072】本發明的包含CDR的肽可以通過以下步驟來生產：構建本發明的特異性識別人CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體的VH和VL的CDR的編碼DNA，將所述DNA插入到原核生物表現載體或真核生物表現載體中，然後將所述表現載體導入到原核生物或真核生物中以表現所述肽。也可以通過化學合成方法例如Fmoc方法或tBoc方法來生產所述包含CDR的肽。

【0073】本文中使用的術語「抗體框架」，是指可變結構域VL或VH的一部分，其用作該可變結構域的抗原結合環（CDR）的支架。從本質上講，其是不具有CDR的可變結構域。

【0074】術語「胺基酸突變」是指多肽與其變體之間，在多肽片段上某個或某些胺基酸位點之間的突變，其中變體可以由多肽上某個或某些位點經替代、插入或缺失胺基酸獲得。

【0075】術語「表位」或「抗原決定簇」是指抗原上免疫球蛋白或抗體特異性結合的部位（例如，CD96分子上的特定部位）。表位通常以獨特的空間構象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個連續或非連續的胺基酸。參見，例如，*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*，第66卷，G.E.Morris，Ed.(1996)。

【0076】術語「特異性結合」、「選擇性結合」、「選擇性地結合」和「特異性地結合」是指抗體對預先確定的抗原上的表位的結合。通常，抗體以大約小於 10^{-8}M ，例如大約小於 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 或更小的親和力（KD）結合。

【0077】術語「KD」是指特定抗體-抗原相互作用的解離平衡常數。通常，本發明的抗體以小於大約 10^{-7}M ，例如小於大約 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的解離平衡常數（KD）結合CD96，例如，如使用表面等離子體共振（SPR）技術在BIACORE 儀中測定的。

【0078】當術語「競爭」用於競爭相同表位的抗原結合蛋白（例如中和抗原結合蛋白或中和抗體或特異性結合的抗體）的情況中時，意指在抗原結合蛋白之間競爭，其通過以下測定法來測定：待檢測的抗原結合蛋白（例如抗體或其免疫學功能片段）防止或抑制（例如降低）參考抗原結合蛋白（例如配體或參考抗體）與共同抗原（例如CD96抗原或其片段）的特異性

結合。眾多類型的競爭性結合測定可用於確定一種抗原結合蛋白是否與另一種競爭，這些測定例如：固相直接或間接放射免疫測定（RIA）、固相直接或間接酶免疫測定（EIA）、夾心競爭測定（參見例如Stahli等，1983，*Methods in Enzymology* 9：242-253）；固相直接生物素-親和素EIA（參見例如Kirkland等，1986，*J.Immunol.*137：3614-3619）、固相直接標記測定、固相直接標記夾心測定（參見例如Harlow和Lane，1988，*Antibodies， A Laboratory Manual*（抗體，實驗室手冊），Cold Spring Harbor Press）；用I-125標記物的固相直接標記RIA（參見例如Morel等，1988，*Molec.Immunol.*25：7-15）；固相直接生物素-親和素EIA（參見例如Cheung，等，1990，*Virology*176：546-552）；和直接標記的RIA（Moldenhauer等，1990，*Scand.J.Immunol.*32：77-82）；或通過如本發明測試例7的方法進行測定。通常所述測定法關於使用能與帶有未標記的檢測抗原結合蛋白及標記的參考抗原結合蛋白結合的純化抗原（所述抗原在固態表面或細胞表面上）。在待測抗原結合蛋白存在下，測量結合於固態表面或細胞的標記的量，來測量競爭性抑制。或者如在本文測試例7中提供的關於用於測定競爭性結合的方法，通過固定抗原結合蛋白A，檢測與抗原結合蛋白預先結合的標記過的抗原訊號變化來測定競爭性抑制。通常，這種競爭性抑制測試會調換抗原結合蛋白A和抗原結合蛋白B的位置進行確認。由競爭性測定（競爭抗原結合蛋白）鑒定的抗原結合蛋白包括：與參考抗原結合蛋白相同的表位發生結合的抗原結合蛋白；以及，與充分接近參考抗原結合蛋白結合的表位所鄰近的表位發生結合的抗原結合蛋白，所述兩個表位在空間上互相妨礙結合的發生。通常當競爭的抗原結合蛋白過量存在時，部分競爭性抗原結合蛋白抑制（例如降低）至少40%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%）參考抗原結合蛋白與共同抗原

的特異性結合。在完全競爭情況下，參考抗原結合蛋白與抗原的結合被抑制至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或更多。抑制小於30%被認為是不競爭。在以測試例7提供的測試競爭性結合的方法中，無論競爭性抗原結合蛋白作為抗原結合蛋白A或作為抗原結合蛋白B能夠抑制參考抗原結合蛋白上述程度的結合，都被認為是競爭或部分競爭。

【0079】「胺基酸保守修飾」或「胺基酸保守取代」或「胺基酸的保守替代」指蛋白質中的胺基酸被具有相似特徵（例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象和剛性等）的其他胺基酸取代，從而使得在不改變蛋白質的生物活性或其他所需特性（例如抗原親和力和/或特異性）的情況下，可以經常進行改變。本領域技術人員認識到，通常，多肽的非必需區域中的單個胺基酸取代基本上不改變生物活性（參見，例如，Watson等人，(1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 第224頁（第4版））。此外，結構上或功能上相似的胺基酸的取代不太可能破壞生物活性。示例性保守取代於下表「示例性胺基酸保守取代」中陳述。

示例性胺基酸保守取代

原始殘基	保守取代
Ala(A)	Gly; Ser
Arg(R)	Lys; His
Asn(N)	Gln; His; Asp
Asp(D)	Glu; Asn
Cys(C)	Ser; Ala; Val
Gln(Q)	Asn; Glu
Glu(E)	Asp; Gln
Gly(G)	Ala
His(H)	Asn; Gln
Ile(I)	Leu; Val

Leu(L)	Ile; Val
Lys(K)	Arg; His
Met(M)	Leu; Ile; Tyr
Phe(F)	Tyr; Met; Leu
Pro(P)	Ala
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe
Tyr(Y)	Trp; Phe
Val(V)	Ile; Leu

【0080】 本文中使用的術語「核酸分子」是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是單鏈或雙鏈的，但首選是雙鏈DNA。當將核酸與另一個核酸序列置於功能關係中時，核酸是「有效連接的」。例如，如果啟動子或增強子影響編碼序列的轉錄，那麼啟動子或增強子有效地連接至所述編碼序列。

【0081】 術語「載體」是指能夠運輸與其連接的另一個核酸的核酸分子。在一個實施方案中，載體是「質粒」，其是指可將另外的DNA區段連接至其中的環狀雙鏈DNA環。在另一個實施方案中，載體是病毒載體，其中可將另外的DNA區段連接至病毒基因組中。本文中公開的載體能夠在已引入它們的宿主細胞中自主複製（例如，具有細菌的複製起點的細菌載體和附加型哺乳動物載體）或可在引入宿主細胞後整合入宿主細胞的基因組，從而隨宿主基因組一起複製（例如，非附加型哺乳動物載體）。

【0082】 現有技術中熟知生產和純化抗體和抗原結合片段的方法，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8章和15章。例如，鼠可以用人CD96或其片段免疫，所得到的抗體能被覆性、純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的CDR區加上一個或多個人源FR區。人FR種系序列可以通過比對IMGT人類抗體可變區種系基因數據庫和MOE軟

件，從ImMunoGeneTics (IMGT) 的網站<http://imgt.cines.fr>得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351上獲得。

【0083】術語「宿主細胞」是指已向其中引入了表現載體的細胞。宿主細胞可包括微生物（例如細菌）、植物或動物細胞。易於轉化的細菌包括腸桿菌科(enterobacteriaceae)的成員，例如大腸桿菌(*Escherichia coli*)或沙門氏菌(*Salmonella*)的菌株；芽孢桿菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌(*Pneumococcus*)；鏈球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。適當的微生物包括釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。適當的動物宿主細胞系包括CHO（中國倉鼠卵巢細胞系）、HEK293和NS0 細胞。

【0084】本發明工程化的抗體或抗原結合片段可用常規方法製備和純化。比如，編碼重鏈和輕鏈的cDNA序列，可以複製並重組至GS表現載體。重組的免疫球蛋白表現載體可以穩定地轉染CHO細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表現系統會導致抗體的糖基化，特別是在Fc區的高度保守N端位點。通過表現與人CD96特異性結合的抗體得到穩定的複製。陽性的複製在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用常規技術純化。比如，用含調整過的緩衝液的A或G Sepharose FF柱進行純化。洗去非特異性結合的組分。再用pH梯度法洗脫結合的抗體，用SDS-PAGE檢測抗體片段，收集。抗體可用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70°C，或者凍乾。

【0085】「緩解免疫抑制」表示以抑制或抑制一種或更多種通常表現CD96的細胞的免疫功能，至少部分消除、去除或克服CD96的正常活性或功能。典型地，一種或更多種通常表現CD96的細胞是T細胞，包括CD4⁺和CD8⁺T

細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NKT細胞、以及自然殺傷（NK）細胞。在一些實施方案中，緩解免疫抑制可能包括或關於廢除對外來病原體、顯示外來病原體的宿主細胞（例如在自體MHC中顯示外來病原體衍生的多肽）和/或宿主的癌細胞或組織的外周耐受。

【0086】術語「阻斷」是指本發明的抗體或其抗原結合片段封閉、部分封閉、乾擾、降低、抑制、減少靶蛋白或使其失活的能力，所述靶蛋白即CD96和/或其配體（如CD155）。因此，本領域的技術人員理解術語「阻斷」可以涵蓋所述配體或受體的全部和/或部分活性喪失。所述配體或受體的活性可以通過與配體/受體蛋白的活性位點結合的化合物，或通過其它方式，諸如使活化受抑制的第一蛋白的第二蛋白失活來阻抑或抑制。例如，CD96和CD155之間的相互作用的全部和/或部分抑制可以通過NK細胞活化增加來表示。

【0087】術語「腫瘤」指所有贅生性（neoplastic）細胞生長和增殖，無論是惡性的還是良性的，及所有癌前（pre-cancerous）和癌性細胞和組織。

【0088】術語「癌症」和「癌性」指向或描述哺乳動物中特徵通常為細胞生長不受調節的生理疾患。術語「癌症」，「癌性」，「細胞增殖性病症」，「增殖性病症」和「腫瘤」在本文中提到時並不互相排斥。

【0089】「給予」、「施用」和「處理」當應用於動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。「給予」、「施用」和「處理」可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中所述流體與細胞接觸。「給予」、「施用」和「處理」還意指通過試劑、診斷、結合組合物或通過另一種細胞體外和離體處理細胞。「處理」當應

用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

【0090】「治療」意指給予患者內用或外用治療劑，例如包含本發明的任一種抗體或其抗原結合片段的組合物或編碼抗體或其抗原結合片段的核酸分子，所述患者具有一種或多種疾病症狀，而已知所述治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，以誘導這類症狀退化或抑制這類症狀發展到任何臨床有測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量（也稱作「治療有效量」）可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。通過醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本發明的實施方案（例如治療方法或製品）在緩解每個目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如Student t檢驗、卡方檢驗、依據Mann和Whitney的U檢驗、Kruskal-Wallis檢驗（H檢驗）、Jonckheere-Terpstra檢驗和Wilcoxon檢驗確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

