



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114585644 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 03

(21) 申请号 202080061188.4

K.M.布谢尔 E.C.P.布赖恩德

(22) 申请日 2020.08.31

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30) 优先权数据

专利代理师 张文辉

62/894,334 2019.08.30 US

62/931,476 2019.11.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.02.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/048700 2020.08.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/042019 EN 2021.03.04

(71) 申请人 艾吉纳斯公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D.S.钱德 R.B.戈姆博斯

O.伊格纳托维奇 N.A.拉姆塞

权利要求书7页 说明书123页 附图50页

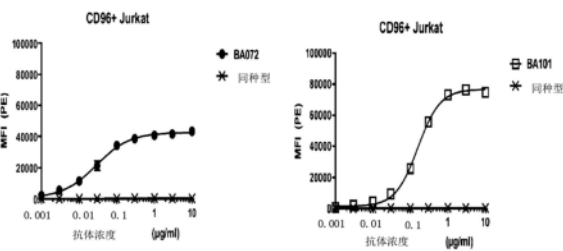
(54) 发明名称

抗CD96抗体及其使用方法

(57) 摘要

本公开提供了特异性结合至CD96 (例如,人CD96) 以及拮抗CD96功能的抗体。还提供了包含这些抗体、编码这些抗体的核酸、表达载体和用于制备这些抗体的宿主细胞的药物组合物,以及使用这些抗体来治疗受试者的方法。

亲本抗CD96抗体与表达人CD96的同种型2的 Jurkat 细胞的结合



1. 一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含互补决定区(CDR)CDRH1、CDRH2和CDRH3,并且所述轻链可变区包含CDR CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中:

(a) CDRH1包含 $X_1YX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO:135)的氨基酸序列,其中

X_1 是Q或S;

X_2 是A或S;

X_3 是M或I;并且

X_4 是H或S;

(b) CDRH2包含 $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{10}$ QKFQG (SEQ ID NO:137)的氨基酸序列,其中

X_1 是W或G;

X_2 是N或I;

X_3 是A、E、V或P;

X_4 是V、G、W或I;

X_5 是S、Y、T、N或F;

X_6 是G或W;

X_7 是D、Y、N或T;

X_8 是T或A;

X_9 是K或N;并且

X_{10} 是S或A;

(c) CDRH3包含NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO:180)、GYDSRPLDV (SEQ ID NO:19)或GYDSRPLDY (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列,其中

X_1 是M或L;并且

X_2 是M或L;

(d) CDRL1包含RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO:139)或GGNNIGSKIVH (SEQ ID NO:26)的氨基酸序列,其中

X_1 是S、T或L;并且

X_2 是S、P或W;

(e) CDRL2包含 X_1X_2 SSLQS (SEQ ID NO:141)或DDRDRPS (SEQ ID NO:32)的氨基酸序列,其中

X_1 是S或A;并且

X_2 是A、S或E;并且/或者

(f) CDRL3包含QQX₁YSTPALX₂ (SEQ ID NO:143)或QVWDINVHHVI (SEQ ID NO:35)的氨基酸序列,其中

X_1 是S或A;并且

X_2 是T或S。

2. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中:

(a) CDRH1包含 X_1YX_2 MH (SEQ ID NO:136)的氨基酸序列,其中

X_1 是Q或S;并且

X_2 是A或S;

(b) CDRH2包含WINX₁X₂X₃X₄X₅TKYSQKFQG (SEQ ID NO:138)的氨基酸序列,其中

X₁是A、V或E;

X₂是V、W或G;

X₃是S、Y、T或N;

X₄是G或W;并且

X₅是D、N、Y或T;

(c) CDRH3包含NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO:180)的氨基酸序列,其中

X₁是M或L;并且

X₂是M或L;

(d) CDRL1包含RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO:139)的氨基酸序列,其中

X₁是S、T或L;并且

X₂是S、P或W;

(e) CDRL2包含X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO:141)的氨基酸序列,其中

X₁是S或A;并且

X₂是A、S或E;并且/或者

(f) CDRL3包含QQSYSTPALT (SEQ ID NO:33) 或QQAYSTPALS (SEQ ID NO:34)的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中:

(a) CDRH1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;

(b) CDRH2包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;

(c) CDRH3包含SEQ ID NO:19或20的氨基酸序列;

(d) CDRL1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;

(e) CDRL2包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;并且/或者

(f) CDRL3包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、5和18;2、6和18;2、8和18;2、9和18;2、10和18;1、7和18;2、11和18;1、12和18;1、13和18;1、14和18;3、15和18;1、16和18;1、5和140;1、5和142;1、5和179;4、17和19;或者4、17和20的氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:21、28和33;21、29和33;21、30和33;21、31和33;22、29和33;24、29和33;23、29和33;25、28和34;或者26、32和35的氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、5、18、21、28和33;1、5、18、21、29和33;1、5、18、22、29和33;1、5、18、23、29和33;1、5、18、24、29和33;1、5、18、25、28和34;1、5、140、21、28和33;1、5、142、21、28和33;1、5、179、21、28和33;1、7、18、21、29和33;1、12、18、21、28和33;1、13、18、21、28和33;1、14、18、21、28和33;1、16、18、21、28和33;2、6、18、21、29和33;2、8、18、21、29和33;2、9、18、21、30和33;2、10、18、21、29和33;2、11、18、21、31和33;3、15、18、21、28和33;4、17、19、26、32和35;或者4、17、20、26、32和35的氨基酸序列。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含VH,所述VH包含与

SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

8.如权利要求7所述的分离的抗体,其中所述VH的氨基酸序列由SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60或61的氨基酸序列组成。

9.如权利要求7或8所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中的任一者中的X是谷氨酰胺。

10.如权利要求7或8所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中的任一者中的X是焦谷氨酸。

11.如权利要求1-10中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,或75的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

12.如权利要求11所述的分离的抗体,其中所述VL的氨基酸序列由SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75的氨基酸序列组成。

13.一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,所述抗体包含:VH和/或VL,所述VH包含SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61的氨基酸序列;所述VL包含SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75的氨基酸序列。

14.如权利要求13所述的分离的抗体,其中所述VH和所述VL分别包含SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70的氨基酸序列。

15.如权利要求14所述的分离的抗体,其中所述VH和所述VL的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70的氨基酸序列组成。

16.如权利要求13-15中任一项所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中的任一者中的X是谷氨酰胺。

17.如权利要求13-15中任一项所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中的任一者中的X是焦谷氨酸。

18.如权利要求1-17中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体特异性结合至SEQ ID NO:130或131的氨基酸序列。

19. 一种分离的抗体,其特异性结合至SEQ ID NO:130或131的氨基酸序列。
20. 如权利要求18或19所述的分离的抗体,其中所述抗体结合至SEQ ID NO:134的氨基酸序列。
21. 如权利要求1-20中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体在结合至表达人CD96的细胞后被内化。
22. 一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,其中所述抗体在结合至表达人CD96的细胞后被内化。
23. 如权利要求1-22中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区选自自由以下各项组成的组:人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。
24. 如权利要求23所述的分离的抗体,其中所述抗体包含IgG1重链恒定区。
25. 如权利要求24所述的分离的抗体,其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含根据EU编号系统编号的N297A突变。
26. 如权利要求25所述的分离的抗体,其中所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:124或176的氨基酸序列。
27. 如权利要求24所述的分离的抗体,其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含根据EU编号系统编号的S239D、A330L和I332E突变。
28. 如权利要求27所述的分离的抗体,其中所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:125或177的氨基酸序列。
29. 如权利要求24所述的分离的抗体,其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含根据EU编号系统编号的S267E和L328F突变。
30. 如权利要求29所述的分离的抗体,其中所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:126或178的氨基酸序列。
31. 如权利要求1-24中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中所述变体重链恒定区结合至Fc γ R的亲和力比所述野生型重链恒定区结合至所述Fc γ R的亲和力高。
32. 如权利要求31所述的分离的抗体,其中所述Fc γ R是Fc γ RIIB。
33. 如权利要求1-24中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168或169的氨基酸序列。
34. 如权利要求33所述的分离的抗体,其中所述重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168或169的氨基酸序列组成。
35. 如权利要求33或34所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168和169中的任一者中的X是谷氨酰胺。
36. 如权利要求33或34所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,

83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168和169中的任一者中的X是焦谷氨酸。

37. 如前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含轻链恒定区,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:122或123的氨基酸序列。

38. 如前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114或115的氨基酸序列。

39. 如权利要求38所述的分离的抗体,其中所述轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114或115的氨基酸序列组成。

40. 一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,所述抗体包含:重链和/或轻链,所述重链包含SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168或169的氨基酸序列;所述轻链包含SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114或115的氨基酸序列。

41. 如权利要求40所述的分离的抗体,其中所述重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168或169的氨基酸序列组成;并且/或者所述轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,或115的氨基酸序列组成。

42. 如权利要求40所述的分离的抗体,其中所述重链和所述轻链分别包含SEQ ID NO:76和102;79和103;78和103;82和103;84和104;83和104;86和103;85和103;81和103;80和103;87和105;77和102;88和102;77和106;77和107;77和108;77和103;89和102;90和102;91和102;92和102;93和102;77和109;94和102;95和102;96和102;97和102;98和102;99和102;100和110;100和111;100和112;100和113;100和114;100和115;101和110;144和102;147和103;146和103;150和103;152和104;151和104;154和103;153和103;149和103;148和103;155和105;145和102;156和102;145和106;145和107;145和108;145和103;157和102;158和102;159和102;160和102;161和102;145和109;162和102;163和102;164和102;165和102;166和102;167和102;168和110;168和111;168和112;168和113;168和114;168和115;或者169和110的氨基酸序列。

43. 如权利要求41所述的分离的抗体,其中所述重链和所述轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:76和102;79和103;78和103;82和103;84和104;83和104;86和103;85和103;81和103;80和103;87和105;77和102;88和102;77和106;77和107;77和108;77和103;89和102;90和102;91和102;92和102;93和102;77和109;94和102;95和102;96和102;97和102;98和102;99和102;100和110;100和111;100和112;100和113;100和114;100和115;101和110;144和102;147和103;146和103;150和103;152和104;151和104;154和103;153和103;149和103;148和103;155和105;145和102;156和102;145和106;145和107;145和108;145和103;157和102;158和102;159和102;160和102;161和102;145和109;162和102;163和102;

164和102;165和102;166和102;167和102;168和110;168和111;168和112;168和113;168和114;168和115;或者169和110的氨基酸序列组成。

44.如权利要求40-43中任一项所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:76-101或144-169中任一项中的X是谷氨酰胺。

45.如权利要求40-43中任一项所述的分离的抗体,其中SEQ ID NO:76-101或144-169中任一项中的X是焦谷氨酸。

46.一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,其中所述抗体结合至如前述权利要求中任一项所述的抗体相同的人CD96的表位。

47.一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,其中所述抗体与如前述权利要求中任一项所述的抗体竞争与人CD96的结合。

48.如前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体是人抗体。

49.如前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体是多特异性抗体。

50.如前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体缀合至细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记。

51.如前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体缀合至第二抗体。

52.一种分离的多核苷酸,其编码如前述权利要求中任一项所述的抗体的VH和/或VL。

53.一种载体,其包含如权利要求52所述的多核苷酸。

54.一种重组宿主细胞,其包含如权利要求52所述的多核苷酸或如权利要求55所述的载体。

55.一种药物组合物,其包含如权利要求1-51中任一项所述的抗体、如权利要求52所述的多核苷酸、如权利要求53的载体或如权利要求54所述的宿主细胞;以及药学上可接受的载剂或赋形剂。

56.一种产生特异性结合至人CD96的抗体的方法,所述方法包括在合适的条件下培养如权利要求54所述的宿主细胞,从而表达所述多核苷酸以及产生所述抗体。

57.一种增加受试者的免疫应答的方法,所述方法包括将有效量的如权利要求1-51中任一项所述的抗体、如权利要求52所述的多核苷酸、如权利要求53所述的载体、如权利要求54所述的宿主细胞或如权利要求55所述的药物组合物施用于所述受试者。

58.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括将有效量的如权利要求1-51中任一项所述的抗体、如权利要求52所述的多核苷酸、如权利要求53所述的载体、如权利要求54所述的宿主细胞或如权利要求55所述的药物组合物施用于所述受试者。

59.如权利要求57或58所述的方法,其中所述抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物通过全身、静脉内、皮下或瘤内施用,或者递送至肿瘤引流淋巴结。

60.如权利要求57-59中任一项所述的方法,还包括将另外的治疗剂施用于所述受试者。

61.如权利要求60所述的方法,其中所述另外的治疗剂是化疗剂。

62.如权利要求61所述的方法,其中所述另外的治疗剂是检查点靶向剂。

63.如权利要求62所述的方法,其中所述检查点靶向剂选自以下各项组成的组:拮抗性抗PD-1抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体、拮抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗TIM-3抗体、拮抗性抗LAG-3抗体、拮抗性抗CEACAM1抗体、激动性抗CD96抗体、拮抗性抗

TIGIT抗体、拮抗性抗VISTA抗体、激动性抗GITR抗体和激动性抗OX40抗体。

64. 如权利要求63所述的方法, 其中所述另外的治疗剂是抗PD-1抗体, 任选地其中所述抗PD-1抗体是帕博利珠单抗或纳武单抗。

65. 如权利要求60所述的方法, 其中所述另外的治疗剂是吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)的抑制剂。

66. 如权利要求65所述的方法, 其中所述抑制剂选自以下各项组成的组: 依帕卡司他、F001287、英妥昔莫和NLG919。

67. 如权利要求60所述的方法, 其中所述另外的治疗剂是疫苗。

68. 如权利要求67所述的方法, 其中所述疫苗包含热休克蛋白肽复合物(HSPPC), 所述热休克蛋白肽复合物包含与抗原肽复合其中的热休克蛋白。

69. 如权利要求68所述的方法, 其中所述热休克蛋白是hsc70并且与肿瘤相关抗原肽复合。

70. 如权利要求68所述的方法, 其中所述热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合, 任选地其中所述HSPPC来源于从受试者获得的肿瘤。

71. 一种治疗受试者的感染性疾病的方法, 所述方法包括将有效量的如权利要求1-51中任一项所述的抗体、如权利要求52所述的多核苷酸、如权利要求53所述的载体、如权利要求54所述的宿主细胞或如权利要求55所述的药物组合物施用于所述受试者。

抗CD96抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年8月30日提交的美国临时申请号62/894,334和2019年11月6日提交的美国临时申请号62/931,476的权益,它们中的每个均以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及特异性结合至CD96(例如,人CD96)的抗体及其使用方法。

背景技术

[0004] CD96(分化簇96),也称为TACTILE(T细胞活化,晚期表达增加),是免疫球蛋白(Ig)超家族中的I型跨膜蛋白。它具有单个Ig结构域、I型跨膜结构域、单个胞内免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和单个YXXM磷酸化基序,并且在T细胞和自然杀伤(NK)细胞的表面上表达。

[0005] CD96被认为在调节免疫细胞(例如,NK细胞和T细胞)和肿瘤转移中发挥作用。尤其是,已经表明,CD96功能的阻断以CD8+T细胞依赖性方式抑制若干小鼠肿瘤模型中的原发性肿瘤生长。

[0006] 鉴于人CD96在调节免疫应答中的作用,被设计为阻断CD96配体相互作用的治疗剂对于治疗涉及免疫抑制的疾病具有很大的前景。

发明内容

[0007] 本公开提供了特异性结合至CD96(例如,人CD96)以及调节CD96功能例如CD96介导的免疫抑制的抗体。还提供了包含这些抗体、编码这些抗体的核酸、表达载体和用于制备这些抗体的宿主细胞的药物组合物,以及使用这些抗体来治疗受试者的方法。本文公开的抗体特别可用于增加免疫细胞活化,因此可用于治疗受试者的癌症或者治疗或预防受试者的感染性疾病。

[0008] 因此,在一个方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含互补决定区(CDR)CDRH1、CDRH2和CDRH3,并且所述轻链可变区包含CDR CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中:

[0009] (a) CDRH1包含 $X_1YX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO:135)的氨基酸序列,其中

[0010] X_1 是Q或S;

[0011] X_2 是A或S;

[0012] X_3 是M或I;并且

[0013] X_4 是H或S;

[0014] (b) CDRH2包含 $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{10}QKFQG$ (SEQ ID NO:137)的氨基酸序列,其中

[0015] X_1 是W或G;

[0016] X_2 是N或I;

[0017] X_3 是A、E、V或P;

[0018] X_4 是V、G、W或I;

- [0019] X_5 是S、Y、T、N或F；
- [0020] X_6 是G或W；
- [0021] X_7 是D、Y、N或T；
- [0022] X_8 是T或A；
- [0023] X_9 是K或N；并且
- [0024] X_{10} 是S或A；
- [0025] (c) CDRH3包含NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO:180)、GYDSRPLDV (SEQ ID NO:19) 或GYDSRPLDY (SEQ ID NO:20) 的氨基酸序列,其中
- [0026] X_1 是M或L；并且
- [0027] X_2 是M或L；
- [0028] (d) CDRL1包含RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO:139) 或GGNNIGSKIVH (SEQ ID NO:26) 的氨基酸序列,其中
- [0029] X_1 是S、T或L；并且
- [0030] X_2 是S、P或W；
- [0031] (e) CDRL2包含X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO:141) 或DDRDRPS (SEQ ID NO:32) 的氨基酸序列,其中
- [0032] X_1 是S或A；并且
- [0033] X_2 是A、S或E；并且/或者
- [0034] (f) CDRL3包含QQX₁YSTPALX₂ (SEQ ID NO:143) 或QVWDINVHHVI (SEQ ID NO:35) 的氨基酸序列,其中
- [0035] X_1 是S或A；并且
- [0036] X_2 是T或S；
- [0037] 任选地,其中紧邻CDRH1的N-末端的氨基酸是N、T、S、D或A。
- [0038] 在某些实施方案中:
- [0039] (a) CDRH1包含X₁YX₂MH (SEQ ID NO:136) 的氨基酸序列,其中
- [0040] X_1 是Q或S；并且
- [0041] X_2 是A或S；
- [0042] (b) CDRH2包含WINX₁X₂X₃X₄X₅TKYSQKFQG (SEQ ID NO:138) 的氨基酸序列,其中
- [0043] X_1 是A、V或E；
- [0044] X_2 是V、W或G；
- [0045] X_3 是S、Y、T或N；
- [0046] X_4 是G或W；并且
- [0047] X_5 是D、N、Y或T；
- [0048] (c) CDRH3包含NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO:180) 的氨基酸序列,其中
- [0049] X_1 是M或L；并且
- [0050] X_2 是M或L；
- [0051] (d) CDRL1包含RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO:139) 的氨基酸序列,其中
- [0052] X_1 是S、T或L；并且
- [0053] X_2 是S、P或W；

[0054] (e) CDRL2包含 X_1X_2 SSLQS (SEQ ID NO:141)的氨基酸序列,其中

[0055] X_1 是S或A;并且

[0056] X_2 是A、S或E;并且/或者

[0057] (f) CDRL3包含QQSYSTPALT (SEQ ID NO:33) 或QQAYSTPALS (SEQ ID NO:34)的氨基酸序列。

[0058] 在某些实施方案中:

[0059] (a) CDRH1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;

[0060] (b) CDRH2包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;

[0061] (c) CDRH3包含SEQ ID NO:19或20的氨基酸序列;

[0062] (d) CDRL1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;

[0063] (e) CDRL2包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;并且/或者

[0064] (f) CDRL3包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0065] 在某些实施方案中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、5和18;2、6和18;2、8和18;2、9和18;2、10和18;1、7和18;2、11和18;1、12和18;1、13和18;1、14和18;3、15和18;1、16和18;1、5和140;1、5和142;1、5和179;4、17和19;或者4、17和20的氨基酸序列。

[0066] 在某些实施方案中,CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:21、28和33;21、29和33;21、30和33;21、31和33;22、29和33;24、29和33;23、29和33;25、28和34;或者26、32和35的氨基酸序列。

[0067] 在某些实施方案中,CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、5、18、21、28和33;1、5、18、21、29和33;1、5、18、22、29和33;1、5、18、23、29和33;1、5、18、24、29和33;1、5、18、25、28和34;1、5、140、21、28和33;1、5、142、21、28和33;1、5、179、21、28和33;1、7、18、21、29和33;1、12、18、21、28和33;1、13、18、21、28和33;1、14、18、21、28和33;1、16、18、21、28和33;2、6、18、21、29和33;2、8、18、21、29和33;2、9、18、21、30和33;2、10、18、21、29和33;2、11、18、21、31和33;3、15、18、21、28和33;4、17、19、26、32和35;或者4、17、20、26、32和35的氨基酸序列。

[0068] 在某些实施方案中,所述抗体包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述VH的氨基酸序列由SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0069] 在某些实施方案中,所述抗体包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74或75的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述VL的氨基酸序列由SEQ ID NO:62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74或75的氨基酸序列组成。

[0070] 在另一个方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,所述抗体

包含:VH和/或VL,所述VH包含SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60或61的氨基酸序列;所述VL包含SEQ ID NO:62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74或75的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述VH和所述VL分别包含SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述VH和所述VL的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60或61中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0071] 在某些实施方案中,所述抗体特异性结合至SEQ ID NO:130或131的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体结合至SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0072] 在某些实施方案中,所述抗体在结合至表达人CD96的细胞后被内化。

[0073] 在另一个方面,本公开提供了一种特异性结合SEQ ID NO:130或131的氨基酸序列的分离的抗体。在某些实施方案中,所述抗体结合至SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0074] 在另一个方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,其中所述抗体在结合至表达人CD96的细胞后被内化。

[0075] 在某些实施方案中,所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区选自由以下各项组成的组:人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。在某些实施方案中,所述抗体包含IgG1重链恒定区。在某些实施方案中,所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含根据EU编号系统编号的N297A突变。在某些实施方案中,所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:124或176的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含根据EU编号系统编号的S239D、A330L和I332E突变。在某些实施方案中,所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:125或177的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含根据EU编号系统编号的S267E和L328F突变。在某些实施方案中,所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:126或178的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中所述变体重链恒定区结合至Fc γ R的亲和力比所述野生型重链恒定区结合至Fc γ R的亲和力高。在某些实施方案中,所述Fc γ R是Fc γ RIIB。

[0076] 在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168或169的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,

99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,或169的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168和169中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168和169中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0077] 在某些实施方案中,所述抗体包含轻链恒定区,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:122或123的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114或115的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114或115的氨基酸序列组成。

[0078] 在另一个方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,所述抗体包含:重链和/或轻链,所述重链包含SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,或169的氨基酸序列;所述轻链包含SEQ ID NO:102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114或115的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168或169的氨基酸序列组成;并且/或者所述轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,或115的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,所述重链和所述轻链分别包含SEQ ID NO:76和102;79和103;78和103;82和103;84和104;83和104;86和103;85和103;81和103;80和103;87和105;77和102;88和102;77和106;77和107;77和108;77和103;89和102;90和102;91和102;92和102;93和102;77和109;94和102;95和102;96和102;97和102;98和102;99和102;100和110;100和111;100和112;100和113;100和114;100和115;101和110;144和102;147和103;146和103;150和103;152和104;151和104;154和103;153和103;149和103;148和103;155和105;145和102;156和102;145和106;145和107;145和108;145和103;157和102;158和102;159和102;160和102;161和102;145和109;162和102;163和102;164和102;165和102;166和102;167和102;168和110;168和111;168和112;168和113;168和114;168和115;或者169和110的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链和所述轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:76和102;79和103;78和103;82和103;84和104;83和104;86和103;85和103;81和103;80和103;87和105;77和102;88和102;77和106;77和107;77和108;77和103;89和102;90和102;91和102;92和102;93和102;77和109;94和102;95和102;96和102;97和102;98和102;99和102;100和110;100和111;100和112;100和113;100和114;100和115;101和110;144和102;147和103;146和103;150和103;152和104;151和104;154和103;153和103;149和103;148和103;155和105;145和102;156和102;145和106;145和107;145和108;145和103;157和102;158和102;159和102;160和102;161和102;145和109;162和102;163和102;164和102;165和102;166和102;167和102;168和110;168和111;168和112;168和113;168和114;168和115;或者169和110的氨基酸序列。

103;155和105;145和102;156和102;145和106;145和107;145和108;145和103;157和102;158和102;159和102;160和102;161和102;145和109;162和102;163和102;164和102;165和102;166和102;167和102;168和110;168和111;168和112;168和113;168和114;168和115;或者169和110的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76-101或144-169中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76-101或144-169中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0079] 在另一个方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,其中所述抗体结合至与本文公开的抗体相同的人CD96的表位。

[0080] 在另一个方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD96的分离的抗体,其中所述抗体与本文公开的抗体竞争与人CD96的结合。

[0081] 在某些实施方案中,所述抗体是人抗体。在某些实施方案中,所述抗体是多特异性抗体。在某些实施方案中,所述抗体缀合至细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记。在某些实施方案中,所述抗体缀合至第二抗体。

[0082] 在另一个方面,本公开提供了一种编码本文公开的抗体的VH和/或VL的分离的多核苷酸。在另一个方面,本公开提供了一种包含所述多核苷酸的载体。在另一个方面,本公开提供了一种包含所述多核苷酸或所述载体的重组宿主细胞。在另一个方面,本公开提供了一种产生特异性结合至人CD96的抗体的方法,所述方法包括在合适的条件下培养所述宿主细胞,从而表达所述多核苷酸并且产生所述抗体。

[0083] 在另一个方面,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文公开的抗体、多核苷酸、载体或宿主细胞;以及药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0084] 在另一个方面,本公开提供了一种增加受试者的免疫应答的方法,所述方法包括将有效量的本文公开的抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物施用于所述受试者。

[0085] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括将有效量的本文公开的抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物施用于所述受试者。

[0086] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗受试者的感染性疾病的方法,所述方法包括将本文公开的抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物施用于所述受试者。

[0087] 在前述方法的某些实施方案中,所述抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物通过全身、静脉内、皮下、瘤内施用,或者递送至肿瘤引流淋巴结。

[0088] 在前述方法的某些实施方案中,所述方法还包括将一种另外的治疗剂施用于所述受试者。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是化疗剂。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是检查点靶向剂。在某些实施方案中,所述检查点靶向剂选自以下各项组成的组:拮抗性抗PD-1抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体、拮抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗TIM-3抗体、拮抗性抗LAG-3抗体、拮抗性抗VISTA抗体、拮抗性抗TIGIT抗体、拮抗性抗CEACAM1抗体、拮抗性抗CD96抗体、激动性抗GITR抗体和激动性抗OX40抗体。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是抗PD-1抗体,任选地其中所述抗PD-1抗体是帕博利珠单抗或纳武单抗。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是吡咯酮-2,3-双加氧酶(IDO)的抑制剂。在某些实施方案中,所述抑制剂选自以下各项组成的组:依帕卡司他、F001287、英妥昔莫和NLG919。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是疫苗。在某些实施方案中,所述疫苗包含热休克蛋白肽复合物(HSPPC),所述热休克蛋白肽复合物包含与抗原肽复合的热休克蛋白。

在某些实施方案中,所述热休克蛋白是hsc70并且与肿瘤相关抗原肽复合。在某些实施方案中,所述热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合,其中所述HSPPC来源于从受试者获得的肿瘤。

附图说明

[0089] 图1A和1B是显示抗CD96抗体BA072或BA101或者IgG1同种型对照抗体与被工程化为表达高水平的细胞表面人CD96同种型2的Jurkat细胞的结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图1A)或BA101(图1B)的Jurkat细胞结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的Jurkat细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0090] 图2A和2B是显示抗CD96抗体BA072或BA101或者IgG1同种型对照抗体与被工程化为表达高水平的细胞表面人CD96同种型1的CHO细胞的结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图2A)或BA101(图2B)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的CHO细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0091] 图3A和3B是显示抗CD96抗体BA072或BA101或者IgG1同种型对照抗体与被工程化为表达高水平的细胞表面人CD96同种型2的CHO细胞的结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图3A)或BA101(图3B)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的CHO细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0092] 图4A和4B是显示抗CD96抗体BA072或BA101或者IgG1同种型对照抗体与被工程化为表达高水平的细胞表面食蟹猕猴CD96同种型2的CHO细胞的结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图4A)或BA101(图4B)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的CHO细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0093] 图5A和5B是显示抗CD96抗体BA072或BA101或者IgG1同种型对照抗体与表达细胞表面CD96的活化的原代人T细胞结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图5A)或BA101(图5B)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的活化的原代人T细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0094] 图6A、6B和6C是显示抗CD96抗体BA072、BA083或BA084或者IgG1同种型对照抗体与表达细胞表面CD96的活化的原代人T细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图6A)、BA083(图6B)或BA084(图6C)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的活化的原代人T细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0095] 图7A-7F是显示抗CD96抗体BA101、BA102、BA103、BA104、BA105或BA106或者IgG1同种型对照抗体与表达细胞表面CD96的活化的原代人T细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA101(图7A)、BA102(图7B)、BA103(图7C)、BA104(图7D)、BA105(图7E)或BA106(图7F)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的活化的原代人T细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0096] 图8A-8M是显示亲和力成熟抗CD96抗体BA074、BA073、BA079、BA078、BA081、BA080、BA077、BA076、BA082或BA075、亲本抗体BA072或BA101、种系抗体BA083或者IgG1同种型对照抗体与NY-ESO-1转染的表达细胞表面CD96的CD8⁺T细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图8A)、BA083(图8B)、BA074(图8C)、BA073(图8D)、BA079(图8E)、BA078(图8F)、BA081(图8G)、BA080(图8H)、BA077(图8I)、BA076(图8J)、BA082(图8K)、BA075

(图8L)或BA101(图8M)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的NY-ESO-1转染的CD8⁺T细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0097] 图9A和9B是显示抗CD96抗体BA072或BA101或者IgG1同种型对照抗体与表达细胞表面食蟹猴CD96的活化的食蟹猴原代T细胞结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的BA072(图9A)或BA101(图9B)的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的活化的原代食蟹猴T细胞结合相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0098] 图10A和10B是显示抗CD96抗体BA072(图10A)或BA101(图10B)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的人CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0099] 图11A和11B是显示抗CD96抗体BA072(图11A)或BA101(图11B)阻断PVR-His与被工程化为表达高水平的人CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-His的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0100] 图12A-12C是显示抗CD96抗体BA072(图12A)、BA083(图12B)或BA084(图12C)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的人CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0101] 图13A-13L是显示抗CD96抗体BA072(图13A)、BA083(图13B)、BA085(图13C)、BA086(图13D)、BA087(图13E)、BA089(图13F)、BA090(图13G)、BA088(图13H)、BA091(图13I)、BA092(图13J)、BA093(图13K)或BA094(图13L)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的人CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0102] 图14A-14L是显示抗CD96抗体BA073(图14A)、BA074(图14B)、BA078(图14C)、BA079(图14D)、BA080(图14E)、BA081(图14F)、BA076(图14G)、BA077(图14H)、BA082(图14I)、BA075(图14J)、BA083(图14K)或BA072(图14L)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的人CD96的细胞表面同种型1的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0103] 图15A-15L是显示抗CD96抗体BA073(图15A)、BA074(图15B)、BA078(图15C)、BA079(图15D)、BA080(图15E)、BA081(图15F)、BA076(图15G)、BA077(图15H)、BA082(图15I)、BA075(图15J)、BA083(图15K)或BA072(图15L)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的人CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0104] 图16A-16F是显示抗CD96抗体BA101(图16A)、BA102(图16B)、BA103(图16C)、BA104(图16D)、BA105(图16E)或BA106(图16F)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的CD96的细胞表面人同种型2的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc

的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0105] 图17A和17B是显示抗CD96抗体BA101(图17A)或BA107(图17B)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的CD96的细胞表面人同种型2的CHO细胞结合的图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0106] 图18A-18C是显示抗CD96抗体BA072(图18A)、BA083(图18B)或BA084(图18C)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的食蟹猕猴CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0107] 图19A-19L是显示抗CD96抗体BA072(图19A)、BA083(图19B)、BA085(图19C)、BA086(图19D)、BA088(图19E)、BA087(图19F)、BA089(图19G)、BA090(图19H)、BA091(图19I)、BA092(图19J)、BA093(图19K)或BA094(图19L)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的食蟹猕猴CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0108] 图20A-20L是显示抗CD96抗体BA073(图20A)、BA074(图20B)、BA078(图20C)、BA079(图20D)、BA080(图20E)、BA081(图20F)、BA076(图20G)、BA077(图20H)、BA082(图20I)、BA075(图20J)、BA083(图20K)或BA072(图20L)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的食蟹猕猴CD96的细胞表面同种型1的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0109] 图21A-21L是显示抗CD96抗体BA073(图21A)、BA074(图21B)、BA078(图21C)、BA079(图21D)、BA080(图21E)、BA081(图21F)、BA076(图21G)、BA077(图21H)、BA082(图21I)、BA075(图21J)、BA083(图21K)或BA072(图21L)阻断PVR-Fc与被工程化为表达高水平的食蟹猕猴CD96的细胞表面同种型2的CHO细胞结合的一系列图。将通过中位数荧光强度(MFI)评估的PVR-Fc的结合水平,在每种情况下,与IgG1同种型对照抗体的阻断相比,以%最大反应对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0110] 图22A和22B是显示在存在抗CD96抗体BA072(图22A)或BA101(图22B)或者IgG1同种型对照抗体的情况下,被工程化为表达高水平的人CD96的同种型2或PVR的CHO细胞的缀合物形成。将所形成的缀合物的百分比,在每种情况下,与IgG1同种型对照相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。图22C是显示在存在同种型对照的情况下,以及在不存在阻断性抗体的情况下,象限Q2中的缀合物形成的散点图。

[0111] 图23是显示在存在抗CD96抗体BA072、BA083、BA084或者IgG1同种型对照抗体的情况下,被工程化为表达高水平的人CD96的同种型2或PVR的CHO细胞的缀合物形成的图。将所形成的缀合物的百分比,在每种情况下,与IgG1同种型对照相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0112] 图24是显示在存在抗CD96抗体BA101、BA102、BA103、BA104、BA105或BA106的情况下,被工程化为表达高水平的人CD96的同种型2或PVR的CHO细胞的缀合物形成的图。将所形

成的缀合物的百分比,在每种情况下,与IgG1同种型对照相比,对与细胞一起温育的相应抗体的浓度作图。

[0113] 图25A-25H是显示在两个不同的供体中,当与或不与抗PD-1抗体一起施用,抗CD96抗体BA072和BA101以剂量依赖性方式促进SEA刺激的PBMC分泌IL-2的一系列图。图25A-D表示具有第一供体的第一实验,图25E-H表示具有第二供体的第二实验。

[0114] 图26A-26F是显示亲和力成熟BA073、BA078、BA080和BA076抗体以及种系抗体BA083在存在和不存在抗PD-1抗体的情况下促进SEA刺激的PBMC分泌IL-2的一系列图。图26A和26B表示不具有(图26A)和具有(图26B)抗PD-1抗体的一个实验。图26C和26D表示具有不同的供体、不具有(图26C)和具有(图26D)抗PD-1抗体的第二实验。图26E和26F表示具有不同的供体、不具有(图26E)和具有(图26F)抗PD-1抗体的第三实验。

[0115] 图27A-27F是显示亲和力成熟BA074、BA079、BA077、BA081、BA082和BA075抗体以及亲本BA072抗体促进SEA刺激的PBMC分泌IL-2的能力的一系列图。图27A和27B表示不具有(图27A)和具有(图27B)抗PD-1抗体的一个实验。图27C和27D表示具有不同的供体、不具有(图27C)和具有(图27D)抗PD-1抗体的第二实验。图27E和27F表示具有不同的供体、不具有(图27E)和具有(图27F)抗PD-1抗体的第三实验。

[0116] 图28A和28B是显示在存在BA072和PVR以及表达抗CD3的CHO细胞的情况下,表达CD96的Jurkat报告细胞上的NFAT-萤光素酶(图28A)和NF κ B-萤光素酶(图28B)信号传导增加的图。将BA072和同种型对照之间的 δ 相对光单位(RLU)对抗体浓度作图。图28C是显示CD96、CD226、PVR和CD3的细胞表面表达的一系列直方图。

[0117] 图29A和29B是显示在存在BA072和PVR以及表达抗CD3的CHO细胞的情况下,具有(图29A)和不具有(图29B)CD226表面表达的CD96的Jurkat报告细胞上的NFAT-萤光素酶信号传导增加的一系列图。将BA072和同种型对照之间的 δ 相对光单位(RLU)对抗体浓度作图。

[0118] 图30A-30C是显示在每种情况下,与同种型对照相比,在存在原代NK细胞的情况下,促进表达CD96的细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的一系列图,如通过BA072 IgG1(图30A)、Fc增强的BA072(BA109)(图30B)或BA072的Fc沉默变体(BA108)(图30C)进行的半胱天冬酶3/7活化的诱导所测量。将%诱导的半胱天冬酶3/7活化对时间(h)作图。

[0119] 图31A-31C是显示在存在抗CD96 BA072 Fc变体、Fc增强的BA072变体(BA109)(图31B)、BA072的Fc沉默变体(BA108)(图31C)或BA072 IgG1(图31A)的情况下,与表达CD96的靶细胞结合(4:1E:T比率)的表达Fc γ RIIIA的Jurkat报告细胞的Fc γ RIIIA介导的NFAT信号传导的一系列图。将相对光单位(RLU)对抗体浓度作图。

[0120] 图32A和32B是显示在使用来自两个人供体的PBMC的T细胞:APC共培养测定法中,BA072(图32A)和BA108(BA072的Fc沉默变体;图32B)引发的IL-2分泌程度的图。

[0121] 图33A-33D是显示在存在BA072(图33A)、BA101(图33B)、参考抗体参考A(图33C)或PVR-Fc(图33D)的情况下,使用表达CD96的Jurkat细胞的CD96内化百分比的一系列图。

[0122] 图34A-34D是显示在存在亲本抗体BA072(图34A)或BA101(图34D)或者种系变体BA083(图34B)或BA084(图34C)的情况下,使用表达CD96的Jurkat细胞的CD96内化百分比的一系列图。

[0123] 图35A和35B是显示在供体1(图35A)和供体2(图35B)中存在BA072的情况下,表达CD96的原代T细胞的CD96内化的图。

[0124] 图36A和36B是显示BA072 Fab、BA101 Fab和参考A Fab与Fc标记的全长人CD96(图36A)或人CD96的Fc标记结构域1(图36B)结合的传感图。

[0125] 图37A-37D是显示BA072 Fab、BA101 Fab和参考A Fab与Fc标记的全长人CD96(图37A和37B)或人CD96的Fc标记的结构域1(图37C和37D)的结合的一系列传感图。图37A和37C表示与BA072的初始缔合的实验。图37B和37D表示与BA101的初始缔合的实验。

具体实施方式

[0126] 本公开提供了特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)以及拮抗CD96功能例如CD96介导的免疫抑制的抗体。还提供了包含这些抗体、编码这些抗体的核酸、表达载体和用于制备这些抗体的宿主细胞的药物组合物,以及使用这些抗体来治疗受试者的方法。本文公开的抗体特别可用于增加免疫细胞活化,因此可用于治疗受试者的癌症或者治疗或预防受试者的感染性疾病。本文所述的“分离的抗体”的所有实例被另外考虑为可以是但不必是分离的抗体。本文所述的“分离的多核苷酸”的所有实例被另外考虑为可以是但不必是分离的多核苷酸。本文所述的“抗体”的所有实例被另外考虑为可以是但不必是分离的抗体。本文所述的“多核苷酸”的所有实例被另外考虑为可以是但不必是分离的多核苷酸。

[0127] 5.1定义

[0128] 如本文所用,术语“约”和“大约”,当用于修饰数值或数值范围时,表示大5%至10%(例如,大最多5%至10%)和小5%至10%(例如,小最多5%至10%)的偏差,所述值或范围保持在所引述值或范围的预期含义内。

[0129] 如本文所用,术语“CD96”是指在人类中由CD96基因编码的分化簇96,也称为TACTILE(T细胞活化,晚期表达增加)。如本文所用,术语“人CD96”是指由野生型人CD96基因(例如,GenBankTM登录号NM_005816.5)、它们的片段或变体编码的CD96蛋白。人CD96的示例性胞外部分在本文中作为SEQ ID NO:127、128、129、130和131提供。食蟹猕猴CD96的示例性胞外部分在本文中作为SEQ ID NO:132、133和134提供。

[0130] 如本文所用,术语“CD155”、“脊髓灰质炎病毒受体”和“PVR”可互换使用,是指由CD155基因编码的CD155蛋白(例如,GenBankTM登录号NM_006505.5)、它们的片段或变体。

[0131] 如本文所用,术语“抗体(antibody和antibodies)”包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段以及包含抗体CDR、VH区和/或VL区的分子。抗体的实例包括但不限于单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两条重链分子和两条轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、异源缀合物抗体、抗体-药物缀合物、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fv(scFv)、骆驼化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗-Id)抗体(包括,例如,抗-抗-Id抗体)以及上述中的任一者的抗原结合片段。在某些实施方案中,本文所述的抗体是指多克隆抗体群。抗体可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2)或任何子类(例如,IgG2a或IgG2b)的免疫球蛋白分子。在某些实施方案中,本文所述的抗体是IgG抗体或它们

的类别(例如,人IgG1或IgG4)或子类。在一个具体实施方案中,抗体是人源化单克隆抗体。在另一个具体实施方案中,抗体是人单克隆抗体。

[0132] 如本文所用,术语“VH区”和“VL区”分别指单个抗体重链和轻链可变区,包括FR(框架区)1、2、3和4以及CDR(互补决定区)1、2和3(参见Kabat等人,(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (NIH Publication No.91-3242, Bethesda), 该文献以引用的方式整体并入本文)。

[0133] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指在重链和轻链多肽的可变区内存在的非连续抗原组合位点。Kabat等人, *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) 和Kabat等人, *Sequences of protein of immunological interest.* (1991), Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), 和MacCallum等人, *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996) 已经描述了这些特定区域,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文,其中当彼此比较时,该定义包括氨基酸残基的重叠和子集。在某些实施方案中,术语“CDR”是如MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996) and Martin A. “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,” in *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001) . 定义的CDR。在某些实施方案中,术语“CDR”是Kabat等人, *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) 和Kabat等人, *Sequences of protein of immunological interest.* (1991) 定义的CDR。在某些实施方案中,抗体的重链CDR和轻链CDR使用不同的惯例来定义。在某些实施方案中,重链CDR和/或轻链CDR通过对抗体进行结构分析并且鉴定预测与靶分子(例如,人和/或食蟹猕猴CD96)的表位区接触的一个或多个可变区中的残基来定义。CDRH1、CDRH2和CDRH3表示重链CDR, CDRL1、CDRL2和CDRL3表示轻链CDR。

[0134] 如本文所用,术语“框架(FR)氨基酸残基”是指免疫球蛋白链的框架区中的那些氨基酸。如本文所用,术语“框架区”或“FR区”包括作为可变区的一部分但不是CDR的一部分的氨基酸残基(例如,使用CDR的Kabat或MacCallum定义)。

[0135] 如本文所用,术语“可变区”和“可变结构域”可互换使用,并且在本领域中是常见的。可变区通常是指抗体的一部分,通常是轻链或重链的一部分,通常在成熟重链中的氨基末端约110至120个氨基酸或110至125个氨基酸以及成熟轻链中的约90至115个氨基酸,它在抗体之间的序列差异很大,并且被用于特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性。序列的可变性集中在称为互补决定区(CDR)的区域中,而可变结构域中的高度保守的区域称为框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论的束缚,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施方案中,可变区是人可变区。在某些实施方案中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人框架区(FR)。在特定实施方案中,可变区是灵长类动物(例如,非人灵长类动物)可变区。在某些实施方案中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和灵长类动物(例如,非人灵长类动物)框架区(FR)。