【0091】「有效量」包含足以改善或預防醫學疾病的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定患者或獸醫學受試者的有效量可依據以下因素而變化：例如，待治療的病症、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

【0092】「外源性」指根據情況在生物、細胞或人體外產生的物質。「內源性」指根據情況在細胞、生物或人體內產生的物質。

【0093】「同源性」是指兩個多核苷酸序列之間或兩個多肽之間的序列相似性。當兩個比較序列中的位置均被相同鹼基或胺基酸單體亞基佔據時，例如如果兩個DNA分子的每一個位置都被腺嘌呤佔據時，那麼所述分子在該位置是同源的。兩個序列之間的同源性百分率是兩個序列共有的匹配或同源位置數除以比較的位置數 $\times 100$ 的函數。例如，在序列最佳比對時，如果兩個序列中的10個位置有6個匹配或同源，那麼兩個序列為60%同源；如果兩個序列中的100個位置有95個匹配或同源，那麼兩個序列為95%同源。一般而言，當比對兩個序列而得到最大的同源性百分率時進行比較。

【0094】本文使用的表述「細胞」、「細胞系」和「細胞培養物」可互換使用，並且所有這類名稱都包括後代。因此，單詞「轉化體」和「轉化細胞」包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在DNA含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉化細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

【0095】本文使用的「聚合酶鏈式反應」或「PCR」是指其中微量的特定部分的核酸、RNA和/或DNA如在例如美國專利號4,683,195中所述擴增的程序或技術。一般來說，需要獲得來自目標區域末端或之外的序列訊息，使得可以設計寡核苷酸引物；這些引物在序列方面與待擴增模板的對應鏈相同或相似。2個引物的5'末端核苷酸可以與待擴增材料的末端一致。PCR可用於擴增特定的RNA序列、來自總基因組DNA的特定DNA序列和由總細胞RNA轉錄的cDNA、噬菌體或質粒序列等。一般參見Mullis等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 編輯，(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的PCR被視為用於擴增核酸測試樣品的核酸聚合酶反應法的一個實例，但不是唯一的實例，所述方

法包括使用作為引物的已知核酸和核酸聚合酶，以擴增或產生核酸的特定部分。

【0096】「任選」或「任選地」意味著隨後所描述地事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如，「任選包含1-3個抗體重鏈可變區」意味著特定序列的抗體重鏈可變區可以但不必須存在。

【0097】「藥物組合物」表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，所述其他組分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。藥物組合物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【0098】此外，本發明包括用於治療與CD96相關的疾病的藥劑，所述藥劑包含本發明的單株抗體或其抗體片段作為活性成分。

【0099】對與CD96相關的疾病沒有限制，只要它是與CD96相關的疾病即可，例如利用本發明的分子誘導的治療反應可通過結合人類CD96然後阻斷CD96與其配體CD155的結合，從而降低對NK細胞的抑制。因此，當處於適於治療應用的製備物和製劑中時，本發明的分子對這樣一些人是非常有用的，他們患有腫瘤、癌症或感染性疾病。

【0100】此外，本發明關於用於免疫檢測或測定CD96的方法、用於免疫檢測或測定CD96的試劑、用於免疫檢測或測定表現CD96的細胞的方法和用於診斷與CD96相關的疾病的診斷劑，其包含本發明的特異性識別人CD96並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體或抗體片段作為活性成分。

【0101】在本發明中，用於檢測或測定CD96的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫檢測或測定方法。

【0102】免疫檢測或測定方法是使用標記的抗原或抗體檢測或測定抗體量或抗原量的方法。免疫檢測或測定方法的實例包括放射性物質標記的免疫抗體方法(RIA)、酶免疫測定法(EIA或ELISA)、熒光免疫測定法(FIA)、發光免疫測定法、蛋白質免疫印跡法、物理化學方法等。

【0103】上述與CD96相關的疾病可以通過用本發明的單株抗體或抗體片段檢測或測定表現CD96的細胞來診斷。

【0104】為了檢測表現多肽的細胞，可以使用已知的免疫檢測方法，並優先使用免疫沉澱法、螢光細胞染色法、免疫組織染色法等。此外，可以使用利用FMAT8100HTS系統(Applied Biosystem)的螢光抗體染色法等。

【0105】在本發明中，對用於檢測或測定CD96的活體樣品沒有特別限制，只要它具有包含表現CD96的細胞的可能性即可，例如組織細胞、血液、血漿、血清、胰液、尿液、糞便、組織液或培養液。

【0106】根據所需的診斷方法，含有本發明的單株抗體或其抗體片段的診斷劑還可以含有用於執行抗原-抗體反應的試劑或用於檢測反應的試劑。用於執行抗原-抗體反應的試劑包括緩衝劑、鹽等。用於檢測的試劑包括通常用於免疫檢測或測定方法的試劑，例如識別所述單株抗體、其抗體片段或其結合物的標記的第二抗體和與所述標記對應的受質等。

【0107】具體實施方式

【0108】以下結合實施例進一步描述本發明，但這些實施例並非限制著本發明的範圍。本發明實施例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，如冷泉港的抗體技術實驗手冊，分子複製手冊；或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未註明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

【0109】實施例1、CD96抗原蛋白設計及表現

【0110】以人CD96蛋白（Uniprot號：P40200-2）作為本發明CD96的模板，設計本發明關於的抗原及檢測用蛋白的胺基酸序列，可選的在CD96蛋白基礎上融合不同的標籤，分別複製到pHr載體上（自產）或pXC-17.4載體上（LONZA）上，在293細胞瞬轉表現或CHO細胞穩定表現純化，獲得編碼本發明抗原及檢測用蛋白。以下CD96抗原未特殊說明的均指人CD96。

【0111】帶Flag標籤的CD96胞外區（SEQ ID NO：1）：CD96-Flag，用於免疫小鼠

MEKKWKYCAVYYIIQIHFKVWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQT
 QTVGFFVQM~~QWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA~~YGRPCESLVTFTETP
 ENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADE
 WNSNHTIEIEINQTL~~EIPCFQNSSSKISSEFTY~~AWSVEDNGTQETLISQNH
 LISNSTLLKDRV~~KLGTDYRLHLSPVQIFDDGRKF~~SCHIRVGP~~NKILRSST~~
 VKVFAKPEIPVIVENNSTDVLVERRFTCLLKNVFPKANITWFIDGSFLHD
 EKEGIYITNEERK~~GKDGFL~~ELKSVLTRVHSNKPAQSDNLT~~IWC~~MALSPV
 PGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTD~~PPLSV~~TESTLDTQPSPASSVSPARYPA
 TSSVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSRIPS
 ETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVN
 KPKDGM~~DYK~~DDDDK

註釋：劃橫線部分為訊號肽，斜體部分為Flag-tag標籤。

【0112】CD96胞外區和mIgG2a Fc的融合蛋白（SEQ ID NO：2）：CD96-mFc，用於免疫

MEFGLSWLFLVAILKGVQCVWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQT
 VGFFVQM~~QWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA~~YGRPCESLVTFTETPEN
 GSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEW

NSNHTIEIEINQTLEIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQNHLS
 NSTLLKDRVKLGTDYRLHLSPVQIFDDGRKFSCHIRVGPKNILRSSTTVK
 VFAKPEIPVIVENNSTDVLVERRFTCLLKNVFPKANITWFIDGSFLHDEK
 EGIYITNEERKKGKDGFLKSVLTRVHSNKPAQSDNLTWCMALSPVPG
 NKVWNISSEKITFLLGSEISSTDPPLSVTESTLDTQPSPASSVSPARYPATS
 SVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSRIPSET
 YSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVNKP
 KDGMEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVV
 VDSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM
 SGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLT
 CMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKN
 WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPGK

註釋：劃橫線部分為訊號肽，斜體部分為mFc。

【0113】全長CD96（SEQ ID NO：3）：用於構建CD96過表現細胞株，用於免疫和檢測

MEKKWKYCAVYYIIQIHVKGVWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTTCQT
 QTVGFFVQMQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCAYGRPCESLVTFTETP
 ENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADE
 WNSNHTIEIEINQTLEIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQNH
 LISNSTLLKDRVKLGTDYRLHLSPVQIFDDGRKFSCHIRVGPKNILRSST
 VKVFAKPEIPVIVENNSTDVLVERRFTCLLKNVFPKANITWFIDGSFLHD
 EKEGIYITNEERKKGKDGFLKSVLTRVHSNKPAQSDNLTWCMALSPV
 PGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTDPPLSVTESTLDTQPSPASSVSPARYPA
 TSSVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSRIPS

ETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVN
 KPKDGMSWPVIVAALLFCCMILFGLGVRKWCQYQKEIMERPPPFKPPPPPI
 KYTCIQEPNESDLPYHEMETL

註釋：下劃橫線部分為訊號肽，正體部分為胞外區，斜體部分為跨膜區和胞內區

【0114】帶His標籤的CD96胞外區（SEQ ID NO：4）：CD96-His，用於檢測

MEKKWKYCAVYYIIQIHVKGVWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQT
 QTVGFFVQM^QWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA^YGRPCESLVTFTETP
 EN^GSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADE
 WNSNHTIEIEINQ^TLEIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQNH
 LISNSTLLKDRV^KLGTDYRLHLSPVQIFDDGRKFSCHIRVGP^NKILRSST
 VKVFAKPEIPVIVENNSTDV^LVERRFTCLLKNVFPKANITWFIDGSFLHD
 EKEGIYITNEERK^GKDGFLELKS^VLTRVHSNKPAQSDNLTIWCMALSPV
 PGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTD^PPLSVTESTLDTQPSPASSVSPARYPA
 TSSVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSRIPS
 ETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVN
 KPKDGMHHHHHH

註釋：劃橫線部分為訊號肽，斜體部分為His tag。

【0115】CD96胞外區和hIgG1Fc的融合蛋白（SEQ ID NO：5）：CD96-Fc，用於檢測

MEFGLSWLFLVAILKGVQCVWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQT
 VGFFVQM^QWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA^YGRPCESLVTFTETPEN
 GSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEW

NSNHTIEIEINQTL EIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQNHLS
 NSTLLKDRVKLGTDYRLHLSPVQIFDDGRKFSCHIRVGP NKILRSSTTVK
 VFAKPEIPVIVENNSTDVL VERRFTCLLKNVFPKANITWFIDGSFLHDEK
 EGIYITNEERKKGKDGFL ELKSVLTRVHSNKPAQSDNLT IWCMA LSPVPG
 NKVWNISSEKITFLLGSEISSTDPPLSVTESTLDTQPSPASSVSPARYPATS
 SVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSRIPSET
 YSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVNKP
 KDGM EPKSSDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