[0136] 术语“VL”和“VL结构域”可互换使用,是指抗体的轻链可变区。

[0137] 术语“VH”和“VH结构域”可互换使用,是指抗体的重链可变区。

[0138] 如本文所用,术语“恒定区”和“恒定结构域”是可互换的,并且在本领域中是常见的。恒定区是抗体部分,例如轻链和/或重链的羧基末端部分,它不直接涉及抗体与抗原的结合,但是可以表现出各种效应子功能,诸如与Fc受体(例如,Fc γ 受体)的相互作用。

[0139] 如本文所用,当用于提及抗体时,术语“重链”可以指基于恒定结构域的氨基酸序列的任何独特类型,例如,α(alpha)、δ(delta)、ε(epsilon)、γ(gamma)和μ(mu),它们分别产生抗体的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别,包括IgG的子类,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0140] 如本文所用,当用于提及抗体时,术语“轻链”可以指基于恒定结构域的氨基酸序列的任何独特类型,例如κ(kappa)或λ(lambda)。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。在具体实施方案中,轻链是人轻链。

[0141] 如本文所用,术语“EU编号系统”是指抗体的恒定区的EU编号规定,如Edelman, G.M.等人,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85 (1969)和Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Dept.Health and Human Services,第5版,1991所述,这些专利中的每个均以引用的方式整体并入本文。

[0142] “结合亲和力”通常是指分子的单个结合位点(例如,抗体)及其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力可以通常以解离常数(K_D)表示。亲和力可以以本领域已知的多种方式,包括但不限于平衡解离常数(K_D)和平衡缔合常数(K_A)来测量和/或表达。 K_D 由 k_{off}/k_{on} 的商计算得出,而 K_A 由 k_{on}/k_{off} 的商计算得出。 k_{on} 是指例如抗体对抗原的缔合速率常数, k_{off} 是指例如抗体对抗原的解离速率常数。 k_{on} 和 k_{off} 可以通过本领域的普通技术人员已知的技术诸如BIAcore®或KinExA来确定。如本文所用,“较低的亲和力”是指较大的 K_D 。

[0143] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”、“免疫特异性结合”和“免疫特异性识别”在抗体的上下文中是类似的术语,并且是指结合至抗原(例如,表位或免疫复合物)的分子,因为这种结合是本领域的技术人员所理解的。例如,特异性结合至抗原的分子可以结合至其他肽或多肽,通常具有较低亲和力,如通过例如免疫测定法、BIAcore®、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments,Boise,ID)或本领域已知的其他测定法所测定。在一个具体实施方案中,特异性结合至抗原的分子结合至一种抗原的 K_A ,比所述分子非特异性结合至另一种抗原时的 K_A 大至少2个对数(例如,因子为10)、2.5个对数、3个对数、4个对数或更大。

[0144] 在另一个具体实施方案中,特异性结合至抗原的分子在相似的结合条件下不与其他蛋白质交叉反应。在另一个具体实施方案中,特异性结合至CD96的分子不与其他非CD96蛋白交叉反应。在一个具体实施方案中,本文提供了一种这样的抗体:其结合至CD96(例如,人CD96)的亲和力高于结合至另一种不相关抗原的亲和力。在某些实施方案中,本文提供了一种这样的抗体:其结合至CD96(例如,人CD96)的亲和力为结合至另一种不相关抗原的亲和力的20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%或更高,如通过例如放射免疫测定法、表面等离子共振或动力学排除测定法所测量。在一个具体实施方案中,本文所述的抗CD96抗体结合至不相关非CD96蛋白的程度比所述抗体结合至CD96蛋白的程度小10%、15%或20%,如通过例如放射免疫测定法所测量。

[0145] 如本文所用,“表位”是本领域中的术语并且是指抗体可以特异性结合的抗原区域。表位可以是例如多肽的连续氨基酸(线性或连续表位),或者表位可以例如来自一个或多个多肽的两个或更多个非连续区域(构象、非线性、不连续或不连续表位)。在某些实施方案中,抗体结合的表位可以通过例如NMR光谱、X射线衍射晶体学研究、ELISA测定法、氢/氘

交换与质谱(例如,液相色谱电喷雾质谱)联用、基于阵列的寡肽扫描测定法(例如,使用CLIPS(支架上的化学连接肽)来限定肽以绘制不连续或构象表位)和/或诱变作图(例如,定点诱变作图)来确定。对于X射线晶体学,结晶可以使用本领域已知的方法中的任一者来实现(例如,Giegé R et al.,(1994)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4):339-350;McPherson A(1990)Eur J Biochem 189:1-23;Chayen NE(1997)Structure 5:1269-1274;McPherson A(1976)J Biol Chem 251:6300-6303,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文)。抗体:抗原晶体可以使用熟知的X射线衍射技术来研究,并且可以使用计算机软件诸如X-PLOR来精修(Yale University,1992,distributed by Molecular Simulations,Inc.;参见,例如,Meth Enzymol(1985)第114和115卷,Wyckoff HW等人编,;U.S.2004/0014194),以及BUSTER(Bricogne G(1993)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1):37-60;Bricogne G(1997)Meth Enzymol 276A:361-423,ed Carter CW;Roversi P et al.,(2000)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10):1316-1323),这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。可以使用本领域的技术人员已知的任何方法来实现诱变作图研究。关于诱变技术,包括丙氨酸扫描诱变技术的描述,参见,例如,Champe M等人,(1995)J Biol Chem 270:1388-1394和Cunningham BC& Wells JA(1989)Science 244:1081-1085,这些文献中的每个以引用的方式整体并入本文。CLIPS(支架上的化学连接肽)是一种以结构限定构型提供一个或多个肽以充当复合蛋白质结构域的功能模拟物的技术。参见,例如,美国公开号US 2008/0139407 A1和US 2007/009240 A1,和美国专利号7,972,993,这些专利中的每个均以引用的方式整体并入本文。在一个具体实施方案中,使用丙氨酸扫描诱变研究来确定抗体的表位。在一个具体实施方案中,抗体的表位使用氢/氘交换与质谱联用来确定。在一个具体实施方案中,抗体的表位使用来自Pepscan Therapeutics的CLIPS表位作图技术来确定。在一个具体实施方案中,抗体的表位通过蛋白质诱变,例如,通过产生具有来自另一个物种的直系同源物的部分的抗原的转换突变体,然后测试转换突变体的抗体结合丧失(例如,通过基于FACS细胞结合测定法,如本文所述)来确定。

[0146] 如本文所用,术语“T细胞受体”和“TCR”可互换使用,并且是指全长异源二聚体 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ TCR、全长TCR的抗原结合片段和包含TCR CDR或可变区的分子。TCR的实例包括但不限于全长TCR、全长TCR的抗原结合片段、缺乏跨膜和胞质区的可溶性TCR、含有通过柔性接头连接的TCR的可变区的单链TCR、通过经工程化的二硫键连接的TCR链、单特异性TCR、多特异性TCR(包括双特异性TCR)、TCR融合体、人TCR、人源化TCR、嵌合TCR、重组产生的TCR和合成TCR。该术语涵盖野生型TCR和基因工程TCR(例如,包含嵌合TCR链的嵌合TCR,所述嵌合TCR链包含来自第一物种的TCR的第一部分和来自第二物种的TCR的第二部分)。

[0147] 如本文所用,术语“主要组织相容性复合体”和“MHC”可互换使用,是指MHC I类分子和/或MHC II类分子。

[0148] 如本文所用,术语“肽-MHC复合物”是指具有在本领域公认的MHC的肽结合袋中所结合的肽的MHC分子(MHC I类或MHC II类)。

[0149] 如本文所用,术语“治疗(treat、treating和treatment)”是指本文所述的治疗性或预防性措施。“治疗”方法采用将抗体施用于患有疾病或障碍或者易患此类疾病或障碍的受试者,以预防、治愈、延迟、降低所述疾病或障碍或者复发性疾病或障碍的严重性,或者改

善所述疾病或障碍或者复发性疾病或障碍的一种或多种症状,或者将受试者的存活时间延长至超过在不存在此类治疗的情况下的预期存活时间。

[0150] 如本文所用,在将疗法施用于受试者的上下文中,术语“有效量”是指实现所期望的预防或治疗效果的疗法的量。

[0151] 如本文所用,术语“内化(internalization或internalized)”是指在抗体与细胞表面表达的抗原结合后,抗体被摄取到细胞的胞内区室中。

[0152] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。在一个实施方案中,受试者是人或非人哺乳动物。在一个实施方案中,受试者是人。

[0153] 两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的“同一性百分比”的确定可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的具体非限制性实例是Karlin S&Altschul SF (1990) PNAS 87:2264-2268的算法,该算法在Karlin S&Altschul SF (1993) PNAS 90:5873-5877中进行了修改,这些文献中的每个以引用的方式整体并入本文。这种算法被纳入Altschul SF等人, (1990) J Mol Biol 215:403的NBLAST和XBLAST程序中,该文献以引用的方式整体并入本文。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如,分数=100,字长=12,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序参数集进行,例如,分数=50,字长=3,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以使用空位BLAST,如Altschul SF等人, (1997) Nuc Acids Res 25:3389-3402所述,该文献以引用的方式整体并入本文。或者,PSI BLAST可用于执行迭代搜索,以检测分子之间的远距离关系(Id.)。当使用BLAST、空位BLAST和PSI Blast程序时,可以使用各个程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见,例如,万维网上的美国国家生物技术信息中心(NCBI),ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一个具体非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11-17的算法,该文献以引用的方式整体并入本文。这种算法被纳入ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。

[0154] 两个序列之间的同一性百分比可以使用与上述技术类似的技术,在允许或不允许缺口的情况下确定。在计算同一性百分比时,通常只计算完全匹配。

[0155] 5.2抗CD96抗体

[0156] 在一个方面,本公开提供了特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)以及拮抗CD96功能的抗体。示例性抗体的氨基酸序列列于本文的表1中。

[0157] 表1. 示例性抗CD96抗体的氨基酸序列。

[0158]

描述	氨基酸序列	SEQ ID NO:
CDRH1 共有序列 1	X ₁ YX ₂ X ₃ X ₄ , 其中 X ₁ 是 Q 或 S; X ₂ 是 A 或 S; X ₃ 是 M 或 I; 并且 X ₄ 是 S 或 H。	135
CDRH1 共有序列 2	X ₁ YX ₂ MH, 其中 X ₁ 是 Q 或 S; 并且 X ₂ 是 A 或 S。	136
CDRH2 共有序列 1	X ₁ IX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ YX ₁₀ QKFQG, 其中 X ₁ 是 W 或 G; X ₂ 是 N 或 I; X ₃ 是 A、E、V 或 P; X ₄ 是 V、G、W 或 I; X ₅ 是 S、Y、T、N 或 F; X ₆ 是 G 或 W; X ₇ 是 D、Y、N 或 T; X ₈ 是 T 或 A; X ₉ 是 K 或 N; 并且 X ₁₀ 是 S 或 A。	137
CDRH2 共有序列 2	WINX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ TKYSQKFQG, 其中 X ₁ 是 A、V 或 E; X ₂ 是 V、W 或 G; X ₃ 是 S、Y、T 或 N; X ₄ 是 G 或 W; 并且 X ₅ 是 D、N、Y 或 T。	138
CDRH3 共有序列	NWGX ₁ SYGX ₂ DV, 其中 X ₁ 是 M 或 L; 并且 X ₂ 是 M 或 L。	180
CDRL1 共有序列	RASQSIX ₁ X ₂ YLN, 其中 X ₁ 是 S、T 或 L; 并且 X ₂ 是 S、P 或 W。	139
CDRL2 共有序列	X ₁ X ₂ SSLQS, 其中 X ₁ 是 S 或 A; 并且 X ₂ 是 A、S 或 E。	141
CDRL3 共有序列	QQX ₁ YSTPALX ₂ , 其中 X ₁ 是 S 或 A; 并且 X ₂ 是 T 或 S。	143

[0159]

CDRH1 - BA072, BA083, BA081, BA080, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA089, BA090, BA091, BA093, BA094, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	SYAMH	1
CDRH1 - BA074, BA073, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082	QYAMH	2
CDRH1 - BA092	SYSMH	3
CDRH1 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	SYAIS	4
CDRH2 - BA072, BA083, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	WINAGNGNTKYSQKFQG	5
CDRH2 - BA074, BA073	WINAVSGDTKYSQKFQG	6
CDRH2 - BA081, BA080	WINAGTGDTKYSQKFQG	7
CDRH2 - BA075	WINEGYGNTKYSQKFQG	8
CDRH2 - BA077, BA076	WINAGYGYTKYSQKFQG	9
CDRH2 - BA079, BA078	WINAGTGNTKYSQKFQG	10
CDRH2 - BA082	WINAGYGNTKYSQKFQG	11
CDRH2 - BA089	WINAWNGNTKYSQKFQG	12
CDRH2 - BA090	WINVGTGTTKYSQKFQG	13
CDRH2 - BA091	WINAVNGNTKYSQKFQG	14
CDRH2 - BA092	WINAGNWNTKYSQKFQG	15
CDRH2 - BA093	WINAWTGNTKYSQKFQG	16
CDRH2 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	GIPIFGTANYAQKFQG	17
CDRH3 - BA072, BA083, BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA094	NWGMSYGMDV	18

[0160]

CDRH3 - BA095, BA098	NWGMSYGLDV	140
CDRH3 - BA096, BA099	NWGLSYGMDV	142
CDRH3 - BA097, BA100	NWGLSYGLDV	179
CDRH3 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	GYDSRPLDV	19
CDRH3 - BA107	GYDSRPLDY	20
CDRL1 - BA072, BA083, BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082, BA084, BA088, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	RASQSISSYLN	21
CDRL1 - BA085	RASQSISSPYLN	22
CDRL1 - BA087	RASQSILSYLN	23
CDRL1 - BA086	RASQSISSWYLN	24
CDRL1 - BA094	RASQSITSYLN	25
CDRL1 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	GGNNIGSKIVH	26
CDRL2 - BA072, BA083, BA084, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA094, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	AASSLQS	28
CDRL2 - BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA079, BA078, BA085, BA086, BA087, BA088	SASSLQS	29
CDRL2 - BA077, BA076	SESSLQS	30
CDRL2 - BA082	SSSSLQS	31
CDRL2 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	DDRDRPS	32

[0161]

CDRL3 - BA072, BA083, BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	QQSYSTPALT	33
CDRL3 - BA094	QQAYSTPALS	34
CDRL3 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	QVWDINVHHVI	35
VH - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	36
VH - BA083, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGT TTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	37
VH - BA074	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	38
VH - BA073	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGT TTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	39
VH - BA081	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGD T KYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	40
VH - BA080	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGD T KYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGT TTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	41

[0162]

VH - BA075	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINEGYGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYVCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	42
VH - BA077	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYVCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	43
VH - BA076	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	44
VH - BA079	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYVCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	45
VH - BA078	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	46
VH - BA082	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYVCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	47
VH - BA084	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	48
VH - BA089	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAWNGNTKYSQKFQ QGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR NWGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	49
VH - BA090	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINVTGTTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	50

[0163]

VH - BA091	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARN WGMSYGM DVWGQGTTTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰 胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	51
VH - BA092	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFASYS MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNWNTKYSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR NWGMSYGM DVWGQGTTTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰 胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	52
VH - BA093	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAWTGNTKYSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR NWGMSYGM DVWGQGTTTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰 胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	53
VH - BA095	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGLDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰 胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	54
VH - BA096	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGLSYGM DVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰 胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	55
VH - BA097	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGLSYGLDVWGQGTMTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	56
VH - BA098	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARN WGMSYGLDVWGQGTTTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	57
VH - BA099	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARN WGLSYGM DVWGQGTTTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	58
VH - BA100	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARN WGLSYGLDVWGQGTTTVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	59

[0164]

VH - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYDSRP LDVWGQGTLVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或 焦谷氨酸 (pE)	60
VH - BA107	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYDSRP LDYWGQGTLVTVSS, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或 焦谷氨酸 (pE)	61
VL - BA072, BA083, BA084, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGKVDI K	62
VL - BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA079, BA078, BA088	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYASASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGKVDIK	63
VL - BA077, BA076	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYSESSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGKVDIK	64
VL - BA082	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYSSSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGKVDIK	65
VL - BA085	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYASASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGKVDIK	66
VL - BA086	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY YQQKPGKAPKLLIYASASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGKVDI K	67
VL - BA087	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY YQQKPGKAPKLLIYASASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGKVDI K	68
VL - BA094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQAYSTPALTFGGGKVDI K	69
VL - BA101, BA107	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLLVSDDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGK VTVL	70
VL - BA102	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKPGQAPVLLVSDDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGK LTVL	71

[0165]

VL - BA103	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLVIYDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVL	72
VL - BA104	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKPGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVL	73
VL - BA105	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVL	74
VL - BA106	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRAQAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVL	75
全长重链（含有 C-末端 赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	76
全长重链（不含有 C-末 端赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	144

[0166]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA083, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	77
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA083, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	145
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA074	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGM DVWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	78

[0167]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA074	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	146
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA073	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	79
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA073	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	147

[0168]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA081	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	80
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA081	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	148
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA080	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	81

[0169]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA080	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	149
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA075	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINEGYGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	82
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA075	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINEGYGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	150

[0170]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA077	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	83
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA077	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	151
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA076	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	84

[0171]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA076	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	152
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA079	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	85
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA079	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	153

[0172]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA078	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	86
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA078	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	154
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA082	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	87

[0173]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA082	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDQYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN TKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	155
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA084	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGN TKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	88
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA084	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGN TKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	156

[0174]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA089	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAWNGNTKYSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR NWGMSYGMĐVWGQGTТTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPТTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVТTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	89
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA089	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAWNGNTKYSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR NWGMSYGMĐVWGQGTТTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPТTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVТTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	157
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA090	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINVGTGTTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARN WGMSYGMĐVWGQGTТTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPТTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVТTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	90

[0175]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA090	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINVTGTTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	158
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA091	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	91
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA091	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAVNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	159

[0176]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA092	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFASYS MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNWN TKYSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR NWGMSYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	92
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA092	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFASYS MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNWN TKYSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR NWGMSYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	160
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA093	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAWTGNTKYSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR NWGMSYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	93

[0177]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA093	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAWTGN TKYSQKF QGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR NWGMSYGM DVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	161
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA095	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGN TKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGLD VWGQGT MVT VSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	94
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA095	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGN TKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGLD VWGQGT MVT VSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	162

[0178]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA096	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGLSYGMDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	95
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA096	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGLSYGMDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	163
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA097	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGLSYGLDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	96

[0179]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA097	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGLSYGLDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	164
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA098	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGLDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	97
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA098	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGMSYGLDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	165

[0180]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA099	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGLSYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	98
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA099	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGLSYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	166
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA100	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGLSYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	99

[0181]

全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA100	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WGLSYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	167
全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYDSRP LDVWGQGTLLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	100
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYDSRP LDVWGQGTLLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	168

[0182]

全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA107	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYDSRP LDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK，其中 X 是谷氨酰胺（Q）或焦谷氨酸（pE）	101
全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA107	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYDSRP LDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G，其中 X 是谷氨酰胺（Q）或焦谷氨酸（pE）	169
全长轻链 -BA072, BA083, BA084, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGTKVDI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	102
全长轻链 -BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA079, BA078, BA088	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGTKVDIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	103
全长轻链 -BA077, BA076	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYSESSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGTKVDIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	104

[0183]

全长轻链-BA082	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYSSSSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGTKVDIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	105
全长轻链-BA085	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSPYLNWY QQKPGKAPKLLIYSASSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGTKVDIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	106
全长轻链-BA086	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIWYLNW YQQKPGKAPKLLIYSASSLSQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	107
全长轻链-BA087	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSILSYLNW YQQKPGKAPKLLIYSASSLSQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALTFGGGTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	108
全长轻链-BA094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSITSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLSQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQAYSTPALSFGGGTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	109
全长轻链-BA101、 BA107	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK VTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	110
全长轻链-BA102	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKPGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS	111

[0184]

全长轻链-BA103	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLVIYDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS	112
全长轻链-BA104	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKPGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS	113
全长轻链-BA105	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS	114
全长轻链-BA106	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVHWY QQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRQAGDEADYYCQVWDINVHHVIFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS	115
IgG1 N297A 变体全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK,其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	116

[0185]

IgG1 N297A 变体全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYCYARN WGMSYGMVDVWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	170
IgG1 N297A 变体全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYDSRP LDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	117
IgG1 N297A 变体全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYDSRP LDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	171

[0186]

IgG1 S239D/A330L/I332E 变 体全长重链（含有 C-末 端赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPDPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	118
IgG1 S239D/A330L/I332E 变 体全长重链（不含有 C- 末端赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPDPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	172
IgG1 S239D/A330L/I332E 变 体全长重链（含有 C-末 端赖氨酸）-BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYDSRP LDVWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	119

[0187]

IgG1 S239D/A330L/I332E 变体全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYDSRP LDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	173
IgG1 S267E L328F 变体全长重链（含有 C-末端赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	120
IgG1 S267E L328F 变体全长重链（不含有 C-末端赖氨酸）-BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ GRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCARN WGMSYGM DVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG, 其中 X 是谷氨酰胺 (Q) 或焦谷氨酸 (pE)	174

[0188]

重链恒定区（含有 C-末端赖氨酸）-BA072、BA101	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	121
重链恒定区（不含有 C-末端赖氨酸）-BA072、BA101	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	175
轻链恒定区-BA072	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	122
轻链恒定区-BA101	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS	123
IgG1 N297A 变体恒定区（含有 C-末端赖氨酸）-BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	124
IgG1 N297A 变体恒定区（不含有 C-末端赖氨酸）-BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	176

[0189]

IgG1 S239D/A330L/I332E 变体恒定区（含有 C-末端赖氨酸）-BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	125
IgG1 S239D/A330L/I332E 变体恒定区（不含有 C-末端赖氨酸）-BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	177
IgG1 S267E L328F 变体恒定区（含有 C-末端赖氨酸）-BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKAFFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	126
IgG1 S267E L328F 变体恒定区（不含有 C-末端赖氨酸）-BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKAFFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	178

[0190] 表2.CD96的示例性序列。

[0191]

描述	氨基酸序列	SEQ ID NO:
----	-------	------------

[0192]

示例性人 CD96 胞外结构域同种型 1 序列 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFV QMOWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESL VTFTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVL YPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEWNSNHTIEIEINQT LEIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVENSSTDSDWVLLSK GIKEDNGTQETLISQNHLSNSTLLKDRVKLGTDY RLHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGP NKILRSSTTVKV FAKPEIPVIVENNSTDVL VERRFTCLLKNVFPKANI TWFIDGSFLHDEKEGIYITNEERK GKDG FLELKS LTRVHSNKPAQSDNLTWCMALSPVPGNKVWNIS SEKITFLLGSEISSTDPLSVTESTLDTQPSPASSVSP ARYPATSSSVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTTRGF NYPWTSSGTDTKKSVSRIPSETYSSSPSGAGSTLH DNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVN KPKDGM	127
示例性人 CD96 胞外结构域同种型 2 序列 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFV QMOWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESL VTFTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVL YPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEWNSNHTIEIEINQT LEIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQ HLISNSTLLKDRVKLGTDYRLHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGP NKILRSSTTVKVFAKPEIPVIVENNSTD VLVERRFTCLLKNVFPKANITW FIDGSFLHDEKEG IYITNEERK GKDG FLELKS VLTRVHSNKPAQSDNLT TIWCMALSPVPGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTD PLSVTESTLDTQPSPASSVSPARYPATSSSVTLVDVS ALRPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSV SRIPSETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPT TANGSTKTNHVHITGIVVNKPKDGM	128
示例性人 CD96 胞外结构域同种型 2 C89S ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFV QMOWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESL VTFTETPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLVL YPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEWNSNHTIEIEINQT LEIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQ HLISNSTLLKDRVKLGTDYRLHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGP NKILRSSTTVKVFAKPEIPVIVENNSTD VLVERRFTCLLKNVFPKANITW FIDGSFLHDEKEG IYITNEERK GKDG FLELKS VLTRVHSNKPAQSDNLT TIWCMALSPVPGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTD PLSVTESTLDTQPSPASSVSPARYPATSSSVTLVDVS ALRPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSV SRIPSETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPT TANGSTKTNHVHITGIVVNKPKDGM	129
示例性人 CD96 结构域 1 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFV QMOWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESL VTFTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVL YPEGIQTKIYNLLIQTHV	130

[0193]

示例性人 CD96 结构域 1 C89S ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFV MQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCAYGSPCESL VTFTETPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLVL YPEGIQTKIYNLLIQTHV	131
示例性食蟹猕猴 CD96 胞外结构域 ²	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCQTQAKGFLVQ MQWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYGSPCESL VTFTQTPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLTL YPEGMQTKIYNLLIQTHVTPDEWKSNTHTIEINQT LEIPCFQNSSEISSEFTYAWLVVKNSSTDWSVLLS KGKRYDNGTQQTLISQDHLISSSTLLKDRVKVGID YRLHLSPVQIFDDGRKFSCHIRVGPDKILRSSTTIK VFAKPEIPMIVENNSTDVLVERTFTCLLKNVFPKA NIIWFIDGSFLHDEKEGIYITNEERKGKDGFLKLS VLTRVHSDKPAQSDNLTWCMALSPVPGNKVWNI SSEKITFLLGSEMSTDLPPSVTESTLDTQPSPASSV SPTRYPATSSVTLADVSALRPNTTPQSSSSSVTTQD FNYPWTSSGTDAKKSFSQIPSETYSSSPSGAGSTLH DNVFTSTTRALSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVS KPKDGM	132
示例性食蟹猕猴 CD96 胞外结构域序列同种型 2 ²	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCQTQAKGFLVQ MQWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYGSPCESL VTFTQTPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLTL YPEGMQTKIYNLLIQTHVTPDEWKSNTHTIEINQT LEIPCFQNSSEISSEFTYAWLVEDNGTQQTLISQD HLISSSTLLKDRVKVGIDYRLHLSPVQIFDDGRKFS CHIRVGPDKILRSSTTIKVFAKPEIPMIVENNSTDVL VERTFTCLLKNVFPKANIIWFIDGSFLHDEKEGIYI TNEERKGKDGFLKLSVLTRVHSDKPAQSDNLT WCMALSPVPGNKVWNISSEKITFLLGSEMSTDL PSVTESTLDTQPSPASSVSPTRYPATSSVTLADVSA LRPNTTPQSSSSSVTTQDFNYPWTSSGTDAKKSFS QIPSETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTTRALSEVPTT ANGSTKTNHVHITGIVVSKPKDGM	133
示例性食蟹猕猴 CD96 结构域 1 ²	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCQTQAKGFLVQ MQWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYGSPCESL VTFTQTPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLTL YPEGMQTKIYNLLIQTHV	134

[0194] ¹根据hCD96结构域的UniProt描述分配的结构域。

[0195] ²对于cyCD96序列,hCD96序列和cyCD96序列之间的同源性被用于定义结构域1、结构域2或结构域3。

[0196] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含VH,所述VH包含本文的表1中列出的VH的CDR中的一个、两个或全部三个。在某些实施方案中,所述抗体包含表1中列出的VH的CDRH1。在某些实施方案中,所述抗体包含表1中列出的VH的CDRH2。在某些实施方案中,所述抗体包含表1中列出的VH的CDRH3。

[0197] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含VL,所述VL包含本文的表1中公开的VL的CDR中的一个、两个或全部三个。在某些实施方案中,所述抗体包含表1中列出的VL的CDRL1。在某些实施方案中,所述抗体包含表1中列出的VL的CDRL2。在某些实施方案中,所述抗体包含表1中列出的VL的CDRL3。

[0198] 在某些实施方案中,抗体的CDR可以根据Kabat等人,J.Biol.Chem.252,6609-6616 (1977)和Kabat等人,Sequences of protein of immunological interest (1991)来确定,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。在某些实施方案中,抗体的轻链CDR根据Kabat来确定,抗体的重链CDR根据MacCallum (同上) 来确定。在某些实施方案中,重链CDR和/或轻链CDR通过对抗体进行结构分析并且鉴定预测与靶分子(例如,人和/或食蟹猕猴CD96)的表位区接触的一个或多个可变区中的残基来定义。

[0199] 在某些实施方案中,抗体的CDR可以根据Chothia编号方案来确定,该方案是指免疫球蛋白结构环的位置(参见,例如,Chothia C&Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196:901-917;Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273:927-948;Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227:799-817;Tramontano A et al., (1990) J Mol Biol 215(1):175-82;和美国专利号7,709,226,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文)。通常,当使用Kabat编号规定时,Chothia CDRH1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDRH2环存在于重链氨基酸52至56处,Chothia CDRH3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDRL1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDRL2环存在于轻链氨基酸50至56处,Chothia CDRL3环存在于轻链氨基酸链氨基酸89至97处。当使用Kabat编号规定来编号时,Chothia CDRH1环的末端在H32和H34之间变化,具体取决于环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果只有35A存在,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。

[0200] 在某些实施方案中,抗体的CDR可以根据MacCallum RM等人, (1996) J Mol Biol 262:732-745来确定,该文献以引用的方式整体并入本文。另外参见,例如Martin A. “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”,载于Antibody Engineering,Kontermann和Dübel编,第31章,第422-439页,Springer-Verlag, Berlin (2001),该文献以引用的方式整体并入本文。

[0201] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含本文的表1中公开的VH的Chothia VH CDR。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含本文的表1中公开的VL的Chothia VL CDR。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含本文的表1中公开的抗体的Chothia VH CDR和Chothia VL CDR。在某些实施方案中,特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体包含一个或多个CDR,其中Chothia和Kabat CDR具有相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且包含Kabat CDR和Chothia CDR的组合。

[0202] 在某些实施方案中,抗体的CDR可以根据以下文献描述的IMGT编号系统来确定:Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7:132-136;Lefranc M-P等人, (1999) Nucleic Acids Res 27:209-212,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文;和Lefranc M-P等人, (2009) Nucleic Acids Res 37:D1006-D1012。

[0203] 在某些实施方案中,本公开提供了这样的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且包含本文的表1中公开的抗体的CDR,如通过IMGT编号系统

所确定,例如,如Lefranc M-P(1999)同上和Lefranc M-P等人,(1999)同上所述。

[0204] 在某些实施方案中,抗体的CDR可以根据AbM编号方案来确定,该编号方案是指AbM高变区,表示Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(Oxford Molecular Group, Inc.)使用,以引用的方式整体并入本文。在一个特定实施方案中,本公开提供了这样的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)并且包含如通过AbM编号方案所确定的本文的表1中公开的抗体的CDR。

[0205] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的分离的抗体,其中所述抗体包含VH和VL,所述VH包含SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61中列出的VH的CDRH1、CDRH2和CDRH3区氨基酸序列,所述VL包含SEQ ID NO:62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,或75中列出的VL的CDRL1、CDRL2和CDRL3区氨基酸序列,其中每个CDR根据CDR的MacCallum定义、Kabat定义、Chothia定义、IMGT编号系统、AbM定义、结构分析或它们的组合来定义,其中结构分析鉴定预测与CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的表位区接触的一个或多个可变区中的残基。在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)并且包含由Kabat定义来定义的CDR和由抗体的结构分析来定义的CDR的组合,其中结构分析鉴定预测与CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的表位区接触的一个或多个可变区中的残基。

[0206] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含:

[0207] (a) CDRH1包含 $X_1YX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO:135)的氨基酸序列,其中

[0208] X_1 是Q或S;

[0209] X_2 是A或S;

[0210] X_3 是M或I;并且

[0211] X_4 是H或S;

[0212] (b) CDRH2包含 $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{10}QKFQG$ (SEQ ID NO:137)的氨基酸序列,其中

[0213] X_1 是W或G;

[0214] X_2 是N或I;

[0215] X_3 是A、E、V或P;

[0216] X_4 是V、G、W或I;

[0217] X_5 是S、Y、T、N或F;

[0218] X_6 是G或W;

[0219] X_7 是D、Y、N或T;

[0220] X_8 是T或A;

[0221] X_9 是K或N;并且

[0222] X_{10} 是S或A;

[0223] (c) CDRH3包含 $NWGX_1SYGX_2DV$ (SEQ ID NO:180)、 $GYDSRPLDV$ (SEQ ID NO:19)或 $GYDSRPLDY$ (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列,其中

[0224] X_1 是M或L;并且

[0225] X_2 是M或L;

[0226] (d) CDRL1包含RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO:139) 或GGNNIGSKIVH (SEQ ID NO:26) 的氨基酸序列,其中

[0227] X₁是S、T或L;并且

[0228] X₂是S、P或W;

[0229] (e) CDRL2包含X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO:141) 或DDRDRPS (SEQ ID NO:32) 的氨基酸序列,其中

[0230] X₁是S或A;并且

[0231] X₂是A、S或E;并且/或者

[0232] (f) CDRL3包含QQX₁YSTPALX₂ (SEQ ID NO:143) 或QVWDINVHHVI (SEQ ID NO:35) 的氨基酸序列,其中

[0233] X₁是S或A;并且

[0234] X₂是T或S。

[0235] 在本文公开的抗体的某些实施方案中,紧邻CDRH1的N-末端的氨基酸(例如,如本文的表1中所述)是N、T、S、D或A。

[0236] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含:

[0237] (a) CDRH1包含X₁YX₂X₃X₄ (SEQ ID NO:135) 的氨基酸序列,其中

[0238] X₁是Q或S;

[0239] X₂是A或S;

[0240] X₃是M或I;并且

[0241] X₄是H或S;

[0242] (b) CDRH2包含X₁IX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉YX₁₀QKFQG (SEQ ID NO:137) 的氨基酸序列,其中

[0243] X₁是W或G;

[0244] X₂是N或I;

[0245] X₃是A、E、V或P;

[0246] X₄是V、G、W或I;

[0247] X₅是S、Y、T、N或F;

[0248] X₆是G或W;

[0249] X₇是D、Y、N或T;

[0250] X₈是T或A;

[0251] X₉是K或N;并且

[0252] X₁₀是S或A;

[0253] (c) CDRH3包含NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO:180)、GYDSRPLDV (SEQ ID NO:19) 或GYDSRPLDY (SEQ ID NO:20) 的氨基酸序列,其中

[0254] X₁是M或L;并且

[0255] X₂是M或L;

[0256] (d) CDRL1包含RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO:139) 或GGNNIGSKIVH (SEQ ID NO:26) 的氨基酸序列,其中

[0257] X₁是S、T或L;并且

[0258] X_2 是S、P或W;

[0259] (e) CDRL2包含 X_1X_2 SSLQS (SEQ ID NO:141) 或DDRDRPS (SEQ ID NO:32) 的氨基酸序列,其中

[0260] X_1 是S或A;并且

[0261] X_2 是A、S或E;以及

[0262] (f) CDRL3包含QQX₁YSTPALX₂ (SEQ ID NO:143) 或QVWDINVHHVI (SEQ ID NO:35) 的氨基酸序列,其中

[0263] X_1 是S或A;并且

[0264] X_2 是T或S。

[0265] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96 (例如,人CD96或食蟹猴CD96) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VH,所述VH分别包含SEQ ID NO:1、5和18;2、6和18;2、8和18;2、9和18;2、10和18;1、7和18;2、11和18;1、12和18;1、13和18;1、14和18;3、15和18;1、16和18;1、5和140;1、5和142;1、5和179;4、17和19;或者4、17和20所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0266] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96 (例如,人CD96或食蟹猴CD96) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VL,所述VL分别包含SEQ ID NO:21、28和33;21、29和33;21、30和33;21、31和33;22、29和33;24、29和33;23、29和33;25、28和34;或者26、32和35所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0267] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96 (例如,人CD96或食蟹猴CD96) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VH和VL,所述VH包含CDRH1、CDRH2和CDRH3区,所述VL包含CDRL1、CDRL2和CDRL3区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:1、5、18、21、28和33;1、5、18、21、29和33;1、5、18、22、29和33;1、5、18、23、29和33;1、5、18、24、29和33;1、5、18、25、28和34;1、5、140、21、28和33;1、5、142、21、28和33;1、5、179、21、28和33;1、7、18、21、29和33;1、12、18、21、28和33;1、13、18、21、28和33;1、14、18、21、28和33;1、16、18、21、28和33;2、6、18、21、29和33;2、8、18、21、29和33;2、9、18、21、30和33;2、10、18、21、29和33;2、11、18、21、31和33;3、15、18、21、28和33;4、17、19、26、32和35;或者4、17、20、26、32和35所示的氨基酸序列。

[0268] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96 (例如,人CD96或食蟹猴CD96) 的分离的抗体,所述抗体包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61所示的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100% (例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96 (例如,人CD96或食蟹猴CD96) 的分离的抗体,所述抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,VH的氨基酸序列由SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36-61中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36-61中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0269] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96 (例如,人CD96或食蟹猴

猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75所示的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含VL,所述VL包含SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,VL的氨基酸序列由SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75所示的氨基酸序列组成。

[0270] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含VH和VL,所述VH包含与SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60或61所示的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一性的氨基酸序列,所述VL包含与SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75所示的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含VH和VL,所述VH包含SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61的氨基酸序列,所述VL包含SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75的氨基酸序列。在某些实施方案中,VH的氨基酸序列由SEQ ID NO:36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,或61所示的氨基酸序列组成;VL的氨基酸序列由SEQ ID NO:62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36-61中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36-61中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0271] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体分别包含SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70所示的VH和VL氨基酸序列。在某些实施方案中,VH和VL的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70所示的VH和VL氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36-61中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:36-61中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0272] 在某些实施方案中,本公开提供了一种交叉竞争与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)结合的分离的抗体,所述抗体分别包含SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;

57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70所示的VH和VL氨基酸序列。

[0273] 在某些实施方案中,本公开提供了一种结合至与本文所述的抗体相同或重叠的CD96的表位(例如,人CD96的表位或食蟹猕猴CD96的表位)的分离的抗体,例如,所述抗体分别包含SEQ ID NO:36和62;37和62;37和63;37和66;37和67;37和68;37和69;38和63;39和63;40和63;41和63;42和63;43和64;44和64;45和63;46和63;47和65;48和62;49和62;50和62;51和62;52和62;53和62;54和62;55和62;56和62;57和62;58和62;59和62;60和70;60和71;60和72;60和73;60和74;60和75;或者61和70所示的VH和VL氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体的表位可以通过例如NMR光谱、表面等离子共振(BIAcore[®])、X射线衍射晶体学研究、ELISA测定法、氢/氘交换与质谱联用(例如液相色谱法电喷雾质谱)、基于阵列的寡肽扫描测定法和/或诱变作图(例如,定点诱变作图)来确定。对于X射线晶体学,结晶可以使用本领域已知的方法中的任一者来实现(例如,Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4):339-350;McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189:1-23;Chayen NE (1997) *Structure* 5:1269-1274;McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251:6300-6303,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文)。抗体:抗原晶体可以使用熟知的X射线衍射技术来研究,并且可以使用计算机软件诸如X-PLOR来精修(Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.;参见,例如, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114&115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. Patent Application No. 2004/0014194), and BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1):37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A:361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10):1316-1323,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文)。可以使用本领域的技术人员已知的任何方法来实现诱变作图研究。关于诱变技术,包括丙氨酸扫描诱变技术的描述,参见,例如, Champe M等人, (1995) 同上和 Cunningham BC&Wells JA (1989) 同上。在一个具体实施方案中,使用丙氨酸扫描诱变研究来确定抗体的表位。此外,识别和结合至相同或重叠的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的表位的抗体可以使用常规技术诸如免疫测定法,例如,通过展示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力,即竞争性结合测定法来鉴定。竞争性结合测定法也可以用于确定两种抗体是否对表位具有相似的结合特异性。竞争性结合可以在测定法中确定,其中测试的免疫球蛋白抑制参考抗体与共同抗原诸如CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的特异性结合。许多类型的竞争性结合测定法是已知的,例如:固相直接或间接放射免疫测定法(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定法(EIA)、夹心竞争测定法(参见Stahli C等人, (1983) *Methods Enzymol* 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland TN等人, (1986) *J Immunol* 137:3614-9);固相直接标记测定法、固相直接标记夹心测定法(参见Harlow E&Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel GA等人, (1988) *Mol Immunol* 25 (1):7-15);固相直接生物素-亲和素EIA(参见Cheung RC等人, (1990) *Virology* 176:546-52);和直接标记的RIA(参见Moldenhauer G等人, (1990) *Scand J Immunol* 32:77-82),所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。通常,这种测定法涉及使用结合至固体表面或携带这些未标记的测试免疫球蛋白和标记的参考免疫球蛋白中的任一者的细胞的纯化抗

原(例如,CD96,诸如人CD96或食蟹猕猴CD96)。竞争性抑制可以通过在存在测试免疫球蛋白的情况下测定结合至固体表面或细胞的标记的量来测量。通常,测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争性抗体过量存在时,它将抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。可以使用标记的抗原或标记的抗体以大量不同的形式来构造竞争性结合测定法。在该测定法的常见形式中,抗原被固定在96孔板上。然后使用放射性或酶标记来测量未标记的抗体阻断标记的抗体与抗原结合的能力。关于更多详细信息,参见,例如,Wagener C et al., (1983) J Immunol 130:2308-2315; Wagener C et al., (1984) J Immunol Methods 68:269-274; Kuroki M et al., (1990) Cancer Res 50:4872-4879; Kuroki M et al., (1992) Immunol Invest 21:523-538; Kuroki M et al., (1992) Hybridoma 11:391-407 and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E&Lane D编,同上,第386-389页,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0274] 在某些实施方案中,抗体抑制人CD96与人CD155(也称为脊髓灰质炎病毒受体(PVR))的结合。在某些实施方案中,相对于在不存在抗体的情况下人CD96与人CD155的结合,在存在抗体的情况下人CD96与人CD155的结合减少超过50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,或99%。

[0275] 在某些实施方案中,抗体抑制人CD96的可溶性片段与人CD155的可溶性片段的结合。在某些实施方案中,相对于在不存在抗体的情况下人CD96的可溶性片段与人CD155的可溶性片段的结合,在存在抗体的情况下人CD96的可溶性片段与人CD155的可溶性片段的结合减少超过50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0276] 在某些实施方案中,抗体抑制表达CD96的细胞与人CD155的可溶性片段的结合。在某些实施方案中,相对于在不存在抗体的情况下表达CD96的细胞与人CD155的可溶性片段的结合,在存在抗体的情况下表达CD96的细胞与人CD155的可溶性片段的结合减少超过50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,或99%。

[0277] 在某些实施方案中,抗体抑制表达CD96的细胞与表达人CD155的细胞的结合。在某些实施方案中,相对于在不存在抗体的情况下表达CD96的细胞与表达CD155的细胞的结合,在存在抗体的情况下表达CD96的细胞与表达CD155的细胞的结合减少超过50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,或99%。

[0278] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168或169所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含

[illegible]

SEQ ID NO:163所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:164所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:165所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:166所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:167所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:168所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:169所示的氨基酸序列。

[illegible]

示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:154所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:155所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:156所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:157所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:158所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:159所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:160所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:161所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:162所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:163所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:164所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:165所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:166所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:167所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:168所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:169所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76-101或144-169中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76-101或144-169中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0280] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,或115所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链的氨基酸序列由选自以下各项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114和115。