註釋：劃橫線部分為訊號肽，斜體部分為Fc。

【0116】實施例2、CD96相關重組蛋白的純化，以及融合瘤抗體、重組抗體的純化

【0117】1. 帶Flag標籤的CD96-Flag重組蛋白的純化步驟：

【0118】將樣品高速離心去除雜質，並濃縮至適當體積。使用0.5×PBS平衡flag親和柱，沖洗2-5倍柱體積。將除雜後的細胞表現上清樣品上柱。用0.5×PBS沖洗柱子，至A280讀數降至基線。用含有0.3M NaCl的PBS沖洗柱子，沖洗雜蛋白，並收集。用0.1M乙酸(pH3-4)或者Flag肽溶液洗脫目的蛋白，並收集目的產物洗脫峰，調節pH至中性。

【0119】收集的洗脫產物濃縮後可示例性地使用凝膠層析Superdex200(GE)進一步純化，流動相為PBS，去除聚體及雜蛋白峰，收集目的產物洗脫峰。所得到的蛋白經電泳，肽圖，LC-MS鑒定為正確後分裝備用。

【0120】 2. 帶His標籤的CD96-His重組蛋白的純化步驟：

【0121】 將細胞表現上清樣品高速離心去除雜質，並將緩衝液置換為PBS，加入咪唑至終濃度為5mM。用含有5mM咪唑的PBS溶液平衡鎳柱，沖洗2-5倍柱體積。將置換後的上清樣品上柱結合，介質可以選擇不同公司的鎳柱。用含有5mM咪唑的PBS溶液沖洗柱子，至A280讀數降至基線。後用PBS+10mM咪唑沖洗層析柱，除去非特異結合的雜蛋白，並收集流出液。再用含有300mM咪唑的PBS溶液洗脫目的蛋白，並收集洗脫峰。

【0122】 收集的洗脫產物濃縮後可示例性地用凝膠層析Superdex200(GE) 進一步純化，流動相為PBS，去除聚體及雜蛋白峰，收集目的產物洗脫峰。所得到的蛋白經電泳，肽圖，LC-MS鑒定為正確後分裝備用。

【0123】 3. 融合瘤上清分離純化/ProteinG 親和層析：重組抗體，Fc融合蛋白的純化

【0124】 對於小鼠融合瘤上清純化首選ProteinG進行親和層析，將培養所得融合瘤離心取上清，根據上清體積加入10-15%體積的1M Tris-HCl

(pH8.0-8.5) 調節上清pH。ProteinG柱利用6M鹽酸胍洗3-5倍柱體積，然後利用純水清洗3-5倍柱體積；利用如1×PBS (pH7.4) 緩衝體系作為平衡緩衝液對層析柱平衡3-5倍柱體積；細胞上清利用低流速上樣結合，控制流速使保留時間約1min或更長時間；利用1×PBS (pH7.4) 洗滌層析柱3-5倍柱體積至紫外吸收回落至基線；利用0.1M醋酸/醋酸鈉 (pH3.0) 緩衝液進行樣品洗脫，根據紫外檢測收集洗脫峰，洗脫產物利用1M Tris-HCl (pH8.0) 快速調節pH至5-6暫存。對於洗脫產物可以利用本領域技術人員熟知的方法進行溶液置換，如利用超濾管進行超濾濃縮及溶液置換至所需的緩衝體系，或者利用分子排阻如G-25脫鹽替換成所需的緩衝體系，或者利用如

Superdex 200等高分辨率分子排阻柱去除洗脫產物中的聚體成分以提高樣品純度。

【0125】 4. Protein A親和層析提取帶Fc標籤的融合蛋白或者抗體

【0126】 首先將表現Fc融合蛋白或者抗體的細胞培養上清進行高速離心收取上清。ProteinA親和柱利用6M鹽酸胍洗3-5倍柱體積，然後利用純水清洗3-5倍柱體積。利用如1×PBS (pH7.4) 緩衝體系作為平衡緩衝液對層析柱平衡3-5倍柱體積。細胞上清利用低流速上樣結合，控制流速使保留時間約1min或更長時間，結合完畢後利用1×PBS (pH7.4) 洗滌層析柱3-5倍柱體積至紫外吸收回落至基線。利用0.1M醋酸/醋酸鈉 (pH3.0-3.5) 緩衝液進行樣品洗脫，根據紫外檢測收集洗脫峰，洗脫產物利用1M Tris-HCl (pH8.0) 快速調節pH至5-6暫存。對於洗脫產物可以利用本領域技術人員熟知的方法進行溶液置換，如利用超濾管進行超濾濃縮及溶液置換至所需的緩衝體系，或者利用分子排阻如G-25脫鹽替換成所需的緩衝體系，或者利用如Superdex 200等高分辨率分子排阻柱去除洗脫產物中的聚體成分以提高樣品純度。

【0127】 實施例3、抗人CD96融合瘤單株抗體的製備

【0128】 1.免疫

【0129】 抗人CD96單株抗體通過免疫小鼠產生。實驗用SJL白小鼠，雌性，6-8週齡（北京維通利華實驗動物技術有限公司，動物生產許可證號：SCXK(京)2012-0001）。飼養環境：SPF級。小鼠購進後，實驗室環境飼養1周，12/12小時光/暗週期調節，溫度20-25 °C；濕度40-60 %。將已適應環境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原為帶Flag標籤或mFc的人CD96胞外區（SEQ ID NO: 1或2），以及過表現人CD96的CHO細胞株。

【0130】 免疫方案A：用TiterMax® Gold Adjuvant（Sigma Cat No. T2684）與Thermo Imject® Alum（Thermo Cat No. 77161）佐劑交叉免疫。抗原與佐劑（TiterMax® Gold Adjuvant）比例為1:1，抗原與佐劑（Thermo Imject® Alum）比例為3:1，50µg/隻/次（首免），25µg/隻/次（加強免疫）。抗原乳化後進行接種，時間為第0、14、28、42、56天。第0天腹膜內（IP）注射50µg/隻的乳化後抗原。第14天皮下（sc）多點（一般背部6-8點）注射25µg/隻。第28、42天根據背部結塊和腹部腫脹情況，選擇背部或腹膜內注射抗原。於第21、35、49、63天取血，用ELISA方法確定小鼠血清中的抗體滴度。在4-5免以後，選擇血清中抗體滴度高並且滴度趨於平臺的小鼠進行脾細胞融合。在進行脾細胞融合前3天加強免疫，腹膜內（IP）注射50µg/隻的生理鹽水配製的抗原溶液。

【0131】 免疫方案B：用QuickAntibody-Mouse5W（KX0210041）佐劑對小鼠進行免疫。抗原與佐劑比例為1:1，25µg/隻/次（首免/加強免疫）。抗原與佐劑迅速充分混勻後接種，時間為第0、21、35天。第0天小鼠後小腿肌肉（IM）注射25µg/隻的抗原。第21、35天按同樣方式注射25µg/隻（根據滴度決定第3免是否進行）。於第28、42天取血，用ELISA方法確定小鼠血清中的抗體滴度。選擇血清中抗體滴度高並且滴度趨於平臺的小鼠進行脾細胞融合。在進行脾細胞融合前3天加強免疫，腹膜內（IP）注射50µg/隻的生理鹽水配製的抗原溶液。

【0132】 2.脾細胞融合

【0133】 採用優化的PEG介導的融合步驟將脾淋巴細胞與骨髓瘤細胞Sp2/0細胞(ATCC® CRL-8287™)進行融合得到融合瘤細胞。融合好的融合瘤細胞以 $0.5-1 \times 10^6$ /ml的密度用完全培養基（含20% FBS、1×HAT、1×OPI的DMEM培養基）重懸，100µl/孔種於96孔板中，37°C，5%CO₂孵育3-4天後，補充

HAT完全培養基100 μ l/孔，繼續培養3-4天至形成針尖般複製。去除上清，加入200 μ l/well的HT完全培養基（含20%FBS、1 \times HT和1 \times OPI的RPMI-1640培養基），37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培養3天後進行ELISA檢測。

【0134】 3.融合瘤細胞篩選

【0135】 根據融合瘤細胞生長密度，用結合ELISA方法進行融合瘤培養上清檢測。並將結合ELISA檢測的陽性孔細胞上清進行細胞結合實驗和細胞阻斷實驗。結合和阻斷均為陽性的孔細胞及時進行擴增凍存保種和二到三次亞複製直至獲得單細胞複製。

【0136】 每次亞複製細胞也均需進行CD96結合ELISA、細胞結合實驗和細胞阻斷實驗檢測。通過以上實驗篩選得到融合瘤複製，用無血清細胞培養法進一步製備抗體，按純化實例（實施例2第3項）純化抗體，供在檢測例中使用。

【0137】 4.融合瘤陽性複製序列測定

【0138】 從陽性融合瘤中複製序列過程如下。收集對數生長期融合瘤細胞，用Trizol（Invitrogen, Cat No. 15596-018）按照試劑盒說明書步驟提取RNA，用PrimeScript™ Reverse Transcriptase試劑盒反轉錄（Takara, Cat No. 2680A）。將反轉錄得到的cDNA採用小鼠Ig-Primer試劑盒（Novagen, TB326 Rev.B 0503）進行PCR擴增後送測序公司測序。得到鼠源抗體m1718、m1719、m1720、m1721、m1722的重鏈和輕鏈可變區DNA序列對應的胺基酸序列（VH/VL中CDR的胺基酸殘基由Kabat編號系統確定並註釋，下劃線標註的序列為CDR）：

m1718 VH（SEQ ID NO：6）

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASAYSITDYNMNWVKQSNGKSLEWI
GVINPSYGITDYNQNFKDKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYC
AIQLRLPGYFDVWGTGTTVIVSS

m1718VL (SEQ ID NO : 7)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLNWFQQKPGKSPKTLIY
RANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLKYDEFPTYF
GGGTKVEIK

m1719VH (SEQ ID NO : 8)

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLISYGVSWVRQPPGKGLEWLG
VIWGDGNTNYHSVLISRLSIRKDDSKSQVFLKLNSLQTDDTATYYCAKN
NYYGSRYGYPMDYWGQGTSVTVSS

m1719VL (SEQ ID NO : 9)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKATQDVGTAVAWYQQKPGHSPKLLI
YWASTRHTGVPERFTGSGSGTDFTLTIDNVQSEDLADYFCQQYGSSVLT
FGAGTKVELR

m1720VH (SEQ ID NO : 10)

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASAYSLTDYNMNWVKQSNGKSLEWI
GVINPSYGISSYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCA
RQLRLPGYFDVWGTGTTVTVSS

m1720VL (SEQ ID NO : 11)

DIKMTQSPSSKNASLGERVTITCKASQDINSYLNWFQQKPGKSPKTLIYR
ASRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLKYDEFPTYFGG
GTKLEIK

m1721VH (SEQ ID NO : 12)

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLISYGVNWVRQPPGKGLEWLG
 VIWGDGSTNYHSALISRLSISKDDSKSQVFLNLNSLQTDDTATYYCAKN
 YFYGSRYGYAMDSWGQGISVTVSS

m1721VL (SEQ ID NO : 13)

DIQMTQSPASLSAAVGETVTITCRASENIYSSSLAWYQQKQKGKSPQLLVY
 NAKTLIETVASRFGSGSGGTQYSLKINSLQPEDFGSFYCQH HYGTPYTFG
 GGTKLEIK

m1722VH (SEQ ID NO : 14)

QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGNTFIDYWMHWVKQRPGQGLE
 WIGMLHPNSGTTSFNEKFKIKTTLTIDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYC
 ASDYSGPFAYWGQGLTVTSA

m1722VL (SEQ ID NO : 15)

QIVLTQSPGIMSAFPGEKVTMTCSASSSVNYIHWYQQKSGTSPKRWIFD
 TSKLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWRSNPLTFG
 AGTKLELK

其中各抗體輕重鏈中CDR序列如表1所示。

表1. 各抗體重鏈及輕鏈CDR區序列

抗體	重鏈CDR區		輕鏈CDR區	
m1718	HCDR1	DYNMN SEQ ID NO : 16	LCDR1	KASQDINNYLN SEQ ID NO : 19
	HCDR2	VINPSYGITDYNQNFKD SEQ ID NO : 17	LCDR2	RANRLVD SEQ ID NO : 20
	HCDR3	QLRLPGYFDV SEQ ID NO : 18	LCDR3	LKYDEFPYT SEQ ID NO : 21
m1719	HCDR1	SYGVS SEQ ID NO : 22	LCDR1	KATQDVGTA SEQ ID NO : 25
	HCDR2	VIWGDGNTNYHSVLIS SEQ ID NO : 23	LCDR2	WASTRHT SEQ ID NO : 26
	HCDR3	NNYYGSRYGYPMDY	LCDR3	QQYGSSVLT

		SEQ ID NO : 24		SEQ ID NO : 27
m1720	HCDR1	DYNMN SEQ ID NO : 28	LCDR1	KASQDINSYLN SEQ ID NO : 31
	HCDR2	VINPSYGISSYNQKFKG SEQ ID NO : 29	LCDR2	RASRLVD SEQ ID NO : 32
	HCDR3	QLRLPGYFDV SEQ ID NO : 30	LCDR3	LKYDEFPYT SEQ ID NO : 33
m1721	HCDR1	SYGVN SEQ ID NO : 34	LCDR1	RASENIYSSLA SEQ ID NO : 37
	HCDR2	VIWGDGSTNYHSALIS SEQ ID NO : 35	LCDR2	NAKTLIE SEQ ID NO : 38
	HCDR3	NYFYGSRYGYAMDS SEQ ID NO : 36	LCDR3	QHHYGTPYT SEQ ID NO : 39
m1722	HCDR1	DYWMH SEQ ID NO : 40	LCDR1	SASSSVNYIH SEQ ID NO : 43
	HCDR2	MLHPNSGTTSFNEKFKI SEQ ID NO : 41	LCDR2	DTSKLAS SEQ ID NO : 44
	HCDR3	DYSGPFAY SEQ ID NO : 42	LCDR3	QQWRSNPLT SEQ ID NO : 45

【0139】上述鼠源抗體的輕重鏈可變區分別與人源抗體的輕鏈恆定區（SEQ ID NO : 117）和重鏈恆定區（SEQ ID NO : 118）連接後形成嵌合抗體，m1718抗體對應的嵌合抗體命名為ch1718，其他抗體類推。

【0140】實施例4、鼠源抗CD96抗體的人源化

【0141】通過比對IMGT人類抗體重輕鏈可變區種系基因數據庫和MOE軟件，分別挑選與鼠源抗體同源性高的重鏈和輕鏈可變區種系基因作為模板，將鼠源抗體的CDR分別移植到相應的人源模板中，形成次序為FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可變區序列。根據需要，將骨架序列中關鍵胺基酸回復突變為鼠源抗體對應的胺基酸，以保證原有的親和力，即得到人源化抗CD96單株抗體。其中回復突變時胺基酸殘基由自然編號確定並註釋。

【0142】4.1融合瘤複製m1718的人源化

【0143】（1）m1718人源化構架選擇

【0144】鼠源抗體m1718的人源化輕鏈模板為IGKV1-16*01和hjk4.1，人源化重鏈模板為IGHV1-3*01和hjh6.1，經CDR graft後得到人源化抗體h1718-001，人源化可變區序列如下：

h1718-001 VH-CDR graft

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMNWVRQAPGQRLEWMG
VINPSYGITDYNQNFKDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQLRL
PGYFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 46

h1718-001 VL-CDR graft

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINNYLNWFQQKPGKAPKSLIYRA
NRLVDGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTFGGGT
 KVEIK

SEQ ID NO : 47

註：順序為FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為FR序列，下劃線為CDR序列。

【0145】（2）h1718系列回復突變設計如下表：

表2. h1718抗體的回復突變

h1718-VL		h1718-VH	
h1718-VL1	Grafted	h1718-VH1	Grafted
h1718-VL2	S46T, T69Q, F71Y	h1718-VH2	M48I, R72V
		h1718-VH3	F29I, M48I, R72V, R98I
		h1718-VH4	F29I, R38K, M48I, R67K, R72V, R98I

註：如S46T表示依照胺基酸序列自然順序編號，將46位S突變回T。Grafted代表鼠抗體CDR植入人種系FR區序列。

【0146】（3）h1718系列人源化抗體可變區序列組合如下表：

表3. h1718系列人源化抗體可變區序列組合

	h1718-VH1	h1718-VH2	h1718-VH3	h1718-VH4
h1718-VL1	h1718-001	h1718-002	h1718-003	h1718-004
h1718-VL2	h1718-005	h1718-006	h1718-007	h1718-008

註：該表表示各種突變組合所得的序列。如h1718-006表示，在人源化的抗體h1718-006包含有輕鏈可變區h1718-VL2和重鏈可變區h1718-VH2。其它類推。

【0147】（4）h1718系列人源化抗體可變區具體序列如下：

>h1718-VL1（同 H1718-001VL-CDR graft）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYLNWFQQKPGKAPKSLIYRANR
LVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTFGGGKVEI
K

SEQ ID NO : 47

>h1718-VL2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYLNWFQQKPGKAPKTLLIYRANR
LVDGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTFGGGKVEI
K

SEQ ID NO : 48

>h1718-VH1（同 H1718-001VH-CDR graft）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNMNVWRQAPGQRLEWMGV
 INPSYGITDYNQNFKDRVITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQLRLPG
 YFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 46

>h1718-VH2

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNMNVWRQAPGQRLEWIGVI
 NP SYGITDYNQNFKDRVITVDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQLRLPG
 YFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 49

>h1718-VH3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTITDYNMNVWRQAPGQRLEWIGVI
 NP SYGITDYNQNFKDRVITVDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIQLRLPGY
 FDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 50

>h1718-VH4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTITDYNMNVWKQAPGQRLEWIGVI
 NP SYGITDYNQNFKDKVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIQLRLPGY
 FDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 51

【0148】 (5) h1718-VL熱點突變：

【0149】 將h1718系列人源化VL的CDR1 (即SEQ ID NO: 19 ,
 KASQDINNYLN)中NN突變為NQ、NT、NL,以提高抗體的穩定性。h1718VL
 CDR1序列通式為KASQDINX₁YLN (SEQ ID NO : 52) , 其中X₁選自：N、
 T、L和Q。具體的h1718VL CDR1突變體包括KASQDINQYLN (SEQ ID NO :

108) , KASQDINTYLN (SEQ ID NO : 109) , KASQDINLYLN (SEQ ID NO : 110) 。

【0150】h1718-VL1可變為以下輕鏈可變區序列：

>h1718. VL1a (SEQ ID NO : 53)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINQYLNWFQQKPGKAPKSLIY
RANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTFG
GGTKVEIK

>h1718. VL1b (SEQ ID NO : 54)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINTYLNWFQQKPGKAPKSLIYR
ANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTFGG
GTKVEIK

>h1718. VL1c (SEQ ID NO : 55)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINLYLNWFQQKPGKAPKSLIYR
ANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTFGG
GTKVEIK

【0151】h1718-VL2可變為以下輕鏈可變區序列：

>h1718. VL2a (SEQ ID NO : 56)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINQYLNWFQQKPGKAPKTLIY
RANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTF
GGGTKVEIK

>h1718. VL2b (SEQ ID NO : 57)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINTYLNWFQQKPGKAPKTLIY
RANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTF
GGGTKVEIK

>h1718.VL2c (SEQ ID NO : 58)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINLYLNWFQQKPGKAPKTLIY
RANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLKYDEFPYTF
GGGTKVEIK

【0152】 h1718系列人源化抗體可變區序列組合如下表：

表4. h1718系列人源化抗體可變區序列組合

	h1718-VH3	h1718-VH4	h1718-VH1	h1718-VH2
h1718-VL1a	h1718-009	h1718-015	h1718-021	h1718-027
h1718-VL1b	h1718-010	h1718-016	h1718-022	h1718-028
h1718-VL1c	h1718-011	h1718-017	h1718-023	h1718-029
h1718-VL2a	h1718-012	h1718-018	h1718-024	h1718-030
h1718-VL2b	h1718-013	h1718-019	h1718-025	h1718-031
h1718-VL2c	h1718-014	h1718-020	h1718-026	h1718-032

【0153】 4.2融合瘤複製m1719的人源化

【0154】 (1) m1719人源化構架選擇

【0155】 鼠源抗體m1719的人源化輕鏈模板為IGKV1-12*01和hjk4.1，人源化重鏈模板為IGHV2-26*01和hjh6.1，經CDR graft後得到人源化抗體h1719-001，人源化可變區序列如下：

h1719-001 VH-CDR graft

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLAVIWG
DGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTATYYCARNNYYSRYG
YPMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 59

h1719-001 VL-CDR graft

DIQMTQSPSSVSASVGVDRVTITCKATQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWAS
TRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYGSSVLTFFGGGKVE
 IK

SEQ ID NO : 60

註：順序為FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為FR序列，
 下劃線為CDR序列。

【0156】（2）h1719-001回復突變設計如下表：

表5. h1719人源化抗體回復突變

h1719-VL		h1719-VH	
h1719-VL1	Grafted	h1719-VH1	Grafted
h1719-VL2	A43S，S60E， Y87F	h1719-VH2	I37V，R97K
		h1719-VH3	I37V，A44G，A49G，M82L， R97K

註：如A43S表示依照胺基酸序列自然順序編號，將43位A突變回S。Grafted
 代表鼠抗體CDR植入人種系FR區序列。

【0157】（3）h1719系列人源化抗體可變區序列組合如下表：

表6. h1719系列人源化抗體可變區序列組合

	h1719-VH1	h1719-VH2	h1719-VH3
h1719-VL1	h1719-001	h1719-002	h1719-003
h1719-VL2	h1719-004	h1719-005	h1719-006

註：該表表示各種突變組合所得的序列。如h1719-005表示，在人源化的抗
 體h1719-005上包含輕鏈可變區h1719-VL2和重鏈可變區h1719-VH2。其它
 類推。

【0158】 (4) h1719系列人源化抗體可變區具體序列如下：

>h1719-VL1 (同 h1719-001 VL-CDR graft)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKATQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWAS
TRHTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYGSSVLTFGGGTKVE
IK

SEQ ID NO : 60

>h1719-VL2

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKATQDVGTAVAWYQQKPGKSPKLLIYWAS
TRHTGVPERFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQQYGSSVLTFGGGTKV
EIK

SEQ ID NO : 61

>h1719-VH1 (同 h1719-001 VH-CDR graft)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLAVIWG
DGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARNYYGSRYG
YPMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 59