[0281] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,其中重链和轻链分别包含SEQ ID NO:76和102;79和103;78和103;82和103;84和104;83和104;86和103;85和103;81和103;80和103;87和105;77和102;88和102;77和106;77和107;77和108;77和103;89和102;90和102;91和102;92和102;93和102;77和109;94和102;95和102;96和102;97和102;98和102;99和102;100和110;100和111;100和112;100和113;100和114;100和115;101和110;144和102;147和103;146和103;150和103;152和104;151和104;154和103;153和103;149和103;148和103;155和105;145和102;156和102;145和106;145和107;145和108;145和103;157和102;158和102;159和102;160和102;161和102;145和109;162和102;163和102;164和102;165和102;166和102;167和102;168和110;168和111;168和112;168和113;168和114;168和115;或者169和110的氨基酸序列。在某些实施方案中,其中重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:76和102;79和103;78和103;82和103;84和104;83和104;86和103;85和103;81和103;80和103;87和105;77和102;88和102;77和106;77和107;77和108;77和103;89和102;90和102;91和102;92和102;93和102;77和109;94和102;95和102;96和102;97和102;98和102;99和102;100和110;100和111;100和112;100和113;100和114;100和115;101和110;144和102;147和103;146和103;150和103;152和104;151和104;154和103;153和103;149和103;148和103;155和105;145和102;156和102;145和106;145和107;145和108;145和103;

157和102;158和102;159和102;160和102;161和102;145和109;162和102;163和102;164和102;165和102;166和102;167和102;168和110;168和111;168和112;168和113;168和114;168和115;或者169和110的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76-101或144-169中的任一者中的X是谷氨酰胺。在某些实施方案中,SEQ ID NO:76-101或144-169中的任一者中的X是焦谷氨酸。

[0282] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:145和106的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:145和107的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:145和108的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:145和103的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:157和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:158和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:159和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:160和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:161和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:145和109的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:162和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:163和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:164和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:165和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:166和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:167和102的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:168和110的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:168和111的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:168和112的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:168和113的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:168和114的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:168和115的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:169和110的氨基酸序列组成。

[0284] 任何抗体形式都可以用于本文公开的抗体中。在某些实施方案中,抗体是单链抗体或单链Fv(scFv)。在某些实施方案中,抗体是与Fc区融合的scFv(scFv-Fc)。在某些实施方案中,抗体是Fab片段。在某些实施方案中,抗体是F(ab')₂片段。

[0285] 在某些实施方案中,本文公开的抗体是特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)和第二抗原的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。

[0286] 在某些实施方案中,本文公开的抗体缀合至细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记。在某些实施方案中,细胞毒性剂能够诱导与其接触的细胞的死亡或破坏。在某些实施方案中,细胞抑制剂能够防止或基本上减少增殖并且/或者抑制与其接触的细胞的活性或功能。在某些实施方案中,细胞毒性剂或细胞生长抑制剂是化疗剂。在某些实施方案中,放射性核素选自以下各项组成的组:isotopes ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹¹⁷Lu, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁹⁸Au, ²¹¹At, ²¹³Bi, ²²⁵Ac 和 ¹⁸⁶Re。在某些实施方案中,可检测标记包含荧光部分或点击化学柄部。

[0287] 任何免疫球蛋白(Ig)恒定区均可以用于本文公开的抗体。在某些实施方案中,Ig区是人IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、

IgG4、IgA1和IgA2)或任何子类(例如,IgG2a和IgG2b)的免疫球蛋白分子。

[0288] 在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:121或175的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含轻链恒定区,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:122或123的氨基酸序列。

[0289] 在某些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸置换)引入本文所述抗体的Fc区,例如,根据EU编号系统编号的CH2结构域(人IgG1的残基231-340)和/或CH3结构域(人IgG1的残基341-447)和/或铰链区,以改变抗体的一种或多种功能性质、诸如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。

[0290] 在某些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸置换)引入Fc区的铰链区(CH1结构域),从而改变铰链区中的半胱氨酸残基的数量(例如,增加或减少),如例如美国专利号5,677,425所述,该文献以引用的方式整体并入本文。CH1结构域的铰链区中的半胱氨酸残基的数量可以被改变以例如促进轻链和重链的组装或者改变(例如,增加或减少)抗体的稳定性。

[0291] 在一个具体实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,置换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地Fc或铰链-Fc结构域片段),以改变(例如,减少或增加)抗体的体内半衰期。关于将改变(例如,减少或增加)抗体的体内半衰期的突变的实例,参见例如国际公开号W0 02/060919;W0 98/23289;和W0 97/34631;以及美国专利号5,869,046、6,121,022、6,277,375和6,165,745,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。在某些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,置换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地Fc或铰链-Fc结构域片段),以减少抗体的体内半衰期。在其他实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,置换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地Fc或铰链-Fc结构域片段),以增加抗体的体内半衰期。在一个具体实施方案中,抗体可以具有根据EU编号系统编号的第二恒定(CH2)结构域(人IgG1的残基231-340)和/或第三恒定(CH3)结构域(人IgG1的残基341-447)中的一个或多个氨基酸突变(例如,置换)。在一个具体实施方案中,本文所述抗体的IgG1的恒定区包含根据EU编号系统编号的第252位的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)置换、第254位的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)置换和第256位的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)置换。参见美国专利号7,658,921,该专利以引用的方式整体并入本文。这种类型的突变IgG,称为“YTE突变体”,显示出与相同抗体的野生型相比,半衰期增加四倍(参见Dall’Acqua WF等人,(2006)J Biol Chem 281:23514-24,该文献以引用的方式整体并入本文)。在某些实施方案中,抗体包含IgG恒定结构域,所述IgG恒定结构域包含根据EU编号系统编号的第251-257、285-290、308-314、385-389和428-436位的氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸置换。

[0292] 在某些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸置换)引入本文所述的抗体的Fc区,例如,根据EU编号系统编号的CH2结构域(人IgG1的残基231-340)和/或CH3结构域(人IgG1的残基341-447)和/或铰链区,以增加或减少抗体对效应细胞表面上的Fc受体(例如,活化的Fc受体)的亲和力。减少或增加抗体对Fc受体的亲和力的抗体的Fc区的突变以及用于将此类突变引入Fc受体或其片段的技术是本领域的技术人员已知的。可以制备

以改变抗体对Fc受体的亲和力的抗体的Fc受体的突变的实例在例如Smith P等人, (2012) PNAS 109:6181-6186、美国专利号6,737,056和国际公开号WO 02/060919;WO 98/23289;和WO 97/34631中有所描述,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。

[0293] 在某些实施方案中,所述抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中所述变体重链恒定区结合至Fc γ RIIB的亲和力比所述野生型重链恒定区结合至Fc γ RIIB更高。在某些实施方案中,变体重链恒定区是变体人重链恒定区,例如变体人IgG1、变体人IgG2或变体人IgG4重链恒定区。在某些实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含根据EU编号系统编号的以下氨基酸突变中的一者或多者:G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E。在某些实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含一组选自由以下各项组成的组的氨基酸突变:根据EU编号系统编号的S267E和L328F;P238D和L328E;P238D和一个或多个选自由以下各项组成的组的置换:E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;G236D和S267E;S239D和S267E;V262E、S267E和L328F;以及V264E、S267E和L328F。在某些实施方案中,Fc γ RIIB在选自由以下各项组成的组的细胞上表达:巨噬细胞、单核细胞、B细胞、树突细胞、内皮细胞和活化的T细胞。

[0294] 在另一个实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸置换引入IgG恒定结构域Fc区,以改变抗体的一个或多个效应子功能。例如,一个或多个选自根据EU编号系统编号的氨基酸残基234,235,236,237,239,243,267,292,297,300,318,320,322,328,330,332和396的氨基酸,可以用不同的氨基酸残基替换,以使得抗体对效应子配体的亲和力有所改变,但是保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。这种方法在美国专利号5,624,821和5,648,260中更详细地描述,这些专利中的每个均以引用的方式整体并入本文。在某些实施方案中,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可以减少循环抗体的Fc受体结合,从而增加肿瘤定位。关于缺失或失活恒定结构域从而增加肿瘤定位的突变的描述,参见,例如,美国专利号5,585,097和8,591,886,这些专利中的每个均以引用的方式整体并入本文。在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸置换引入本文所述抗体的Fc区,以除去Fc区上的潜在糖基化位点,这可以减少Fc受体结合(参见,例如,Shields RL等人, (2001) J Biol Chem 276:6591-604,该文献以引用的方式整体并入本文)。在多个实施方案中,可以在本文所述的抗体的恒定区中产生以下突变中的一者或多者:根据EU编号系统编号的N297A置换;N297Q置换;L234A置换;L234F置换;L235A置换;L235F置换;L235V置换;L237A置换;S239D置换;E233P置换;L234V置换;L235A置换;C236缺失;P238A置换;S239D置换;F243L置换;D265A置换;S267E置换;L328F置换;R292P置换;Y300L置换;A327Q置换;P329A置换;A332L置换;I332E置换;或P396L置换。

[0295] 在某些实施方案中,可以在本文所述抗体的恒定区中产生选自由以下各项组成的组的突变:根据EU编号系统编号的D265A、P329A以及它们的组合。在某些实施方案中,可以在本文所述抗体的恒定区中产生选自由以下各项组成的组的突变:根据EU编号系统编号的L235A、L237A以及它们的组合。在某些实施方案中,可以在本文所述抗体的恒定区中产生选自由以下各项组成的组的突变:根据EU编号系统编号的S267E、L328F以及它们的组合。在某些实施方案中,可以在本文所述抗体的恒定区中产生选自由以下各项组成的组的突变:根据EU编号系统编号的S239D、I332E、任选地A330L以及它们的组合。在某些实施方案中,可以在本文所述抗体的恒定区中产生选自由以下各项组成的组的突变:根据EU编号系统编号的

L235V、F243L、R292P、Y300L、P396L以及它们的组合。在某些实施方案中,可以在本文所述抗体的恒定区中产生选自由以下各项组成的组的突变:根据EU编号系统编号的S267E、L328F以及它们的组合。

[0296] 在一个具体实施方案中,本文所述的抗体包含具有根据EU编号系统编号的N297Q或N297A氨基酸置换的IgG1的恒定结构域。在一个实施方案中,本文所述的抗体包含具有选自由以下各项组成的组的突变的IgG1的恒定结构域:根据EU编号系统编号的D265A、P329A以及它们的组合。在另一个实施方案中,本文所述的抗体包含具有选自由以下各项组成的组的突变的IgG1的恒定结构域:根据EU编号系统编号的L234A、L235A以及它们的组合。在另一个实施方案中,本文所述的抗体包含具有选自由以下各项组成的组的突变的IgG1的恒定结构域:根据EU编号系统编号的L234F、L235F、N297A以及它们的组合。在某些实施方案中,本文所述的抗体的恒定区中对应于根据EU编号系统编号的人IgG1s重链的第L234、L235和D265位的位置的氨基酸残基分别不是L、L和D。该方法在国际公开号W0 14/108483中有所详细描述,该公开以引用的方式整体并入本文。在一个特定实施方案中,对应于根据EU编号系统编号的人IgG1重链的第L234、L235和D265位的氨基酸分别是F、E和A;或者A、A和A。

[0297] 在某些实施方案中,根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中的一个或多个选自氨基酸残基329、331和322的氨基酸可以被不同的氨基酸残基替换,以使得抗体的C1q结合得以改变并且/或者补体依赖性细胞毒性(CDC)得以减少或消除。该方法在美国专利号6,194,551(Idusogie等人)中更详细地描述,该专利以引用的方式整体并入本文。在某些实施方案中,根据EU编号系统编号的本文描述的抗体的CH2结构域的N-末端区域的氨基酸第231至238位内的一个或多个氨基酸残基被改变,从而改变抗体固定补体的能力,。该方法在国际公开号W0 94/29351中进一步描述,该公开以引用的方式整体并入本文。在某些实施方案中,通过在以下位置使一个或多个氨基酸突变(例如,引入氨基酸置换),修饰本文所述抗体的Fc区,以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fc受体的亲和力:根据EU编号系统编号的238,239,248,249,252,254,255,256,258,265,267,268,269,270,272,276,278,280,283,285,286,289,290,292,293,294,295,296,298,301,303,305,307,309,312,315,320,322,324,326,327,328,329,330,331,333,334,335,337,338,340,360,373,376,378,382,388,389,398,414,416,419,430,434,435,437,438或439。该方法在国际公开号W0 00/42072中进一步描述,该公开以引用的方式整体并入本文。

[0298] 在某些实施方案中,本文所述的抗体包含经修饰的IgG1的恒定结构域,其中所述修饰增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。在某些实施方案中,0.1、1或10 μ g/mL抗体能够在1、2或3小时内诱导表达CD96的细胞死亡至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%,如通过本文所述和/或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,经修饰的IgG1的恒定结构域包含根据EU编号系统编号的S239D和I332E置换。在某些实施方案中,经修饰的IgG1的恒定结构域包含根据EU编号系统编号的S239D、A330L和I332E置换。在某些实施方案中,经修饰的IgG1的恒定结构域包含根据EU编号系统编号的L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L置换。在某些实施方案中,抗体能够在效应T细胞和Treg中诱导细胞死亡,其中经历细胞死亡的Treg的百分比比经历细胞死亡的效应T细胞的百分比多至少1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍。

[0299] 在某些实施方案中,本文所述的抗体包含IgG₄抗体的恒定区,并且根据EU编号系统编号的重链氨基酸残基228处的丝氨酸被脯氨酸置换。在某些实施方案中,本公开提供了一种特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的分离的抗体,所述抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0300] 在某些实施方案中,本文所述的恒定区突变或修饰中的任一者可以被引入具有两个重链恒定区的本文所述的抗体的一个或两个重链恒定区中。

[0301] 在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且作为拮抗剂发挥作用(例如,降低或抑制CD96活性)。

[0302] 在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的活性,降低或抑制CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的活性至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%,或99%,如通过本文所述和/或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96)的抗体)的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96),降低或抑制CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的活性至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多,如通过本文所述和/或本领域的技术人员已知的方法所评估。CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)活性的非限制性实例可以包括CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)信号传导;CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)结合至其配体(例如,CD155)或它们的片段和/或融合蛋白;T细胞(例如,表达人CD96的T细胞)的活化;自然杀伤(NK)细胞的活化;Treg的减少或抑制;细胞因子(例如,IL-2)产生的增加;CD155(例如,人CD155)活性的增加。在具体实施方案中,如实施例所述评估CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)活性的增加。

[0303] 在具体实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人或食蟹猕猴CD96)的抗体)的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)与其配体的结合,降低或抑制CD96(例如,人或食蟹猕猴CD96)与其配体(例如,CD155)或它们的片段和/或融合蛋白的结合至少约5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在具体实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人或食蟹猕猴CD96)并且相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人或食蟹猕猴CD96)的抗体)的CD96(例如,人CD96)与其配体的结合,增加CD96(例如,人或食蟹猕猴CD96)与其配体(例如,CD155(例如,人或食蟹猕猴CD155)或它们的片段和/或融合蛋白的结合至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0304] 在具体实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且活化T细胞(例如,表达人CD96的T细胞)。在某些实施方案中,T细胞是记忆T细胞。在某些实施方案中,T细胞是原代表CD3的T细胞。在某些实施方案中,T细胞是表达CD96的Jurkat细胞。在某些实施方案中,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的活化T细胞的核因子(NFAT)活性,本文公开的抗体增加NFAT的活性至少约5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%,或99%,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的NFAT活性,本文公开的抗体增加NFAT的活性至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更多,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,在存在CD96的配体(例如,CD155)或它们的片段和/或融合蛋白并且/或者表达CD96的配体的细胞(例如,单核细胞或树突细胞)的情况下,抗体增加NFAT活性。

[0305] 在具体实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的细胞因子产生,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且增加细胞因子(例如,IL-2)产生至少约5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%,或99%,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在具体实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的细胞因子产生,增加细胞因子(例如,IL-2)产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更多,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,在存在CD96的配体(例如,CD155)或它们的片段和/或融合蛋白并且/或者表达CD96的配体的细胞(例如,单核细胞或树突细胞)的情况下,抗体增加细胞因子(例如,IL-2)产生。在某些实施方案中,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的IL-2产生,抗体增加IL-2的产生。

[0306] 在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的IFN γ 和/或IL-2产生,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且所述抗体单独或与抗PD-1抗体(例如,帕博利珠单抗或纳武单抗)组合,响应于葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激,增加人外周血单个核细胞(PBMC)中的IFN γ 和/或IL-2产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0307] 在某些实施方案中,在存在本文所述的特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴

猴CD96)的抗体的情况下,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的情况下仅用SEA刺激的PBMC的IFN γ 和/或IL-2产生,葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激的人外周血单个核细胞 (PBMC) 增加IFN γ 和/或IL-2产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0308] 在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且增加或促进记忆T细胞的记忆回忆。在某些实施方案中,记忆T细胞是CD8效应记忆T细胞。在某些实施方案中,记忆T细胞是CD4效应记忆T细胞。在某些实施方案中,相对于在不存在任何抗体的情况下或在存在不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的情况下,当记忆T细胞与它们的一个或多个同源抗原接触时,增殖记忆T细胞的数量,当记忆T细胞与它们的一个或多个同源抗原接触时,抗体增加增殖记忆T细胞的数量至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,相对于在不存在任何抗体的情况下或在存在不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的情况下,当记忆T细胞与它们的同源抗原接触时,记忆T细胞产生的细胞因子,当记忆T细胞与它们的同源抗原接触时,抗体增加记忆T细胞产生的细胞因子(例如,IFN γ 、TNF α)至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0309] 在某些实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)并且活化NK细胞。在某些实施方案中,NK细胞是分离的。在某些实施方案中,NK细胞处于PBMC的混合培养物中。在某些实施方案中,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的情况下,NK细胞中的CD107a的表达水平,本文公开的抗体增加NK细胞中的CD107a的表达水平至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、或99%,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的情况下,NK细胞中的CD107a的表达水平,本文公开的抗体增加NK细胞中的CD107a的表达水平至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体)的情况下,NK细胞产生的细胞因子(例如,IFN γ 和/或TNF α) 本文公开的抗体增加NK细胞产生的细胞因子(例如,IFN γ 和/或TNF α)至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、或99%,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施方案中,相对于不具有任何抗体或具有不相关抗体(例如,不

特异性结合至CD96 (例如,人CD96或食蟹猕猴CD96) 的抗体) 情况下,NK细胞产生的细胞因子 (例如,IFN γ 和/或TNF α), 本文公开的抗体增加NK细胞产生的细胞因子 (例如,IFN γ 和/或TNF α) 至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更多,如通过本文所述或本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0310] 5.3 药物组合物

[0311] 本文提供了在生理学可接受的载剂、赋形剂或稳定剂中包含具有所需纯度的本文公开的抗CD96 (例如,人CD96或食蟹猕猴CD96) 抗体的组合物 (参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂 (包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂 (诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;氯化苄甲烃铵、氯化苄乙氧铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量 (小于约10个残基) 的多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物 (例如,Zn-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇 (PEG)。

[0312] 在一个具体实施方案中,药物组合物包含在药学上可接受的载剂中的本文公开的抗CD96 (例如,人CD96或食蟹猕猴CD96) 抗体,和任选地一种或多种另外的预防或治疗剂。在一个具体实施方案中,药物组合物包含在药学上可接受的载剂中的有效量的本文所述的抗体,和任选地一种或多种另外的预防或治疗剂。在某些实施方案中,抗体是药物组合物中包含的唯一活性组分。本文所述的药物组合物可以用于增加或促进CD96 (例如,人CD96或食蟹猕猴CD96) 活性和治疗病症诸如癌症或感染性疾病。在一个实施方案中,本发明涉及用作药物的本发明的药物组合物,所述药物组合物包含本发明的抗CD96抗体。在另一个实施方案中,本发明涉及用于治疗癌症或感染性疾病的方法的本发明的药物组合物。

[0313] 用于肠胃外制剂的药学上可接受的载剂包括水性媒介物、非水性媒介物、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、多价螯合剂或螯合剂以及其他药学上可接受的物质。水性媒介物的实例包括氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖和乳酸林格氏注射液。非水性肠胃外媒介物包括植物来源的不挥发油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。可以将抑细菌或抑真菌浓度的抗微生物剂添加到包装在多剂量容器中的肠胃外制剂中,这些容器包括苯酚或甲酚、汞、苄醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。等渗剂包括氯化钠和葡萄糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。悬浮剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80 (TWEEN[®] 80)。金属离子的多价螯合剂或螯合剂包括EDTA。药物载剂还包括用于水混溶性媒介物的乙醇、聚乙二醇和丙二醇;以及用于pH调节的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0314] 可以配制药组合物以用于针对受试者的任何给药途径。给药途径的具体实例包括鼻内、口服、肺部、透皮、皮内和肠胃外。本文还考虑了以皮下、肌肉内或静脉内注射为特征的肠胃外施用。可以将注射剂制备成常规形式,或者作为液体溶液剂或混悬剂、适合在注射前溶解或混悬在液体中的固体形式,或者作为乳剂。注射剂、溶液剂和乳剂还含有一种或多种赋形剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、葡萄糖、甘油或乙醇。此外,如果需要,待施用的药物组合物还可以含有少量的无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解增强剂和其他此类试剂,例如,乙酸钠、单月桂酸脱水山梨糖醇酯、油酸三乙醇胺和环糊精。

[0315] 用于肠胃外施用抗体的制剂包括准备注射的无菌溶液、无菌干燥可溶性产物,诸如准备在使用前与溶剂混合的冻干粉剂,包括皮下片剂、准备注射的无菌混悬剂、准备在使用前与媒介物和无菌乳剂组合的无菌干燥不溶性产物。溶液剂可以是水性的或非水性的。

[0316] 如果静脉内施用,则合适的载剂包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),以及含有增稠剂和增溶剂(诸如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇以及它们的混合物)的溶液剂。

[0317] 如用于局部和全身施用所述制备包含抗体的局部混合物。所得的混合物可以是溶液剂、混悬剂、乳剂等,并且可以配制成霜剂、凝胶剂、软膏剂、乳剂、溶液剂、酏剂、洗剂、混悬剂、酏剂、糊剂、泡沫剂、气雾剂、冲洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带剂、真皮贴剂或任何其他适合局部施用的制剂。

[0318] 本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可以配制成用于局部施用的气雾剂,诸如通过吸入施用(参见例如,美国专利号4,044,126、4,414,209和4,364,923,它们描述了用于递送类固醇的气雾剂,所述类固醇用于治疗炎症性疾病,特别是哮喘,并且以引用的方式整体并入本文)。这些用于呼吸道施用的制剂可以是单独或与惰性载体诸如乳糖组合的用于喷雾器的气雾剂或溶液剂的形式,或作为用于吹入的微细粉末。在这种情况下,制剂的颗粒将在一个实施方案中具有小于50微米,在一个实施方案中小于10微米的直径。

[0319] 本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可以配制用于区域或局部施用,诸如向皮肤或粘膜局部施用,诸如用于眼睛、以凝胶、霜剂和洗剂形式,以及施用于眼睛或脑池内或脊柱内施用。局部给药被考虑用于透皮递送,也用于向眼睛或粘膜施用,或用于吸入疗法。还可以单独施用抗体的鼻腔溶液或与其他药学上可接受的赋形剂组合施用。

[0320] 透皮贴剂,包括离子电渗和电泳装置,是本领域的技术人员熟知的,可用于施用抗体。例如,这种贴剂在美国专利号6,267,983、6,261,595、6,256,533、6,167,301、6,024,975、6,010,715、5,985,317、5,983,134、5,948,433和5,860,957中有所公开,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。

[0321] 在某些实施方案中,包含本文所述的抗体的药物组合物是冻干粉末,它可以复原以作为溶液剂、乳剂和其他混合物施用。它也可以复原并配制成固体基剂或凝胶剂。通过将本文所述的抗体或其药学上可接受的衍生物溶解在合适的溶剂中来制备冻干粉末。在某些实施方案中,冻干粉末是无菌的。溶剂可包含改善粉末或由粉末制备的复原溶液的稳定性的赋形剂或其他药理学组分。可以使用的赋形剂包括但不限于葡萄糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他合适的试剂。溶剂还可以包含缓冲剂,诸如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或者本领域的技术人员已知的其他此类缓冲剂,在一个实施方案中,

约中性pH。随后对溶液进行无菌过滤,然后在本领域的技术人员已知的标准条件下冻干,从而提供所需的制剂。在一个实施方案中,所得的溶液将被分配到小瓶中冻干。每个小瓶将包含单剂量或多剂量的化合物。冻干粉末可以在适当的条件下储存,诸如在约4℃至室温下。用注射用水复原这种冻干粉末提供了用于肠胃外施用的制剂。对于复原,将冻干粉末添加到无菌水或其他合适的载剂中。精确的量取决于所选的化合物。这种量可以凭经验确定。

[0322] 本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)抗体和本文提供的其他组合物也可以配制为靶向特定组织、受体或待治疗的受试者身体的其他区域。许多这种靶向方法是本领域的技术人员熟知的。本文设想了所有用于本发明的组合物的此类靶向方法。对于靶向方法的非限制性实例,参见例如美国专利号6,316,652,6,274,552,6,271,359,6,253,872,6,139,865,6,131,570,6,120,751,6,071,495,6,060,082,6,048,736,6,039,975,6,004,534,5,985,307,5,972,366,5,900,252,5,840,674,5,759,542和5,709,874,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。在一个具体实施方案中,本文所述的抗体靶向肿瘤。

[0323] 用于体内施用的组合物可以是无菌的。这很容易通过例如无菌过滤膜过滤来实现。

[0324] 5.4使用方法和用途

[0325] 在另一个方面,本公开提供了一种使用本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)抗体来治疗受试者的方法。可以使用本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)抗体来治疗将受益于CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)功能降低的受试者的任何疾病或障碍。在某些实施方案中,疾病或障碍对检查点靶向剂(例如,拮抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体或拮抗性抗PD-1抗体)具有耐受性。在某些实施方案中,疾病或障碍在用检查点靶向剂(例如,拮抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体或拮抗性抗PD-1抗体)治疗后复发。

[0326] 本文公开的抗CD96(例如,人CD96)抗体对于抑制免疫系统对肿瘤的耐受性特别有用,因此可用作癌症受试者的免疫疗法。例如,在某些实施方案中,本公开提供了一种在受试者中增加响应于抗原的T细胞(例如,CD8⁺细胞毒性T细胞、CD4⁺辅助T细胞、NKT细胞、效应T细胞或记忆T细胞)活化的方法,所述方法包括将有效量的如本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)抗体或其药物组合物施用于受试者。在某些实施方案中,本公开提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括将有效量的如本文公开的抗体或药物组合物施用于受试者。

[0327] 可以使用本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猴CD96)抗体或药物组合物来治疗的癌症包括但不限于实体瘤、血液癌症(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤)和转移性病灶。在一个实施方案中,癌症是实体瘤。实体瘤的实例包括恶性肿瘤,例如肉瘤和癌,例如各种器官系统的腺癌,诸如影响肺、乳腺、卵巢、淋巴、胃肠(例如,结肠)、肛门、生殖器和泌尿生殖道(例如,肾、尿路上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS(例如,脑细胞、神经细胞或神经胶质细胞)、头颈部、皮肤(例如,黑素瘤)和胰腺的那些腺癌,以及包括恶性肿瘤的腺癌,例如结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌或小细胞肺癌)、小肠癌和食道癌。癌症可以处于早期、中期、晚期或可以是转移性癌症。在某些实施方案中,癌症对检查点靶向剂(例如,拮抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体或拮抗性抗PD-1抗体)具有耐受性。在某些实施方案中,癌症在用检查点靶向剂(例如,拮

抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体或拮抗性抗PD-1抗体) 治疗后复发。

[0328] 在一个实施方案中,癌症选自肺癌(例如,肺腺癌或非小细胞肺癌(NSCLC)(例如,具有鳞状和/或非鳞状组织学的NSCLC、或NSCLC腺癌))、黑素瘤(例如,晚期黑素瘤)、肾癌(例如,肾细胞癌)、肝癌(例如,肝细胞癌)、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、前列腺癌、乳腺癌(例如,不表达一种、两种或所有雌激素受体的乳腺癌、孕酮受体、或Her2/neu,例如,三阴性乳腺癌)、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈癌(例如,头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、肛门癌、胃食管癌(例如,食管鳞状细胞癌)、间皮瘤、鼻咽癌、甲状腺癌、宫颈癌、上皮癌、腹膜癌或淋巴增生性疾病(例如,移植后淋巴增生性疾病)。在一个具体实施方案中,癌症是宫颈癌。

[0329] 在一个实施方案中,癌症是血液癌症,例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一个实施方案中,癌症是白血病,例如,急性淋巴性白血病(ALL)、急性粒细胞性白血病(AML)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性髓单核细胞白血病(CMML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)或毛细胞白血病。在一个实施方案中,癌症是淋巴瘤,例如,B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、活化B细胞样(ABC)弥漫性大B细胞淋巴瘤、生殖中心B细胞(GCB)弥漫性大B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、复发性非霍奇金淋巴瘤、难治性非霍奇金淋巴瘤、复发性滤泡性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤或结外边缘区淋巴瘤。在一个实施方案中,癌症是骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤。

[0330] 在另一个实施方案中,癌症选自癌(例如,晚期或转移性癌)、黑素瘤或肺癌(例如,非小细胞肺癌)。

[0331] 在一个实施方案中,癌症是肺癌,例如肺腺癌、非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

[0332] 在一个实施方案中,癌症是黑素瘤,例如晚期黑素瘤。在一个实施方案中,癌症是对其他疗法无反应的晚期或不可切除的黑素瘤。在其他实施方案中,癌症是具有BRAF突变(例如,BRAF V600突变)的黑素瘤。在另外其他实施方案中,在存在或不存在BRAF抑制剂(例如,威罗非尼或达拉非尼)的情况下,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或药物组合物在用抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗)治疗之后施用。

[0333] 在另一个实施方案中,癌症是伴有或不伴有病毒感染(例如,慢性病毒性肝炎)的肝癌(例如,晚期肝癌)。

[0334] 在另一个实施方案中,癌症是前列腺癌,例如晚期前列腺癌。

[0335] 在又一个实施方案中,癌症是骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤。

[0336] 在又一个实施方案中,癌症是肾癌,例如肾细胞癌(RCC)(例如,转移性RCC、透明细胞肾细胞癌(CCRCC)或肾乳头状细胞癌)。

[0337] 在又一个实施方案中,癌症选自肺癌、黑素瘤、肾癌、乳腺癌、结肠直肠癌、白血病或癌症的转移性病变。

[0338] 在某些实施方案中,本公开提供了一种预防或治疗受试者的感染性疾病的方法,所述方法包括将有效量的如本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其药物组合物施用于受试者。在一个实施方案中,本文提供了用于预防和/或治疗感染(例如,病毒感染、细菌感染、真菌感染、原生动物感染或寄生虫感染)的方法。根据所述方法预防和/

或治疗的感染可以由本文鉴定的传染原引起。在一个具体实施方案中,本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或它们的组合物是施用于受试者的唯一活性剂。在某些实施方案中,本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或它们的组合物与抗感染干预(例如,抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂或抗蠕虫剂)组合用于治疗感染性疾病。因此,在一个实施方案中,本发明涉及用于预防和/或治疗感染性疾病的方法的本发明的抗体和/或药物组合物,任选地其中所述抗体或药物组合物是施用于受试者的唯一活性剂,或其中所述抗体或药物组合物与抗感染干预组合使用。

[0339] 可以通过本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或药物组合物治疗和/或预防的感染性疾病由包括但不限于细菌、寄生虫、真菌、原生动物和病毒的传染原引起。在一个具体实施方案中,由本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或药物组合物治疗和/或预防的感染性疾病由病毒引起。可以根据本文描述的方法预防和/或治疗的病毒性疾病或病毒感染包括但不限于由甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、流感(例如,甲型流感或乙型流感)、水痘、腺病毒、单纯疱疹病毒I型(HSV-I)、单纯疱疹病毒II型(HSV-II)、牛瘟、鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头状瘤病毒、罂粟病毒、巨细胞病毒、棘突病毒、虫媒病毒、亨他病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、天花病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、人类免疫缺陷病毒I型(HIV-I)、人类免疫缺陷病毒II型(HIV-II)和病毒性病原,诸如病毒性脑脊髓膜炎、脑炎、登革热或天花引起的感染。

[0340] 可以预防和/或治疗的细菌感染包括由大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、草绿色葡萄球菌和铜绿假单胞菌引起的感染。可以根据本文所述的方法预防和/或治疗的由细菌(例如,大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、草绿色葡萄球菌和铜绿假单胞菌)引起的细菌性疾病包括但不限于立克次氏体、支原体、奈瑟氏菌、肺炎链球菌、伯氏疏螺旋体(莱姆病)、炭疽杆菌(炭疽)、破伤风、链球菌、葡萄球菌、分枝杆菌、百日咳、霍乱、鼠疫、白喉、衣原体、金黄色葡萄球菌和军团菌。

[0341] 可以根据本文描述的方法预防和/或治疗的由原生动物引起的原生动物疾病或原生动物感染包括但不限于利什曼原虫病、球虫病、锥虫血吸虫病或疟疾。可以根据本文描述的方法预防和/或治疗的由寄生虫引起的寄生虫病或寄生虫感染包括但不限于衣原体和立克次氏体。

[0342] 可以根据本文所述的方法预防和/或治疗的真菌疾病或真菌感染包括但不限于由念珠菌感染、接合菌病、念珠菌乳腺炎、伴有潜伏性毛孢菌病的进行性播散性毛孢菌病、播散性念珠菌病、肺类球孢子菌病、肺曲霉病、卡氏肺孢子菌肺炎、隐球菌性脑膜炎、球孢子脑膜炎和脑脊髓血管炎、黑曲霉感染、镰刀菌角膜炎、副鼻窦真菌病、烟曲霉心内膜炎、胫骨软骨发育不全、光滑念珠菌阴道炎、口咽念珠菌症、X连锁慢性肉芽肿病、足癣、皮肤念珠菌病、霉菌性胎盘炎、播散性毛孢菌病、过敏性支气管肺曲霉病、霉菌性角膜炎、新型隐球菌感染、真菌性腹膜炎、弯曲菌感染、葡萄球菌性眼内炎、毛癣菌病和皮肤癣菌病引起的那些。

[0343] 在某些实施方案中,这些方法还包括将另外的治疗剂施用于受试者。在某些实施方案中,另外的治疗剂是化疗剂、放疗剂或检查点靶向剂。在某些实施方案中,化疗剂是低甲基化剂(例如,阿扎胞苷)。在某些实施方案中,化疗剂是DNA损伤诱导剂(例如,吉西他

滨)。在某些实施方案中,检查点靶向剂选自由以下各项组成的组:拮抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体、拮抗性抗PD-1抗体、拮抗性抗TIM-3抗体、拮抗性抗LAG-3抗体、拮抗性抗VISTA抗体、激动性抗CD96抗体、拮抗性抗CEACAM1抗体、拮抗性抗CD137抗体、激动性抗GITR抗体和激动性抗OX40抗体。在某些实施方案中,检查点靶向剂选自由以下各项组成的组:拮抗性抗CTLA-4抗体、拮抗性抗PD-L1抗体、拮抗性抗PD-L2抗体和拮抗性抗PD-1抗体,其中本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或药物组合物与检查点靶向剂协同作用。

[0344] 在一个实施方案中,本发明涉及用于本发明方法的本发明的抗体和/或药物组合物,其中所述方法还包括将另外的治疗剂施用于受试者。在一个实施方案中,本发明涉及(a)本发明的抗体和/或药物组合物以及(b)用作药物的另外的治疗剂。在一个实施方案中,本发明涉及(a)本发明的抗体和/或药物组合物,以及(b)用于治疗癌症的方法的另外的治疗剂。在另一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物、试剂盒或成套试剂盒,所述药物组合物、试剂盒或成套试剂盒包含(a)本发明的抗体和/或药物组合物以及(b)另外的治疗剂。在一个实施方案中,另外的治疗剂是化疗剂、放疗剂或检查点靶向剂。

[0345] 在某些实施方案中,抗PD-1抗体被用于本文公开的方法。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是Bristol-Myers Squibb开发的纳武单抗(nivolumab),也称为BMS-936558或MDX1106。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是Merck&Co.开发的帕博利珠单抗(pembrolizumab),也称为兰布鲁珠单抗(lambrolizumab)或MK-3475。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是CureTech开发的皮地利珠单抗(pidilizumab),也称为CT-011。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是Medimmune开发的MEDI0680,也称为AMP-514。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是Novartis Pharmaceuticals开发的PDR001。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是Regeneron Pharmaceuticals开发的REGN2810。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是Pfizer开发的PF-06801591。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是BeiGene开发的BGB-A317。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是AnaptysBio和Tesarro开发的TSR-042。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是恒瑞开发的SHR-1210。

[0346] 可以用于本文公开的治疗方法的抗PD-1抗体的其他非限制性实例公开于以下专利和专利申请中,所有这些专利和专利申请均以引用的方式整体并入本文用于所有目的:美国专利号6,808,710、美国专利号7,332,582、美国专利号7,488,802、美国专利号8,008,449、美国专利号8,114,845、美国专利号8,168,757、美国专利号8,354,509、美国专利号8,686,119、美国专利号8,735,553、美国专利号8,747,847、美国专利号8,779,105、美国专利号8,927,697、美国专利号8,993,731、美国专利号9,102,727、美国专利号9,205,148、美国公开号US 2013/0202623 A1、美国公开号US 2013/0291136 A1、美国公开号US 2014/0044738 A1、美国公开号US 2014/0356363 A1、美国公开号US 2016/0075783 A1以及PCT公开号W0 2013/033091 A1、PCT公开号W0 2015/036394 A1、PCT公开号W0 2014/179664 A2、PCT公开号W0 2014/209804 A1、PCT公开号W0 2014/206107 A1、PCT公开号W0 2015/058573 A1、PCT公开号W0 2015/085847 A1、PCT公开号W0 2015/200119 A1、PCT公开号W0 2016/015685 A1和PCT公开号W0 2016/020856 A1。

[0347] 在某些实施方案中,抗PD-L1抗体被用于本文公开的方法。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是Genentech开发的阿特珠单抗(atezolizumab)。在某些实施方案中,抗PD-L1抗

体是AstraZeneca、Celgene和Medimmune开发的德瓦鲁单抗 (durvalumab)。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是Merck Serono和Pfizer开发的阿维鲁单抗 (avelumab),也称为MSB0010718C。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是Bristol-Myers Squibb开发的MDX-1105。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是Amplimmune和GSK开发的AMP-224。

[0348] 可以用于本文公开的治疗方法的抗PD-L1抗体的非限制性实例公开于以下专利和专利申请中,所有这些专利和专利申请均以引用的方式整体并入本文用于所有目的:美国专利号7,943,743、美国专利号8,168,179、美国专利号8,217,149、美国专利号8,552,154、美国专利号8,779,108、美国专利号8,981,063、美国专利号9,175,082、美国公开号US 2010/0203056 A1、美国公开号US 2003/0232323 A1、美国公开号US 2013/0323249 A1、美国公开号US 2014/0341917 A1、美国公开号US 2014/0044738 A1、美国公开号US 2015/0203580 A1、美国公开号US 2015/0225483 A1、美国公开号US 2015/0346208 A1、美国公开号US 2015/0355184 A1以及PCT公开号WO 2014/100079 A1、PCT公开号WO 2014/022758 A1、PCT公开号WO 2014/055897 A2、PCT公开号WO 2015/061668 A1、PCT公开号WO 2015/109124 A1、PCT公开号WO 2015/195163 A1、PCT公开号WO 2016/000619 A1和PCT公开号WO 2016/030350 A1。

[0349] 在某些实施方案中,抗CTLA-4抗体被用于本文公开的方法。在某些实施方案中,抗CTLA-4抗体是Bristol-Myers Squibb开发的伊匹单抗。

[0350] 在某些实施方案中,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与靶向免疫调节酶诸如IDO(吡啶胺-(2,3)-双加氧酶)和/或TDO(色氨酸2,3-双加氧酶)的化合物组合施用于受试者。因此,在一个实施方案中,另外的治疗剂是靶向免疫调节酶的化合物,诸如吡啶胺-(2,3)-双加氧酶(IDO)的抑制剂。在某些实施方案中,此类化合物选自由以下各项组成的组:依帕卡司他(epacadostat)(Incyte Corp;参见,例如,WO 2010/005958,该文献以引用的方式整体并入本文)、F001287(Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb)、英妥昔莫(indoximod)(NewLink Genetics)和NLG919(NewLink Genetics)。在一个实施方案中,化合物是依帕卡司他。在另一个实施方案中,化合物是F001287。在另一个实施方案中,化合物是英妥昔莫(indoximod)。在另一个实施方案中,化合物是NLG919。在一个具体实施方案中,将本文公开的抗CD96(例如,人CD96)抗体与IDO抑制剂组合施用于受试者以治疗癌症。如本文所述的用于治疗癌症的IDO抑制剂存在于药物组合物的固体剂型(诸如片剂、丸剂或胶囊剂)中,其中药物组合物包含IDO抑制剂和药学上可接受的赋形剂。因此,如本文所述的抗体和如本文所述的IDO抑制剂可以作为单独的剂型单独、按顺序或同时施用。在一个实施方案中,抗体肠胃外施用,IDO抑制剂口服施用。在特定实施方案中,抑制剂选自由以下各项组成的组:依帕卡司他(Incyte Corporation)、F001287(Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb)、英妥昔莫(NewLink Genetics)和NLG919(NewLink Genetics)。依帕卡司他已经在PCT公开号WO 2010/005958中有所描述,该公开以引用的方式整体并入本文用于所有目的。在一个实施方案中,抑制剂是依帕卡司他。在另一个实施方案中,抑制剂是F001287。在另一个实施方案中,抑制剂是英妥昔莫。在另一个实施方案中,抑制剂是NLG919。

[0351] 在某些实施方案中,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与疫苗组合施用于受试者。疫苗可以是例如肽疫苗、DNA疫苗或RNA疫苗。在某些实施方案中,疫

苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗。在一个具体实施方案中,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗组合施用于受试者。热休克蛋白(HSP)是在所有物种中普遍存在的高度保守蛋白的家族。由于热休克或其他形式的压力,包括暴露于毒素、氧化应激或葡萄糖剥夺,它们的表达可以被强烈地诱导到更高的水平。根据分子量可分为五个家族:HSP-110、-90、-70、-60和-28。HSP通过抗原呈递细胞(APC)诸如巨噬细胞和树突细胞(DC)中的交叉呈递途径递送免疫原性肽,从而导致T细胞活化。HSP充当肿瘤相关抗原肽的分子伴侣载体,形成能够诱导肿瘤特异性免疫的复合物。在从垂死的肿瘤细胞中释放出来后,HSP-抗原复合物被抗原呈递细胞(APC)吸收,其中抗原被加工成结合MHC I类和II类分子的肽,从而活化抗肿瘤CD8⁺和CD4⁺T细胞。来源于肿瘤制剂的HSP复合物引发的免疫特异性针对每个受试者的癌症表达的独特抗原肽库。因此,在一个实施方案中,本发明涉及(a)本发明的抗体和/或药物组合物以及(b)用作药物的疫苗,例如用于治疗癌症的方法。在一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物、试剂盒或成套试剂盒,所述药物组合物、试剂盒或成套试剂盒包含(a)本发明的抗体和/或药物组合物以及(b)疫苗。在一个实施方案中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗。在一个实施方案中,疫苗是基于热休克蛋白的病原体疫苗。在某些实施方案中,疫苗如W0 2016/183486所述,该专利以引用的方式整体并入本文。

[0352] 热休克蛋白肽复合物(HSPPC)是由与抗原肽非共价复合的热休克蛋白组成的蛋白质肽复合物。HSPPC引发先天性和适应性免疫应答。在一个具体实施方案中,抗原肽显示出对正在治疗的癌症的抗原性。HSPPC通过膜受体(主要是CD91)或通过Toll样受体结合被APC有效捕获。HSPPC内化导致APC功能成熟,产生趋化因子和细胞因子,从而活化自然杀伤细胞(NK)、单核细胞以及Th1和Th-2介导的免疫应答。在某些实施方案中,本文公开的方法中使用的HSPPC包括来自与抗原肽复合的应激蛋白的hsp60、hsp70或hsp90家族的一种或多种热休克蛋白。在某些实施方案中,HSPPC包括hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白或它们的两种或更多种的组合。