>h1719-VH2

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKALEWLAVIW
GDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCAKNNYYGSR
YGYPMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 62

>h1719-VH3

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIW
 GDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYYCAKNNYYGSR
 YGYPMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 63

【0159】 (5) h1719-VH熱點突變：

【0160】 將h1719VH CDR3 (NNYYGSRYGYPMDY) 中NN突變為QN、NY、NQ，M突變為L或I，以提高抗體的穩定性。h1719VH CDR3序列通式為 $X_2X_3YYGSRYGYPX_4DY$ (SEQ ID NO : 64)，其中 X_2 選自：N和Q， X_3 選自：N、Y和Q， X_4 選自M、L和I。具體的h1719 VH CDR3突變體可以包括但不限於QNYYGSRYGYPIDY (SEQ ID NO : 111)，NYYYGSRYGYPIDY (SEQ ID NO : 112)，NQYYGSRYGYPIDY (SEQ ID NO : 113)，QNYYGSRYGYPIDY (SEQ ID NO : 114)，NYYYGSRYGYPIDY (SEQ ID NO : 115)，NQYYGSRYGYPIDY (SEQ ID NO : 116)。

【0161】 h1719-VH3可變為以下重鏈可變區序列：

>h1719.VH3a (SEQ ID NO : 65)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLG
 VIWGDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYYCAK
 QNYYGSRYGYPIDYWGQGTTVTVSS

>h1719.VH3b (SEQ ID NO : 66)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLG
 VIWGDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYYCAK
 NYYYGSRYGYPIDYWGQGTTVTVSS

>h1719.VH3c (SEQ ID NO : 67)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLG
 VIWGDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYYCAK
 NQYYGSRYGYPLDYWGQGTTVTVSS

>h1719.VH3d (SEQ ID NO : 68)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLG
 VIWGDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYYCAK
 QNYYGSRYGYPIDYWGQGTTVTVSS

>h1719.VH3e (SEQ ID NO : 69)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLG
 VIWGDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYYCAK
 NYYYGSRYGYPIDYWGQGTTVTVSS

>h1719.VH3f (SEQ ID NO : 70)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLG
 VIWGDGNTNYHSVLISRLTISKDTSKSQVVLTLTNMDPVDTATYYCAK
 NQYYGSRYGYPIDYWGQGTTVTVSS

【0162】 h1719系列人源化抗體可變區序列組合如下表：

表7. h1719系列人源化抗體可變區序列組合

	h1719-VH3a	h1719-VH3b	h1719-VH3c	h1719-VH3d	h1719-VH3e	h1719-VH3f
h1719-VL1	h1719-007	h1719-008	h1719-009	h1719-010	h1719-011	h1719-012
h1719-VL2	h1719-013	h1719-014	h1719-015	h1719-016	h1719-017	h1719-018

【0163】 4.3融合瘤複製m1721的人源化

【0164】 (1) m1721人源化構架選擇

【0165】鼠源抗體m1721的人源化輕鏈模板為IGKV1-39*01和hjk4.1，人源化重鏈模板為IGHV2-26*01和hjh6.1，經CDR graft後得到人源化抗體h1721-001，人源化可變區序列如下：

h1721-001 VH-CDR graft

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVNWIRQPPGKALEWLAVI
WGDGSTNYHSALISRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARNYFYGSRYG
YAMDSWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 71

h1721-001 VL-CDR graft

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSSLAWYQQKPGKAPKLLIYN
AKTLIEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHTGTPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO : 72

註：順序為FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為FR序列，下劃線為CDR序列。

【0166】（2）h1721-001回復突變設計如下表：

表8. h1721人源化抗體回復突變

h1721-VL		h1721-VH	
VL1	Grafted	VH1	Grafted
VL2	A48S, F71Y	VH2	A49G, R97K
VL3	A43S, I48V, F71Y	VH3	A49G, M82L, R97K
		VH4	I37V, A44G, A49G, M82L, R97K

註：如A48S表示依照胺基酸序列自然順序編號，將48位A突變回S。Grafted代表鼠抗體CDR植入人種系FR區序列。

【0167】（3）h1721系列人源化抗體可變區序列組合如下表：

表9. h1721系列人源化抗體可變區序列組合

	h1721-VH1	h1721-VH2	h1721-VH3	h1721-VH4
h1721-VL1	h1721-001	h1721-002	h1721-003	h1721-004
h1721-VL2	h1721-005	h1721-006	h1721-007	h1721-008
h1721-VL3	h1721-009	h1721-010	h1721-011	h1721-012

註：該表表示各種突變組合所得的序列。如h1721-006表示，在人源化的抗體h1721-006包含輕鏈可變區h1721-VL2、重鏈可變區h1721-VH2。其它類推。

【0168】（4）h1721系列人源化抗體可變區具體序列如下：

>h1721V-L1 (同 h1721-001 VL-CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSSLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTL
IEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO : 72

>h1721-VL2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSSLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKT
LIEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPYTFGGGTKVEI
K

SEQ ID NO : 73

>h1721-VL3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSSLAWYQQKPGKSPKLLVYNAKT
LIEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPYTFGGGTKVEI
K

SEQ ID NO : 74

>h1721-VH1 (同 h1721-001 VH-CDR graft)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVNWIRQPPGKALEWLAVIWG
DGSTNYHSALISRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTATYYCARNYFYGSRYG
YAMDSWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 71

>h1721-VH2

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVNWIRQPPGKALEWLGVIW
GDGSTNYHSALISRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTATYYCAKNYFYGSRY
GYAMDSWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 75

>h1721-VH3

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVNWIRQPPGKALEWLGVIW
GDGSTNYHSALISRLTISKDTSKSQVVLTLNMDPVDTATYYCAKNYFYGSRY
GYAMDSWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 76

>h1721-VH4

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVNWRQPPGKGLEWLGVIW
GDGSTNYHSALISRLTISKDTSKSQVVLTLNMDPVDTATYYCAKNYFYGSRY
GYAMDSWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 77

【0169】 4.4融合瘤複製m1722的人源化

【0170】 (1) m1722人源化構架選擇

【0171】鼠源抗體m1722的人源化輕鏈模板為IGKV1-39*01和hjk2.1，人源化重鏈模板為IGHV1-69*02和hjh4.1，經CDR graft後得到人源化抗體h1722-001，人源化可變區序列如下：

h1722-001 VH-CDR graft

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYWMHWVRQAPGQGLEWMG
MLHPNSGTTSFNEKFKIRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDYSG
PFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 78

h1722-001 VL-CDR graft

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVNYIH~~WYQQKPGKAPKLLIYDTSKLA~~
~~SGVPSRFS~~SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ~~QWRSNPLTF~~GQGTKLEIK

SEQ ID NO : 79

註：順序為FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為FR序列，下劃線為CDR序列。

【0172】（2）h1722-001回復突變設計如下表：

表10. h1722人源化回復突變

h1722-VL		h1722-VH	
h1722-VL1	Grafted	h1722-VH1	Grafted
h1722-VL2	L45R, L46W	h1722-VH2	M48I, R98S
h1722-VL3	M4L, L45R, L46W, Y48F, F70Y	h1722-VH3	R38K, M48I, A72I, R98S
		h1722-VH4	G27N, R38K, M48I, V68T, A72I, R98S

註：如L45R表示依照胺基酸序列自然順序編號，將45位L突變回R。Grafted代表鼠抗體CDR植入人種系FR區序列。

【0173】 (3) h1722系列人源化抗體可變區序列組合如下表：

表11. h1722系列人源化抗體可變區序列組合

	h1722-VH1	h1722-VH2	h1722-VH3	h1722-VH4
h1722-VL1	h1722-001	h1722-002	h1722-003	h1722-004
h1722-VL2	h1722-005	h1722-006	h1722-007	h1722-008
h1722-VL3	h1722-009	h1722-010	h1722-011	h1722-012

註：該表表示各種突變組合所得的序列。如h1722-006表示，在人源化的抗體h1722-006包含輕鏈可變區h1722-VL2、重鏈可變區h1722-VH2。其它類推。

【0174】 (4) h1722系列人源化抗體可變區具體序列如下：

>h1722-VL1 (同 h1722-001 VL-CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVNYIHWHYQQKPGKAPKLLIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWRSNPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO : 79

>h1722-VL2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVNYIHWHYQQKPGKAPKRWIYDTSKLA
ASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWRSNPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO : 80

>h1722-VL3

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVNYIHWHYQQKPGKAPKRWIFDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQWRSNPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO : 81

>h1722-VH1 (同 h1722-001 VH-CDR graft)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYWMHWVRQAPGQGLEWMG
MLHPNSGTTSFNEKFKIRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDYSG
PFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 78

>h1722-VH2

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYWMHWVRQAPGQGLEWIG
MLHPNSGTTSFNEKFKIRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASDYSGP
FAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 82

>h1722-VH3

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYWMHWVKQAPGQGLEWIG
MLHPNSGTTSFNEKFKIRVTITIDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASDYSGP
FAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 83

>h1722-VH4

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGNTFSDYWMHWVKQAPGQGLEWIG
MLHPNSGTTSFNEKFKIRTTITIDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASDYSGP
FAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 84

【0175】 (5) h1722-VH 熱點突變：

【0176】 由於h1722-VH CDR2有一個乙醯化高風險位點NS，因此我們將NS突變為KS或QS，以提高抗體的化學穩定性。h1722-VH CDR2的序列通式為MLHPX₅SGTTSFNEKFKI (SEQ ID NO : 119)，其中X₅選自N、K或Q。

具體地，h1722-VH CDR2的突變體包括但不限於；MLHPKSGTTSFNEKFKI (SEQ ID NO : 120) 或MLHPQSGTTSFNEKFKI (SEQ ID NO : 121) 。

【0177】 h1722-VH2可變為以下重鏈可變區序列：

>h1722-VH2a(N54K)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYWMHWVRQAPGQGLEWIG
MLHPKSGTTSFNEKFKIRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC ASDYSGP
FAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 122

>h1722-VH2b (N54Q)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYWMHWVRQAPGQGLEWIG
MLHPQSGTTSFNEKFKIRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC ASDYSGP
FAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO : 123

【0178】 h1722系列人源化抗體可變區序列突變後的組合如下表：

表12. h1722系列人源化抗體可變區序列突變後組合

	h1722-VH2a	h1722-VH2b
h1722-VL1	h1722-013	h1722-014
h1722-VL2	h1722-015	h1722-016
h1722-VL3	h1722-017	h1722-018

【0179】以上各重鏈可變區與如SEQ ID NO:117所示的重鏈恆定區序列重組表現得到最終的完整重鏈序列。以上各輕鏈可變區與如SEQ ID NO:118所示的輕鏈恆定區序列重組表現得到最終的完整輕鏈序列。

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVKDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO : 117