[0353] 在一个具体实施方案中,热休克蛋白肽复合物(HSPPC)包含与重组抗原肽复合的重组热休克蛋白(例如,hsp70或hsc70)或它们的肽结合结构域。重组热休克蛋白可以通过重组DNA技术产生,例如,使用Dworniczak和Mirault,Nucleic Acids Res.15:5181-5197(1987)和GenBank登录号P11142和/或Y00371描述的人hsc70序列,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。在某些实施方案中,Hsp70序列如Hunt和Morimoto Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.82(19),6455-6459(1985)和GenBank登录号P0DMV8和/或M11717所述,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。抗原肽也可以通过本领域已知的重组DNA方法制备。

[0354] 在某些实施方案中,抗原肽包含经修饰的氨基酸。在某些实施方案中,经修饰的氨基酸包含翻译后修饰。在某些实施方案中,经修饰的氨基酸包含翻译后修饰的模拟物。在某些实施方案中,经修饰的氨基酸是已经在侧链羟基或胺上磷酸化的Tyr、Ser、Thr、Arg、Lys或His。在某些实施方案中,经修饰的氨基酸是已经在侧链羟基或胺上磷酸化的Tyr、Ser、Thr、Arg、Lys或His氨基酸的模拟物。

[0355] 在一个具体实施方案中,本文公开的抗CD96(例如人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与热休克蛋白肽复合物(HSPPC)例如热休克蛋白肽复合物-96(HSPPC-96)组合施用于受试者,

以治疗癌症。HSPPC-96包含与抗原肽复合的96kDa热休克蛋白(Hsp) gp96。HSPPC-96是一种癌症免疫疗法,由受试者的肿瘤制成,包含癌症的抗原“指纹”。在某些实施方案中,该指纹包含仅存在于该特定受试者的特定癌细胞中的独特抗原,并且疫苗的注射旨在刺激受试者的免疫系统以识别和攻击具有特定癌症指纹的任何细胞。因此,在一个实施方案中,本发明涉及本发明的抗体和/或药物组合物与热休克蛋白肽复合物(HSPPC)组合用作药物和/或用于治疗癌症的方法。

[0356] 在某些实施方案中,HSPPC,例如HSPPC-96,由受试者的肿瘤组织产生。在一个具体实施方案中,HSPPC(例如,HSPPC-96)由所治疗的癌症类型或其转移的肿瘤产生。在另一个具体实施方案中,HSPPC(例如,HSPPC-96)对于被治疗的受试者是自体的。在某些实施方案中,肿瘤组织是非坏死肿瘤组织。在某些实施方案中,至少1克(例如,至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、或至少10克)非坏死肿瘤组织被用于产生疫苗方案。在某些实施方案中,在手术切除后,非坏死肿瘤组织在用于疫苗制备之前被冷冻。在某些实施方案中,HSPPC,例如HSPPC-96,通过纯化技术从肿瘤组织中分离、过滤并制备用于注射用疫苗。在某些实施方案中,将6-12剂HSPPC,例如HSPPC-96施用于受试者。在这些实施方案中,HSPPC(例如HSPPC-96)剂量可以针对前4个剂量每周施用,然后对于2-8个附加剂量每两周施用一次。

[0357] 可以根据本文所述的方法使用的HSPPC的其他实例在以下专利和专利申请中公开,所有这些专利和专利申请均以引用的方式整体并入本文:美国专利号6,391,306,6,383,492,6,403,095,6,410,026,6,436,404,6,447,780,6,447,781和6,610,659。

[0358] 在某些实施方案中,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与佐剂组合施用于受试者。根据治疗情况,可以使用各种佐剂。适当佐剂的非限制性实例包括但不限于完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)、montanide ISA(不完全脓毒症佐剂)、Ribi佐剂系统(RAS)、Titer Max、胞壁肽、Syntex佐剂调配物(SAF)、明矾(氢氧化铝和/或磷酸铝)、铝盐佐剂、Gerbu[®]佐剂、硝酸纤维素吸收抗原、封装或包埋抗原、3脱氧酰化单磷酸脂质A(3D-MPL)、免疫刺激性寡核苷酸、toll样受体(TLR)配体、甘露聚糖结合凝集素(MBL)配体、STING激动剂、免疫刺激复合物诸如皂苷、Quil A、QS-21、QS-7、ISCOMATRIX等。其他佐剂包括CpG寡核苷酸和双链RNA分子,诸如多聚(A)和多聚(U)。还可以使用上述佐剂的组合。参见,例如,美国专利号6,645,495;7,029,678;和7,858,589,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。在一个实施方案中,本文使用的佐剂是QS-21STIMULON。

[0359] 在某些实施方案中,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与包含TCR的另外治疗剂组合施用于受试者。在某些实施方案中,另外的治疗剂是可溶性TCR。在某些实施方案中,另外的治疗剂是表达TCR的细胞。因此,在一个实施方案中,本发明涉及本发明的抗体和/或药物组合物与包含TCR的另外的治疗剂组合用作药物和/或用于治疗癌症的方法。

[0360] 在某些实施方案中,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞组合施用于受试者。在某些实施方案中,细胞是T细胞。

[0361] 在某些实施方案中,本文公开的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与TCR模拟抗体组合施用于受试者。在某些实施方案中,TCR模拟抗体是特异性结合至肽-MHC复合物的抗体。对于TCR模拟抗体的非限制性实例,参见例如美国专利号9,074,000和美国公开

号US 2009/0304679 A1和US 2014/0134191 A1,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。

[0362] 在某些实施方案中,本文公开的抗CD96(例如人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与双特异性T细胞接合剂(BiTE)(例如,如W02005061547A2中所述,该专利以引用的方式整体并入本文)和/或双亲和重新靶向抗体(DART)(例如,如W02012162067A2中所述,该专利以引用的方式整体并入本文)组合施用于受试者。在某些实施方案中,BiTE和/或DART特异性结合至肿瘤相关抗原(例如,在肿瘤中过表达的多肽、来源于肿瘤病毒的多肽、包含对肿瘤特异的翻译后修饰的多肽、多肽在肿瘤中特异性突变)和效应细胞上的分子(例如,CD3或CD16)。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是EGFR(例如,人EGFR),任选地其中BiTE和/或DART包含西妥昔单抗的VH和VL序列。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是Her2(例如,人Her2),任选地其中BiTE和/或DART包含曲妥珠单抗的VH和VL序列。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是CD20(例如,人CD20)。

[0363] 抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体和另外的治疗剂(例如,化疗剂、放疗剂、检查点靶向剂、IDO抑制剂、疫苗、佐剂、可溶性TCR、表达TCR的细胞、表达嵌合抗原受体的细胞和/或TCR模拟抗体)可以作为单独的剂型单独、顺序或同时施用。在一个实施方案中,抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体肠胃外施用,并且IDO抑制剂口服施用。

[0364] 本文所述的抗体或药物组合物可通过多种途径递送至受试者。这些包括但不限于肠胃外、鼻内、气管内、口服、皮内、局部、肌肉内、腹膜内、透皮、静脉内、肿瘤内、结膜、动脉内和皮下途径。还可以采用肺部施用,例如,通过使用吸入器或喷雾器,以及与雾化剂一起用作喷雾剂的制剂。在某些实施方案中,本文所述的抗体或药物组合物皮下或静脉内递送。在某些实施方案中,本文所述的抗体或药物组合物动脉内递送。在某些实施方案中,本文所述的抗体或药物组合物瘤内递送。在某些实施方案中,本文所述的抗体或药物组合物被递送到肿瘤引流淋巴结中。

[0365] 有效治疗和/或预防病症的抗体或组合物的量将取决于疾病的性质,并且可以通过标准临床技术确定。

[0366] 组合物中使用的精确剂量还取决于给药途径,以及由此引起的感染或疾病的严重程度,并且应根据从业者的判断和每个受试者的情况来决定。例如,有效剂量也可以因给药方式、靶部位、患者的生理状态(包括年龄、体重和健康)、患者是人还是动物、所用的其他药物或治疗是否为预防性或治疗性的。通常,患者是人,但也可以治疗非人哺乳动物(包括转基因哺乳动物)。最佳滴定治疗剂量以优化安全性和有效性。

[0367] 本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体也可用于使用本领域的技术人员已知的经典免疫组织学方法测定生物样品中的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)蛋白水平,包括免疫测定法,诸如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫沉淀或蛋白质印迹。合适的抗体测定标记是本领域已知的并且包括酶标记,诸如、葡萄糖氧化酶;放射性同位素,诸如碘(^{125}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{121}In)和锝(^{99}Tc);发光标记,诸如鲁米诺;和荧光标记,诸如荧光素和罗丹明以及生物素。此类标记可用于标记本文所述的抗体。或者,识别本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的第二抗体可以被标记并且与抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体组合使用,以检测CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)蛋白水平。因此,在一个实施方案中,本发明涉及本发明的抗体用于体外检测

生物样品中的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的抗CD96抗体在体外测定和/或检测生物样品中的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)蛋白水平的用途,任选地其中所述抗CD96抗体与放射性核素或可检测标记缀合,和/或携带本文所述的标记,和/或其中使用免疫组织学方法。

[0368] 测定CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)蛋白的表达水平旨在包括定性或定量测量或估算第一生物样品中的直接(例如,通过确定或估计绝对蛋白质水平)或相对(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白质水平进行比较)CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)蛋白的水平。可以测量或估算第一生物样品中的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)多肽表达水平并与标准CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)蛋白水平进行比较,所述标准取自例如第二生物样品获自未患有障碍的个体或通过对未患有障碍的个体群体的水平进行平均来确定。如本领域所理解,一旦“标准”CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)多肽水平已知,则它可以重复用作比较的标准。因此,在另一个实施方案中,本发明涉及用于测定和/或检测生物样品中的CD96蛋白水平,例如人CD96蛋白水平的体外方法,包括通过免疫组织学方法定性或定量测量或估算生物样品中的CD96蛋白,例如人CD96蛋白水平。

[0369] 如本文所用,术语“生物样品”是指从受试者、细胞系、组织或其他可能表达CD96的细胞来源(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)获得的任何生物样品。从动物(例如,人或食蟹猕猴)获得组织活检和体液的方法在本领域中是熟知的。生物样品包括外周血单个核细胞(PBMC)。

[0370] 本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可用于预后、诊断、监测和筛选应用,包括技术人员熟知和标准的体外和体内应用,以及基于本说明书的应用。预后、诊断、监测用于体外评估和评估免疫系统状态和/或免疫应答的筛选测定和试剂盒可用于预测、诊断和监测评估患者样品,包括已知或怀疑具有免疫系统功能障碍或预期或期望的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应的患者样品。相对于不同的试剂或抗体,免疫系统状态和/或免疫应答的评估和评价也可用于确定患者是否适合进行药物临床试验或施用特定化疗剂、放疗剂或抗体,包括它们的组合。这种类型的预后和诊断监测和评估已经在实践中利用针对乳腺癌中HER2蛋白的抗体(HerceptTest™,Dako),其中该测定还用于评估患者使用Herceptin®的抗体治疗。体内应用包括定向细胞治疗和免疫系统调节以及免疫应答的放射成像。因此,在一个实施方案中,本发明涉及用作诊断的本发明的抗CD96抗体和/或药物组合物。在一个实施方案中,本发明涉及本发明的抗CD96抗体和/或药物组合物,其用于预测、诊断和/或监测患有或疑似患有免疫系统功能障碍的受试者并且/或者关于预期或期望的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应的方法。在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的抗CD96抗体用于预测、诊断和/或监测患有或怀疑患有免疫系统功能障碍的受试者并且/或者关于通过在体外测定和/或检测受试者生物样品中的人CD96蛋白水平来获得预期或所需的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应。

[0371] 在一个实施方案中,抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可用于活检样品的免疫组织化学。在一个实施方案中,所述方法是体外方法。在另一个实施方案中,抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可用于检测CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的水平,或含有CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的细胞在膜表面上的水平,然后可以将其水平与某些疾病症状关联起来。本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可携

带可检测或功能性标记和/或可缀合至放射性核素或可检测标记。当使用荧光标记时,目前可用的显微镜和荧光活化细胞分选仪分析(FACS)或本领域已知的两种方法程序的组合可用于鉴定和定量特异性结合成员。本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可携带或可缀合荧光标记。示例性荧光标记包括例如反应性和缀合探针,例如氨基香豆素、荧光素和德克萨斯红、Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体可以携带或可缀合至放射性标记或放射性核素,诸如同位素 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac 和 ^{186}Re 。当使用放射性标记时,本领域已知的目前可用的计数程序可用于鉴定和定量抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的特异性结合。在标记是酶的情况下,可以通过本领域已知的任何目前使用的比色法、分光光度法、荧光分光光度法、电流分析法或气体分析法来完成检测。这可以通过在允许抗体和CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)之间形成复合物的条件下使样品或对照样品与抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体接触来实现。在样品和对照中检测并比较抗体和CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)之间形成的任何复合物。鉴于本文所述抗体与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的特异性结合,所述抗体可用于特异性检测细胞表面上的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)表达。本文所述的抗体还可用于通过免疫亲和纯化来纯化CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)。本文还包括可以制备成测试试剂盒、试剂盒或成套试剂盒形式的测定系统,用于定量分析例如CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)或CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)/CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)配体复合物的存在程度。系统、测试试剂盒、试剂盒或成套试剂盒可包含标记的组分,例如标记的抗体,和一种或多种另外的免疫化学试剂。

[0372] 5.5产生抗CD96抗体的多核苷酸、载体和方法

[0373] 在另一个方面,本文提供了包含编码特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原的抗体的核苷酸序列的多核苷酸、或者本文所述的其部分或其片段(例如,VL和/或VH;以及轻链和/或重链),以及载体例如包含用于在宿主细胞(例如,大肠杆菌和哺乳动物细胞)中重组表达的此类多核苷酸的载体。本文提供了包含编码本文提供的任何抗体的重链和/或轻链的核苷酸序列的多核苷酸,以及包含此类多核苷酸序列的载体,例如用于它们在宿主细胞例如哺乳动物细胞中有效表达的表达载体。

[0374] 如本文所用,“分离的”多核苷酸或核酸分子是与核酸分子的天然来源(例如,小鼠或人)中存在的其他核酸分子分离的多核苷酸或核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,诸如cDNA分子,在通过重组技术生产时可以基本上不含其他细胞材料或培养基,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品。例如,语言“基本上不含”包括具有小于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(特别是小于约10%)的其他材料,例如细胞材料、培养基、其他核酸分子、化学前体和/或其他化学品。在一个具体实施方案中,编码本文所述抗体的核酸分子是分离的或纯化的。

[0375] 在特定方面,本文提供了包含编码抗体的核苷酸序列的多核苷酸,所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)多肽并包含如本文所述的氨基酸序列,以及与此类抗体竞争的抗体与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)多肽的结合(例如,以剂量依赖性方式),或结合至与此类抗体相同的表位。

[0376] 在某些方面,本文提供包含编码本文所述抗体的轻链或重链的核苷酸序列的多核苷酸。多核苷酸可包含编码包含本文所述的抗体的VL FR和CDR的轻链的核苷酸序列(参见例如表1)或编码包含本文所述的抗体的VH FR和CDR的重链的核苷酸序列(参见例如表1)。

[0377] 本文还提供了编码抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的多核苷酸,所述多核苷酸是优化的,例如,通过密码子/RNA优化、用异源信号序列替换和消除mRNA不稳定元件。通过引入密码子改变和/或消除mRNA中的抑制区域来产生用于重组表达的优化的编码抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段(例如,轻链、重链、VH结构域或VL结构域)的核酸的方法可以通过采用例如美国专利号5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132和6,794,498中描述的优化方法来进行;因此,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。例如,可以在不改变核酸序列编码的氨基酸的情况下突变RNA内的潜在剪接位点和不稳定元件(例如,富含A/T或A/U的元件)以增加RNA用于重组表达的稳定性。改变利用遗传密码的简并性,例如,使用相同氨基酸的替代密码子。在某些实施方案中,可能需要改变一个或多个密码子以编码保守突变,例如具有与原始氨基酸相似的化学结构和性质和/或功能的相似氨基酸。相对于由未经优化的多核苷酸编码的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的表达,这种方法可以使抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段的表达增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更多。

[0378] 在某些实施方案中,编码本文描述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段(例如,VL结构域和/或VH结构域)的优化的多核苷酸序列可以与编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段(例如,VL结构域和/或VH结构域)的未优化的多核苷酸序列的反义(例如,互补)多核苷酸杂交。在具体实施方案中,编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的优化的核苷酸序列或片段在高度严格条件下与编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段的未优化的多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。在一个具体实施方案中,编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段的优化的核苷酸序列在高度严格、中等或较低严格杂交条件下与编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段的未优化的核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。已经描述了关于杂交条件的信息,参见例如美国专利申请公开号US 2005/0048549(例如,第72-73段),该专利以引用的方式整体并入本文。

[0379] 可以通过本领域已知的任何方法获得多核苷酸,并确定多核苷酸的核苷酸序列。编码本文描述的抗体,例如表1中描述的抗体的核苷酸序列,以及这些抗体的修饰形式可以使用本领域熟知的方法来确定,即,已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以这种方式组装以产生编码抗体的核酸。这种编码抗体的多核苷酸可以由化学合成的寡核苷酸组装(例如,如Kutmeier G等人,(1994),BioTechniques 17:242-6中所述,该文献以引用的方式整体并入本文),简言之,涉及合成包含部分编码抗体的序列的重叠寡核苷酸,这些寡核苷酸的退火和连接,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0380] 或者,编码本文所述抗体的多核苷酸可以使用本领域熟知的方法(例如,PCR和其他分子克隆方法)从合适来源(例如,杂交瘤)的核酸产生。例如,使用可与已知序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增可以使用从产生所关注的抗体的杂交瘤细胞获得的基因组DNA进行。此类PCR扩增方法可用于获得包含编码抗体的轻链和/或重链的序列的核酸。此

类PCR扩增方法可用于获得包含编码抗体的可变轻链区和/或可变重链区的序列的核酸。可以将扩增的核酸克隆到载体中以在宿主细胞中表达并进一步克隆,例如,以产生嵌合抗体和人源化抗体。

[0381] 如果包含编码特定抗体的核酸的克隆不可用,但抗体分子的序列是已知的,则可以化学合成编码免疫球蛋白的核酸或从合适的来源(例如,抗体cDNA文库或使用可与3'和5'杂交的合成引物通过PCR扩增产生的cDNA文库或核酸,优选地多聚A+RNA,分离自表达抗体的任何组织或细胞,诸如被选择表达本文所述的抗体的杂交瘤细胞)或通过使用对特定基因序列特异的寡核苷酸探针进行克隆,以鉴定例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆。然后可以使用本领域熟知的任何方法将通过PCR产生的扩增核酸克隆至可复制克隆载体。

[0382] 编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合至编码抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以作为这种DNA的来源。在分离后,DNA可置于表达载体中,然后转染宿主细胞诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞),或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的合成。

[0383] 为了产生完整抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和用于保护限制性位点的侧接序列的PCR引物可用于扩增scFv克隆中的VH或VL序列。利用本领域的技术人员已知的克隆技术,可以将PCR扩增的VH结构域克隆到表达重链恒定区例如人 γ 1或人 γ 4恒定区的载体中,并且PCR扩增的VL结构域可以克隆到表达轻链恒定区,例如人 κ 或 λ 恒定区的载体中。在某些实施方案中,用于表达VH或VL结构域的载体包含EF-1 α 启动子、分泌信号、可变区克隆位点、恒定结构域和选择标记诸如新霉素。VH和VL结构域也可以克隆到一个表达必需恒定区的载体中。然后使用本领域的技术人员已知的技术将重链转化载体和轻链转化载体共转染到细胞系中以产生表达全长抗体例如IgG的稳定或瞬时细胞系。

[0384] DNA也可以被修饰,例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替鼠科动物序列,或通过共价连接至免疫球蛋白编码序列的全部或部分非免疫球蛋白多肽。

[0385] 还提供了在高度严格、中等或较低严格杂交条件下与编码本文所述抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在具体实施方案中,本文所述的多核苷酸在高度严格、中等或较低严格杂交条件下与编码本文提供的VH结构域和/或VL结构域的多核苷酸杂交。

[0386] 杂交条件已在本领域中描述并且是本领域的技术人员已知的。例如,在严格条件下的杂交可以包括在约45℃在6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与过滤结合的DNA杂交,然后在约50-65℃在0.2×SSC/0.1%SDS中进行一次或多次洗涤;在高度严格条件下的杂交可以包括在约45℃下在6×SSC中与滤膜结合的核酸杂交,然后在约68℃下在0.1×SSC/0.2%SDS中进行一次或多次洗涤。在其他严格杂交条件下的杂交是本领域的技术人员已知和描述的,参见,例如,Ausubel FM等人编,(1989)Current Protocols in Molecular Biology,第I卷,Green Publishing Associates,Inc.和John Wiley&Sons,Inc.,New York,第6.3.1-6.3.6和2.10.3页,该文献以引用的方式整体并入本文。

[0387] 在某些方面,本文提供了表达(例如,重组)本文所述的特异性结合至CD96(例如,

人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的细胞(例如,宿主细胞)以及相关的多核苷酸和表达载体。本文提供了包含多核苷酸的载体(例如,表达载体),所述多核苷酸包含编码抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的核苷酸序列或用于在宿主细胞优选地在哺乳动物细胞(例如,CHO细胞)中重组表达的片段。本文还提供了宿主细胞,所述宿主细胞包含用于重组表达本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体(例如,人或人源化抗体)的载体。在一个特定方面,本文提供了用于产生本文所述抗体的方法,包括从宿主细胞表达此类抗体。

[0388] 本文所述的特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体(例如,全长抗体、抗体的重链和/或轻链,或本文所述的单链抗体)的重组表达通常涉及构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码本文所述的抗体分子、抗体的重链和/或轻链或其片段(例如,重链和/或轻链可变区)的多核苷酸,用于产生抗体分子的载体即可使用本领域熟知的技术通过重组DNA技术产生。因此,本文描述了通过表达含有编码核苷酸序列的抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)的多核苷酸来制备蛋白质的方法。本领域的技术人员熟知的方法可用于构建含有抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供了可复制载体,其包含编码可操作地连接至启动子的本文所述的抗体分子的核苷酸序列、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变区或其片段、或重链或轻链CDR。此类载体可以例如包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如国际公开号W0 86/05807和W0 89/01036;以及美国专利号5,122,464,这些专利以引用的方式整体并入本文),并且抗体的可变区可以被克隆到这种载体中,以表达整个重链、整个轻链或者整个重链和轻链。

[0389] 可以通过常规技术将表达载体转移至细胞(例如,宿主细胞),然后可以通过常规技术培养所得细胞以产生本文所述的抗体或其片段。因此,本文提供了宿主细胞,所述宿主细胞含有编码本文所述抗体或其片段、或者其重链或轻链、或者其片段、或者本文所述单链抗体的多核苷酸,它们可操作地连接至启动子以在宿主细胞中表达此类序列。在某些实施方案中,对于双链抗体的表达,分别编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共表达以表达整个免疫球蛋白分子,如下文所详述。在某些实施方案中,宿主细胞包含包含编码本文所述的抗体或其片段的轻链和重链二者的多核苷酸的载体。在具体实施方案中,宿主细胞含有两种不同的载体,第一载体包含编码本文所述的抗体的重链或重链可变区或其片段的多核苷酸,以及第二载体包含编码轻链的多核苷酸或本文所述抗体的轻链可变区,或其片段。在其他实施方案中,第一宿主细胞包含第一载体,所述第一载体包含编码本文所述的抗体的重链或重链可变区或其片段的多核苷酸,并且第二宿主细胞包含第二载体,所述第二载体包含编码本文所述的抗体的轻链或轻链可变区的多核苷酸。在具体实施方案中,由第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区结合以形成本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体。在某些实施方案中,本文提供了包含此类第一宿主细胞和此类第二宿主细胞的宿主细胞群。

[0390] 在一个具体实施方案中,本文提供了包含第一载体和第二载体的载体群,所述第一载体包含编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的轻链/轻链可变区的多核苷酸,所述第二载体包含编码本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的重链/重链可变区的多核苷酸。

[0391] 多种宿主表达载体系统可用于表达本文所述的抗体分子(参见,例如,美国专利号

5,807,715,该专利以引用的方式整体并入本文)。此类宿主表达系统代表可以产生和随后纯化所关注的编码序列的载体,但也代表当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所述的抗体分子的细胞。这些包括但不限于用例如重组噬菌体DNA、质粒DNA或含有抗体编码序列的粘粒DNA表达载体转化的微生物,诸如细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用例如含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母和毕赤酵母);用例如含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用例如重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染或用例如含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻,诸如莱茵衣藻);或含有例如重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS(例如COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa和NIH3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、BW、LM、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞),所述构建体含有来源于哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的启动子。在一个具体实施方案中,用于表达本文所述抗体的细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在某些实施方案中,由CHO细胞产生的抗体的重链和/或轻链可以具有被焦谷氨酸取代的N-末端谷氨酰胺或谷氨酸残基。在一个具体实施方案中,用于表达本文所述抗体的细胞是人细胞,例如人细胞系。在一个具体实施方案中,哺乳动物表达载体是pOptiVEC™或pcDNA3.3。在一个具体实施方案中,细菌细胞诸如大肠杆菌或真核细胞(例如,哺乳动物细胞),特别可用于表达完整的重组抗体分子,用于表达重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞诸如CHO细胞与载体结合,诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件是抗体的有效表达系统(Foecking MK& Hofstetter H(1986) Gene 45:101-5;和Cockett MI等人,(1990) Biotechnology 8(7): 662-7,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文)。在某些实施方案中,本文所述的抗体由CHO细胞或NS0细胞产生。在一个具体实施方案中,编码本文所述的特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体的核苷酸序列的表达受组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子的调节。

[0392] 在细菌系统中,可以根据用于表达的抗体分子的用途有利地选择许多表达载体。例如,当需要产生大量此类抗体时,对于抗体分子的药物组合物的产生,指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体可以为所期望的。此类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruether U&Mueller-Hill B(1983) EMBO J 2:1791-1794),其中抗体编码序列可单独连接到载体中lac Z编码区框内,从而产生融合蛋白;PIN载体(Inouye S&Inouye M(1985) Nuc Acids Res 13:3101-3109;Van Heeke G&Schuster SM(1989) J Biol Chem 24: 5503-5509)等等,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。例如,pGEX载体也可用于将外源多肽表达为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。一般来讲,此类融合蛋白是可溶性的,并且可以通过以下步骤轻松地从裂解细胞纯化:吸附并与基质谷胱甘肽琼脂糖珠结合,然后在存在游离谷胱甘肽的情况下洗脱。pGEX载体被设计为包含凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,从而克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0393] 在昆虫系统中,例如加州苜蓿夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)用作表达外源基因的载体。该病毒在草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。抗体编码序列可以单独克隆至病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)并置于AcNPV启

动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0394] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,所关注的抗体编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后通过体外或体内重组将该嵌合基因插入到腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区域(例如,区域E1或E3)将产生重组病毒,该病毒是存活的并且能够在受感染的宿主中表达抗体分子(例如,参见Logan J&Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655-9,该文献以引用的方式整体并入本文)。插入的抗体编码序列的有效翻译也可以需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同框,以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以有多种来源,包括天然的和合成的。可以通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等来增强表达的效率(参见,例如,Bitter G等人,(1987)Methods Enzymol.153:516-544,该文献以引用的方式整体并入本文)。

[0395] 此外,可以选择调节插入序列的表达,或以所需的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(如,糖基化)和加工(如,切割)对于蛋白质的功能可以是重要的。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征和特定机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统,以确保所表达的外源蛋白质的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于初级转录物的正确加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机器的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO,VERO,BHK,HeLa,MDCK,HEK 293,NIH 3T3,W138,BT483,Hs578T,HTB2,BT20和T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠科动物骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)PER.C6,VERO,HsS78Bst,HEK-293T,HepG2,SP210,R1.1,B-W,L-M,BSC1,BSC40,YB/20,BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施方案中,本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体在哺乳动物细胞诸如CHO细胞中产生。

[0396] 在一个具体实施方案中,本文所述的抗体具有减少的岩藻糖含量或无岩藻糖含量。可以使用本领域的技术人员已知的技术来产生此类抗体。例如,抗体可以在缺陷或缺乏岩藻糖基化能力的细胞中表达。在一个具体的实例中,敲除 α 1,6-岩藻糖基转移酶的两个等位基因的细胞系可用于产生岩藻糖含量降低的抗体。**Potelligent[®]**系统(Lonza)是此类系统的一个实例,可用于产生岩藻糖含量降低的抗体。

[0397] 对于重组蛋白的长期、高产量生产,可以产生稳定的表达细胞。例如,可以工程化稳定表达本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体的细胞系。在具体实施方案中,本文提供的细胞稳定表达结合形成本文所述抗体的轻链/轻链可变区和重链/重链可变区。

[0398] 在某些方面,不使用含有病毒复制起点的表达载体,宿主细胞可以用由适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)控制的DNA和选择性标记转化。在引入外源DNA/多核苷酸后,经工程化的细胞可以在富集培养基中生长1-2天,然后切换到选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并且允许细胞将质粒稳定整合进其染色体,并生长形成灶,继而可克隆所述灶并扩大为细胞系。该方法可以有利地用于工程化表达本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体或其片段的细胞系。此类经工程化的细胞系可特别用于筛选和评估与抗体分子直接或间接相互作用

的组合物。

[0399] 可以使用许多选择系统,包括但不限于分别地tk-细胞、hgp^rt-细胞或ap^rt-细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M等人,(1977)Cell 11(1):223-32)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶((Szybalska EH&Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026-2034)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy I等人,(1980)Cell 22(3):817-23)基因所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。此外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,它赋予氨甲蝶呤抗性(Wigler M et al.,(1980)PNAS 77(6):3567-70;O'Hare K et al.,(1981)PNAS 78:1527-31);gpt,它赋予霉酚酸抗性(Mulligan RC&Berg P(1981)PNAS 78(4):2072-6);neo,它赋予氨基糖苷类抗性G-418(Wu GY&Wu CH(1991)Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev P(1993)Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573-596;Mulligan RC(1993)Science 260:926-932;and Morgan RA&Anderson WF(1993)Ann Rev Biochem 62:191-217;Nabel GJ&Felgner PL(1993)Trends Biotechnol 11(5):211-5);和hygro,它赋予潮霉素抗性(Santerre RF等人,(1984)Gene 30(1-3):147-56),所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。可以常规应用重组DNA技术领域熟知的方法来选择所需的重组克隆,这些方法描述于,例如,Ausubel FM et al.,(eds.),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY(1993);Kriegler M,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);第12章和第13章中,Dracopoli NC et al.,(eds.),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY(1994);Colbère-Garapin F et al.,(1981)J Mol Biol 150:1-14,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0400] 抗体分子的表达水平可以通过载体扩增来提高(有关综述,参见Bebbington CR&Hentschel CCG,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987),该文献以引用的方式整体并入本文)。当载体系统表达抗体中的标记物是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体基因相关,抗体的产生也将增加(Crouse GF等人,(1983)Mol Cell Biol 3:257-66,该文献以引用的方式整体并入本文)。

[0401] 宿主细胞可以用本文所述的两种或更多种表达载体共转染,第一载体编码重链衍生的多肽,而第二载体编码轻链衍生的多肽。两种载体可以含有相同的选择性标记,使重链和轻链多肽能够等同表达。宿主细胞可以用不同量的两种或更多种表达载体共转染。例如,宿主细胞可以用以下比例的第一表达载体和第二表达载体中的任何一种进行转染:约1:1,1:2,1:3,1:4,1:5,1:6,1:7,1:8,1:9,1:10,1:12,1:15,1:20,1:25,1:30,1:35,1:40,1:45,或1:50。

[0402] 或者,可以使用编码并能够表达重链和轻链多肽的单一载体。在这种情况下,应将轻链置于重链之前以避免过量的无毒重链(Proudfoot NJ(1986)Nature 322:562-565;和Köhler G(1980)PNAS 77:2197-2199,这些文献中的每个以引用的方式整体并入本文)。重链和轻链的编码序列可以包括cDNA或基因组DNA。表达载体可以是单顺反子或多顺反子。多顺反子核酸构建体可以编码2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个基因/核苷酸序列,或在2-5、5-10或10-20个基因/核苷酸序列的范围内。例如,双顺反子核酸构建体可以按以下顺序包含

启动子、第一基因(例如,本文所述抗体的重链)和第二基因和(例如,本文所述抗体的轻链)。在这种表达载体中,两个基因的转录都可以由启动子驱动,而来自第一基因的mRNA的翻译可以通过帽依赖性扫描机制进行,而来自第二基因的mRNA的翻译可以通过与上限不相关机制,例如,通过IRES来进行。

[0403] 一旦通过重组表达产生了本文所述的抗体分子,它可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法进行纯化,例如通过色谱法(例如离子交换、亲和色谱,特别是对蛋白A后特异性抗原的亲和色谱,以及大小柱色谱)、离心、差异溶解度,或通过任何其他用于纯化蛋白质的标准技术。此外,本文所述的抗体可以与本文所述或本领域已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0404] 在具体实施方案中,本文所述的抗体是分离的或纯化的。通常,分离的抗体是基本上不含具有与分离的抗体不同的抗原特异性的其他抗体的抗体。例如,在一个具体实施方案中,本文所述的抗体制剂基本上不含细胞材料和/或化学前体。术语“基本上不含细胞材料”包括抗体制剂,其中抗体与分离或重组产生抗体的细胞的细胞组分分离。因此,基本上不含细胞物质的抗体包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(以干重计)的异源蛋白质(本文也称为“污染蛋白质”)和/或抗体变体,例如抗体的不同翻译后修饰形式或抗体的其他不同形式(例如抗体片段)的抗体制剂。当重组产生抗体时,它通常也基本上不含培养基,即培养基占蛋白质制剂体积的小于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%。当通过化学合成产生抗体时,它通常基本上不含化学前体或其他化学物质,即它与化学前体或参与蛋白质合成的其他化学物质分离。因此,此类抗体制剂具有少于约30%、20%、10%或5%(以干重计)的化学前体或除所关注的抗体之外的化合物。在一个具体实施方案中,本文所述的抗体是分离的或纯化的。

[0405] 与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)特异性结合的抗体或其片段可以通过本领域已知的用于合成抗体的任何方法产生,例如通过化学合成或通过重组表达技术产生。除非另外说明,否则本文描述的方法采用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交以及本领域技术的相关领域中的常规技术。例如,这些技术在本文引用的参考文献中有所描述,并且在文献中有所充分解释。参见,例如,Maniatis T et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987和年度更新版); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987和年度更新版) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0406] 在一个具体实施方案中,本文所述的抗体是通过涉及产生的任何方式制备、表达、产生或分离的抗体(例如,重组抗体),例如通过DNA序列的合成、基因工程。在某些实施方案

中,此类抗体包含在体内动物或哺乳动物(例如,人)的抗体种系库中不天然存在的序列(例如,DNA序列或氨基酸序列)。

[0407] 在一个方面,本文提供了一种制备特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体的方法,所述方法包括培养本文所述的细胞或宿主细胞。在一个实施方案中,所述方法在体外进行。在某个方面,本文提供了一种制备特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体的方法,所述方法包括使用本文所述的细胞或宿主细胞(例如,细胞或包含编码本文所述抗体的多核苷酸的宿主细胞)。在一个具体实施方案中,细胞是分离的细胞。在一个特定实施方案中,外源多核苷酸已经被引入细胞中。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括纯化从细胞或宿主细胞获得的抗体的步骤。

[0408] 用于产生多克隆抗体的方法是本领域已知的(参见,例如,第11章:Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 第5版,Ausubel FM等人,编,John Wiley and Sons,New York,该文献以引用的方式整体并入本文)。

[0409] 可以使用本领域已知的多种技术制备单克隆抗体,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或它们的组合。例如,可以使用杂交瘤技术生产单克隆抗体,包括本领域和教导已知的技术,例如Harlow E&Lane D,Antibodies:A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed.1988);Hammerling GJ等人,载于:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681(Elsevier,N.Y.,1981),这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。如本文所用,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。例如,单克隆抗体可以由外源表达本文所述抗体或其片段(例如,此类抗体的轻链和/或重链)的宿主细胞重组产生。

[0410] 在具体实施方案中,如本文所用,“单克隆抗体”是由单细胞(例如,产生重组抗体的杂交瘤或宿主细胞)产生的抗体,其中所述抗体特异性结合至CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96),如通过例如ELISA或本领域或本文提供的实施例中已知的其他抗原结合或竞争性结合测定法所确定。在特定实施方案中,单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施方案中,单克隆抗体是单价抗体或多价(例如,二价)抗体。在特定实施方案中,单克隆抗体是单特异性或多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。本文所述的单克隆抗体可以例如通过如Kohler G&Milstein C(1975)Nature 256:495中所述的杂交瘤方法制备,该文献以引用的方式整体并入本文,或者可以例如使用如本文描述的技术从噬菌体文库中分离。用于制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其他方法是本领域熟知的(参见,例如,第11章:Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 第5版,Ausubel FM等人,同上)。

[0411] 如本文所用,当抗体包含至少两个(例如,两个或更多个)单价结合域时,抗体与抗原多价(例如,二价)结合,每个单价结合域能够结合抗原上的表位。每个单价结合域可以结合抗原上相同或不同的表位。

[0412] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法是本领域常规和熟知的。例如,在杂交瘤方法中,免疫小鼠或其他合适的宿主动物,诸如绵羊、山羊、兔、大鼠、仓鼠或猕猴,以诱导淋巴细胞产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白质(例如,CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96))。或者,淋巴细胞可以在体外免疫。然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding JW(编),Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,第59-103页(Academic Press,1986),该文献以引用的方式整

体并入本文)。此外,RIMMS(重复免疫多位点)技术可用于免疫动物(Kilpatrick KE等人,(1997)Hybridoma 16:381-9,该文献以引用的方式整体并入本文)。

[0413] 在某些实施方案中,小鼠(或其他动物,诸如大鼠、猴、驴、猪、绵羊、仓鼠或狗)可以用抗原(例如,CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96))进行免疫,并且一旦免疫检测反应,例如在小鼠血清中检测抗原特异性抗体,即可收获小鼠脾脏并分离脾细胞。然后通过熟知的技术将脾细胞与任何合适的骨髓瘤细胞融合,例如来自美国典型培养物保藏中心(ATCC®)(Manassas,VA)的细胞系SP20的细胞,以形成杂交瘤。通过有限稀释选择和克隆杂交瘤。在某些实施方案中,免疫小鼠的淋巴结被收获并且与NS0骨髓瘤细胞融合。

[0414] 将这样制备的杂交瘤细胞接种,并在优选地含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活的事物的合适培养基中生长。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏酶,即次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基碟呤和胸苷(HAT培养基),它们是阻止HGPRT缺陷细胞生长的物质。

[0415] 具体实施方案采用有效融合的骨髓瘤细胞,支持所选抗体产生细胞稳定地高水平产生抗体,并且对培养基诸如HAT培养基敏感。在这些骨髓瘤细胞系中,有鼠科动物骨髓瘤细胞系,诸如NS0细胞系或衍生自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的细胞系,它们可从美国加利福尼亚州圣地亚哥的索克研究所(Salk Institute)细胞分布中心获得,以及SP-2或X63-Ag8.653细胞,它可从美国马里兰州罗克维尔的美国典型培养物保藏中心获得。人骨髓瘤和小鼠-人异质骨髓瘤细胞系也被描述用于生产人单克隆抗体(Kozbor D(1984)J Immunol 133:3001-5;Brodeur et al.,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987),,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。

[0416] 测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基中针对CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的单克隆抗体的产生。由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过本领域已知的方法确定,例如免疫沉淀或体外结合测定法,诸如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)。

[0417] 在鉴定产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可以通过有限稀释程序将克隆亚克隆并通过标准方法生长(Goding JW(编),Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,同上)。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI 1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以在动物体内作为腹水肿瘤生长。

[0418] 通过常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱,从培养基、腹水或血清适当地分离亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0419] 本文所述的抗体包括例如识别特定CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)的抗体片段,它可以通过本领域的技术人员已知的任何技术产生。例如,本文所述的Fab和F(ab')₂片段可以通过免疫球蛋白分子的蛋白水解切割,使用酶诸如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')₂片段)切割来产生。Fab片段对应于抗体分子的两个相同臂之一,并包含与重链的VH和CH1结构域配对的完整轻链。F(ab')₂片段包含通过铰链区中的二硫键连接的抗体分子的两个抗原结合臂。

[0420] 此外,本文所述的抗体也可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法产生。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的

表面上。特别地,编码VH和VL结构域的DNA序列从动物cDNA文库(例如,受影响组织的人或鼠科动物cDNA文库)中扩增。通过PCR将编码VH和VL结构域的DNA与scFv接头重组在一起并克隆到噬菌粒载体中。使载体在大肠杆菌中电穿孔,然后大肠杆菌被辅助噬菌体感染。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括fd和M13,并且VH和VL结构域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。表达结合特定抗原的抗原结合结构域的噬菌体可以用抗原来选择或鉴定,例如,使用标记的抗原或结合或捕获到固体表面或珠粒的抗原。可用于制备本文所述抗体的噬菌体展示方法的实例包括Brinkman U et al., (1995) J Immunol Methods 182:41-50; Ames RS et al., (1995) J Immunol Methods 184:177-186; Kettleborough CA et al., (1994) Eur J Immunol 24:952-958; Persic L et al., (1997) Gene 187:9-18; Burton DR&Barbas CF (1994) Advan Immunol 57:191-280; PCT申请号PCT/GB91/001134; 国际公开号WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, 和WO 97/13844; 以及美国专利号5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743和5,969,108公开的那些,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0421] 如上述参考文献中所述,在噬菌体选择之后,可以分离来自噬菌体的抗体编码区并用于产生完整的抗体,包括人抗体,或任何其他所需的抗原结合片段,并在任何所需的宿主中表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如,如下所述。重组产生抗体片段,诸如Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术也可以使用本领域已知的方法利用,诸如PCT公开号WO 92/22324; Mullinax RL et al., (1992) BioTechniques 12(6):864-9; Sawai H et al., (1995) Am J Reprod Immunol 34:26-34; 和Better M等人, (1988) Science 240:1041-1043公开的那些方法,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0422] 在某些实施方案中,为了产生完整抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧接序列的PCR引物可用于从模板例如scFv克隆扩增VH或VL序列。利用本领域的技术人员已知的克隆技术,可以将PCR扩增的VH结构域克隆到表达VH恒定区的载体中,并且可以将PCR扩增的VL结构域克隆到表达VL恒定区的载体中,例如人κ或λ恒定区。VH和VL结构域也可以克隆到一个表达必需恒定区的载体中。然后使用本领域的技术人员已知的技术将重链转化载体和轻链转化载体共转染到细胞系中以产生表达全长抗体例如IgG的稳定或瞬时细胞系。

[0423] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分衍生自不同免疫球蛋白分子的分子。例如,嵌合抗体可以包含与人抗体的恒定区融合的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见,例如, Morrison SL (1985) Science 229:1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) BioTechniques 4:214-221; Gillies SD et al., (1989) J Immunol Methods 125:191-202; 和美国专利号5,807,715、4,816,567、4,816,397和6,331,415,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0424] 人源化抗体能够与预定抗原结合并且其包含基本上具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的框架区和基本上具有非人免疫球蛋白(例如,鼠科动物免疫球蛋白)的氨基酸序列的CDR。在特定实施方案中,人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。抗体还可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。人源化抗体可