輕鏈恆定區：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

SEQ ID NO : 118

【0180】採用所屬領域的常規技術手段，將以上輕鏈可變區、重鏈可變區
還可與其他可選的人源化恆定區，及經過功能性修飾的人源化恆定區，重
組並表現。

【0181】用於檢測的猴CD96抗原：猴CD96-3×Flag（SEQ ID NO：95）

MEFGLSWLFLVAILKGVQCVWVGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCQTQAK
GFLVQMQWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYGSPCESLVTFTQTPENG
SKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLTLYPEGMQTKIYNLLIQTHVTPDEWK
SNHTIEIEINQTLEIPCFQNSSSEISSEFTYA WLVEDNGTQQTLISQDHLISS
STLLKDRVKVGIDYRLHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGPDKILRSSTTIKVF
AKPEIPMIVENNSTDV LVERTFTCLLKNVFPKANIIWFIDGSFLHDEKEGI
YITNEERKKGKDGFLLELKS VLTRVHSDKPAQSDNLTIWCMALSPVPGNK

VWNISSEKITFLLGSEMSTTDLPPSVTESTLDTQPSPASSVSPTRYPATSS
 VTLADVSALRPNTTPQSSSSSVTTQDFNYPWTSSGTDAKKSFSQIPSEY
 SSSPSGAGSTLHDNVFTSTTRALSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVSKPK
 DGM DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

下劃線部分為訊號肽，斜體部分為3×Flag-tag。製備方法見實施例2第1項。

【0182】以下用生化測試方法驗證本發明性能及有益效果。

【0183】測試例1：CD96抗體結合人CD96蛋白的ELISA實驗

【0184】抗CD96抗體的結合能力通過抗體與人CD96蛋白的ELISA實驗來檢測。用帶His標籤的CD96融合蛋白包被在酶標板中，抗體加入後訊號的強弱被用於判斷抗體和CD96的結合活性，具體實驗方法如下。

【0185】用pH7.4的PBS（上海源培生物科技有限公司，Cat No. B320）緩衝液將實施例1中序列如SEQ ID NO:4所示的CD96-His稀釋至2μg/ml濃度，以50μl/孔的體積加入96孔酶標板（Corning，Cat No. CLS3590-100EA）中，於37°C 孵育箱中放置2小時。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶（BD，232100）封閉液250μl/孔，37°C 孵育箱孵育2.5小時或4°C 放置過夜（16-18小時）進行封閉。封閉結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液（pH7.4 PBS含0.05% tween-20）洗板4次後，加入50μl/孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體（融合瘤純化抗體或人源化抗體），放於37°C 孵育箱孵育1小時。孵育結束後用PBST洗板4次，加入50μl/孔用樣品稀釋液稀釋的HRP標記的羊抗鼠二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 115-035-003）或羊抗人二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 109-035-003），37°C 孵育1小時。用PBST洗板4次後，加入50μl/孔TMB顯色受質（KPL，Cat No. 52-00-03），於室溫孵育5-15min，加入50μl/孔1M H₂SO₄終止反應，用

NOVOStar酶標儀在波長450nm處讀取吸收值，計算CD96抗體對人CD96的結合EC50值（見表13）。

表13.CD96抗體與人CD96的親和力ELISA測定

候選抗體	EC50 (nM)	候選抗體	EC50 (nM)
ch1718	0.084	h1718-012	0.095
ch1719	0.065	h1719-003	0.085
ch1720	0.074	h1719-006	0.083
ch1721	0.075	h1719-014	0.091
ch1722	0.094	h1721-003	0.07
h1722-005	0.072	h1722-006	0.077
h1722-010	0.073	h1722-017	0.113
h1722-018	0.091		

【0186】結果顯示抗CD96的嵌合抗體和人源化抗體能夠與人CD96特異性結合。

【0187】測試例2：CD96抗體結合食蟹猴 CD96蛋白的ELISA實驗

【0188】抗CD96抗體的與猴CD96的交叉反應結合力通過抗體與食蟹猴CD96蛋白的ELISA實驗來檢測。用帶3×FLAG標籤的食蟹猴CD96融合蛋白包被在酶標板中，抗體加入後訊號的強弱被用於判斷抗體和食蟹猴CD96的結合活性，具體實驗方法如下。

【0189】用pH7.4的PBS（上海源培生物科技有限公司，Cat No. B320）緩衝液將上述實施例4製備得到的胺基酸序列為SEQ ID NO：95的cyno-CD96-3×FLAG稀釋至2μg/ml濃度，以50μl/孔的體積加入96孔酶標板（Corning，Cat No. CLS3590-100EA）中，於37°C 孵育箱中放置2小時。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶（BD，232100）封閉液250μl/孔，37°C 孵育箱孵育2.5小時或4°C 放置過夜（16-18小時）進行封閉。封閉結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液（pH7.4 PBS含0.05% tween-20）洗板4次後，加入50μl/孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體（融合瘤純化抗體或人源化抗體），放於37°C 孵育箱孵育1小時。孵育結束後用PBST洗板4

次，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的HRP標記的羊抗鼠二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 115-035-003）或羊抗人二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 109-035-003），37 $^{\circ}$ C 孵育1小時。用PBST洗板4次後，加入50 μ l/孔TMB顯色受質（KPL，Cat No. 52-00-03），於室溫孵育5-15min，加入50 μ l/孔1M H₂SO₄終止反應，用NOVOStar酶標儀在波長450nm處讀取吸收值，計算CD96抗體對猴CD96的結合EC50值（見表14）。

表14. CD96抗體與食蟹猴CD96結合ELISA測定

抗體	EC50 (nM)	抗體	EC50 (nM)
ch1718	0.068	h1718-012	0.075
ch1719	0.047	h1719-014	0.065
ch1720	0.096	h1721-003	0.037
ch1721	0.046	h1722-010	0.047
ch1722	0.050	h1722-017	0.047
h1722-018	0.051		

【0190】結果顯示CD96嵌合抗體和人源化抗體能夠與猴CD96具有交叉反應。

【0191】測試例3：CD96抗體與人CD96過表現CHO-s細胞的結合實驗

【0192】抗CD96抗體的結合能力通過抗體與過表現人CD96蛋白的CHO-S細胞的結合實驗來檢測。通過電轉染的方法將CD96全長質粒轉染進CHO-S細胞中後加壓篩選兩周後，檢測CD96的表現量。將過表現細胞固定於96孔板底後，抗體加入後訊號的強弱被用於判斷抗體和CD96過表現CHO-S細胞的結合活性，具體實驗方法如下。

【0193】將細胞以 9×10^4 /100 μ L/well密度，接種於96孔板中過夜培養。吸掉上清，用PBS洗一遍後，加入100 μ l/孔免疫染色固定液（碧雲天，P0098）室溫固定一小時，PBS洗三遍。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶（BD，232100）封閉液250 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2.5小時進行封閉。封閉結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液（pH7.4 PBS含0.05% tween-20）

洗板4次後，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體（融合瘤純化抗體或人源化抗體），放於37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2小時。孵育結束後用PBST洗板4次，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的HRP標記的羊抗鼠二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 115-035-003）或羊抗人二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 109-035-003），37 $^{\circ}$ C 孵育1小時。用PBST洗板4次後，加入50 μ l/孔TMB顯色受質（KPL，Cat No. 52-00-03），於室溫孵育10-25min，加入50 μ l/孔1M H₂SO₄終止反應，用NOVOSTar酶標儀在波長450nm處讀取吸收值，計算CD96抗體對CD96過表現CHO-S細胞的結合EC₅₀值（見圖1和表15）。

表15. CD96抗體與過表現人CD96-CHOs細胞的親和力ELISA測定

候選抗體	EC ₅₀ (nM)	候選抗體	EC ₅₀ (nM)
ch1718	0.026	h1718-012	0.031
ch1719	0.012	h1719-003	0.028
ch1720	0.036	h1719-006	0.016
ch1721	0.036	h1719-014	0.02
ch1722	0.043	h1721-003	0.074
h1722-005	0.045	h1722-006	0.043
h1722-010	0.047	h1722-017	0.053
h1722-018	0.044		

【0194】 結果顯示CD96嵌合抗體和人源化抗體能夠結合CD96過表現CHO-S細胞。

【0195】 測試例4：抗CD96抗體阻斷CD96抗原和CD155-CHOs細胞結合實驗

【0196】 CD155-CHOs細胞（上海恆瑞構建）以 9×10^4 /100 μ L/well的數量接種於96孔培養板中過夜培養，吸掉上清，用PBS洗一遍後，加入100 μ l/孔免疫染色固定液（碧雲天，P0098）室溫固定一小時，PBS洗三遍。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶（BD，232100）封閉液250 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2.5小時進行封閉。封閉結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液

(pH7.4 PBS含0.05% tween-20)洗板4次後，加入50 μ l/孔抗原-抗體預孵育液(梯度濃度的融合瘤待測抗體與終濃度0.5 μ g/mL的CD96-Fc 37 $^{\circ}$ C預混合30分鐘，或者梯度濃度的人源化抗體樣品與終濃度0.5 μ g/mL的Bio-CD96-His 37 $^{\circ}$ C預混合30分鐘)(生物素標記試劑盒，東仁化學，Cat No. LK03)，置37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育2小時。孵育結束後，棄去酶標板中的反應液，用PBST洗板4次後，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋HRP標記的羊抗人二抗(Jackson Immuno Research，Cat No. 109-035-003)或者HRP標記的鏈黴親和素(Sigma，Cat No. S2438)，37 $^{\circ}$ C孵育1小時。用PBST洗板4次後，加入50 μ l/孔TMB顯色受質(KPL，Cat No. 52-00-03)，於室溫孵育10-20min，加入50 μ l/孔1M H₂SO₄終止反應，用NOVOStar酶標儀在波長450nm處讀取吸收值，計算CD96抗體對抗原與CD155-CHOs細胞結合的阻斷作用(見圖2和表16)。

表16. CD96抗體阻斷CD96與表現人CD155-CHOs細胞的結合測定

候選抗體	IC50 (nM)	候選抗體	IC50 (nM)
ch1718	0.096	h1718-012	0.133
ch1719	0.137	h1719-003	0.096
ch1720	0.149	h1719-006	0.064
ch1721	0.214	h1719-014	0.046
ch1722	0.159	h1721-003	0.155
h1722-006	0.398	h1722-010	0.207
h1722-017	0.135	h1722-018	0.134

【0197】結果顯示CD96嵌合抗體和人源化抗體能夠阻斷CD96和CD155-CHOs細胞的結合。

【0198】測試例5：BIAcore檢測抗CD96抗體親和力實驗

【0199】1.人Fc抗體親和力測定方法：

【0200】用Protein A生物傳感芯片親和捕獲待測抗體，然後於芯片表面流經CD96抗原，用Biacore儀器實時檢測反應訊號獲得結合和解離曲線。在每

個實驗循環解離完成後，用甘胺酸-鹽酸再生溶液（pH 1.5）將生物傳感芯片洗淨再生。

【0201】 2.鼠Fc抗體親和力測定方法：

【0202】 用偶聯有抗鼠Fc抗體的CM5生物傳感芯片親和捕獲待測抗體，然後於芯片表面流經CD96抗原，利用Biacore儀器實時檢測反應訊號獲得結合和解離曲線。在每個實驗循環解離完成後，用小鼠抗體捕獲試劑盒裡的再生溶液將生物芯片洗淨再生。