以选自任何种类的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。可以使用本领域已知的多种技术产生人源化抗体,包括但不限于CDR-接枝(欧洲专利号EP 239400;国际公开号W0 91/09967;和美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089)、饰面或表面重整(欧洲专利号EP 592106和EP 519596;Padlan EA(1991)Mol Immunol 28(4/5):489-498;Studnicka GM et al.,(1994)Prot Engineering 7(6):805-814;and Roguska MA et al.,(1994)PNAS 91:969-973),链改组(美国专利号5,565,332)以及例如美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、国际公开号W0 93/17105;Tan P et al.,(2002)J Immunol 169:1119-25;Caldas C et al.,(2000)Protein Eng.13(5):353-60;Morea V et al.,(2000)Methods 20(3):267-79;Baca M et al.,(1997)J Biol Chem 272(16):10678-84;Roguska MA et al.,(1996)Protein Eng 9(10):895904;Couto JR et al.,(1995)Cancer Res.55(23Supp):5973s-5977s;Couto JR et al.,(1995)Cancer Res 55(8):1717-22;Sandhu JS(1994)Gene 150(2):409-10和Pedersen JT等人,(1994)J Mol Biol 235(3):959-73中公开的技术,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。另外参见美国申请公开号US 2005/0042664 A1(2005年2月24日),该公开以引用的方式整体并入本文。

[0425] 已经描述了制备多特异性(例如双特异性抗体)的方法,参见例如美国专利号7,951,917;7,183,076;8,227,577;5,837,242;5,989,830;5,869,620;6,132,992和8,586,713,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。

[0426] 单域抗体,例如缺少轻链的抗体,可以通过本领域熟知的方法产生。参见Riechmann L&Muyldermans S(1999)J Immunol 231:25-38;Nuttall SD et al.,(2000)Curr Pharm Biotechnol 1(3):253-263;Muyldermans S,(2001)J Biotechnol 74(4):277-302;美国专利号6,005,079;以及国际公开号W0 94/04678、W0 94/25591和W0 01/44301,所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0427] 此外,与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原特异性结合的抗体继而可用于使用本领域的技术人员熟知的技术产生“模拟”抗原的抗独特型抗体。参见,例如,Greenspan NS&Bona CA(1989)FASEB J 7(5):437-444;和Nissinoff A(1991)J Immunol 147(8):2429-2438,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。

[0428] 在特定实施方案中,与本文所述的抗CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗体结合相同的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)表位的本文所述抗体是人抗体。在特定实施方案中,竞争性阻断(例如,以剂量依赖性方式)本文所述的抗体中的任一者与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)结合的本文所述抗体是人抗体。可以使用本领域已知的任何方法产生人抗体。例如,可以使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。具体而言,可以将人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞。或者,除人重链和轻链基因之外,人可变区、恒定区和多样性区可以被引入小鼠胚胎干细胞。小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以在通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座的同时或单独或同时失去功能。具体而言, J_H 区的纯合缺失阻止了内源性抗体的产生。将经修饰的胚胎干细胞扩增并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后培育嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合子代。转基因小鼠以正常方式用选定的抗原免疫,例如全部或部分抗原(例如,CD96(例如人CD96或食蟹猕猴CD96))。可以使用常规杂交瘤技

术从免疫的转基因小鼠中获得针对该抗原的单克隆抗体。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化过程中重新排列,随后发生类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术,可以产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。对于用于产生人抗体的该技术的概述,参见Lonberg N&Huszar D(1995) Int Rev Immunol 13:65-93,该文献以引用的方式整体并入本文。对于用于产生人抗体和人单克隆抗体的该技术和产生这种抗体的方案的详细讨论,参见例如国际公开号W0 98/24893、W0 96/34096和W0 96/33735;和美国专利号5,413,923,5,625,126,5,633,425,5,569,825,5,661,016,5,545,806,5,814,318和5,939,598,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。能够产生人抗体的小鼠的实例包括XenomouseTM (Abgenix, Inc.; 美国专利号6,075,181和6,150,184)、HuAb-MouseTM (Medarex, Inc./Gen Pharm; 美国专利号5,545,806和5,569,825)、Trans Chromo MouseTM (Kirin) 和KM MouseTM (Medarex/Kirin),所有这些文献均以引用的方式整体并入本文。

[0429] 与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)特异性结合的人抗体可通过本领域已知的多种方法制备,包括上述使用来源于人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。另外参见美国专利号4,444,887、4,716,111和5,885,793;和国际公开号W0 98/46645, W0 98/50433, W0 98/24893, W0 98/16654, W0 96/34096, W0 96/33735, 和W0 91/10741,所有这些专利均以引用的方式整体并入本文。

[0430] 在某些实施方案中,人抗体可以使用小鼠-人杂交瘤产生。例如,用EB病毒(EBV)转化的人外周血淋巴细胞可以与小鼠骨髓瘤细胞融合产生分泌人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤,并且可以筛选这些小鼠-人杂交瘤以确定分泌人单克隆抗体的杂交瘤,所述单克隆抗体特异性结合至靶抗原(例如,CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96))。这样的方法是已知的并且在本领域中有所描述,参见,例如,Shinmoto H et al., (2004) Cytotechnology 46:19-23;Naganawa Y et al., (2005) Human Antibodies 14:27-31,这些文献中的每个均以引用的方式整体并入本文。

[0431] 5.6试剂盒

[0432] 还提供了包含本文所述的一种或多种抗体或其药物组合物或缀合物的试剂盒。在一个具体实施方案中,本文提供药物包装或试剂盒,所述药物包装或试剂盒包括一个或多个容器,所述容器填充有本文所述的药物组合物的组分中的一种或多种,诸如本文提供的一种或多种抗体。在某些实施方案中,试剂盒含有本文所述的药物组合物和任何预防剂或治疗剂,诸如本文所述的那些。在某些实施方案中,试剂盒可包含T细胞有丝分裂原,例如植物血凝素(PHA)和/或佛波醇肉豆蔻酸酯(PMA)或TCR复合物刺激抗体,诸如抗CD3抗体和抗CD28抗体。任选地与此类容器相关的可以是管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定形式的通知,该通知反映了制造、使用或销售机构对人类施用的批准。

[0433] 还提供了可用于前述方法的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒在一个或多个容器中包含本文所述的抗体,优选地纯化的抗体。在一个具体实施方案中,本文所述的试剂盒包含基本上分离的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原作为对照。在另一个具体实施方案中,本文所述的试剂盒还包含不与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原反应的对照抗体。在另一个具体实施方案中,本文所述的试剂盒包含一种或多种元件,用于检测抗体与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原的结合(例如,所述抗体可以与可检测的底物诸如荧光化合物,酶底物、放射性化合物或发光化合物缀合,或者识别第一抗体的第二抗体可

以与可检测的底物缀合)。在具体实施方案中,本文提供的试剂盒可包括重组产生或化学合成的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原。试剂盒中提供的CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原也可以附着于固相支持物。在更具体实施方案中,上述试剂盒的检测工具包括固相支持物,CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原附着到所述固相支持物上。这种试剂盒还可以包括未附着的报告标记的抗人抗体或抗小鼠/大鼠抗体。在该实施方案中,抗体与CD96(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96)抗原的结合可以通过所述报告标记抗体的结合来检测。在一个实施方案中,本发明涉及本发明的试剂盒用于体外测定和/或检测生物样品中的CD96抗原(例如,人CD96或食蟹猕猴CD96

[0434] 6. 实施例

[0435] 本节(即第6节)中的实施例是为了说明而非限制的方式提供的。

[0436] 6.1 实施例1: 抗CD96抗体的表征

[0437] 本实施例描述了特异性结合至人CD96的抗体的表征。这些抗体的氨基酸序列列于表1中。

[0438] 6.1.1 抗人CD96抗体与纯化的人和食蟹猕猴CD96蛋白结合

[0439] 亲本和种系抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的His标记同种型2的结合

[0440] 通过表面等离子共振评估亲本抗体BA072和种系变体BA083和BA084与具有His标记的C89S突变(SEQ ID NO:129)的人CD96的全长同种型2的结合亲和力。

[0441] 简而言之,使用Biacore T200仪器进行表面等离子体共振实验,并通过Biacore T200评估软件使用1:1结合模型从每个实验计算缔合速率(K_a)、解离速率(K_d)和解离常数(K_D)。

[0442] 在运行缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表面活性剂P20)中稀释的约4 μ g/ml BA072、BA083、BA084、BA0833和BA0834在S系列蛋白A传感器芯片(GE Healthcare Ltd, 目录号29-1275-56)的单个流动池中被捕获,保持单个流通池作为参考。以10 μ l/min的流速注射15秒以达到约150个共振单位(RU),从而捕获抗体。将具有C89S突变(SEQ ID NO:129)的人CD96的全长同种型2与His标记,在运行缓冲液中以0.41、1.23、3.7、11.1、33.3、100、300nM的浓度稀释,以30 μ l/min的流速在芯片表面上流动,结合期为3分钟,解离期为10分钟或15分钟。传感器芯片在循环之间通过30秒注射10mM甘氨酸pH1.5进行再生。使用BIAevaluation 3.1软件的全局数据分析选项,对Sensorgrams进行评估并拟合到简单Langmuir 1:1交互模型。通过视觉检查偏差和曲线拟合以及评估 R_{max} 、Chi2和Tc的参数来验证数据质量。结合动力学(K_a 、 K_d 和 K_D)由传感图分析确定,如表3所示。

[0443] 表3. 抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的全长同种型2(SEQ ID NO:129)结合的动力学参数。

[0444]

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA072	8.95E+04	3.08E-04	4.34E-09
BA083	1.71E+05	2.98E-04	3.11E-09
BA084	8.98E+04	4.03E-04	4.80E-09

[0445] 亲本和种系抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的His标记同种型2的结合

[0446] 通过表面等离子共振评估亲本抗体BA101和种系变体BA102、BA103、BA104、BA105、BA106和BA107与具有His标记的C89S突变(SEQ ID NO:129)的人CD96的全长同种型2的结合

亲和力。

[0447] 简而言之,使用Biacore T200仪器进行表面等离子体共振实验,并通过Biacore T200评估软件使用1:1结合模型从每个实验计算缔合速率(K_a)、解离速率(K_d)和解离常数(K_D)。

[0448] 在运行缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表面活性剂P20)中稀释的约4 μ g/ml BA102、BA103、BA104、BA105、BA106和BA107在S系列蛋白A传感器芯片(GE Healthcare Ltd,目录号29-1275-56)的单个流动池中被捕获,保持单个流通池作为参考。以10 μ l/min的流速注射15秒以达到约200个共振单位(RU),从而捕获抗体。将具有C89S突变(SEQ ID NO:129)的人CD96的全长同种型2与His标记,在运行缓冲液中以0.41、1.23、3.7、11.1、33.3、100、300nM的浓度稀释,以30 μ l/min的流速在芯片表面上流动,结合期为3分钟,解离期为10分钟(对于g16)或a15分钟。传感器芯片在循环之间通过30秒注射10mM甘氨酸pH1.5进行再生。使用BIAevaluation 3.1软件的全局数据分析选项,对Sensorgrams进行评估并拟合到简单Langmuir 1:1交互模型。通过视觉检查偏差和曲线拟合以及评估 R_{max} 、Chi2和Tc的参数来验证数据质量。结合动力学(K_a 、 K_d 和 K_D)由传感图分析确定,如表4所示。

[0449] 表4. 抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的全长同种型2(SEQ ID NO:129)结合的动力学参数

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA101	2.77E+05	9.57E-04	4.52E-09
BA102	3.19E+05	8.34E-04	2.61E-09
BA103	3.53E+05	0.001272	3.61E-09
BA104	3.36E+05	9.90E-04	2.95E-09
BA105	3.28E+05	8.41E-04	2.56E-09
BA106	3.08E+05	8.72E-04	2.83E-09
BA107	1.15E+05	1.59E-03	1.38E-08

[0451] 亲和力成熟抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的His标记结构域1或食蟹猕猴CD96的His标记结构域1结合

[0452] 亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA093、BA092、BA091、BA089、BA086、BA094、BA088、BA090、BA087和BA085对具有His标记的C89S突变的人CD96的结构域1(SEQ ID NO:131)或具有His标记的食蟹猕猴CD96的结构域1(SEQ ID NO:134)的结合亲和力通过表面等离子体共振评估。选择亲和力成熟变体以增加对食蟹猕猴CD96的亲和力。

[0453] 简而言之,使用Biacore T200仪器进行表面等离子体共振实验,并通过Biacore T200评估软件使用1:1结合模型从每个实验计算缔合速率(K_a)、解离速率(K_d)和解离常数(K_D)。

[0454] 具体而言,在运行缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表面活性剂P20)中稀释的抗体在S系列蛋白A传感器芯片(GE Healthcare Ltd,目录号29-1275-56)的单个流动池中被捕获,保持单个流通池作为参考。以10 μ l/min的流速注射15秒以达到对动力学分析最佳的捕获水平(约430RU),从而捕获抗体。为每个实验分别确定达到最佳捕获水平的抗体浓度(每个抗体使用约8 μ g/ml)。将具有His标记的C89S突变的人CD96的结构域1(SEQ ID NO:131),或具有His标记的食蟹猕猴CD96的结构域1(SEQ ID NO:134),在浓度为

0.41、1.23、3.7、11.1、33.3、100、300nM的运行缓冲液中稀释,以30 μ l/min的流速流过芯片表面,结合期为3分钟,解离期为15分钟。传感器芯片在循环之间通过30秒注射10mM甘氨酸pH1.5进行再生。使用BIAevaluation 3.1软件的全局数据分析选项,对Sensorgrams进行评估并拟合到简单Langmuir 1:1交互模型。通过视觉检查偏差和曲线拟合以及评估 R_{max} 、Chi2和Tc的参数来验证数据质量。结合动力学(K_a 、 K_d 和 K_D)由传感图分析确定,并显示在表5(人)和表6(食蟹猕猴)中。

[0455] 表5. 抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的结构域1结合的动力学参数 (SEQ ID NO:131)。

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA093	3.33E+05	4.32E-04	1.30E-09
BA092	9.46E+05	4.66E-04	4.93E-10
BA091	8.13E+05	4.35E-04	5.35E-10
BA089	1.23E+07	2.16E-03	1.76E-09
BA086	9.80E+05	4.40E-04	4.49E-10
BA083	1.02E+06	4.99E-05	4.88E-10
BA094	8.23E+05	4.53E-04	5.51E-10

[0456]

BA088	7.79E+05	4.04E-04	5.18E-10
BA090	7.75E+05	4.58E-04	9.13E-10
BA087	6.43E+05	4.10E-04	6.39E-10
BA085	6.43E+05	3.94E-04	6.12E-10
BA072	6.87E+05	4.20E-04	6.11E-10

[0457]

[0458] 表6. 抗CD96抗体结合食蟹猕猴CD96 (SEQ ID NO:134) 结构域1的动力学参数。

[0459]

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA093	3.95E+05	4.10E-04	1.04E-09
BA092	2.33E+05	5.46E-04	2.44E-09
BA091	3.36E+05	3.70E-04	1.10E-09
BA089	4.72E+05	4.14E-04	8.77E-09
BA086	3.03E+05	7.69E-04	2.54E-09
BA083	4.23E+05	3.39E-03	8.03E-09
BA094	3.69E+05	5.42E-04	1.47E-09
BA088	3.43E+05	7.73E-04	2.26E-09
BA090	3.57E+05	1.40E-03	3.93E-09
BA087	3.67E+05	3.94E-04	1.075-9
BA085	3.14E+05	5.33E-04	1.70E-09
BA072	4.33E+05	5.09E-03	1.18E-08

[0460] 亲和力成熟抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的His标记结构域1或食蟹猕猴CD96的His标记结构域1结合

[0461] 亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA073、BA074、BA078、BA079、BA080、BA081、BA076、BA077、BA082、BA075对具有His标记的C89S突变的人CD96的结构域1 (SEQ ID NO:131) 或具有His标记的食蟹猕猴CD96的结构域1 (SEQ ID NO:134) 的结合亲和力通过表面等离子体共振评估。选择亲和力成熟变体以增加对食蟹猕猴CD96的亲和力。

[0462] 简而言之,使用Biacore T200仪器进行表面等离子体共振实验,并通过Biacore T200评估软件使用1:1结合模型从每个实验计算缔合速率(K_a)、解离速率(K_d) 和解离常数(K_D)。

[0463] 具体而言,在运行缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表面活性剂P20)中稀释的抗体在S系列蛋白A传感器芯片(GE Healthcare Ltd,目录号29-1275-56)的单个流动池中被捕获,保持单个流通池作为参考。以10 μ l/min的流速注射15秒以达到对动力学分析最佳的捕获水平(约250RU),从而捕获抗体。为每个实验分别确定达到最佳捕获水平的抗体浓度(每个抗体使用约4 μ g/ml)。将具有His标记的C89S突变的人CD96的结构域1 (SEQ ID NO:131),或具有His标记的食蟹猕猴CD96的结构域1 (SEQ ID NO:134),在浓度为0.75、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100nM的运行缓冲液中稀释,以30 μ l/min的流速流过芯片表面,结合期为3分钟,解离期为15分钟。传感器芯片在循环之间通过30秒注射10mM甘氨酸pH1.5进行再生。使用BIAevaluation 3.1软件的全局数据分析选项,对Sensorgrams进行评估并拟合到简单Langmuir 1:1交互模型。通过视觉检查偏差和曲线拟合以及评估 R_{max} 、Chi2和Tc的参数来验证数据质量。结合动力学(K_a 、 K_d 和 K_D)由传感图分析确定,并显示在表7(人)和表8(食蟹猕猴)中。

[0464] 表7. 抗CD96抗体与具有C89S突变的人CD96的结构域1结合的动力学参数 (SEQ ID NO:131)。

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA073	9.32E+05	3.25E-04	3.48E-10
BA074	9.15E+05	4.42E-04	4.83E-10
[0465] BA078	8.32E+05	3.57E-04	4.29E-10
BA079	5.54E+05	3.18E-04	5.75E-10
BA080	9.95E+05	4.41E-04	4.43E-10
BA081	7.80E+05	4.60E-04	5.90E-10
BA076	6.67E+05	2.77E-04	4.15E-10
BA077	5.65E+05	3.01E-04	5.32E-10
BA082	7.53E+05	4.39E-04	5.83E-10
[0466] BA075	5.29E+05	3.83E-04	7.25E-10
BA083	1.14E+06	4.91E-04	4.31E-10
BA072	9.69E+05	5.01E-04	5.17E-10

[0467] 表8. 抗CD96抗体结合食蟹猕猴CD96 (SEQ ID NO:134) 结构域1的动力学参数。

抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA073	5.38E+05	2.36E-04	4.38E-10

BA074	4.59E+05	2.18E-04	4.74E-10
BA078	5.11E+05	2.79E-04	5.46E-10
BA079	4.46E+05	2.66E-04	5.97E-10
BA080	5.31E+05	2.86E-04	5.40E-10
BA081	4.05E+05	3.06E-04	7.55E-10
BA076	3.46E+05	2.25E-04	6.50E-10
BA077	2.90E+05	2.17E-04	7.47E-10
BA082	4.91E+05	2.85E-04	5.81E-10
BA075	2.81E+05	2.75E-04	9.78E-10
BA083	4.40E+05	0.003536	8.04E-09
BA072	5.18E+05	0.006013	1.16E-08

[0469] 6.1.2抗人CD96抗体与表达人和食蟹猕猴CD96的细胞结合

[0470] 在多种细胞类型中测试了人抗CD96 IgG1抗体与表达人CD96或食蟹猕猴CD96的细胞结合的能力。

[0471] 抗CD96抗体与表达人CD96同种型2的Jurkat细胞的结合

[0472] 评估了亲本抗体BA072和BA101与在Jurkat细胞表面上表达的人CD96同种型2结合的能力。简而言之,用编码人CD96全长同种型2(SEQ ID NO:128)的载体转染Jurkat细胞,并选择稳定表达高水平CD96的克隆。这种稳定的细胞系在补充有10%热灭活FBS和1%嘌呤霉素(R10培养基)的RPMI-1640培养基中培养。

[0473] 对于抗体结合测定法,将细胞以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种在96孔U型底组织培养板中,并在4℃下用BA072、BA101的系列稀释液或浓度为10μg/mL至0.3ng/mL的同种型对照抗体(在补充有2%热灭活FBS(FACS缓冲液)的PBS中稀释)温育30分钟。

[0474] 对于抗体染色,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并以1:20的稀释度重悬在含有R-藻红蛋白山羊抗人IgG(Fab'2)(Fitzgerald/43C-CJ0123)的FACS缓冲液中。在4℃温育10分钟后,用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并通过流式细胞仪(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞。通过前向散射面积(FSC-A)与侧向散射面积(SSC-A)的图和另一个用于单细胞选择的FSC-A与FSC高度(FSC-H)的图,使用未染色的对照细胞对淋巴细胞群进行门控。通过对以下群体按顺序门控来分析样品:FSC-A与SSC-A、FSC-H与FSC-A、SSC-A与PE。计算平均荧光强度(MFI),并通过GraphPad Prism软件绘制数据。

[0475] 如图1A和图1B所示,BA072(图1A)和BA101(图1B)以剂量依赖性方式与表达人CD96的Jurkat细胞结合。图1A和1B中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积(AUC)和EC50值列于表9和表10中。

[0476] 表9.图1A和1B中的抗CD96抗体的AUC值。

抗体	曲 线 下 面 积 (AUC)	标准误差
BA072	417270	2658
BA101	733360	10440
同种型	4763	359.5

[0477]

[0478] 表10.图1A和1B中的抗CD96抗体的EC50值。*

[0479]	抗体	EC ₅₀ (ng/ml)	95% CI (ng/ml)
	BA072	28.23	23.45-33.91
	BA101	157.2	144-171.6

[0480] *根据2个实验计算得出。

[0481] 抗CD96抗体与表达人CD96同种型1或人CD96同种型2的CHO细胞的结合

[0482] 评估了亲本抗体BA072和BA101与在CHO细胞表面上表达的人CD96结合的能力。简而言之,用编码人CD96的全长同种型1 (SEQ ID NO:127) 或人CD96的全长同种型2 (SEQ ID NO:128) 的载体转染CHO细胞,并选择稳定表达CD96的同种型1或同种型2。这些稳定的细胞系在含有4mM L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素、1×HT-补充物和2.5μg/ml嘌呤霉素的Power CHO-2培养基中培养。

[0483] 对于抗体结合测定,将冷冻的人CD96-CHO细胞(同种型1或同种型2)等分试样在37℃解冻,然后转移到含有补充有0.5%牛血清白蛋白和0.05%叠氮化钠的PBS的试管中(FACS缓冲)。将细胞以300g离心五分钟。弃去上清液,将重悬于FACS缓冲液中的细胞以每孔2×10⁵个细胞的密度在50μL中接种在96孔U型底组织培养板中。在单独的微孔板中,制备每种抗体(即,BA072、BA101和同种型对照)的2×浓缩中间原液。抗体在FACS缓冲液中以1比3连续稀释。总共制备11种工作稀释液,范围从60μg/mL至0.000339μg/mL。然后将每种稀释液中的五十微升转移到含有人CD96-CHO细胞的微孔板中。然后将细胞在4℃下温育30分钟。对于抗体染色,用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并重悬于含有R-藻红蛋白(PE) AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG、Fcγ片段特异性FACS缓冲液(Jackson,Cat##109-116-098)中,最终稀释度1:800。在冰上温育30分钟后,用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并通过流式细胞仪(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞。使用FlowJo软件通过依次门控FSC-A与SSC-A和SSC-H与SSC-A来分析数据。计算PE的平均荧光强度(MFI)值,并通过GraphPad Prism软件绘制数据。该软件用于通过使用四参数逻辑方程的曲线拟合来确定导产生50%最大结合的抗体浓度(有效浓度50,[EC50])。

[0484] 如图2A和图2B所示,BA072(图2A)和BA101(图2B)以剂量依赖性方式与表达人CD96全长同种型1 (SEQ ID NO:127) 的CHO细胞结合。图2A和2B中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积(AUC)和EC50值列于表11和表12中。

[0485] 表11.图2A和2B中的抗CD96抗体的AUC值。

[0486]	抗体	曲线下面积 (AUC)	标准误差
	BA072	548231	12784
	BA101	257360	6734
	同种型	43478	9434

[0487] 表12.图2A和2B中的抗CD96抗体的EC50值。*

[0488]

抗体	EC ₅₀ (ng/ml)	95% CI (ng/ml)
BA072	258	169-393
BA101	393	185-834

[0489] *根据4个实验计算得出。

[0490] 如图3A和图3B所示,BA072 (图3A) 和BA101 (图3B) 以剂量依赖性方式与表达人CD96全长同种型2 (SEQ ID NO:128) 的CHO细胞结合。图3A和3B中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积 (AUC) 和EC50值列于表13和表14中。

[0491] 表13. 图3A和3B中的抗CD96抗体的AUC值。

[0492]

抗体	曲 线 下 面 积 (AUC)	标准误差
BA072	122641	3382
BA101	115846	2318
同种型	5811	851.6

[0493] 表14. 图3A和3B中的抗CD96抗体的EC50值。*

[0494]

抗体	EC ₅₀ (ng/ml)	95% CI (ng/ml)
BA072	221	17-2932
BA101	348	89 - 1352

[0495] *根据3个实验计算得出。

[0496] 抗CD96抗体与表达食蟹猕猴CD96同种型2的CHO细胞的结合

[0497] 在与以上本节所述的那些类似的实验中,测试了亲本抗体BA072和BA101结合CHO细胞的能力,所述CHO细胞经工程改造以在其细胞表面上表达食蟹猕猴CD96的同种型2 (SEQ ID NO:133)。简而言之,用编码食蟹猕猴CD96的同种型2的载体转染CHO细胞,并选择稳定表达CD96的克隆。这种稳定的细胞系在含有4mM L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素、1×HT-补充物和2.5μg/ml嘌呤霉素的Power CHO-2培养基中培养。如上文针对人CD96-CHO细胞所述测定抗体BA072和BA101结合食蟹猕猴CD96-CHO的同种型2的能力。

[0498] 如图4A和图4B所示,BA072 (图4A) 和BA101 (图4B) 以剂量依赖的方式与表达食蟹猕猴CD96的同种型2 (SEQ ID NO:133) 的CHO细胞结合。图4A和4B中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积 (AUC) 和EC50值列于表15和表16中。

[0499] 表15. 图4A和4B中的抗CD96抗体的AUC值。

[0500]

抗体	曲线下面积 (AUC)	标准误差
BA072	160331	3674
BA101	21400	689.3
同种型	6028	1824

[0501] 表16. 图4A和4B中的抗CD96抗体的EC50值。*

	抗体	EC ₅₀ (ng/ml)	95% CI (ng/ml)
[0502]	BA072	29	4-200
	BA101	N/A	N/A

[0503] *根据3个实验计算得出。

[0504] 抗CD96抗体与活化的原代人细胞的结合

[0505] 在该实验中,测试了抗CD96抗体与活化的人T细胞结合的能力。

[0506] 对于活化的T细胞,从液氮中取出冷冻的人PBMC等分试样,并立即在37℃水中解冻,直到观察到浮冰。使用PanT细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec/130-096-535)分离T细胞。然后将T细胞转移到10mL的预热R10培养基中。取出20μL并添加到380μL活力染料中以对细胞计数并使用Muse仪器检查活力。将样品以1200rpm离心五分钟,然后用R10培养基悬浮至终浓度为 1×10^6 个细胞/mL。

[0507] 将伴刀豆球蛋白A(Sigma/C-5275)添加到如上所述制备的分离的T细胞中,最终浓度为5μg/ml,用50U IL-2(R&D Systems/202-IL)吸取100μL的刺激细胞放入96孔圆底组织培养板的每个孔中,并在37℃、5%CO₂中培养八天。

[0508] 在96孔圆底板中制备一定剂量范围的抗体。首先,在缓冲液中制备600μL 50μg/ml的每种抗体(即,BA072、BA101或IgG1同种型对照)。然后通过将200μL此前的稀释液移液到400μL样品缓冲液中,用三倍稀释液滴定抗体。总共制备9种稀释液,浓度范围从10μg/ml至0.3ng/mL。

[0509] 在八天后,将样品板以2000rpm离心两分钟,弃去上清液。样品用在PBS中的

LIVE/DEAD[®]可固定近红外死细胞染色剂(Life Technologies/L10119)染色10分钟。然后将样品板以2000rpm离心两分钟,弃去上清液。然后将细胞重悬在100μL BA072、BA101或IgG1同种型对照中,浓度如图5、图6和图7所示。样品板在4℃下温育20分钟。通过加入冷样品缓冲液洗涤细胞并以2000rpm离心两分钟,弃去上清液。该洗涤重复一次。

[0510] 在11mL FAC缓冲液中制备PE标记的抗人IgG(Fab'2)二抗的最终混合物。每孔加入50μL二抗到圆底96孔板中。在4℃温育10分钟后,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并重悬在1.6%多聚甲醛的PBS溶液中。

[0511] 使用BD LSR Fortessa流式细胞仪通过流式细胞术测量抗体结合。通过FSC-A与侧向散射面积(SSC-A)的图和另一个用于单细胞选择的FSC-A与FSC-H的图,使用未染色的对照细胞对淋巴细胞群进行门控。将每个单独抗体染色的细胞管用于计算实验中使用的各种颜色的补偿。每个样品记录50,000个事件。通过对以下群体按顺序门控来分析样品:FSC-A与SSC-A、FSC-H与FSC-A、SSC-A与LIVE/DEAD以及SSC-A与PE。计算MFI。

[0512] 如图5A和图5B所示,BA072(图5A)和BA101(图5B)以剂量依赖性方式与表达CD96的活化的原代人T细胞结合。图5A和5B中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积(AUC)和EC50值列于表17和表18中。

[0513] 表17.图5A和5B中的抗CD96抗体的AUC值。

	抗体	曲 线 下 面 积 (AUC)	标准误差
[0514]	BA072	5587	57.92
	BA101	11603	207.5
	同种型	1409	90.83

[0515] 表18.图5A和5B中的抗CD96抗体的EC50值。

	抗体	EC ₅₀ (ng/ml)	95% CI (ng/ml)
[0516]	BA072	6.67	3.61-14.74
	BA101	10.54	8.58-12.95

[0517] 如图6A-6C所示,BA072 (图6A)、BA083 (图6B) 和BA084 (图6C) 以剂量依赖性方式与活化的原代人T细胞结合。图6A-C中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积 (AUC) 值列于表19中。

[0518] 表19.图6A-C中的抗CD96抗体的AUC值。

	抗体	曲 线 下 面 积 (AUC)	标准误差
[0519]	BA072	71147	714.2
	BA083	68546	2250
	BA084	69040	775.7
	同种型	23135	515.5

[0520] 如图7A-F所示,BA101 (图7A)、BA102 (图7B)、BA103 (图7C)、BA104 (图7D)、BA105 (图7E) 和BA106 (图7F) 与活化的原代人T细胞以剂量依赖的方式结合。图7A-F中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积 (AUC) 值列于表20中。

[0521] 表20.图7A-F中的抗CD96抗体的AUC值。

	抗体	曲 线 下 面 积 (AUC)	标准误差
[0522]	BA101	120826	1037
	BA102	124947	2067
	BA103	123323	1053
	BA104	122312	1367
	BA105	123476	1864
	BA106	125241	4917
	同种型	23135	515.5

[0523] 亲和力成熟抗CD96抗体与活化的原代人细胞的结合

[0524] 测试BA072、BA083、BA073、BA074、BA078、BA079、BA080、BA081、BA076、BA077、BA075、BA082和BA101与NY-ESO-1转染的CD8⁺T细胞结合的能力。简而言之,从液氮中取出冷冻的NY-ESO-1转染T细胞等分试样,并立即在37℃水中解冻,直到观察到浮冰。然后将细胞转移到9mL预热的R10NY-ESO-1培养基中。将样品以300g离心5分钟,然后用R10培养基悬浮

至终浓度为 1×10^6 个细胞/mL。将T细胞以1:1稀释度添加到组织培养瓶中,该培养瓶含有用NY-ESO-1肽转导的辐照U251MG细胞,并在37℃、5%CO₂的组织培养箱中温育,直到所有U251MG细胞被杀死。将T细胞转移到装有新鲜辐照U251MG NYESO细胞的烧瓶中并重复温育。该循环在8天内重复3次。

[0525] 在96孔圆底板中制备一定剂量范围的抗体。首先,在缓冲液中制备300μL 40μg/mL的每种抗体。然后通过将62.5μL此前的稀释液移液到250μL样品缓冲液中,将抗体以1比5连续稀释。总共制备8种稀释液,范围从40μg/mL至0.000512μg/mL。用2μL LIVE/DEAD[®]可固定近红外死细胞染色剂(Life Technologies, Cat#L10119)在500μL PBS中在4℃下对上述活化的T细胞染色15分钟。用PBS将细胞添加至10mL,然后以300g离心5分钟,弃去上清液。将细胞重悬于500μL冷FACS缓冲液中,并与以1:10稀释的人TruStain FcX[™](Fc受体封闭溶液, BioLegend, 目录号422302)在4℃下温育15分钟。然后将细胞重悬在15mL的FACS缓冲液中,并与50μL的抗CD96抗体或相关同种型对照以1:50稀释的人TruStain FcX[™](Fc受体阻断溶液, BioLegend, Cat#422302)一起在图8A-8M所示的浓度下50温育。样品板在4℃下温育60分钟。通过加入冷样品缓冲液洗涤细胞并以300g离心5分钟,弃去上清液。该洗涤重复一次。

[0526] 然后将细胞重悬在荧光标记抗体的混合物中。对于抗体染色,将细胞用冷的FACS缓冲液洗涤两次并重悬在FACS中。在FACS缓冲液中制备足以用于所有样品的荧光标记抗体混合物。然后将含有以1:100稀释的R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段驴抗人IgG(H+L)(Jackson, Cat#09-116-149)和以1:200稀释的CD4 BUV496和以1:200稀释的CD8 APC的50μL缓冲液添加到样品板中。将样品板在冰上温育30分钟。通过加入冷样品缓冲液洗涤细胞,以300g离心5分钟,弃去上清液。该洗涤重复一次。将细胞重悬在FACS缓冲液中的1.6%PFA中。

[0527] 使用BD LSR Fortessa流式细胞仪通过流式细胞术测量抗体结合。通过前向散射面积(FSC-A)与侧向散射面积(SSC-A)的图和另一个用于单细胞选择的FSC-A与FSC高度(FSC-H)的图,使用未染色的对照细胞对淋巴细胞群进行门控。将每个单独抗体染色的细胞管用于计算实验中使用的各种颜色的补偿。每个样品记录20,000个事件。通过对以下群体按顺序门控来分析样品:FSC-A与SSC-A、FSC-H与FSC-A、SSC-A与LIVE/DEAD以及CD4与CD8。计算PE的平均荧光强度(MFI)。

[0528] 如图8A-8M所示,BA072(图8A)、BA083(图8B)、BA074(图8C)、BA073(图8D)、BA079(图8E)、BA078(图8F)、BA081(图8G)、BA080(图8H)、BA077(图8I)、BA076(图8J)、BA082(图8K)、BA075(图8L)和BA101(图8M)与NY-ESO-1转染的CD8⁺T细胞以剂量依赖性方式结合。图8A-8M中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积(AUC)值列于表21中。实验进行两次,单次重复的结果具有代表性。

[0529] 表21. 图8A-8M中的抗CD96抗体的AUC值。

[0530]	抗体	曲线下面积 (AUC)	标准误差
	BA072	146011	2840
	BA083	153719	705.1
	BA073	152117	1510
	BA074	153273	847.4
	BA078	152808	731.6
	BA079	152593	1000
	BA080	150253	736.6
	BA081	146170	1925
	BA076	168753	777.1
	BA077	166930	1468
[0531]	BA082	168052	853
	BA075	170820	1379
	BA101	248634	3574
	同种型	35746	647.6

[0532] 抗CD96抗体与活化的原代食蟹猕猴细胞的结合

[0533] 在这个实施例中,测试BA072和BA101与活化的食蟹猕猴细胞结合的能力。

[0534] 从液氮中取出冷冻的食蟹猕猴外周血单个核细胞(PBMC)等分试样,并立即在37℃水中解冻,直到观察到浮冰。然后将细胞转移到9mL的预热R10培养基中。取出20μL并添加到380μL活力染料中以对细胞计数并使用Muse仪器检查活力。将样品以2000rpm离心两分钟,然后用R10培养基悬浮至终浓度为 1×10^6 个细胞/mL。

[0535] 将伴刀豆球蛋白A(Sigma/C-5275)添加到如上所述制备的PBMC细胞中,最终浓度为5μg/ml,用50U IL-2(R&D Systems/202-IL)吸取100μL的刺激细胞放入96孔圆底组织培养板的每个孔中,并在37℃、5%CO₂中培养八天。

[0536] 在96孔圆底板中制备一定剂量范围的抗体。首先,在缓冲液中制备600μL 50μg/ml的每种抗体(即,BA072、BA101或IgG1同种型对照)。然后通过将200μL此前的稀释液移液到400μL样品缓冲液中,用三倍稀释液滴定抗体。总共制备9种稀释液,浓度范围从10μg/ml至0.3ng/mL。在八天后,将样品板以2000rpm离心两分钟,弃去上清液。样品用在PBS中的LIVE/DEAD[®]可固定近红外死细胞染色剂(Life Technologies/L10119)染色10分钟。然后将样品板以2000rpm离心两分钟,弃去上清液。然后将细胞重悬于100μL BA072、BA101或IgG1同种型对照中,浓度如图9A和9B所示。样品板在4℃下温育20分钟。通过加入冷样品缓冲液洗涤细胞并以2000rpm离心两分钟,弃去上清液。该洗涤重复一次。

[0537] 在11mL FAC缓冲液中制备PE标记的抗人IgG(Fab'2)二抗的最终混合物。每孔加入50μL二抗到圆底96孔板中。在4℃温育10分钟后,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并重悬在1.6%多聚甲醛的PBS溶液中。

[0538] 使用BD LSR Fortessa流式细胞仪通过流式细胞术测量抗体结合。通过FSC-A与SSC-A的图和另一个用于选择单细胞的FSC-A与FSC-H的图,使用未染色的对照细胞对淋巴细胞群进行门控。将每个单独抗体染色的细胞管用于计算实验中使用的各种颜色的补偿。每个样品记录50,000个事件。通过对以下群体按顺序门控来分析样品:FSC-A与SSC-A、FSC-H与FSC-A、SSC-A与LIVE/DEAD以及SSC-A与PE。计算MFI。

[0539] 如图9A和9B所示,BA072 (图9A) 和BA101 (图9B) 与表达CD96的活化原代食蟹猕猴T细胞结合。图9A和9B中提供的抗CD96抗体的计算曲线下面积 (AUC) 值列于表22中。

[0540] 表22. 图9A和9B中的抗CD96抗体的AUC值。

[0541]	抗体	曲线下面积 (AUC)	标准误差
	BA072	2484	114.7
	BA101	1494	57.97
	同种型	1274	76.96

[0542] 6.1.3抗CD96抗体阻断配体与CD96的结合

[0543] 在本实施例中,测试抗CD96抗体阻断CD96与其配体PVR (也称为CD155) 之间结合的能力。

[0544] 亲本抗CD96抗体阻断CD155/PVR-Fc与表达人CD96同种型2的CHO细胞的结合

[0545] 用PBS以 1×10^6 个细胞/mL重悬表达CD96的CHO细胞。取出100 μ L细胞分装到96孔圆底板中,以1200rpm离心五分钟,弃去上清液。在FACS缓冲液中以30 μ g/mL制备每种抗体 (即,BA07、BA101或IgG1同种型对照)。然后将112 μ L此前的稀释液移液到224 μ L样品缓冲液中,用三倍稀释液滴定抗体。总共制备7种工作稀释液,范围从30 μ g/mL至0.033 μ g/mL。将50 μ L每种抗体浓度添加到96孔板中的细胞中,并在4 $^{\circ}$ C下温育1小时。

[0546] 使用LYNX快速R-PE抗体缀合试剂盒 (Bio-Rad/LNK022RPE) 将PVR-Fc (Sino Biological/10109-H02H-100) 与R-藻红蛋白缀合。将PVR-Fc-PE以5 μ g/mL重悬于PBS中,将50 μ L溶液与抗体一起添加到细胞中,并在4 $^{\circ}$ C下温育1小时。通过添加冷FAC缓冲液洗涤细胞。该洗涤重复一次,并将细胞重悬在PBS中的1.6%多聚甲醛中。

[0547] 使用BD LSR Fortessa流式细胞仪通过流式细胞术测量抗体结合。通过FSC-A与SSC-A的图和另一个用于选择单细胞的FSC-A与FSC-H的图,使用未染色的对照细胞对淋巴细胞群进行门控。将每个单独抗体染色的细胞管用于计算实验中使用的各种颜色的补偿。每个样品记录50,000个事件。通过对以下群体按顺序门控来分析样品:FSC-A与SSC-A、FSC-H与FSC-A、SSC-A与PE。计算MFI。结合百分比计算公式如下:
$$\frac{(MFI(\text{样品}) - MFI(\text{仅链霉亲和素背景}))}{(MFI(\text{无抗体完全结合}))} \times 100$$

[0548] 如图10A和10B所示,BA072 (图10A) 和BA101 (图10B) 阻断PVR-Fc与表达CD96的细胞的结合。

[0549] 亲本抗CD96抗体阻断人CD96-CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0550] 在本实施例中,测试BA072和BA101阻断人CD96与其配体人CD155 (也称为PVR) 之间结合的能力。具体而言,通过流式细胞术在体外测试BA072、BA101和同种型对照阻断在CHO

细胞上过表达的人CD96同种型2与可溶性人CD155之间结合的能力。

[0551] 简而言之,在微孔板中制备每种抗体(即BA072、BA101和同种型对照)的4×浓缩中间原液。抗体在FACS缓冲液中以1比3连续稀释。总共制备11个工作稀释液,范围从120μg/mL至0.000677μg/mL。然后将二十五微升每种稀释液转移到96孔U形底微孔板中,该微孔板含有如第6.1.2节所述制备的25μL人CD96-CHO细胞。在如下所述添加CD96配体之前,将细胞与抗体稀释液在4℃下预温育30分钟。在FACS缓冲液中制备含有300ng/mL与R-藻红蛋白(CD155-His-PE)缀合的人CD155-His的溶液。然后将五十微升这种人CD155-His-PE工作储备液添加到含有人CD96-CHO细胞和抗体的微量滴定板的孔中。在冰上温育30分钟后,用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并通过流式细胞仪(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞。使用FlowJo软件通过依次门控FSC-A与SSC-A和SSC-H与SSC-A来分析数据。计算PE的平均荧光强度(MFI)值,并通过GraphPad Prism软件绘制数据。对于每个抗体浓度,使用在不存在抗体的情况下用CD155-His-PE温育的人CD96-CHO细胞获得的MFI值和人CD96-CHO细胞自体荧光(背景)的MFI值根据等式1对实验数据进行归一化。

[0552] 等式1

[0553] %最大信号=

[0554] $(\text{MFI“抗体”}-\text{MFI“背景”})/(\text{MFI“总数”}-\text{MFI“背景”})$

[0555] 其中

[0556] “抗体”是BA072或BA101

[0557] “背景”是单独的细胞(无抗体或CD155-his-PE)

[0558] “总共”是在不存在抗体的情况下用CD155-His-PE温育的细胞

[0559] 测定抑制50%(IC50)CD155-His-PE与人CD96-CHO细胞结合的抗体浓度。IC50值是使用GraphPad Prism软件通过曲线拟合使用四参数逻辑方程计算的。