【0203】 流動相均為CD96- ECD-His。

表17. 候選抗體的親和力BIACORE測定

抗體	親和力(M)	抗體	親和力(M)
ch1718	3.32E-9	h1721-001	2.73E-9
ch1719	9.74E-9	h1721-002	2.20E-9
ch1720	1.35E-9	h1721-003	1.61E-9
ch1721	2.28E-9	h1721-004	2.00E-9
ch1722	1.05E-9	h1721-005	2.25E-9
h1718-007	3.88E-9	h1721-006	2.29E-9
h1718-008	3.37E-9	h1721-007	1.87E-9
h1718-012	3.98E-9	h1721-008	2.22E-9
h1718-013	4.08E-9	h1721-009	2.01E-9
h1718-014	4.31E-9	h1721-010	2.04E-9
h1718-018	3.82E-9	h1721-011	2.12E-9
h1718-019	3.70E-9	h1721-012	2.14E-9
h1718-020	3.41E-9	h1722-005	9.87E-9
h1719-006	1.31E-8	h1722-006	1.19E-9
h1719-007	2.55E-8	h1722-007	1.31E-9
h1719-008	1.76E-8	h1722-008	1.00E-9
h1719-010	4.65E-7	h1722-009	4.55E-9
h1719-013	1.98E-8	h1722-010	8.60E-10
h1719-014	1.49E-8	h1722-011	9.48E-10
h1719-016	9.07E-8	h1722-012	7.81E-10

*親和力數值3.32E-9M是 3.32×10^{-9} M。

【0204】 抗CD96嵌合抗體ch1718、ch1720、ch1721、ch1719、ch1722與人CD96均有很強的親和力，示例性人源化抗體也與人CD96有很強的親和力。

【0205】 抗人CD96單株抗體的表位測定

【0206】 測試例6：抗CD96抗體的競爭實驗

【0207】 將不同抗體與CD96蛋白結合的競爭實驗用來進行抗體的結合表位分類。具體實驗方法如下：

【0208】 用pH7.4的PBS (上海源培，Cat No. B320) 緩衝液將抗體A稀釋至2 μ g/mL濃度，以50 μ L /孔的體積加入96孔酶標板 (Corning，Cat No. CLS3590-100EA) 中，於4 $^{\circ}$ C包被過夜。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶 (BD skim milk, Cat No.232100) 封閉液250 μ L /孔，37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育3小時。封閉結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液 (pH7.4 PBS含0.05% tween-20) 洗板5次後，備用。1%BSA稀釋抗體B至40 μ g/ml和8 μ g/ml，同時稀釋Biotinylated CD96抗原至4 μ g/mL，將抗體B和抗原按1:1體積比混勻，37 $^{\circ}$ C預孵育45分鐘後，加入到已包被抗體A的酶標板中，放於37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育1.5小時。孵育結束後用PBST洗板5次，加入50 μ L /孔用樣品稀釋液稀釋的HRP標記的鏈黴親和素 (Sigma，Cat No. S2438)，37 $^{\circ}$ C 孵育1小時。用PBST洗板5次後，加入50 μ l /孔TMB顯色受質 (KPL，Cat No. 52-00-03) 進行顯色，加入50 μ l /孔1M H₂SO₄終止反應，用NOVOStar酶標儀在波長450nm處讀取吸收值，根據OD值的大小確定A和B兩種CD96抗體是否競爭。彼此競爭的抗體分為同一類的抗體，不能競爭的抗體則是不同類的抗體。檢測結果見圖3和表18。

表18. 不同組抗體間競爭關係檢測

	包被抗體 (A 抗體)				
競爭抗體 (B 抗體)	h1718-012	ch1720	h1721-003	h1719-014	h1722-010
h1718-012	100.0%	102.9%	102.6%	94.8%	-11.1%
ch1720	94.4%	100.0%	98.7%	92.3%	-2.4%
h1721-003	73.6%	92.6%	100.0%	96.0%	-0.3%
h1719-014	44.3%	67.7%	84.6%	100.0%	28.6%
h1722-010	-3.5%	-11.5%	-8.5%	8.5%	100.0%

【0209】競爭實驗結果表明h1721-003、h1719-014、h1718-012和ch1720抗體之間存在競爭關係，它們都與h1722-010抗體不競爭。

【0210】測試例7：抗CD96抗體結合CD96蛋白不同多肽片段的ELISA實驗

【0211】抗CD96抗體所識別的抗原表位通過抗體與CD96蛋白不同多肽片段的結合實驗來檢測。用CD96抗原的不同肽段的多肽包被在酶標板中，抗體加入後訊號的強弱被用於判斷抗體和多肽的結合活性，具體實驗方法如下：

【0212】用pH7.4的PBS (上海源培，Cat No. B320) 緩衝液將多肽稀釋至20µg/mL濃度，以50µL /孔的體積加入96孔酶標板 (Corning，Cat No. CLS3590-100EA) 中，於4°C包被過夜。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶 (BD skim milk, Cat No.232100) 封閉液250µL /孔，37°C 孵育箱孵育3小時。封閉結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液 (pH7.4 PBS含0.05% tween-20) 洗板5次後，加入50µL /孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體 (融合瘤純化抗體或嵌合抗體)，放於37°C 孵育箱孵育2小時。孵育結束後用PBST洗板5次，加入50µL /孔用樣品稀釋液稀釋的HRP標記的羊抗鼠二抗 (Jackson Immuno Research，Cat No. 115-035-003) 或羊抗人二抗 (Jackson Immuno Research，Cat No. 109-035-003) 或者anti-Rat-IgG HRP (Jackson Immuno Research，Cat No. 112-035-003)，37°C 孵育1小時。用PBST洗板5次後，加入50µL /孔TMB顯色受質 (KPL，Cat No. 52-00-03)，於室溫孵育5-15min，加入50µL /孔1M H₂SO₄終止反應，用酶標儀(Thermo scientific MuLtiskan MK3)在波長450nm處讀取吸收值，推測分析CD96抗體可能所識別的抗原表位。

表19. 抗原表位肽列表

序號(#)	多肽序列 (在 CD96 胞外區中的位置，序列編號)	ch1718	ch1720	ch1721	ch1719
-------	----------------------------	--------	--------	--------	--------

1	GSDVNLTCQTQTVGFFVQMQ (17-36, SEQ ID NO : 85)	+++	-	+	-
2	FVQMOWSKVTNKIDLIAVYH (32-51, SEQ ID NO : 86)	+++	-	+/-	-
3	IAVYHPQYGFYCA YGRPCES (47-66, SEQ ID NO : 87)	++++	+++	++++	+++
4	RPCESLVTFTETPENGSKWT (62-81, SEQ ID NO : 88)	+++	-	-	-
5	GSKWTLHLRNMSCSVSGRYE (77-86, SEQ ID NO : 89)	+++	-	+	-
6	SGRYECMLVLYPEGIQTKIY (92-111, SEQ ID NO : 90)	+++	-	+/-	-
7	QTKIYNLLIQTHVTADEWNS (107-126, SEQ ID NO : 91)	+++	-	+/-	-
8	DEWNSNHTIEIEINQLEIP (122-141, SEQ ID NO : 92)	+++	-	+/-	-
9	TLEIPCFQNSSSKISSEFTY (137-156, SEQ ID NO : 93)	+++	-	-	-
10	KISSEFTYAWSVEDNGTQETLI (149-170, SEQ ID NO : 94)	++	-	-	-
11	QETLISQNHLISNSTLLKDR (166-185, SEQ ID NO : 96)	+++	-	+/-	-
12	LLKDRVKLGTDYRLHLSPVQ (181-200, SEQ ID NO : 97)	+++	-	+/-	-
13	LSPVQIFDDGRKF SCHIRVG (196-215, SEQ ID NO : 98)	+++	-	+/-	-
14	HIRVGPKNILRSSTTVKVFA (211-230, SEQ ID NO : 99)	+++	-	+	-
15	LRSTTVKVF AKPEIPVIVE (220-239, SEQ ID NO : 100)	+++	-	+/-	-
16	PVIVENNSTDVLVERRFTCL (235-254, SEQ ID NO : 101)	+++	-	+/-	-
17	RFTCLLKNVFPKANITWFID (250-269, SEQ ID NO : 102)	++++	-	+	-
18	TWFIDGSFLHDEKEGIYITN (265-284, SEQ ID NO : 103)	+++	-	-	-
19	IYITNEERKKGKDFLELKS V (280-299, SEQ ID NO : 104)	+++	-	-	-
20	ELKSVLTRVHSNKPAQSDNL (295-314, SEQ ID NO : 105)	++	-	+/-	-
21	QSDNLTIWCMALSPVPGNKV (310-329, SEQ ID NO : 106)	++	-	-	-
22	PGNKVWNISSEKITFLLGSE (325-344, SEQ ID NO : 107)	++	-	+/-	-

註：「+」表示結合強度，「+」越多，表示結合力越強；「-」表示無結合。

【0213】根據上述結果，抗體ch1718、ch1720、ch1721、ch1719與3#抗原片段（SEQ ID NO : 87）結合較強，3#抗原片段中含抗體ch1718、ch1720、ch1721、ch1719的表位。

【0214】測試例8：CD96抗體結合CD96不同肽段的FACS實驗

【0215】為了驗證抗體與CD96蛋白多肽片段的結合是特異的，我們設計了以下FACS實驗進行驗證。用多肽片段與抗體孵育結合後，抗體與CD96蛋白結合的表位即被佔據，則抗體再與細胞表面的CD96蛋白結合的訊號下降。具體實驗方法如下：

【0216】1%BSA稀釋抗體樣品至1.2μg/mL，同時稀釋多肽至40μg/mL，將多肽和抗體樣品按1:1體積比混勻，37°C預孵育90分鐘；收集CD96-CHOs

細胞，PBS洗滌一次，按 0.5×10^6 /test分配；用100 μ L的多肽-抗體混合液重懸細胞，4 $^{\circ}$ C 孵育60分鐘，1%BSA洗滌3次；Alexa Fluor 488 anti-human IgG Fc (thermofisher, A-11013)，或者 PE goat anti-mouse IgG(Biolegend, 405307)，或者PE goat anti-Rat IgG (Biolegend, 405406) 稀釋液 (1:400, 1:40, 1:100) 100 μ L重懸細胞，4 $^{\circ}$ C 孵育40分鐘，1%BSA洗滌3次，以200 μ L的1%BSA重懸細胞，在流式細胞儀BD FACSCanto II 上讀取各樣品MFI，GraphPad Prism 5分析數據做出柱狀圖，通過未與多肽孵育的和與多肽孵育的兩者之間的MFI差值來判斷CD96抗體可識別的抗原表位。檢測結果見圖4。

【0217】 檢測結果顯示，嵌合抗體ch1721、ch1719、ch1718結合人CD96胞外區中SEQ ID NO：87所示的表位區段。

【0218】 測試例9：NK細胞介導的細胞殺傷功能實驗

【0219】 為了研究CD96抗體對NK細胞殺傷功能的影響，收集和純化人外周血單核細胞 (PBMC)，提取自然殺傷細胞 (NK)，與人大腸癌細胞 WiDr (Cat No. ATCC-CCL-218)共培養4h，檢測乳酸脫氫酶 (LDH)的分泌程度。