[0560] 如图11A和11B所示,BA072(图11A)和BA101(图11B)阻断人CD96与CD155的结合。计算每个抗体的平均IC50值和95%置信区间,并在表23中报告。

[0561] 表23. 抗体BA072和BA101阻断人CD96同种型2与人CD155结合的IC50值。*

[0562]	抗体名称	IC50 (几何平均值), ng/ml	95% CI, ng/ml
	BA072	97	56-165
	BA101	317	364-382

[0563] *根据4个实验计算得出。

[0564] 种系抗CD96抗体阻断表达人同种型2CD96的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0565] 在本实施例中,测试BA072、BA083和BA084阻断人CD96与其配体人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的人CD96的同种型2与可溶性人CD155之间结合的能力。

[0566] 简而言之,在FACS缓冲液中制备含有200ng/mL与R-藻红蛋白(CD155-Fc-PE)缀合的人CD155-Fc的溶液。然后将五十微升这种人CD155-Fc-PE工作储备液添加到96孔U形底微孔板的孔中。在单独的微孔板中制备每种抗体(即,BA072、BA083、BA084和同种型对照)的4×浓缩中间原液。从40μg/ml开始,抗体在FACS缓冲液中以1比3连续稀释。总共制备11种工作稀释液。然后将二十五微升每种稀释液转移到含有50μL CD155-Fc-PE的微孔板上。最后,

将按照第6.1.1节所述制备的25μL人CD96-CHO细胞(同种型2)添加到每个孔中。在冰上温育30分钟后,用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并通过流式细胞仪(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞。使用FlowJo软件通过依次门控FSC-A与SSC-A和SSC-H与SSC-A来分析数据。计算PE的平均荧光强度(MFI)值,并通过GraphPad Prism软件绘制数据,并且如第6.1.1节所述进行分析。

[0567] 如图12A-12C所示,BA072(图12A)和种系变体BA083(图12B)和BA084(图12C)阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC50值报告在表24中。

[0568] 表24. 抗体BA072、BA083和BA084阻断人CD96的同种型2与人CD155结合的IC50值。*

[0569]

抗体名称	IC50,ng/ml
BA072	235
BA083	296
BA084	271

[0570] *根据1个实验计算得出。

[0571] 通过亲和力成熟抗CD96抗体阻断表达人同种型2CD96的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0572] 在本实施例中,测试亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA085、BA086、BA087、BA089、BA090、BA088、BA091、BA092、BA093和BA094阻断人CD96与其配体人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的人CD96的同种型2与可溶性人CD155之间结合的能力。如第6.1.3节所述设置实验,不同之处在于抗体滴定开始于30μg/ml最终最高浓度,CD155-Fc-PE浓度为1μg/ml最终浓度。

[0573] 如图13A-13L所示,抗CD96抗体BA072(图13A)、BA083(图13B)、BA085(图13C)、BA086(图13D)、BA087(图13E)、BA089(图13F)、BA090(图13G)、BA088(图13H)、BA091(图13I)、BA092(图13J)、BA093(图13K)和BA094(图13L)阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC50值报告在表25中。

[0574] 表25. 阻断人CD96的同种型2与人CD155结合的亲和力成熟抗CD96抗体变体的IC50值。*

[0575]

抗体名称	IC50,ng/ml
BA072	1655
BA083	1421
BA085	321
BA086	1185
BA088	84
BA087	209
BA089	1408
BA090	2244
BA091	2449
BA092	2856
BA093	998

BA094	559
-------	-----

[0576] *根据1个实验计算得出。

[0577] 通过亲和力成熟抗CD96抗体阻断表达人CD96的CHO细胞的同种型1与可溶性人CD155/PVR的结合

[0578] 在该实施例中,测试亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA073、BA074、BA078、BA079、BA080、BA081、BA076、BA077、BA082和BA075阻断人CD96的同种型1与其配体人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的人CD96(同种型1)与可溶性人CD155之间结合的能力。如针对BA072种系变体抗体(第6.1.3节)所述设置实验,不同之处在于抗体滴定开始于30 μ g/ml最终最高浓度,CD155-Fc-PE浓度为1 μ g/ml最终浓度。

[0579] 如图14A-14L所示,抗CD96抗体BA073(图14A)、BA074(图14B)、BA078(图14C)、BA079(图14D)、BA080(图14E)、BA081(图14F)、BA076(图14G)、BA077(图14H)、BA082(图14I)、BA075(图14J)、BA083(图14K)和BA072(图14L)阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC50值报告在表26中。

[0580] 表26.阻断人CD96的同种型1与人CD155结合的亲和力成熟抗CD96抗体变体的IC50值。*

[0581]

抗体名称	IC50 (几何平均值), ng/ml
BA073	111.86
BA074	153.17
BA078	124.24
BA079	135.54
BA080	150.74
BA081	132.33
BA076	135.82
BA077	127.3
BA082	144.32
BA075	172.05
BA083	136.65
BA072	141

[0582] *根据2个实验计算得出。

[0583] 通过亲和力成熟抗CD96抗体阻断表达人同种型2CD96的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0584] 在该实施例中,测试亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA073, BA074, BA078, BA079, BA080, BA081, BA076, BA077, BA082, 和BA075阻断人CD96的同种型2与其配体人CD155 (也称为PVR) 之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的人CD96 (同种型2) 与可溶性人CD155之间结合的能力。如针对BA072种系变体抗体 (第6.1.3节) 所述设置实验,不同之处在于抗体滴定开始于30 μ g/ml最终最高浓度,CD155-Fc-PE浓度为1 μ g/ml最终浓度。

[0585] 如图15A-15L所示,抗CD96抗体BA073 (图15A)、BA074 (图15B)、BA078 (图15C)、BA079 (图15D)、BA080 (图15E)、BA081 (图15F)、BA076 (图15G)、BA077 (图15H)、BA082 (图15I)、BA075 (图15J)、BA083 (图15K)、BA072和 (图15L) 阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC50值报告在表27中。

[0586] 表27. 阻断人CD96的同种型2与人CD155结合的亲和力成熟抗CD96抗体变体的IC50值。*

[0587]

抗体名称	IC50 (几何平均值), ng/ml
BA073	155
BA074	142
BA078	134
BA079	123
BA080	195
BA081	173
BA076	157
BA077	106

[0588]

抗体名称	IC50 (几何平均值), ng/ml
BA082	193
BA075	230
BA083	176
BA072	165

[0589] *根据2个实验计算得出。

[0590] 种系抗CD96抗体阻断表达人同种型2CD96的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0591] 在本实施例中,测试BA101和种系变体BA102、BA103、BA104、BA105和BA106阻断人CD96的同种型2与其配体人CD155 (也称为PVR) 之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照通过流式细胞术在体外测试它们阻断在CHO细胞上过表达的人CD96 (同种型2) 与可溶性人CD155之间结合的能力,如上文针对BA072种系变体抗体所述 (第6.1.3节),但是抗体

滴定开始于30 μ g/ml最终最高浓度。

[0592] 如图16A-16F所示,抗CD96抗体BA101(图16A)、BA102(图16B)、BA103(图16C)、BA104(图16D)、BA105(图16E)和BA106(图16F)阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC₅₀值报告在表28中。

[0593] 表28. 抗体BA101、BA102、BA103、BA104、BA105和BA106阻断人CD96与人CD155结合的IC₅₀值。*

[0594]	抗体名称	IC ₅₀ ,ng/ml
	BA101	1421
	BA102	1383
	BA103	1379
	BA104	1488
	BA105	1499
	BA106	1571

[0595] *根据1个实验计算得出。

[0596] 种系抗CD96抗体阻断表达人同种型2CD96的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0597] 在本实施例中,测试BA101和变体BA107阻断人CD96与其配体人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的人CD96的同种型2与可溶性人CD155之间结合的能力。如针对BA072种系变体抗体(第6.1.3节)所述设置实验,不同之处在于抗体滴定开始于15 μ g/ml最终最高浓度。

[0598] 如图17A和17B所示,BA101(图17A)和BA107(图17B)抗体阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC₅₀值报告在表29中。

[0599] 表29. 抗体BA101和BA107阻断人CD96与人CD155结合的IC₅₀值。*

[0600]	抗体名称	IC ₅₀ ,ng/ml
	BA101	1419
	BA107	2302

[0601] *根据1个实验计算得出。

[0602] 种系抗CD96抗体阻断表达食蟹猕猴CD96的同种型2的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0603] 在该实施例中,测试BA072以及种系变体BA083和BA084阻断食蟹猕猴CD96(SEQ ID NO:133)的同种型2与人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的食蟹猕猴CD96的同种型2与可溶性人CD155之间结合的能力。

[0604] 简而言之,在FACS缓冲液中制备含有200ng/mL与R-藻红蛋白(CD155-Fc-PE)缀合的人CD155-Fc的溶液。然后将五十微升这种人CD155-Fc-PE工作储备液添加到96孔U形底微孔板的孔中。在单独的微孔板中制备每种抗体(即,BA072、BA083、BA084和同种型对照)的4 $\times$ 浓缩中间原液。从30 μ g/ml开始,抗体在FACS缓冲液中以1比3连续稀释。总共制备11种工作稀释液。然后将二十五微升每种稀释液转移到含有50 μ L CD155-Fc-PE的微孔板上。最后,将按照第6.1.2节所述制备25 μ L表达食蟹猕猴CD96的同种型2的CHO细胞添加到每个孔中。

在冰上温育30分钟后,用冷FACS缓冲液洗涤细胞两次,并通过流式细胞仪(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞。使用FlowJo软件通过依次门控FSC-A与SSC-A和SSC-H与SSC-A来分析数据。计算PE的平均荧光强度(MFI)值,并通过GraphPad Prism软件绘制数据,并且如第6.1.2节所述进行分析。

[0605] 如图18A-18C所示,BA072(图18A)和种系变体BA083(图18B)和BA084(图18C)阻断食蟹猕猴CD96的同种型2与CD155的结合。它们各自的IC50值报告在表30中。

[0606] 表30. 抗体BA072、BA083和BA084阻断人CD96的同种型2与食蟹猕猴CD155结合的IC50值。*

[0607]	抗体名称	IC50,ng/ml
	BA072	425
	BA083	611
	BA084	459

[0608] *根据1个实验计算得出。

[0609] 通过亲和力成熟抗CD96抗体阻断表达食蟹猕猴CD96的同种型2的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR的结合

[0610] 在本实施例中,测试亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA085、BA086、BA088、BA087、BA089、BA090、BA091、BA092、BA093和BA094阻断食蟹猕猴CD96的同种型2和人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的食蟹猕猴CD96的同种型2与可溶性人CD155之间结合的能力。如针对BA072种系变体抗体(第6.1.3节)所述设置实验,不同之处在于抗体滴定开始于30μg/ml最终最高浓度,CD155-Fc-PE浓度为1μg/ml最终浓度。

[0611] 如图19A-19L所示,抗CD96抗体BA072(图19A)、BA083(图19B)、BA085(图19C)、BA086(图19D)、BA088(图19E)、BA087(图19F)、BA089(图19G)、BA090(图19H)、BA091(图19I)、BA092(图19J)、BA093(图19K)和BA094(图19L)阻断食蟹猕猴CD96的同种型2与CD155的结合。它们各自的IC50值报告在表31中。

[0612] 表31. 阻断食蟹猕猴CD96的同种型2与猕猴CD155结合的亲和力成熟抗CD96抗体变体的IC50值。*

[0613]	抗体名称	IC50,ng/ml
	BA072	645
	BA083	821
	BA085	537
	BA086	378
	BA088	390
	BA087	451
	BA089	401
	BA090	941
	BA091	886
	BA092	1725
	BA093	347

BA094	238
-------	-----

[0614] *根据1个实验计算得出。

[0615] 食蟹猕猴CD96的同种型1CHO细胞与可溶性人CD155/PVR结合的阻断

[0616] 在该实施例中,测试亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA074、BA078、BA079、BA080、BA081、BA076、BA077、BA082、BA075和BA072阻断食蟹猕猴CD96的同种型1与人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的食蟹猕猴CD96的同种型1的同种型1与可溶性人CD155之间结合的能力。如针对BA072种系变体抗体(第6.1.3节)所述设置实验,不同之处在于抗体滴定开始于30 μ g/ml最终最高浓度,CD155-Fc-PE浓度为1 μ g/ml最终浓度。

[0617] 如图20A-20L所示,抗CD96抗体BA073(图20A)、BA074(图20B)、BA078(图20C)、BA079(图20D)、BA080(图20E)、BA081(图20F)、BA076(图20G)、BA077(图20H)、BA082(图20I)、BA075(图20J)、BA083(图20K)和BA072(图20L)阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC₅₀值报告在表32中。

[0618] 表32.阻断食蟹猕猴CD96的同种型1与人CD155结合的亲和力成熟抗CD96抗体变体的IC₅₀值。*

抗体名称	IC ₅₀ (几何平均值), ng/ml
BA073	74
BA074	74
BA078	62
BA079	54
BA080	96
[0619] BA081	121
BA076	N/A
BA077	N/A
BA082	99
BA075	142
BA083	298
BA072	365

[0620] *根据2个实验计算得出,

[0621] 但BA074

[0622] 从1个实验计算。

[0623] 表达食蟹猕猴CD96的同种型2的CHO细胞与可溶性人CD155/PVR结合的阻断

[0624] 在本实施例中,测试亲本抗体BA072、种系抗体BA083和亲和力成熟变体BA073、

BA074、BA078、BA079、BA080、BA081、BA076、BA077、BA082和BA075阻断食蟹猕猴CD96的同种型2与人CD155(也称为PVR)之间结合的能力。具体而言,这些抗体和同种型对照在体外通过流式细胞术测试其阻断在CHO细胞上过表达的食蟹猕猴CD96的同种型2与可溶性人CD155之间结合的能力。如针对BA072种系变体抗体(第6.1.3节)所述设置实验,不同之处在于抗体滴定开始于30 μ g/ml最终最高浓度,CD155-Fc-PE浓度为1 μ g/ml最终浓度。

[0625] 如图21A-21L所示,抗CD96抗体BA073(图21A)、BA074(图21B)、BA078(图21C)、BA079(图21D)、BA080(图21E)、BA081(图21F)、BA076(图21G)、BA077(图21H)、BA082(图21I)、BA075(图21J)、BA083(图21K)或BA072(图21L)完全或部分阻断人CD96与CD155的结合。它们各自的IC₅₀值报告在表33中。

[0626] 表33. 阻断食蟹猕猴CD96的同种型2与人CD155结合的亲和力成熟抗CD96抗体变体的IC₅₀值。*

[0627]	抗体名称	IC ₅₀ (几何平均值), ng/ml
	BA073	102
	BA074	93
	BA078	55
	BA079	54
	BA080	44
	BA081	26

[0628]	抗体名称	IC ₅₀ (几何平均值), ng/ml
	BA076	N/A
	BA077	N/A
	BA082	66
	BA075	135
	BA083	97
	BA072	123

[0629] *根据2个实验计算得出。

[0630] 抗CD96抗体阻断表达CD155/PVR的细胞与表达CD96的细胞的结合

[0631] 用PBS洗涤表达CD96的CHO细胞和表达PVR的CHO细胞两次,并以1200rpm的转速离心五分钟。取出20 μ L并添加到380 μ L活力染料中以对细胞计数并使用Muse仪器检查活力。将样品在1200rpm下离心五分钟,然后用来自PKH26细胞接头试剂盒(Sigma/PKH26GL)或PKH67细胞接头试剂盒(Sigma/PKH67GL)的稀释剂C悬浮至终浓度为 1×10^7 个细胞/mL。在1mL稀释

剂C中制备4 μ L PKH26红色染料并添加到1mL重悬的表达PVR的CHO细胞中,在1mL稀释剂C中制备4 μ L PKH67绿色染料并添加到1mL重悬表达CD96的CHO细胞中。将细胞与染料在室温下温育五分钟。

[0632] 将10mL PowerCHO培养基添加到每管标记细胞中,并在室温下温育1分钟。将细胞以1200rpm的转速离心五分钟,并用10mL PowerCHO培养基洗涤两次。

[0633] 将标记的细胞重悬在1mL的HBSS中,补充10%热灭活FBS和1%HEPES缓冲液,并以 8×10^5 个细胞/mL重新悬浮。将25 μ L标记的表达CD96的CHO细胞添加到96孔圆底板的每个孔中。

[0634] 在FAC缓冲液中以30 μ g/mL制备每种抗体(即BA072、BA101、其种系变体或IgG1同种型对照)。然后将112 μ L此前的稀释液移液到224 μ L样品缓冲液中,用三倍稀释液滴定抗体,制备范围为30 μ g/mL至0.1 μ g/mL。将25 μ L的每种抗体浓度添加到96孔板中的细胞中,并在室温下温育30分钟。期间不洗涤,将25 μ L标记的表达PVR的CHO细胞添加到96孔板的每个孔中,每孔总共75 μ L,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育45分钟。

[0635] 使用BD LSR Fortessa流式细胞仪通过流式细胞术立即测量缀合形成。每种染料染色的细胞管用于计算红色PKH26标记细胞(PE通道)和绿色PKH67标记细胞(FITC通道)的补偿。每个样品记录50,000个事件。通过对以下群体按顺序门控来分析样品:FSC-A与SSC-A,以及FITC与PE。如图22C所示,当不发生阻塞时,缀合物出现在散点图的Q2象限中。当阻断性抗体存在时,缀合物不能形成,并且在散点图的Q2象限中未检测到缀合物。用GraphPad Prism软件计算并绘制缀合百分比。

[0636] 如图22A和22B所示,BA072和BA101以剂量依赖性方式阻断表达PVR的细胞与表达CD96的细胞的结合(缀合物形成)。如图23所示,BA072、BA083和BA084以剂量依赖性方式阻断表达PVR的细胞与表达CD96的细胞的结合。如图24所示,BA101、BA102、BA103、BA104、BA105和BA106阻断表达PVR的细胞与表达CD96的细胞的结合。

[0637] 6.2实施例2:抗CD96抗体的功能和组合治疗

[0638] 6.2.1抗CD96抗体增强原代细胞的T_H1细胞因子分泌

[0639] 抗CD96抗体通过刺激的PBMC以剂量依赖性方式增强IL-2分泌

[0640] 在4 $\times$ 浓度的1.2mL子弹管中制备一定剂量范围的抗CD96(BA072和BA101)和同种型对照抗体首先,在R10培养基中制备600 μ L的200 μ g/mL(最终浓度为50 μ g/mL)的每种抗体。然后用10倍稀释液滴定抗体,最终浓度为50 μ g/mL至0.5ng/mL。在96孔圆底板中,将25 μ L每种抗CD96抗体或同种型对照抗体移液到相应的孔中。

[0641] 在R10培养基中以20 μ g/mL(最终浓度为5 μ g/mL)的4倍终浓度制备抗PD-1抗体及其各自的同种型对照。将25 μ L抗PD-1或同种型抗体添加到具有此前制备的抗体的相应孔中。从液氮中取出冷冻的人PBMC等分试样,并立即在37 $^{\circ}$ C水中解冻,直到观察到浮冰。将细胞转移到10mL预热的R10培养基中,并立即以1200rpm的转速离心五分钟。为了计数细胞和检查活力,取出20 μ L样品并添加到380 μ L活力染料中,混合并使用Muse仪器读数。

[0642] 将样品以1200rpm离心五分钟,并在R10培养基中重悬至 2×10^6 个细胞/mL的浓度。通过将1 μ L的1000 μ g/mL SEA添加到99 μ L R10中以制成10 μ g/mL的中间浓度,从而制成SEA的中间储备浓度。为了刺激细胞,将2倍最终浓度为2ng/mL(最终浓度为1ng/mL)的SEA添加到上述制备的细胞中。将50 μ L细胞(0.1×10^6 个细胞/孔)和SEA混合物与抗体一起添加到相应

的孔中,并在37℃和5%CO₂的加湿室中温育四天。

[0643] 在温育四天后,将板从培养箱中取出。然后将板以2000rpm的转速离心两分钟。将5 μL上清液转移至384孔AlphaLISA板进行细胞因子分析。AlphaLISA试剂盒(Perkin Elmer)用于测量IL-2分泌。简而言之,通过将2.5mL的10×AlphaLISA免疫分析缓冲液移液到22.5mL水中以制备分析缓冲液。人IL-2分析物用于制备标准稀释液。在测定缓冲液中制备1.6×AlphaLISA抗IL-2受体珠粒和生物素酰化的抗IL-2抗体的混合物。每孔加入8μL,室温避光温育。AlphaLISA板以2000rpm的转速短暂离心。在测定缓冲液中制备2.3×链霉亲和素供体珠粒中间原液。每孔加入10μL,室温避光温育。AlphaLISA板以2000rpm的转速短暂离心。使用AlphaScreen方案在EnVision读板器上测量相对光单位(RLU)。结果绘制在GraphPad Prism中,并使用非配对t检验进行统计分析。

[0644] 如图25A-25H所示,一般而言,相对于同种型对照,无论是在不存在抗PD-1的情况下还是在存在抗PD-1的情况下,BA072或BA101均增强IL-2分泌。这种反应通常是剂量依赖性的。图25A-25D表示具有第一供体的第一实验,图25E-25H表示具有第二供体的第二实验。

[0645] 抗CD96亲和力成熟抗CD96抗体通过刺激的PBMC增强IL-2分泌

[0646] 本实施例中的实验按照上文本节中的程序概述进行,并进行以下更改。抗体(BA072、其亲和力成熟变体或IgG1同种型对照抗体)在1.2ml子弹管中以0.2μg/ml(终浓度为0.05μg/ml)的4倍浓度制备,并且25μl每种抗体被添加到96孔板的相应孔中。

[0647] 如图26A-26F所示,与同种型对照相比,在存在和不存在抗PD-1的BA083、BA073、BA080和BA076的情况下引起所有供体中的IL-2分泌增加。图26A和26B表示不具有(图26A)和具有(图26B)抗PD-1抗体的一个实验。图26C和26D表示具有不同的供体、不具有(图26C)和具有(图26D)抗PD-1抗体的第二实验。图26E和26F表示具有不同的供体、不具有(图26E)和具有(图26F)抗PD-1抗体的第三实验。

[0648] 如图27A-27F所示,一般而言,相对于同种型对照,无论是在不存在抗PD-1的情况下还是在存在抗PD-1的情况下,BA072、BA074、BA079、BA081、BA077、BA082和BA075均增强IL-2分泌。图27A和27B表示不具有(图27A)和具有(图27B)抗PD-1的一个实验。图27C和27D表示具有不同的供体、不具有(图27C)和具有(图27D)抗PD-1抗体的第二实验。图27E和27F表示具有不同的供体、不具有(图27E)和具有(图27F)抗PD-1抗体的第三实验。

[0649] 6.2.2在人CD96T细胞报告基因测定中,抗CD96抗体阻断CD96并增加TCR-NFAT和NFκB信号传导

[0650] CD96阻断NFAT-Luc和NFκB-Luc Jurkat细胞

[0651] 在含有1μg/mL嘌呤霉素的R10培养基中培养内部工程化的Jurkat细胞,以表达CD96和NFAT-荧光素酶或NFκB-荧光素酶。这些Jurkat报告细胞以1200rpm的转速离心五分钟,然后以 1×10^6 个细胞/mL重悬在R10培养基中。仅将抗CD28抗体(BD Biosciences/347698)以2μg/mL的4×最终浓度(最终浓度为0.5μg/mL)添加到NFκB-荧光素酶报告基因Jurkat细胞中。将25μL报告细胞添加(不一起)到检测板上具有CHO细胞和抗体的相应孔中,并在37℃和5%CO₂下温育4小时。

[0652] 在本实施例中,测试可溶性BA072阻断表达CD96的报告细胞和表达PVR的细胞之间的结合以及通过NFAT和NFκB增强T细胞受体(TCR)信号传导的能力。

[0653] 将内部工程化以表达高水平PVR和抗CD3(克隆OKT3)的分选和克隆CHO细胞,以5×

10⁵个细胞/mL重悬在R10培养基中。将50μL细胞 (2.5×10⁴个细胞) 涂铺在白色96孔平底测定板上,并在37℃和5%CO₂下温育4小时至贴壁。

[0654] BA072和IgG1同种型对照抗体在R10培养基中以40μg/mL的4×最终浓度(最终浓度为10μg/mL) 制备,并通过将112μL此前的稀释液移液到224μL样品缓冲液中进行三倍稀释来滴定。在温育4小时后,将25μL的每种抗体浓度添加到测定板中附着有CHO细胞的相应孔中。

[0655] 在4小时后,将板平衡至室温15分钟,然后每孔加入100μL Nano-Glo萤光素酶检测试剂(Promega/N1120)。然后将混合物在室温下温育五分钟,并使用读板器(Envision) 测量发光。RLU的计算式为:RLU_(诱导)-RLU_(背景)。δRLU的计算式为:RLU(BA072)-RLU(同种型),并使用GraphPad Prism绘制。

[0656] 如图28A和28B所示,相对于同种型对照,BA072在表达人CD96的Jurkat报告细胞(图28C) 中增加TCR-NFAT(图28A) 和NFκB(图28B) 信号传导。

[0657] 在类似的实验中,研究了CD266表达对CD96诱导的信号传导的影响。如上文所述针对图28A-28C进行实验;然而,使用的报告细胞是内部工程化以表达CD96和NFAT-萤光素酶的Jurkat细胞(图29A) 或内部工程化以表达CD96和NFAT-萤光素酶且CD226被敲除的Jurkat细胞(图29B)。如图29A和29B所示,相对于同种型对照,BA072增加了TCR-NFAT,这表明这种作用不依赖于CD226表达。

[0658] 6.3实施例3:抗CD96抗体的Fc变体

[0659] 在这个实施例中,分析了Fc区/Fc γ R相互作用对BA072的结合和功能活性的影响。具体而言,BA072的VH区用各种Fc主链表达,如表34中所汇总。

[0660] 表34.BA072的Fc变体。

[0661]	抗体名称	抗体描述 (根据 EU 编号系统编号)	重 链 SEQ ID NO:	轻 链 SEQ ID NO:
	BA072	IgG1	76	102
	BA108	BA072 的 N297A 变体	116	102
	BA109	BA072 的 S239D/A330L/I332E 变体	118	102
	BA110	BA072 的 S267E/L328F 变体	120	102

[0662] 然后在功能测定法中测试这些BA072的Fc变体,如下文所述。

[0663] 6.3.1BA072的Fc变体增强了与CD16⁺NK细胞共培养的CD96⁺Jurkat细胞的杀伤力

[0664] 研究了BA072的Fc变体在表达CD96的Jurkat细胞和表达CD16的自然杀伤(NK) 细胞的共培养物中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC) 活性的能力。简而言之,Jurkat细胞在补充有10%胎牛血清(Benchmark目录#100-106,批次A69E00F) 和1%Pen Strep谷氨酰胺(Gibco目录#10378-016) 的RPMI 1640(Corning目录#10-040-CM) 中培养。NK细胞在补充有5%人血清(Sigma目录#H4522)、1%Pen Strep谷氨酰胺(Gibco目录#10378-016)、100个单位/mL的IL-2(R&D Systems目录#202-16) 和100个单位/mL的IL-15(R&D Systems目录#247-ILB) 的RPMI 1640(Corning目录#10-040-CM) 中培养。通过在1200rpm下离心5分钟使两百万个Jurkat细胞沉淀。通过将沉淀重悬于1mL 0.5μM CellTrace Far Red(Invitrogen目录#C34565) 的PBS(Corning目录#21-040-CV) 中并在37℃和5%CO₂下温30分钟,从而对细胞进行染色。在温育后,加入9mL PBS,以300g离心5分钟使细胞沉淀。然后将细胞沉淀重悬于

含有1 μ M CellEvent半胱天冬酶-3/7绿色检测试剂(Invitrogen目录#C10423)的Jurkat培养基中。抗体在NK培养基中稀释为其最终浓度的三倍。染色的Jurkat细胞稀释至每毫升62.5万个细胞,NK细胞稀释至每毫升62.5万个细胞。该测定法在384孔显微板(Greiner,目录号781936)中进行,每孔移取20 μ L抗体、20 μ L染色的Jurkat细胞(12500个细胞)和20 μ L NK细胞(12500个细胞)。

[0665] 其后立即使用ImageXpress显微共聚焦高通量显微镜(Molecular Devices)在环境控制(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂)下进行实时成像,在四个小时的过程中,每30分钟从分别针对Jurkat细胞和半胱天冬酶3/7阳性Jurkat细胞的Cy5(CellTrace Far Red)和FITC(半胱天冬酶3/7)通道获取图像。使用MetaXpress分析软件(Molecular Devices)进行图像分析。从Cy5通道鉴定Jurkat细胞,并对来自FITC通道的每个细胞的半胱天冬酶3/7信号量进行定量。半胱天冬酶3/7强度高于背景的细胞被指定为凋亡细胞。将凋亡细胞的数量相对于每种条件的总细胞计数归一化,以确定杀伤力百分比。

[0666] 如图30A-30C所示,Fc增强的BA072(BA109)(图30B)比BA072(图30A)和BA072(BA108)的“Fc沉默”N297A突变和同种型对照更大程度地促进了表达CD96的Jurkat细胞的杀伤力(图30C)。

[0667] 6.3.2通过Fc γ RIIIA进行的抗CD96抗体Fc变体信号传导

[0668] 在另一个实施例中,测试BA072Fc变体活化表达Fc γ RIIIA^{V158}的报告细胞的能力。

[0669] 将25 μ L靶细胞(即,在内部工程化以表达第6.1.2节中描述的高水平人CD96的Jurkat细胞)添加到ADCC测定板的孔中(1.5 $\times$ 10⁶个细胞/mL)。在补充有4%低IgGFBS(Promega/G711A)(ADCC检测缓冲液)的RPMI-1640中,将抗体(即BA072、其Fc变体或相应的同种型对照)的三倍系列稀释液制备成范围为30 μ g/mL至0.0003 μ g/mL的3 $\times$ 最终浓度(最终浓度范围为10 μ g/mL至0.0001 μ g/mL)。将25 μ L的3 $\times$ 抗体稀释液添加到含有靶细胞的检测板孔中。将效应细胞(即,过表达具有高亲和力158V/V多态性的Fc γ RIIIA CD16A的Jurkat NFAT-荧光素酶报告细胞,培养不到六周;Promega/G7102)在ADCC测定缓冲液中以6 $\times$ 10⁶个细胞/mL重悬,并且将25 μ L加入到检测板上的每个孔中(150,000个细胞/孔)。然后将测定板在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育20小时。靶细胞表面上的抗体/抗原复合物与效应细胞表面上的CD16A的结合将导致向报告构建体发出信号并表达荧光素酶。

[0670] 第二天,将板平衡至室温15分钟,然后每孔加入75 μ L Bio-Glo荧光素酶检测试剂(Promega/G7940)。然后将混合物在室温下温育5-10分钟,并使用读板器(Envision)测量发光。RLU的计算式为:RLU_(诱导)-RLU_(背景)。

[0671] 如图31A-31C所示,对于Fc γ RIIIA结合和信号传导,BA072(图31A)、BA108(图31C)和同种型对照未表现出信号传导,而BA109(图31B)表现出通过Fc γ RIIIA的信号传导。

[0672] 6.3.3T细胞对抗CD96抗体Fc变体的反应

[0673] 在本实施例中,测试BA072的Fc变体在原代T细胞:APC共培养测定中引发T细胞反应的能力。

[0674] 在2 $\times$ 浓度的1.2ml子弹管中制备一定剂量范围的抗CD96抗体BA072(IgG1)和BA108(BA072的Fc沉默变体)以及同种型对照抗体。首先,在R10培养基中制备600 μ L的100 μ g/ml(最终浓度为50 μ g/ml)的每种抗体。然后用10倍稀释液滴定抗体,最终浓度为50 μ g/ml

至0.05ng/mL。在96孔圆底板中,将50 μ L每种抗CD96抗体或同种型对照抗体移液到相应的孔中。

[0675] 从液氮中取出冷冻的人PBMC等分试样,并立即在37℃水中解冻,直到观察到浮冰。将细胞转移到10mL预热的R10培养基中,并立即以1200rpm的转速离心5分钟。取出每个样品20 μ L并添加到380 μ L活力染料中以对细胞计数并使用Muse仪器检查活力。

[0676] 将样品以1200rpm离心5分钟,并在R10培养基中重悬至 2×10^6 个细胞/mL的浓度。通过将1 μ L的1000 μ g/mL SEA添加到99 μ L R10中以制成10 μ g/mL的中间浓度,从而制成SEA的中间储备浓度。为了刺激细胞,将1ng/mL的SEA添加到上述制备的细胞中。将50 μ L细胞(0.1×10^6 个细胞/孔)和SEA混合物与抗体一起添加到相应的孔中,并在37℃和5%CO₂的加湿室中温育4天。

[0677] 在温育四天后,将板从培养箱中取出。然后将板以2000rpm的转速离心2分钟。将5 μ L上清液转移至384孔AlphaLISA板进行细胞因子分析。AlphaLISA试剂盒(Perkin Elmer)用于测量IL-2分泌。简而言之,通过将2.5mL的10 $\times$ AlphaLISA免疫分析缓冲液移液到22.5mL水中以制备分析缓冲液。人IL-2分析物用于制备标准稀释液。在测定缓冲液中制备 $1.6 \times$ AlphaLISA抗IL-2受体珠粒和生物素酰化的抗IL-2抗体的混合物。每孔加入8 μ L,室温避光温育。AlphaLISA板以2000rpm的转速短暂离心。在测定缓冲液中制备 $2.3 \times$ 链霉亲和素供体珠粒中间原液。每孔加入10 μ L,室温避光温育。AlphaLISA板以2000rpm的转速短暂离心。使用AlphaScreen方案在EnVision读板器上测量相对光单位(RLU)。结果绘制在GraphPad Prism中,并使用非配对t检验进行统计分析。

[0678] 如图32A和32B所示,相对于同种型对照,BA072在来自供体1和供体2的PBMC样品中引发增强的IL-2分泌。这种反应通常是剂量依赖性的。由BA108引发的IL-2分泌与同种型对照相当。

[0679] 6.4实施例4:CD96内化

[0680] 6.4.1表达CD96的Jurkat细胞的CD96内化

[0681] 研究BA072变体在表达CD96的Jurkat细胞上诱导CD96抗体依赖性内化的能力。简而言之,Jurkat细胞在补充有10%胎牛血清(Benchmark目录#100-106,批次A69E00F)和1% Pen Strep谷氨酰胺(Gibco目录#10378-016)的RPMI 1640(Corning目录#10-040-CM)中培养。通过在1200rpm下离心5分钟使两百万个Jurkat细胞沉淀。通过将沉淀在PBS(Corning目录#21-040-CV)中重悬于1mL的0.5 μ M CellTrace Far Red(Invitrogen目录#C34565)和1:500稀释的HaloTag配体AF488(Promega目录#G100A)中,并在37℃和5%CO₂下温育15分钟,从而对细胞进行染色。在温育后,加入9mL PBS,以300g离心5分钟使细胞沉淀。然后将细胞沉淀重悬在Jurkat培养基中。抗体在培养基中稀释为 $2 \times$ 最终浓度(10 μ g/mL)。将染色的Jurkat细胞稀释至每毫升40万个细胞。该测定法在384孔显微板(Greiner,目录号781936)中进行,每孔移30 μ L抗体和30 μ L染色的Jurkat细胞(12500个细胞)。

[0682] 其后立即使用ImageXpress显微共聚焦高通量显微镜(Molecular Devices)在环境控制(37℃,5%CO₂)下进行实时成像,在八个小时的过程中,每小时从针对Jurkat细胞的Cy5(CellTrace Far Red)和FITC(HaloTag Ligand)通道获取图像。使用MetaXpress分析软件(Molecular Devices)进行图像分析。从Cy5通道鉴定Jurkat细胞,并对来自FITC通道的每个细胞的HaloTag配体信号量进行定量。HaloTag配体强度高于背景的细胞被指定为内化

细胞。将内化细胞的数量相对于每种条件的总细胞计数归一化,以确定内化百分比。

[0683] 如图33A-33D所示,相对于同种型对照,BA072(图33A)、BA101(图33B)、参考A(图33C)和PVR-Fc(图33D)促进了CD96在表达CD96的Jurkat细胞上的更高水平的内化。

[0684] 如图34所示,相对于同种型对照,BA072(图34A)和种系变体BA083(图34B)和BA084(图34C)促进了CD96在表达CD96的Jurkat细胞上更高水平的内化。

[0685] 6.4.2原代细胞中的CD96内化

[0686] 在本实施例中,分析抗CD96抗体BA072至表达CD96的原代活化T细胞中的内化。使用与吡咯并苯并二氮杂草(PBD)缀合的抗人IgGFc抗体评估BA072或IgG1同种型对照抗体的内化。这种二抗药物缀合物 α HFc-PBD与抗体(例如BA072)结合并导致细胞毒性有效负载PBD在内化后释放到细胞的细胞质中。

[0687] 简而言之,将表达CD96的预活化原代T细胞以每孔 5×10^4 的密度接种在白底组织培养板中。使用二抗药物缀合物 α HFc-PBD,将BA072或IgG同种型对照抗体与 α HFc-PBD(与一抗比例为1:1)相结合的三倍稀释液的七点剂量滴定($3.3\mu\text{g/ml}$ 至 $0.003\mu\text{g/ml}$)以 $100\mu\text{l}$ /孔的最终体积添加到细胞中。将细胞与一抗和二抗药物缀合物在 37°C 和 $5\%\text{CO}_2$ 下温育72小时。

[0688] 在温育后,将 $90\mu\text{l}$ 复原的CellTiter-Glo(Promega)添加到每个孔中,并将细胞在室温下温育5分钟。使用Envision仪器(Perkin Elmer)记录产生的发光。

[0689] 如图35A和35B所示,BA072在两个单独的供体中诱导了比同种型对照更多的细胞存活减少。因为细胞死亡是内化的标志,所以该结果表明,与同种型对照相比,BA072增强了CD96的内化。

[0690] 6.5实施例5:抗CD96抗体的表位结合

[0691] 6.5.1BA072和BA101 Fab与人CD96的Fc标记的全长同种型2或人CD96的Fc标记的结构域1结合

[0692] BA072 Fab和BA101 Fab与具有Fc标记的人CD96(SEQ ID NO:128)的全长同种型2或具有Fc标记的人CD96(SEQ ID NO:130)的结构域1的结合通过表面等离子共振评估。

[0693] 简而言之,使用Biacore T200仪器进行表面等离子体共振实验,并使用Biacore T200评估软件3.0目测检查传感图。

[0694] 具体而言,在运行缓冲液(10mM HEPES、 150mM NaCl、 3mM EDTA和 0.05% 表面活性剂P20)中稀释 $17\mu\text{g/ml}$ 具有Fc标记的人CD96(SEQ ID NO:128)的全长同种型2和 $5\mu\text{g/ml}$ 具有Fc标记的人CD96(SEQ ID NO:130)的结构域1,使用 $10\mu\text{l/min}$ 流速的60秒进样在单个流动池上捕获S系列蛋白A传感器芯片(GE Healthcare Ltd,目录#29-1275-56),以达到约900个共振单位(RU)。保持单个流动池作为参考。浓度为 100nM 的BA072 Fab、BA101 Fab或参考A Fab以 $30\mu\text{l/min}$ 的流速流过每个流动池,结合期为3分钟,解离期为20分钟。传感器芯片在循环之间通过40秒注射 10mM 甘氨酸pH1.5进行再生。使用Biacore T200评估软件3.0目视检查传感图。

[0695] 如图36A所示,抗人CD96抗体BA072 Fab、BA101 Fab和参考AFab与人CD96的纯化重组全长同种型2(SEQ ID NO:128)结合。如图36B所示,BA072 Fab与人CD96(SEQ ID NO:130)的结构域1结合。BA101 Fab与人CD96的结构域1(SEQ ID NO:130)的结合更有限。未观察到人CD96(SEQ ID NO:130)的结构域1和参考A Fab之间的结合。

[0696] 6.5.2BA072和BA101 Fab的表位结合

[0697] BA072 Fab和BA101 Fab与具有Fc标记的人CD96 (SEQ ID NO:128) 的全长同种型2或具有Fc标记的人CD96 (SEQ ID NO:130) 的结构域1的结合通过表面等离子共振评估。

[0698] 简而言之,使用Biacore T200仪器进行表面等离子体共振实验,并使用Biacore T200评估软件3.0目测检查传感图。

[0699] 具体而言,在运行缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表面活性剂P20)中稀释17 μ g/ml具有Fc标记的人CD96 (SEQ ID NO:128) 的全长同种型2和5 μ g/ml具有Fc标记的人CD96 (SEQ ID NO:130) 的结构域1,使用10 μ l/min流速的60秒进样在单个流动池上捕获S系列蛋白A传感器芯片 (GE Healthcare Ltd, 目录#29-1275-56), 以达到约900个共振单位(RU)。保持单个流动池作为参考。浓度为100nM的BA072 Fab或BA101 Fab以30 μ l/min的流速流过每个流动池,结合期为3分钟。使用Biacore T200的双注射方案,在结合期之后立即以等摩尔浓度进行初始Fab加上第二Fab组合的第二注射(即100nM BA072 Fab+BA101 Fab、100nM BA072 Fab+参考A Fab、100nM BA101Fab+BA072 Fab,或100nM BA101 Fab+BA072 Fab)。双Fab注射液以30 μ l/min的流速流过流通池,结合期为3分钟,然后是10分钟的解离期。传感器芯片在循环之间通过40秒注射10mM甘氨酸pH1.5进行再生。使用Biacore T200评估软件3.0目视检查传感图。

[0700] 如图37A所示,参考A Fab在结合BA072 Fab后能够结合人CD96的全长同种型2,这表明BA072结合CD96上相对于参考A的不同表位。如图37B所示,参考A Fab在BA101 Fab结合后能够结合全长人CD96,这表明BA101结合CD96上相对于参考A不同的表位。如图37C所示,在BA072 Fab结合后,参考A Fab和BA101都不能结合人CD96的结构域1。如图37D所示,BA101 Fab能够结合CD96的结构域1。参考A Fab在BA101 Fab结合后不能与CD96的结构域1结合。BA072 Fab在结合BA101 Fab后能够结合CD96的结构域1,这表明BA072结合相对于BA101不同的表位。

[0701] ***

[0702] 本发明在范围上不受本文所述的具体实施方案的限制。实际上,根据上述说明和附图,除了所述的那些修改之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。此类修改旨在落在所附权利要求的范围内。

[0703] 本文引用的所有参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)以引用的方式整体并入本文并且用于所有目的,达到如同每个单独的参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)被具体和单独指出一样以引用的方式整体并入用于所有目的的程度。

[0704] 其他实施方案在以下权利要求范围内。

亲本抗 CD96 抗体与表达人 CD96 的同种型 2 的 Jurkat 细胞的结合

图 1B

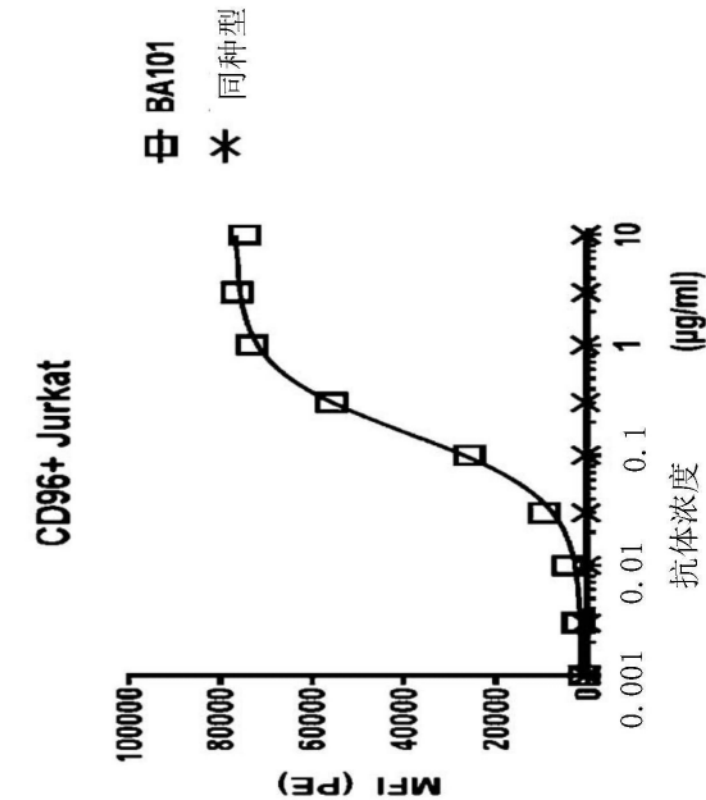
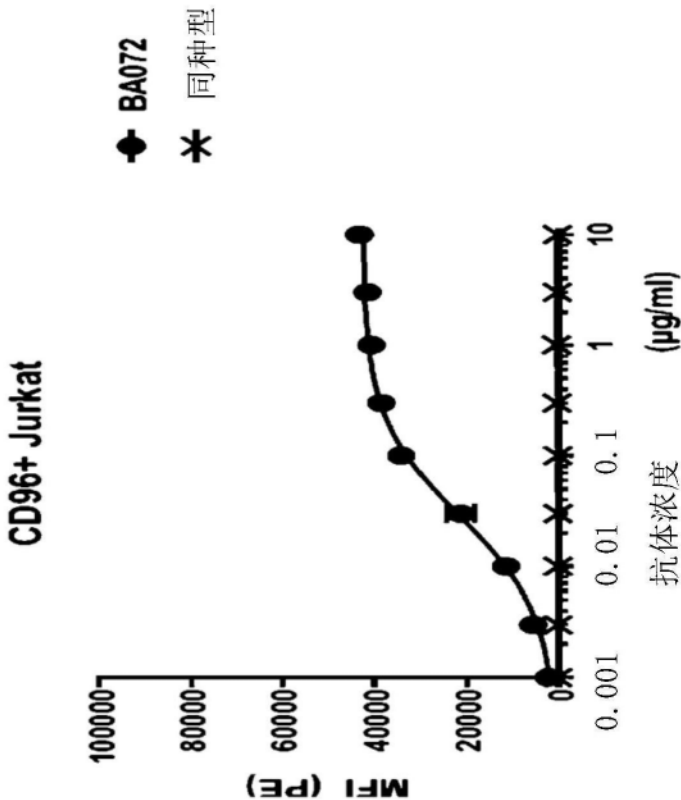


图 1A



亲本抗 CD96 抗体与表达人 CD96 的同种型 1 的 CHO 细胞的结合

图 2A

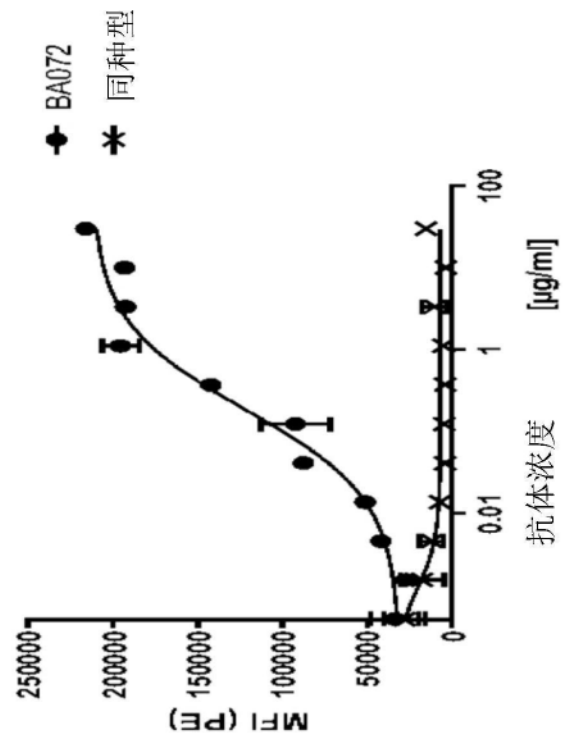
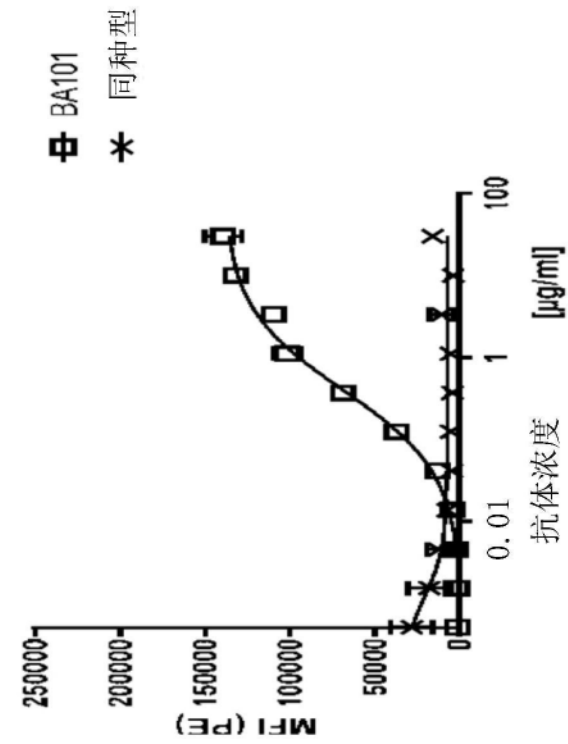


图 2B



亲本抗 CD96 抗体与表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞的结合

图 3A

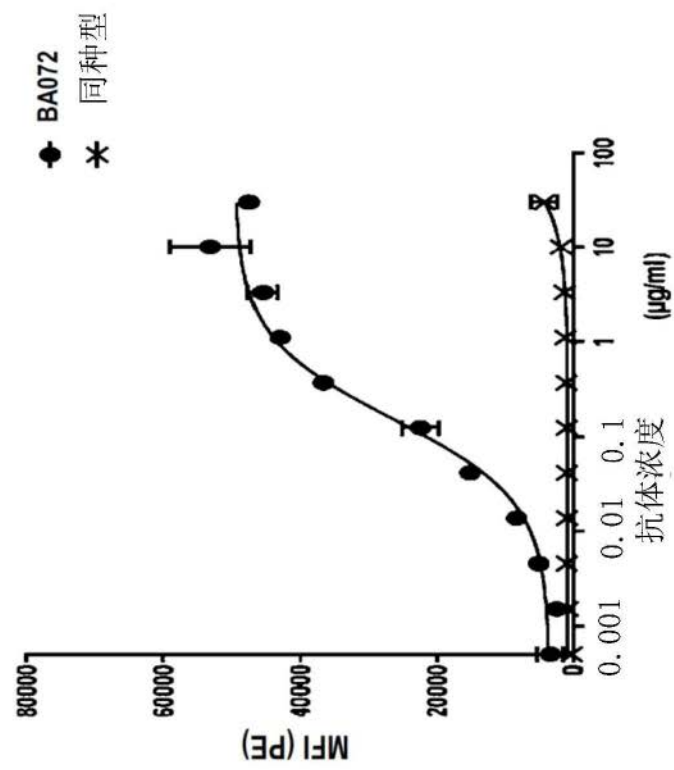
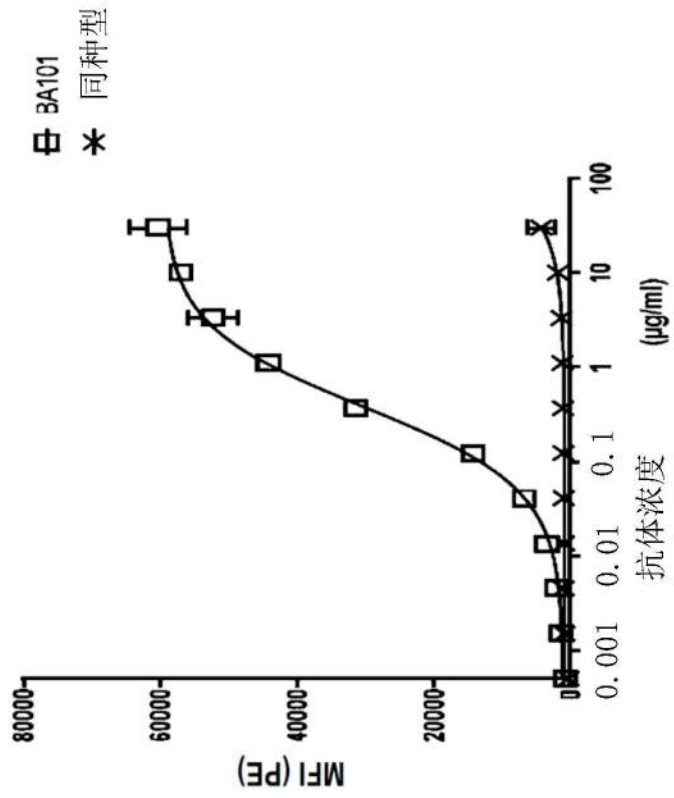


图 3B



亲本抗 CD96 抗体与表达食蟹猕猴 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞的结合

图 4A

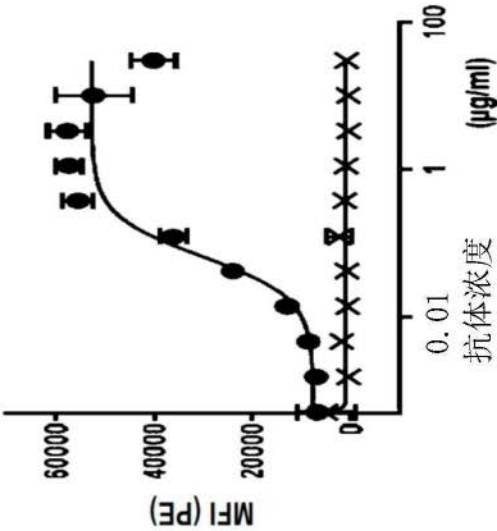
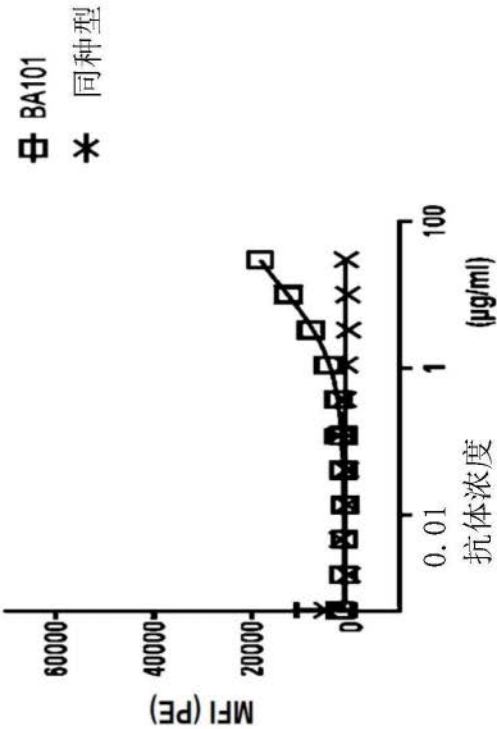


图 4B



亲本抗 CD96 抗体与表达 CD96 的活化原代人 T 细胞的结合

图 5A

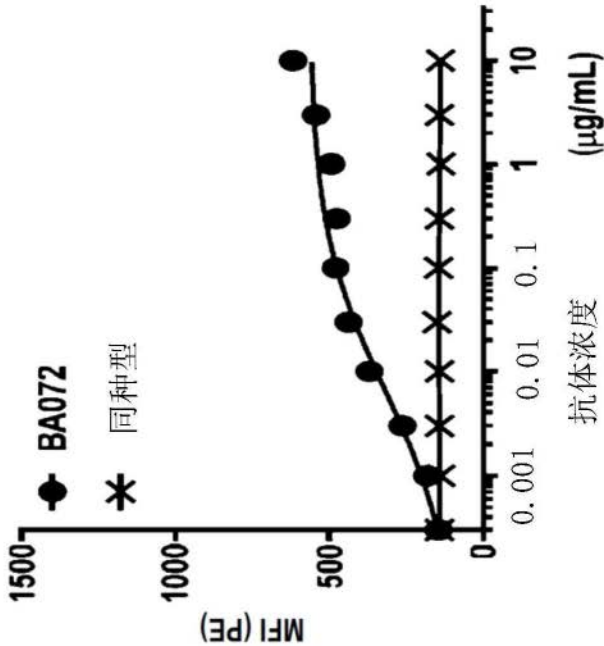
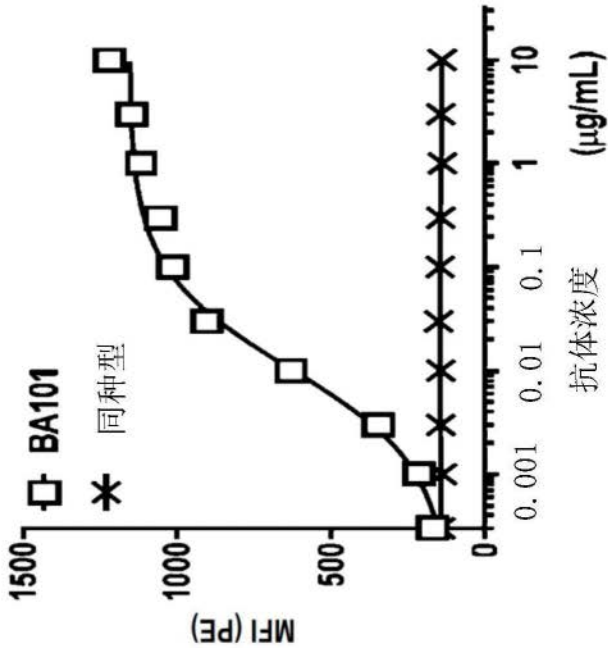


图 5B



抗 CD96 抗体与表达 CD96 的活化人原代 T 细胞的结合

图 6A

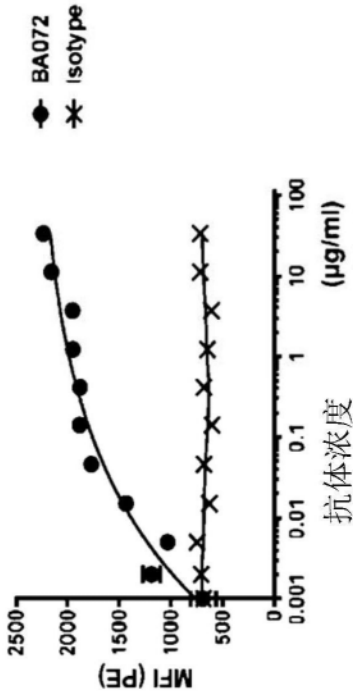


图 6C



抗 CD96 抗体与表达 CD96 的人原代细胞的结合

图 7A

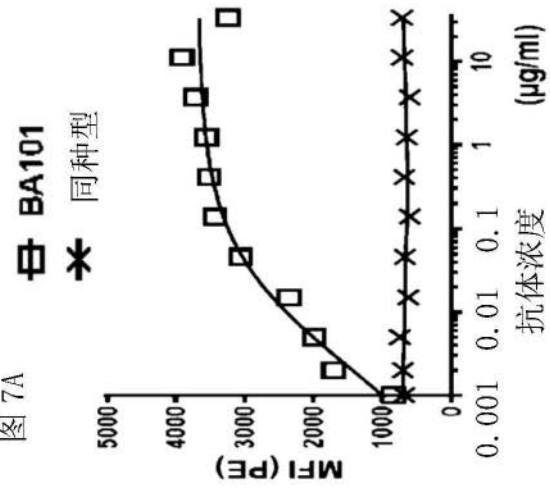


图 7B

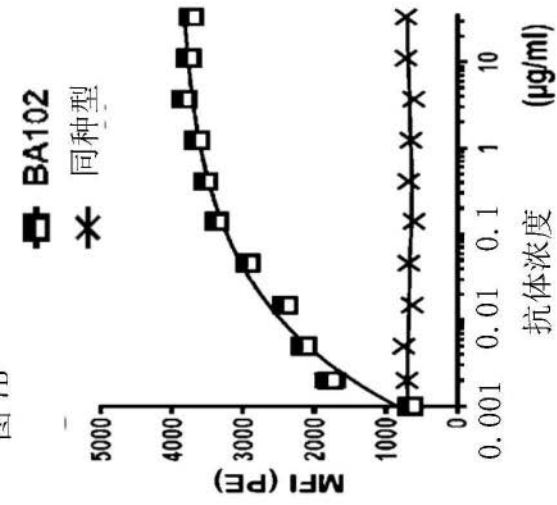
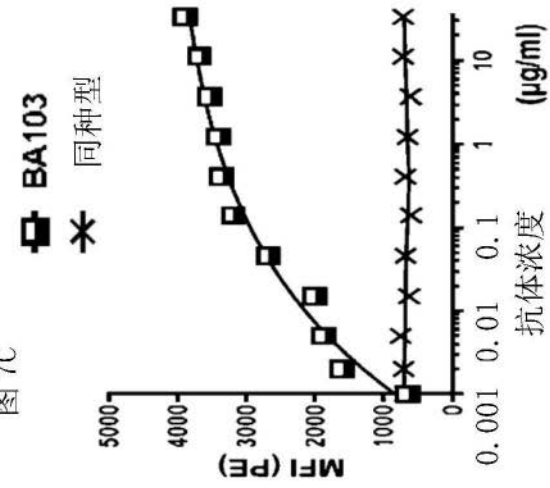


图 7C



抗 CD96 抗体与表达 CD96 的人原代细胞的结合

图 7D

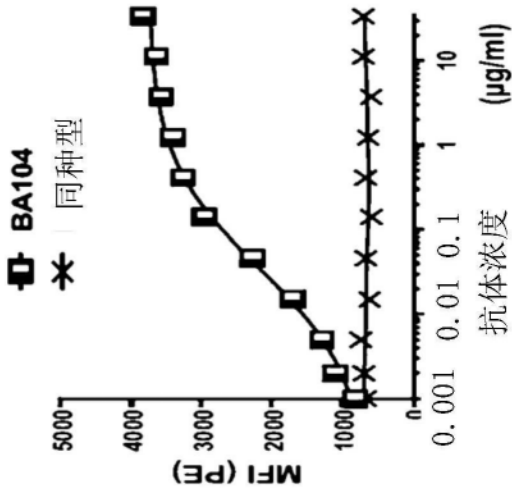


图 7E

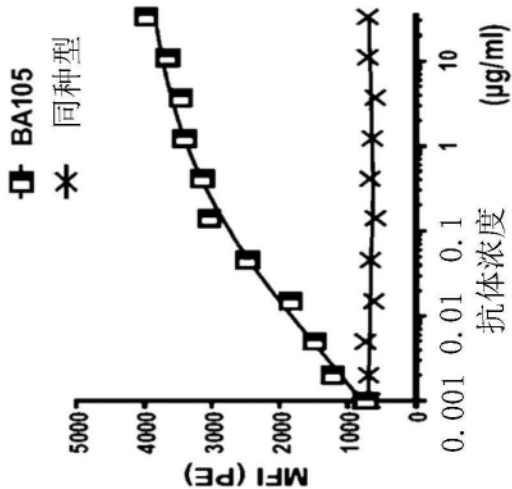
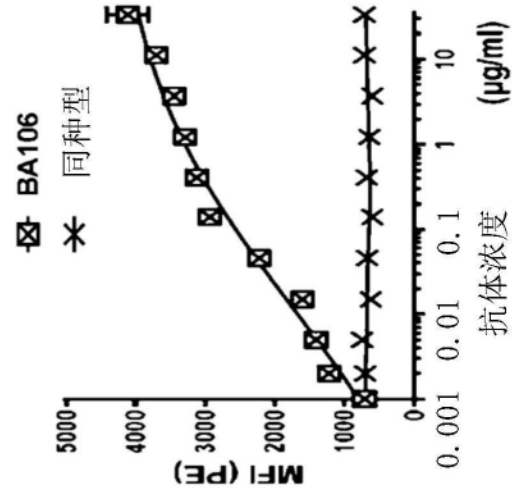
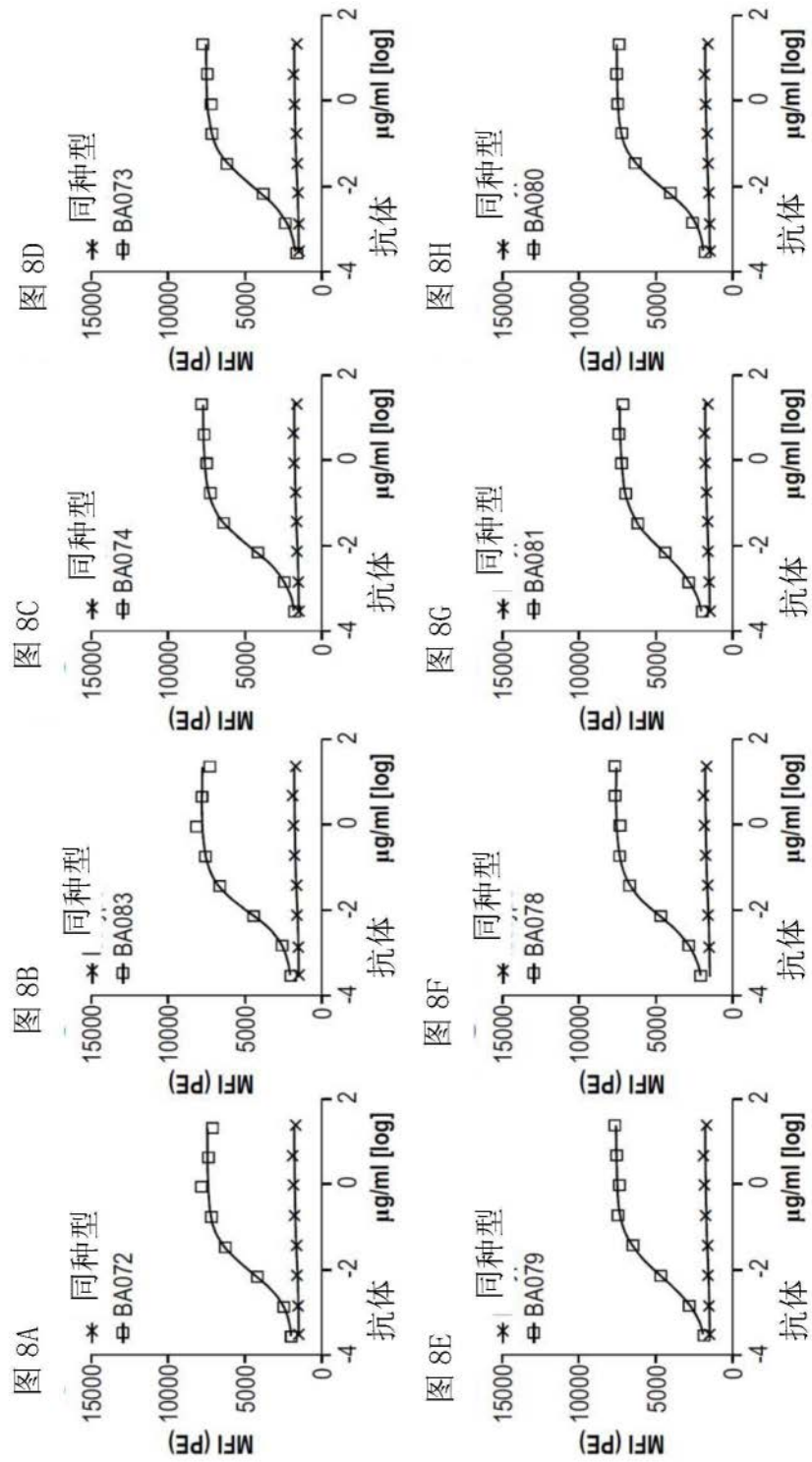
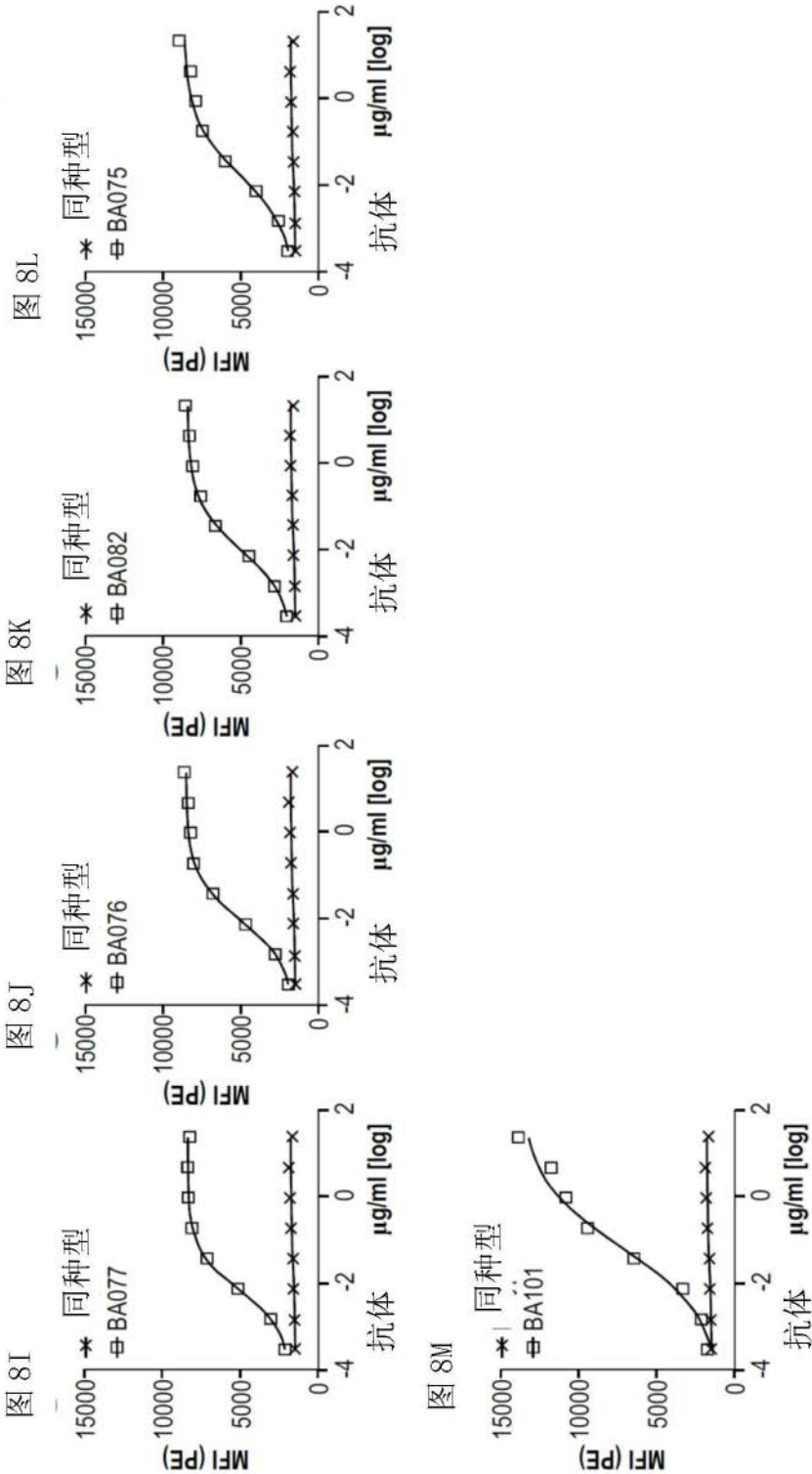


图 7F



抗 CD96 抗体与表达 CD96 的 NY-ESO-1 转染的 CD8⁺ T 细胞的结合

抗 CD96 抗体与表达 CD96 的 NY-ESO-1 转染的 CD8+ T 细胞的结合



亲本抗 CD96 抗体与表达 CD96 的食蟹猴原代细胞的结合

图 9A

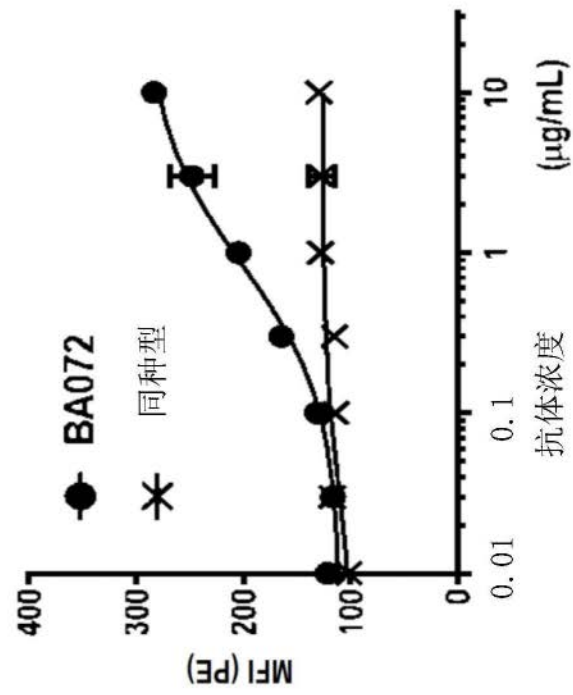
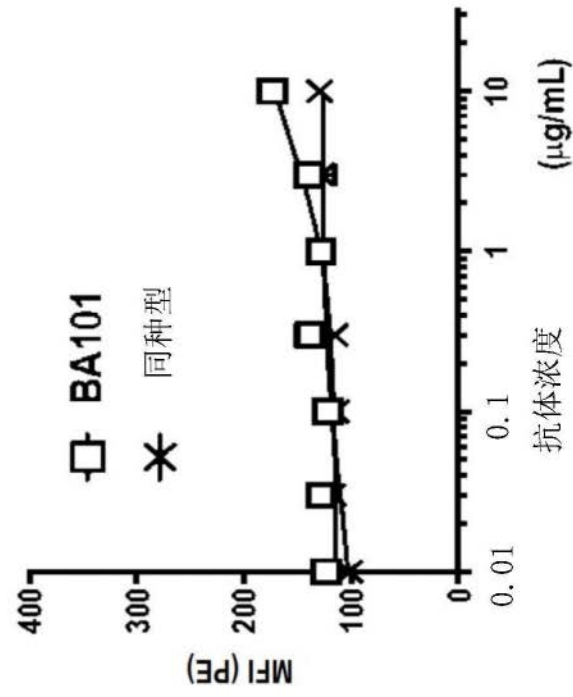


图 9B



PVR-Fc 和表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被亲本抗 CD96 抗体阻断

图 10A

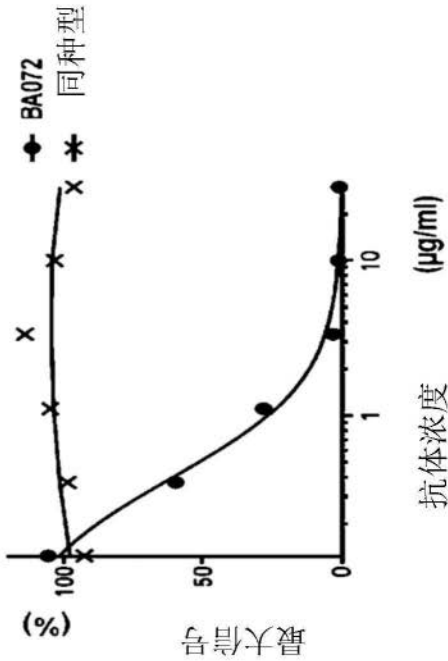
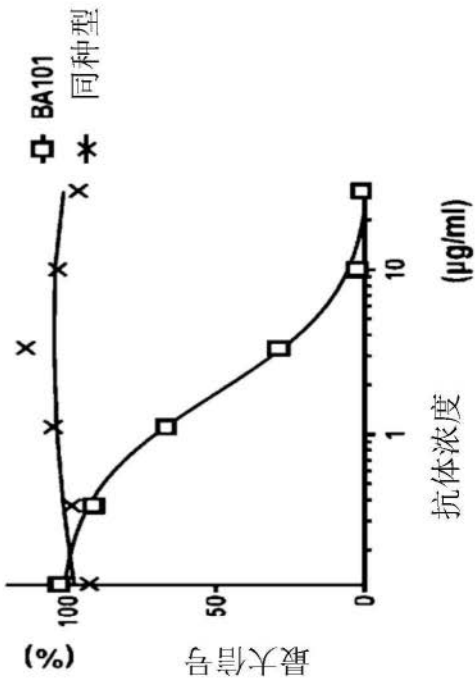


图 10B



PVR-His 和表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被亲本抗 CD96 抗体阻断

图 11A

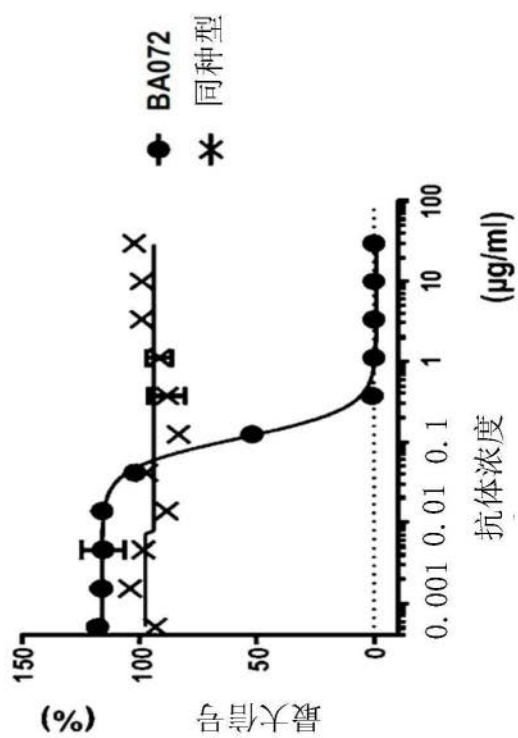
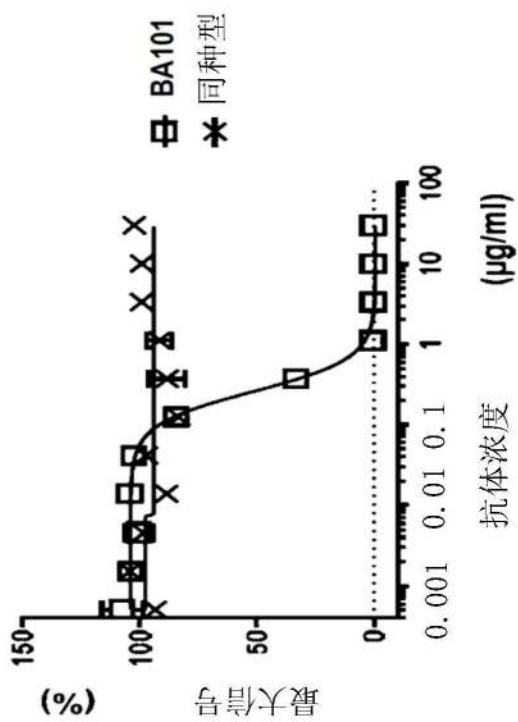


图 11B



PVR-Fc 和表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断

图 12A

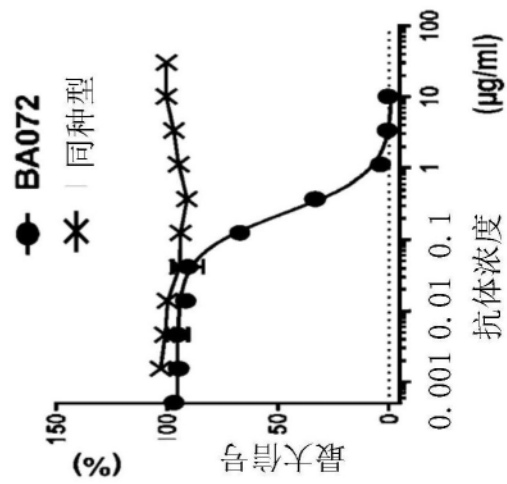


图 12B

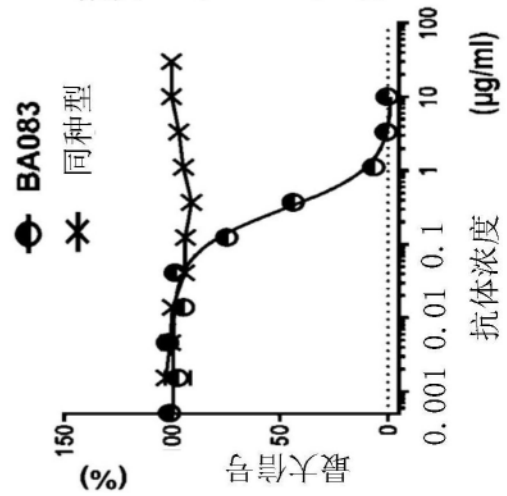
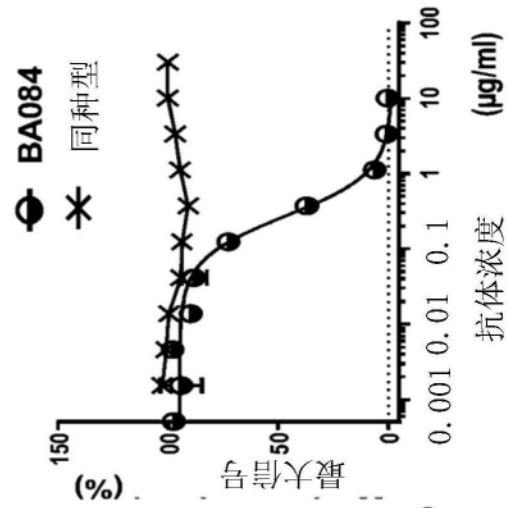
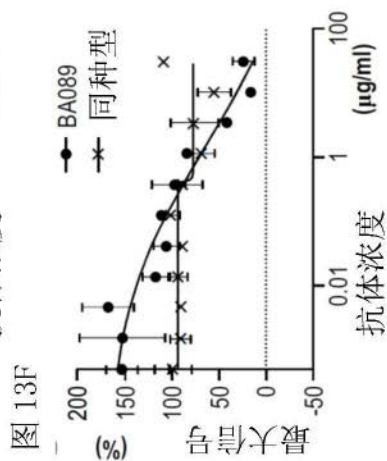
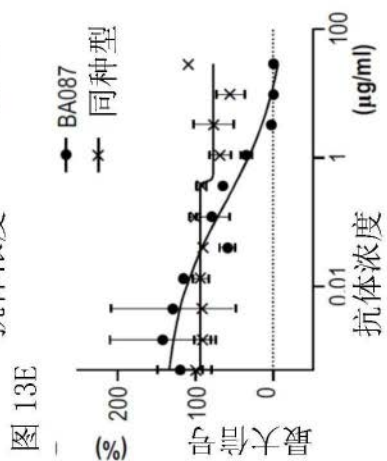
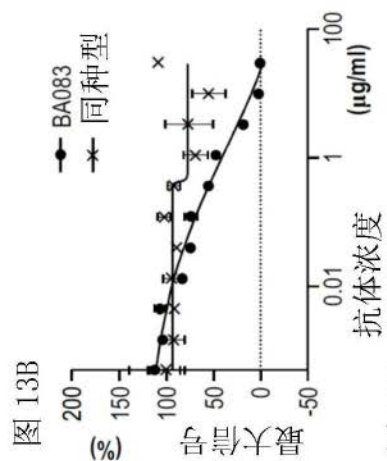
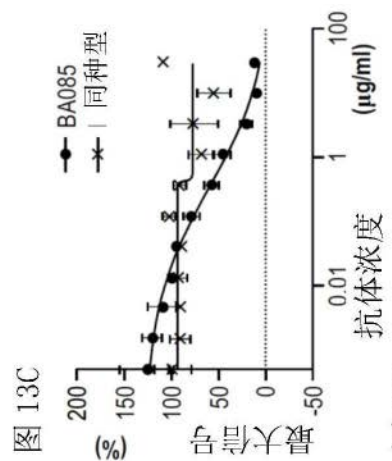
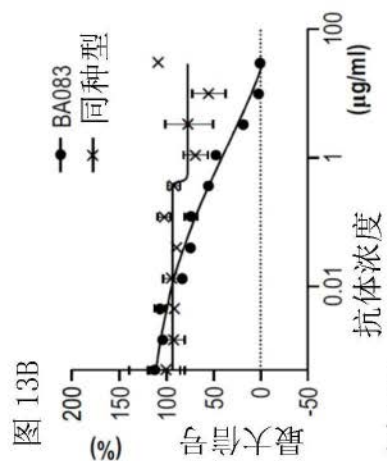
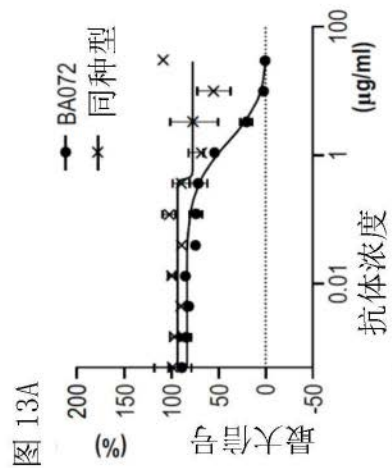