【0220】 實驗過程簡單描述如下：

【0221】 人大腸癌細胞系 WiDr於MEM培養基中培養，該培養基中添加10% (v/v) 胎牛血清(FBS)，37 $^{\circ}$ C、5%CO₂條件下培養。新鮮血液利用 Ficoll-Hypaque 密度梯度離心(Stem Cell Technologies)得到PBMC，人原代NK細胞從新鮮分離的PBMC中提取 (Miltenyi, CAT# 130-092-657)，於RPMI 1640 培養基中培養，該培養基中添加10% (v/v) FBS，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂條件下培養。人原代NK細胞接種至6孔細胞培養板，細胞密度約為 2×10^6 / ml，加入100U/mL人IL-2 (Peprotech, 200-02-100)過夜培養後，利用無酚紅RPMI 1640培養基洗滌，重懸，並接種至96孔U底板中，細胞密度約為 3×10^5 / 孔，

同時加入梯度稀釋的抗體樣品（用PBS稀釋）或等量的同型IgG作為空白對照，以只加入IL-2、NK細胞和癌細胞的孔作為空白對照（control）。37°C，5% CO₂培養箱孵育1h後，靶標細胞 WiDr以1:1比例與人原代NK細胞共培養，37°C，5% CO₂培養箱培養4h後，收集細胞培養上清。採用CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, CAT# G1780)方法檢測細胞培養上清內LDH分泌程度。具體操作參考試劑說明書。特異性細胞溶解的百分比以下式決定： $\% \text{溶解} = 100 \times (\text{ER} - \text{SR1} - \text{SR2}) / (\text{MR} - \text{SR1})$ ，其中ER、SR(1&2)及MR分別代表實驗、自發（1為靶標細胞，2為人原代NK細胞）及最大LDH釋放。自發釋放系由單獨培養於培養基中的靶標細胞或人原代NK細胞所釋放的LDH，最大釋放系利用裂解液裂解所有靶標細胞時所測定的LDH。

【0222】實驗結果見圖5，結果表明CD96的抗體ch1718，ch1720，以及ch1719均能不同程度增強NK細胞對腫瘤細胞的殺傷。

【0223】雖然以上描述了本發明的具體實施方式，但是本領域的技術人員應當理解，這些僅是舉例說明，在不背離本發明的原理和實質的前提下，可以對這些實施方式做出多種變更或修改。因此，本發明的保護範圍由所附申請專利範圍限定。

【符號說明】

【0224】 無



201922792

【發明摘要】**【中文發明名稱】** CD96 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途**【英文發明名稱】** CD96 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF**【中文】**

本發明關於一種 CD96 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途。進一步地，本發明關於包含所述 CD96 抗體 CDR 區的鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體，以及包含 CD96 抗體及其抗原結合片段的醫藥組成物，以及其作為藥物的用途。特別地，本發明關於一種人源化的 CD96 抗體在製備用於治療 CD96 相關的疾病或病症的藥物中的用途。

【英文】

The present invention relates to a CD96 antibody, an antigen-binding fragment, and a pharmaceutical use thereof. Further, the present invention relates to a murine antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody comprising the CDR region of the CD96 antibody, and a pharmaceutical composition comprising the CD96 antibody and antigen-binding fragment thereof, and the use thereof as a medicament. In particular, the invention relates to the use of a humanized CD96 antibody for the manufacture of a medicament for the treatment of a disease or disorder associated with CD96.

【指定代表圖】 圖1**【代表圖之符號簡單說明】** 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種單株抗體或其抗原結合片段，所述單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD96，所述單株抗體包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中：

(i) 重鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：16、17 和 18 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 HCDR 變體，輕鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：19、20 和 21 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 LCDR 變體；
或

(ii) 重鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：22、23 和 24 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 HCDR 變體，輕鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：25、26 和 27 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 LCDR 變體；
或

(iii) 重鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：28、29 和 30 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 HCDR 變體，輕鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：31、32 和 33 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 LCDR 變體；
或

(iv) 重鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：34、35 和 36 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 HCDR 變體，輕鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：37、38 和 39 所示的 LCDR1、

LCDR2 和 LCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 LCDR 變體；
或

(v) 重鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：40、41 和 42 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 HCDR 變體，輕鏈可變區包含選自在分別如 SEQ ID NO：43、44 和 45 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區基礎上分別具有 3、2、1 或 0 個胺基酸突變的 LCDR 變體。

【第2項】 如請求項1所述的單株抗體或其抗原結合片段，其中：

(vi) 重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：16、17 和 18 胺基酸序列所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區，輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：52、20 和 21 胺基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區，其中所述 LCDR1 優選如 SEQ ID NO：19、108、109 和 110 任一所示 LCDR1；或

(vii) 重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：22、23 和 64 胺基酸序列所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區，輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：25、26 和 27 胺基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區，其中所述 HCDR3 優選如 SEQ ID NO：24、111、112、113、114、115 和 116 任一所示 HCDR3；或

(viii) 重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：28、29 和 30 胺基酸序列所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區，輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：31、32 和 33 胺基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區；或

(ix) 重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：34、35 和 36 胺基酸序列所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 區，輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO：37、38 和 39 胺基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 區；或

(x) 重鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：40、119和42胺基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3區，輕鏈可變區包含分別如SEQ ID NO：43、44和45胺基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3區，其中所述的HCDR2優選如SEQ ID NO：41、120或121所示。

【第3項】如請求項1或2所述的單株抗體或其抗原結合片段，其中所述單株抗體或其抗原結合片段是重組抗體，優選自鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體。

【第4項】如請求項3所述的單株抗體或其抗原結合片段，其包含：

a. 序列為SEQ ID NO:6、46、49、50和51任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO：7、47、48、53、54、55、56、57和58任一所示的輕鏈可變區或其變體；或

b. 序列為SEQ ID NO:8、59、62、63、65、66、67、68、69和70任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO：9、60和61任一所示的輕鏈可變區或其變體；或

c. 序列為SEQ ID NO:10所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO:11所示的輕鏈可變區或其變體；或

d. 序列為SEQ ID NO:12、71、75、76和77任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO：13、72、73和74任一所示的輕鏈可變區或其變體；或

e. 序列為SEQ ID NO:14、78、82、83、84、122和123任一所示的重鏈可變區或其變體和/或序列為SEQ ID NO:15、79、80和81任一所示的輕鏈可變區或其變體；

其中a至e中所述變體是在所述輕鏈可變區或重鏈可變區的框架區序列上具有1至10個胺基酸突變，所述的突變較佳地為回復突變。

【第5項】 如請求項4所述的單株抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段包含：

f.選自序列為SEQ ID NO:6、46、49、50和51任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO：7、47、48、53、54、55、56、57和58任一所示的輕鏈可變區；或

g.選自序列為SEQ ID NO:8、59、62、63、65、66、67、68、69和70任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO：9、60和61任一所示的輕鏈可變區；或

h.序列為SEQ ID NO:10所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO:11所示的輕鏈可變區；或

i.選自序列為SEQ ID NO:12、71、75、76和77任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO：13、72、73和74任一所示的輕鏈可變區；或

j.選自序列為SEQ ID NO:14、78、82、83、84、122和123任一所示的重鏈可變區和序列為SEQ ID NO:15、79、80和81任一所示的輕鏈可變區。

【第6項】 如請求項1至5中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體為全長抗體，進一步包括人抗體恆定區，優選包含SEQ ID NO:117所示的人抗體重鏈恆定區和/或SEQ ID NO:118所示的人抗體輕鏈恆定區。

【第7項】 如請求項1至5中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段，其中所述抗原結合片段是選自Fab、Fab'、F(ab')₂、單鏈抗體、二聚化的V區、二硫鍵穩定化的V區和包含CDR的肽的抗原結合片段的形式。

【第8項】 如請求項1至7中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或抗原結合片段以如通過表面等離子共振技術所測定的 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 的KD值的親和力結合人CD96。

【第9項】 一種分離的單株抗體或其抗原結合片段，其與請求項1至8中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段競爭結合人CD96。

【第10項】 如請求項9所述的單株抗體或其抗原結合片段，具有以下特徵中的至少一種：

- i. 以如通過表面等離子共振技術所測定的 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 的KD值的親和力結合人CD96；
- ii. 與食蟹猴或恆河猴CD96交叉反應；
- iii. 阻斷人CD96與人CD155的結合；
- iv. 增加NK細胞和/或T細胞的活化；
- v. 阻斷由CD96與CD155結合所誘導的NK細胞的活化抑制。

【第11項】 如請求項9或10所述的單株抗體或其抗原結合片段，其中所述單株抗體或其抗原結合片段結合人CD96胞外區中如IAVYHPQYGFYCA YGRPCES所示的區域。

【第12項】 一種多特異性抗體，含有如請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段的輕鏈可變區和/或重鏈可變區。

【第13項】 一種單鏈抗體，含有如請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段的輕鏈可變區和/或重鏈可變區。

【第14項】 一種藥物組合物，其含有治療有效量的如請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑、緩衝劑或賦形劑。

【第15項】 一種分離的核酸分子，其編碼請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體。

【第16項】 一種重組載體，其包含請求項15所述的分離的核酸分子。

【第17項】 一種用如請求項16所述的重組載體轉化的宿主細胞，所述宿主細胞選自原核細胞和真核細胞，優選為真核細胞，更優選哺乳動物細胞。

【第18項】 一種用於生產如請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體的方法，所述方法包括將請求項15的宿主細胞在培養基中進行培養以形成並積累請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，以及從培養物回收所述單株抗體或其抗原結合片段、所述多特異性抗體或所述單鏈抗體。

【第19項】 一種用於體外檢測或測定人CD96的方法，所述方法包括使用請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體。

【第20項】 一種請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體在製備用於檢測或測定人CD96的試劑中的用途。

【第21項】 一種減少或緩解免疫抑制的方法，所述方法包括向受試者施用治療有效量的請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，或請求項14所述的藥物組合物，或請求項15所述的分離的核酸分子。

【第22項】 一種增強NK細胞活性的方法，所述方法包括使用請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，或請求項14所述的藥物組合物，或請求項15所述的分離的核酸分子降低CD96活性的步驟。

【第23項】 一種治療與人CD96相關的疾病的方法，所述方法包括向受試者施用治療有效量的請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，或請求項14所述的藥物組合物，或請求項15所述的分離的核酸分子，以治療人CD96相關的疾病，所述疾病優選腫瘤、癌症或感染性疾病。

【第24項】 一種如請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，或請求項14所述的藥物組合物，或請求項15所述的分離的核酸分子或其組合在製備治療或預防疾病或病症的藥物中的用途，其中所述疾病或病症是人CD96相關疾病，所述疾病或病症優選腫瘤、癌症或感染性疾病。

【第25項】 一種作為藥物的請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，或請求項14所述的藥物組合物，或請求項15所述的分離的核酸分子。

【第26項】 如請求項25所述的作為藥物的請求項1至11中任一項所述的單株抗體或其抗原結合片段、請求項12所述的多特異性抗體或請求項13所述的單鏈抗體，或請求項14所述的藥物組合物，或請求項15所述的分離的核酸分子，其中所述的藥物用於人CD96相關的疾病的治療，所述疾病優選腫瘤、癌症或感染性疾病。