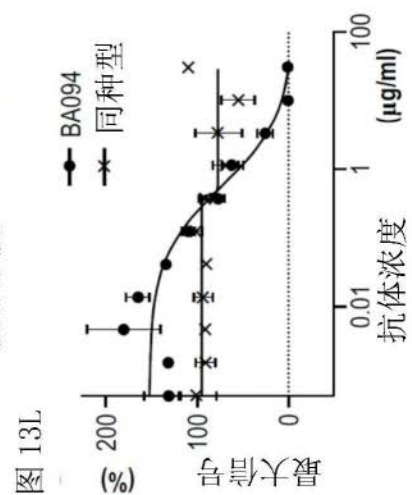
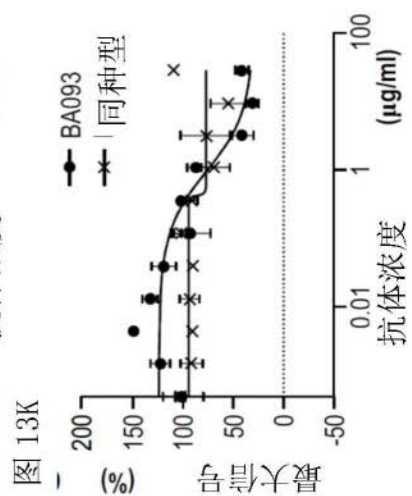
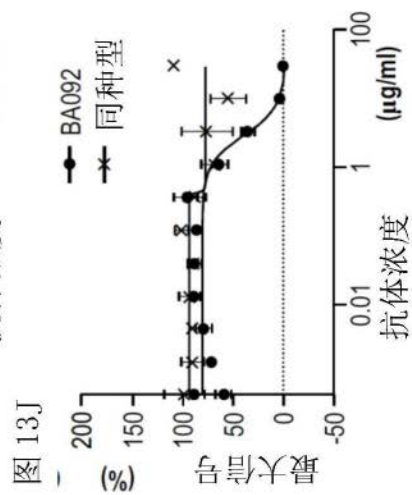
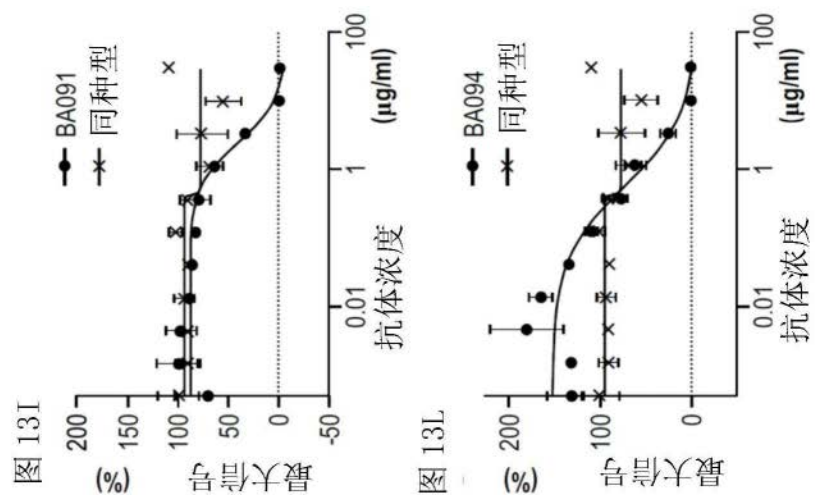
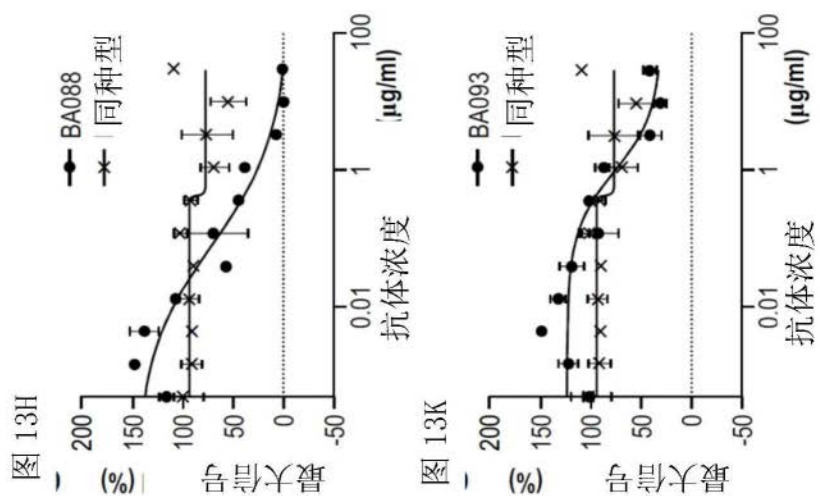
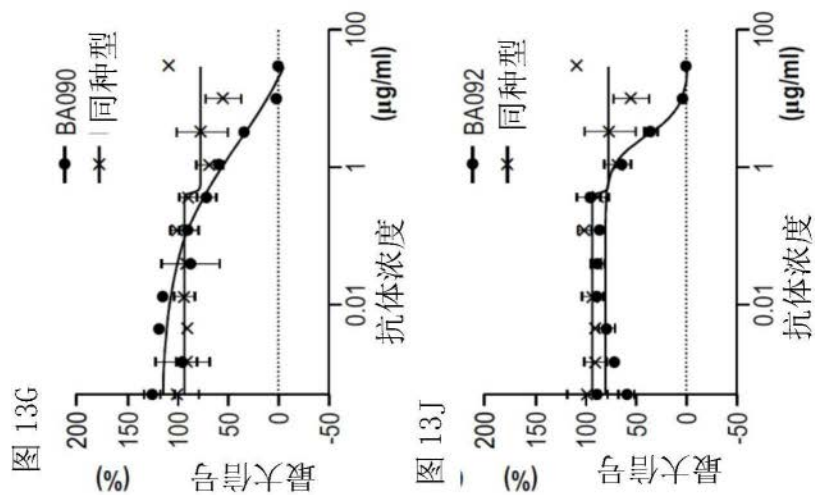
图 12C



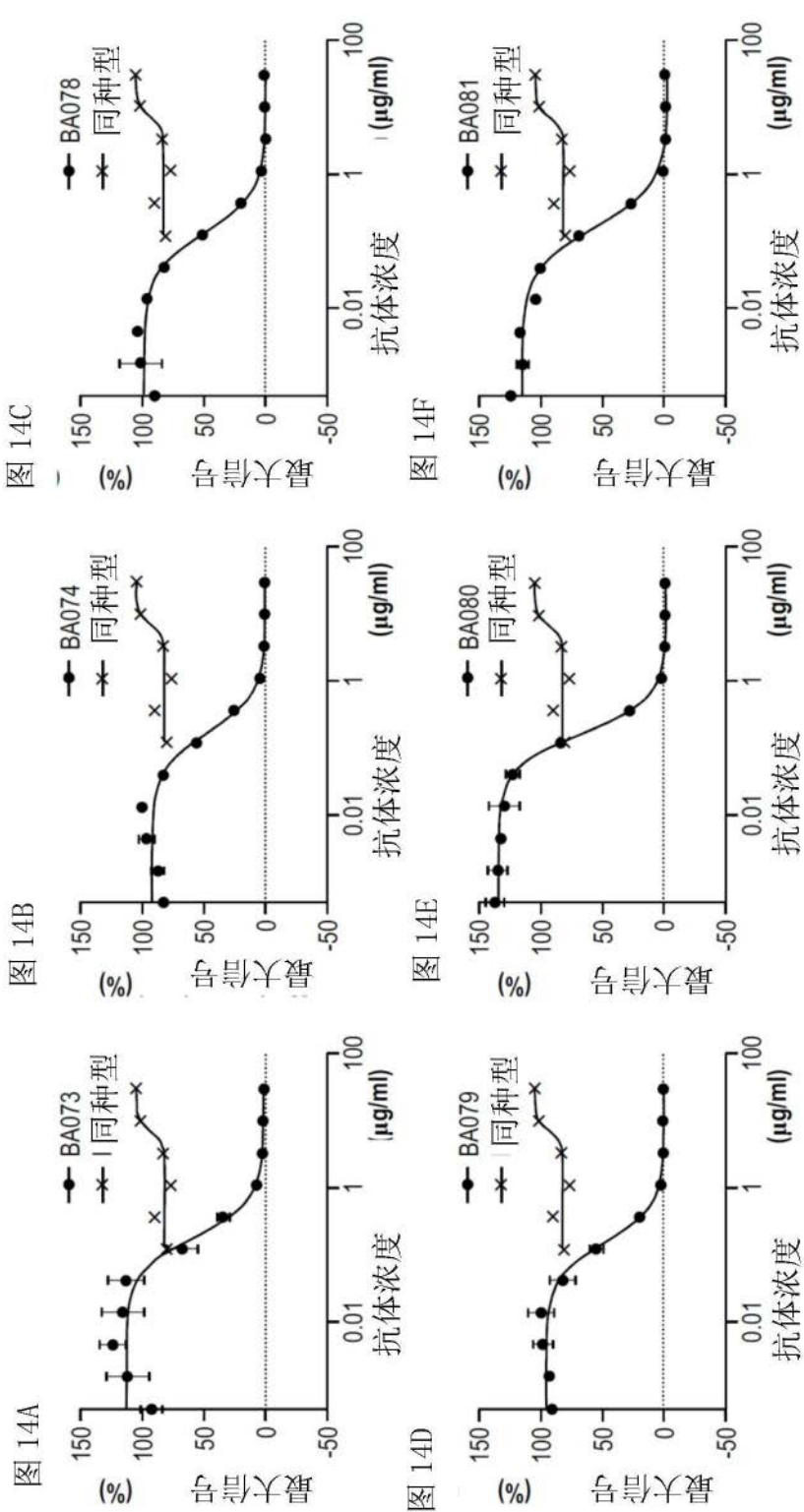
PVR-Fc 和表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



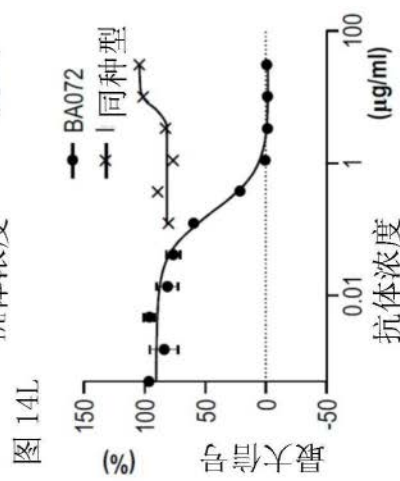
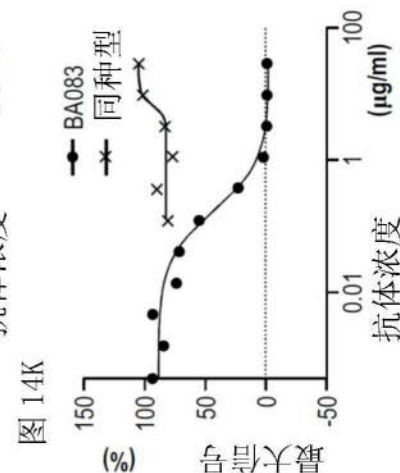
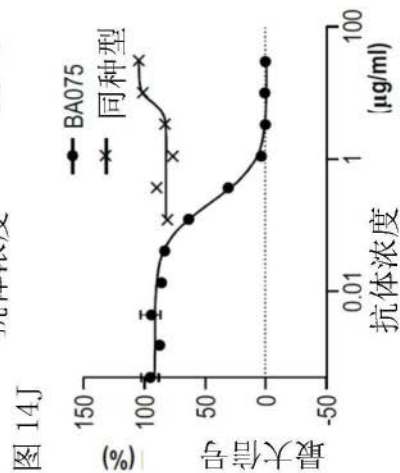
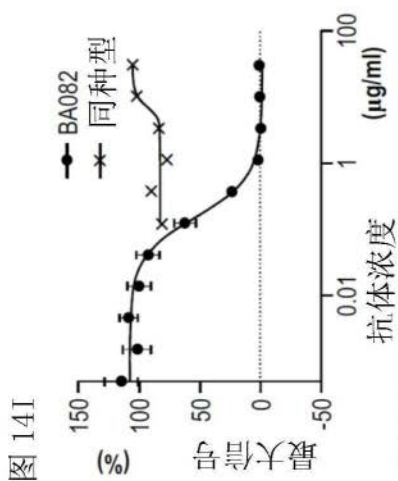
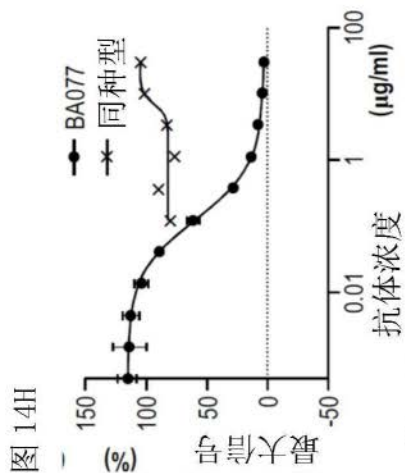
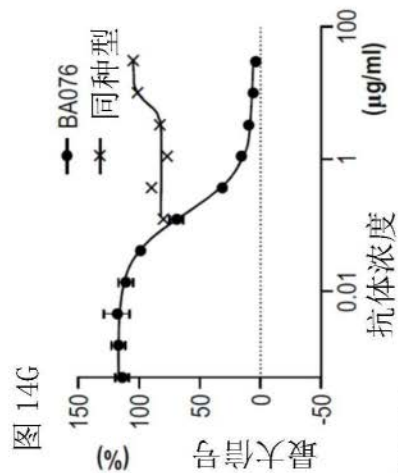
PVR-Fc 和表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PRV-Fc 和表达 CD96 的同种型 1 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PRV-Fc 和表达 CD96 的同种型 1 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达人 DC96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断

图 15A

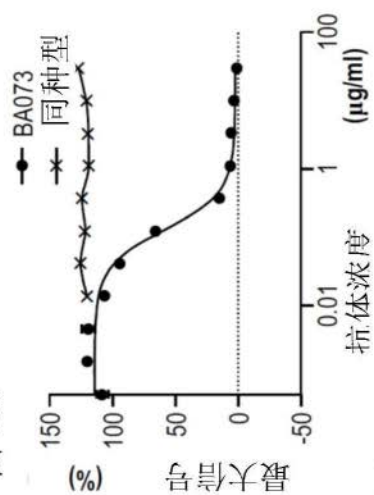


图 15B

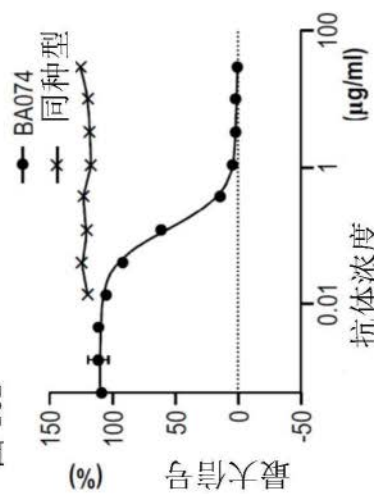


图 15C

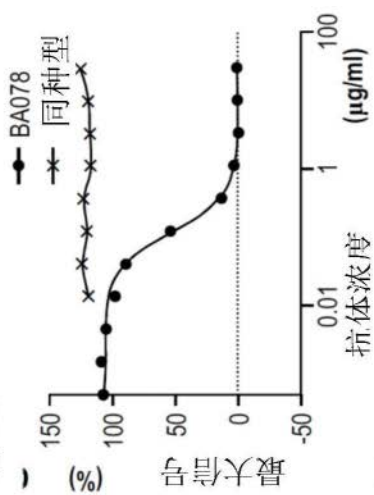


图 15D

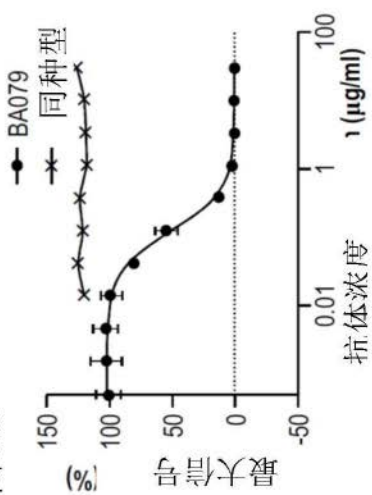


图 15E

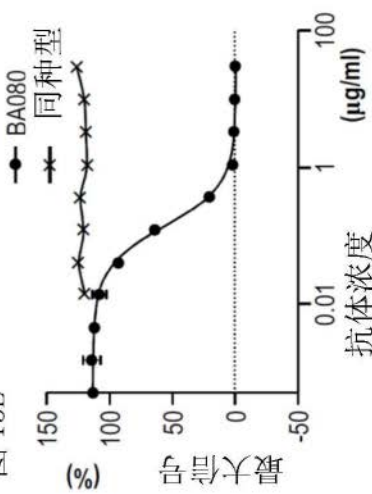
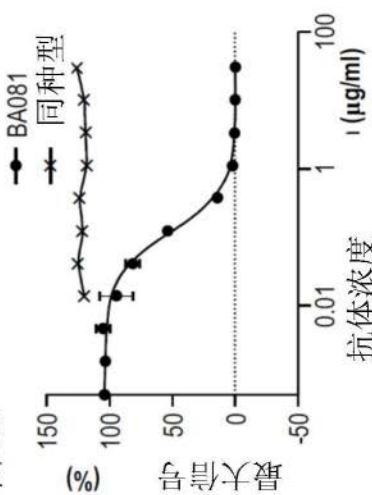
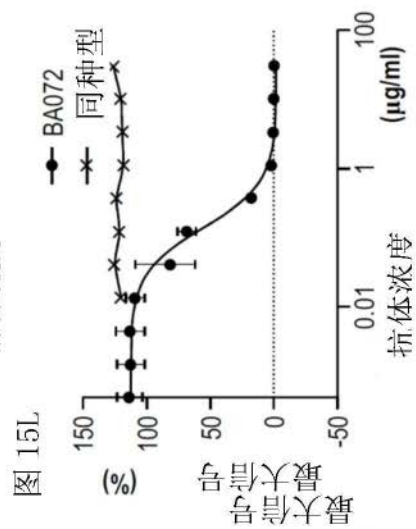
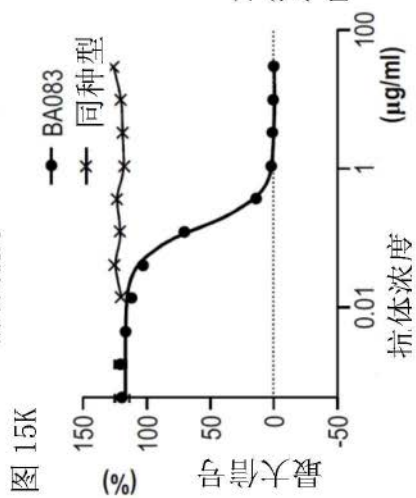
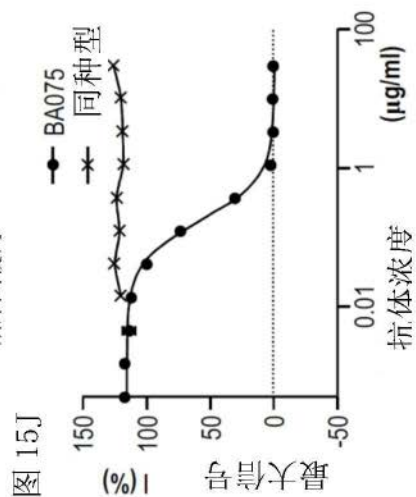
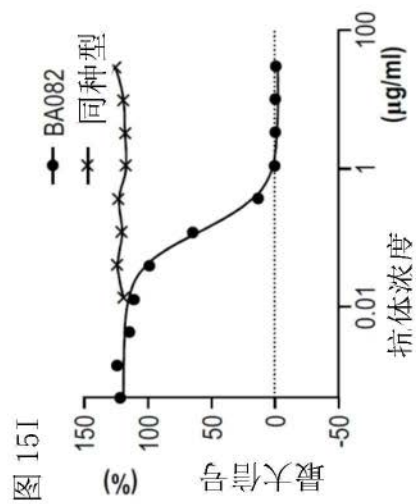
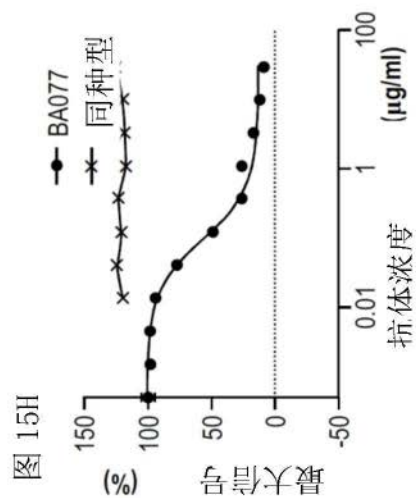
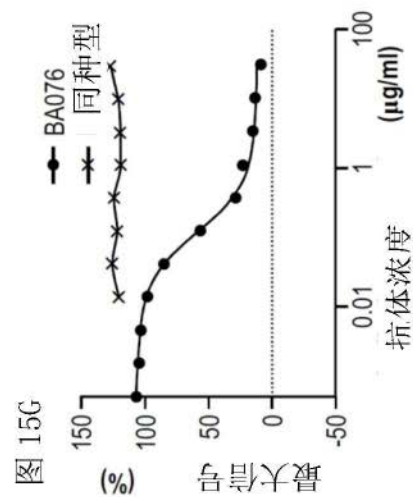


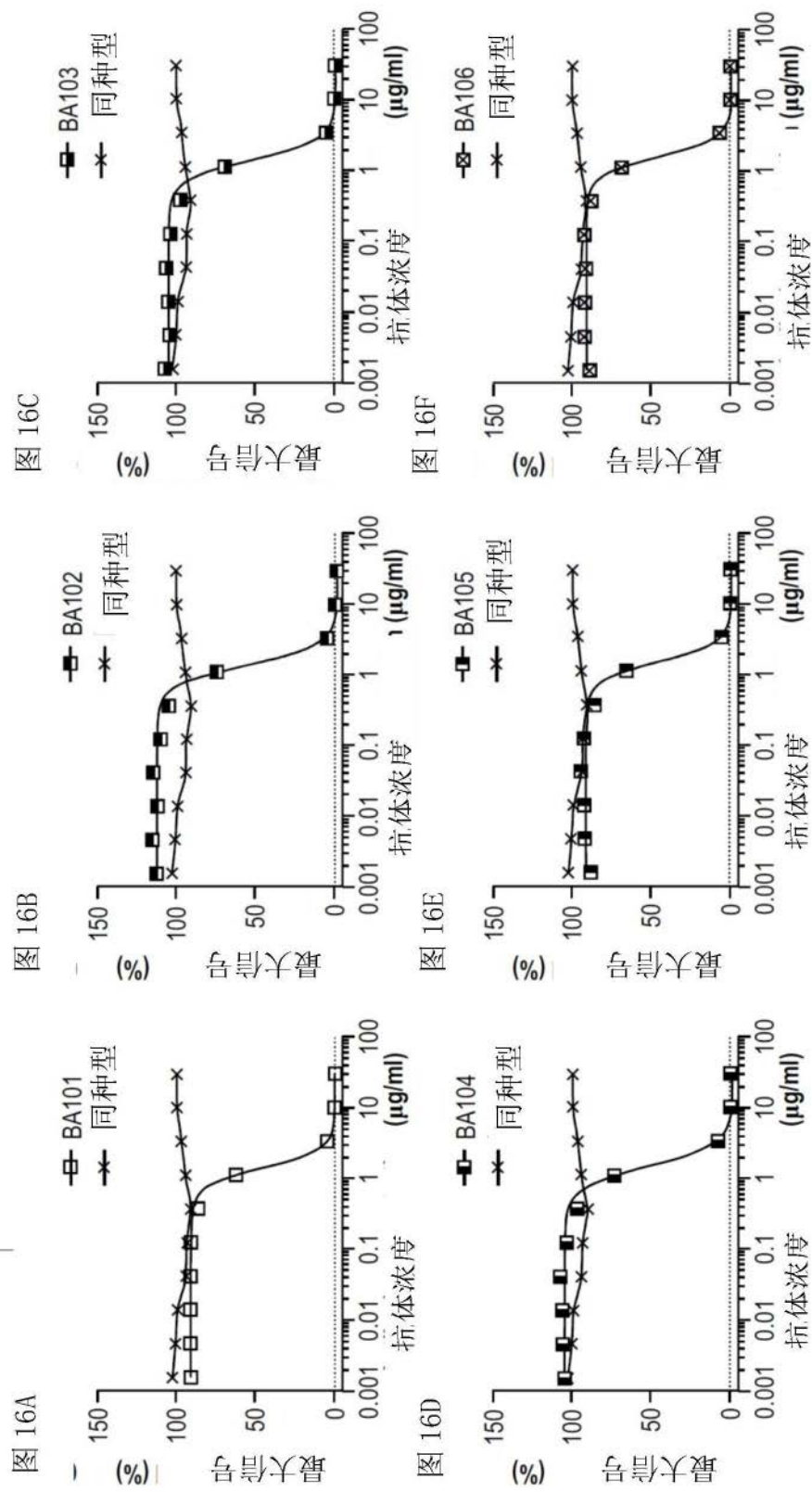
图 15F



PVR-Fc 和表达人 DC96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断

图 17A

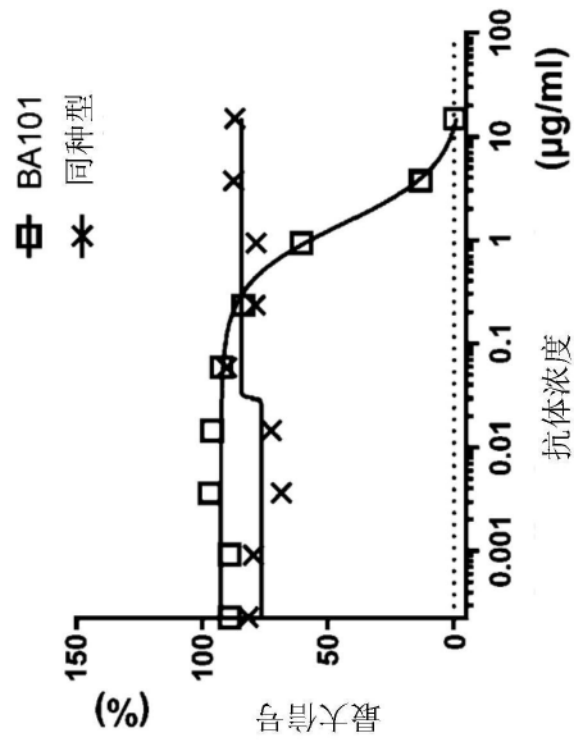
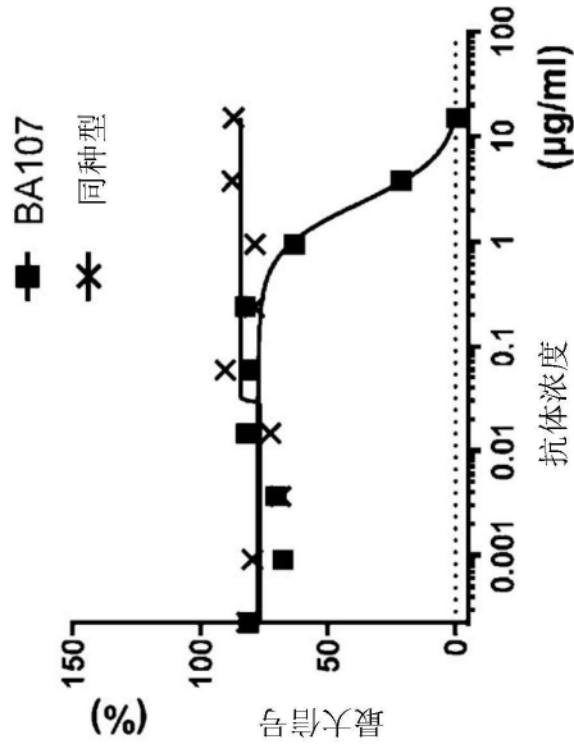
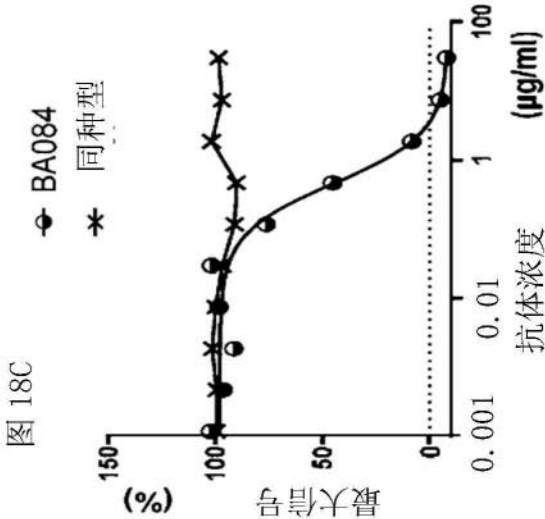
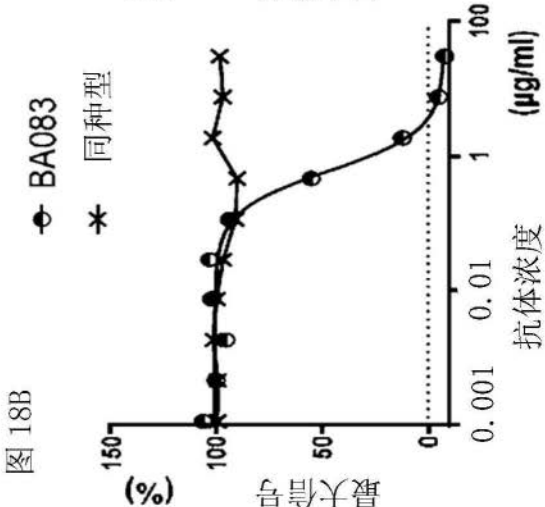
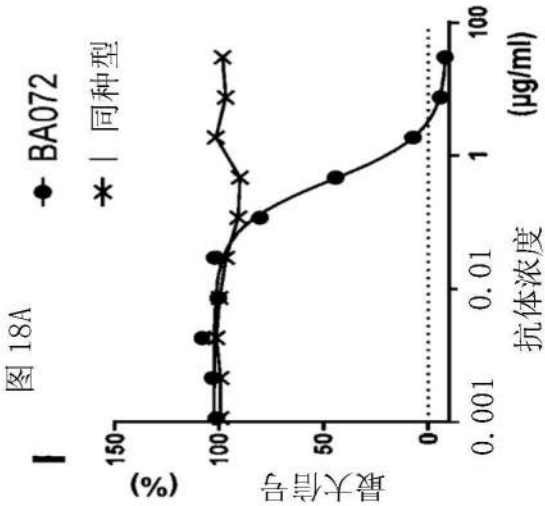


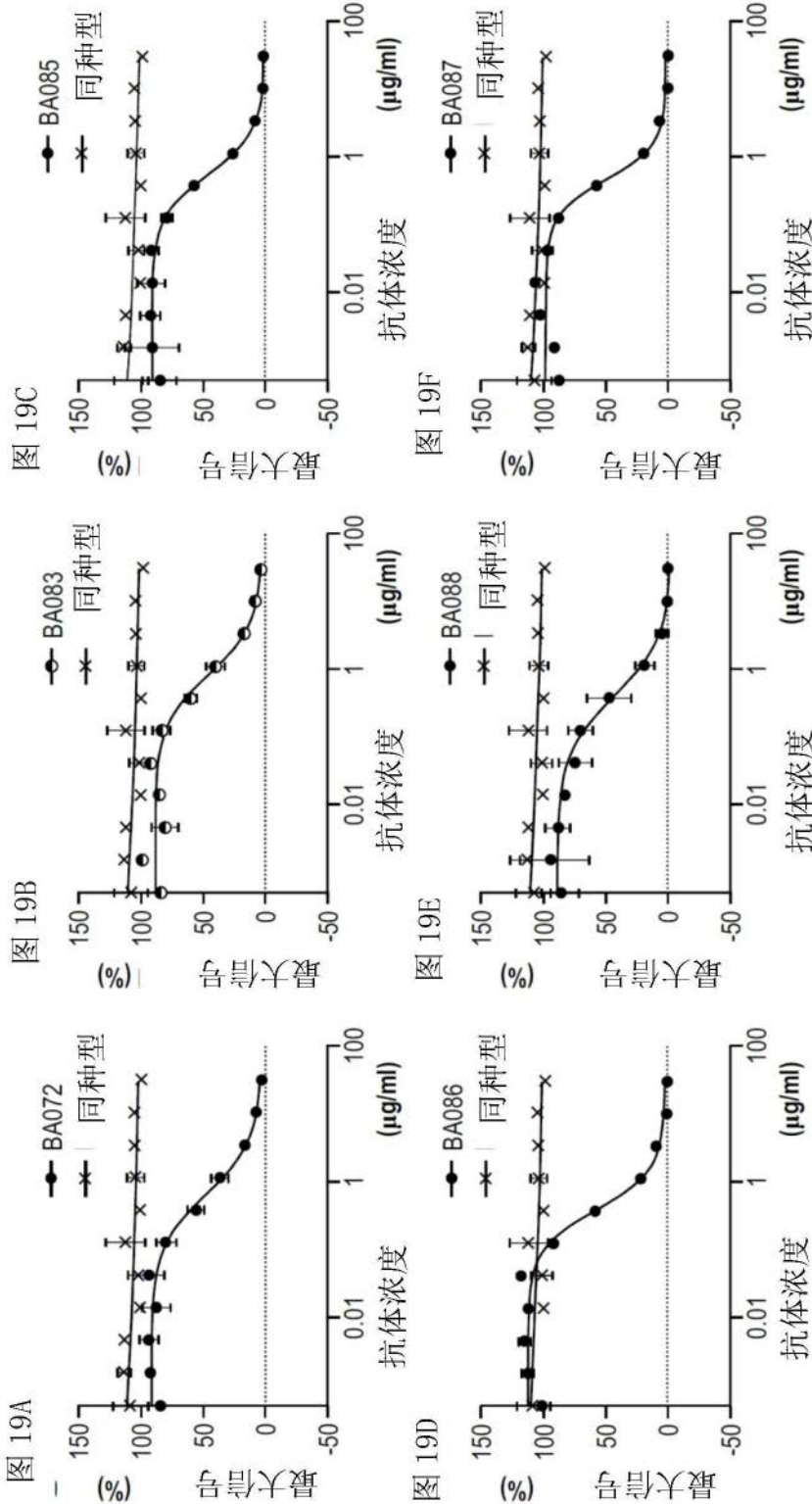
图 17B



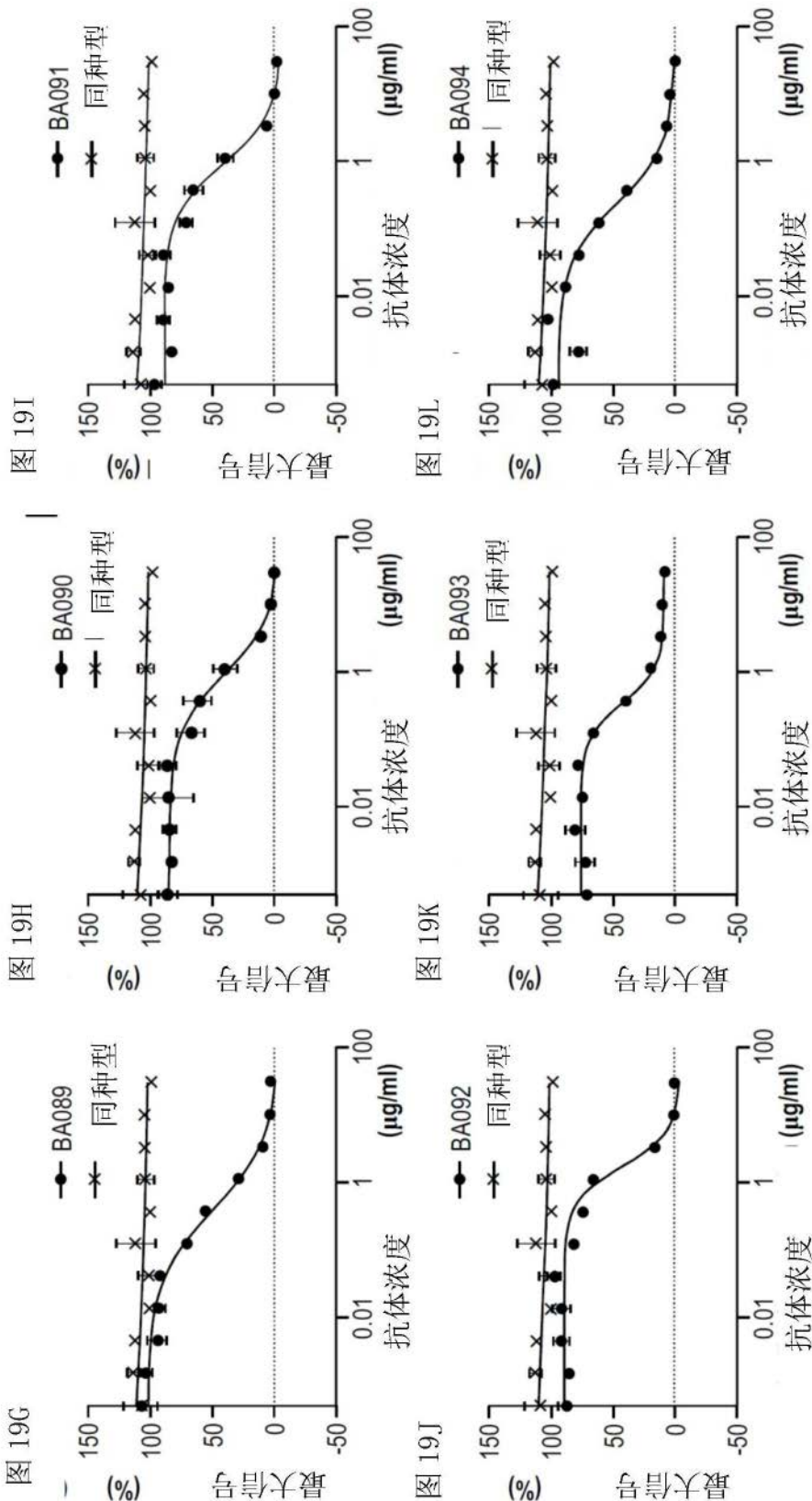
PVR-Fc 和表达食蟹猕猴 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达食蟹猴 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达食蟹猕猴 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达食蟹猕猴 CD96 的同种型 1 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体
阻断

图 20A

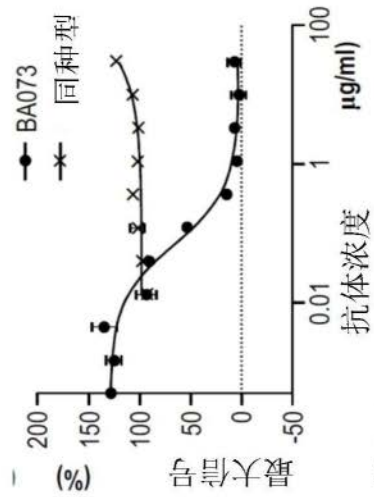


图 20B

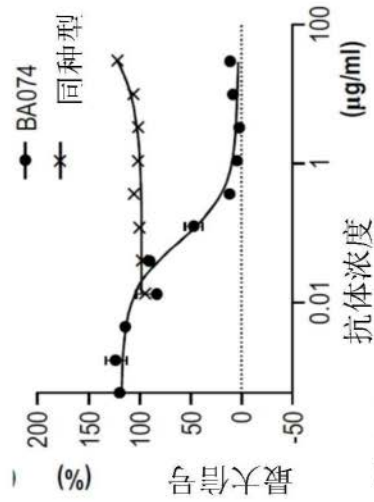


图 20C

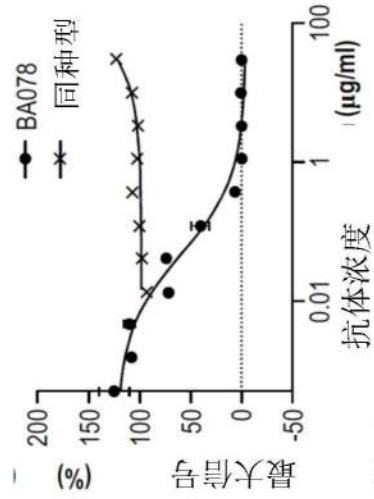


图 20D

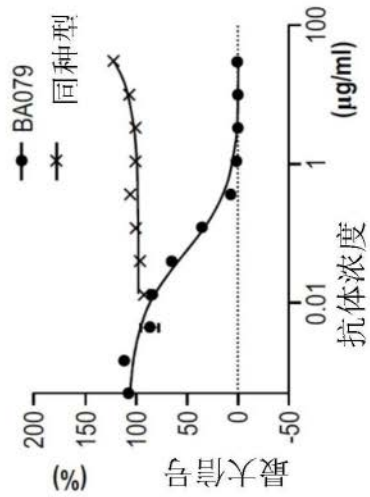


图 20E

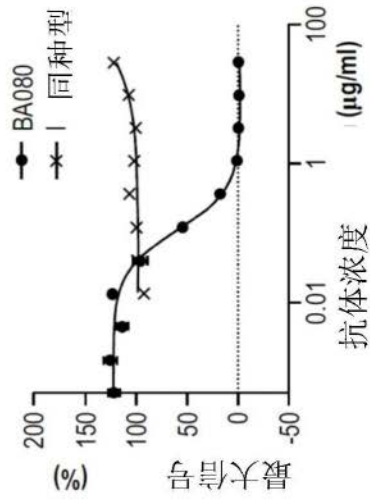


图 20F

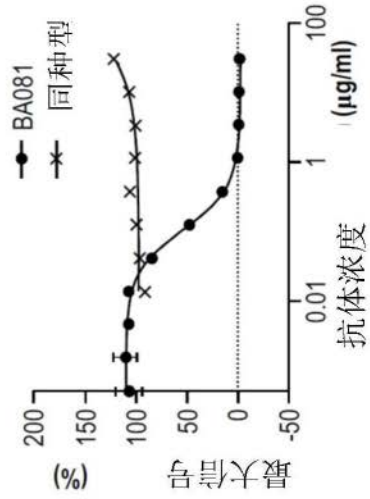
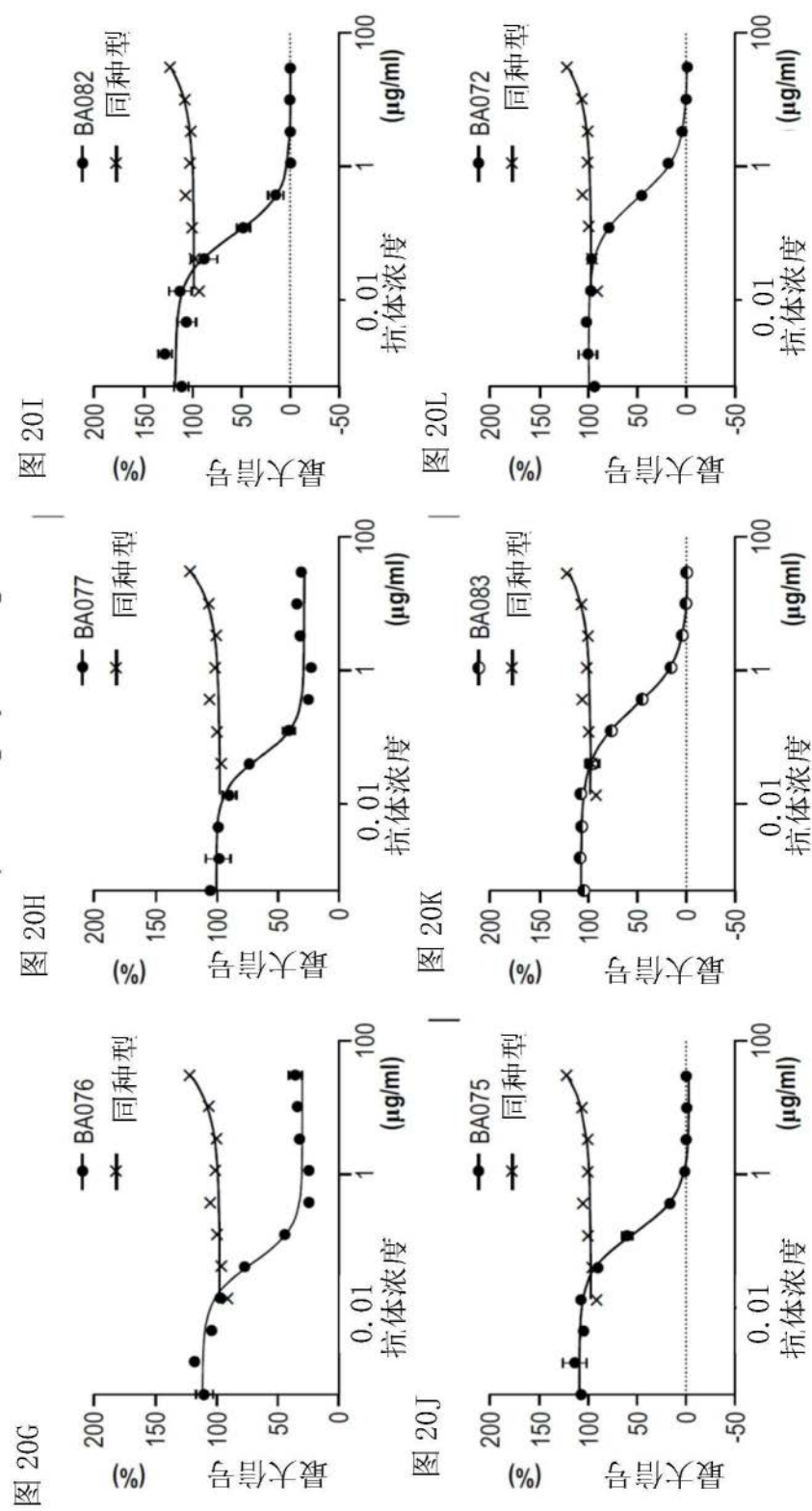
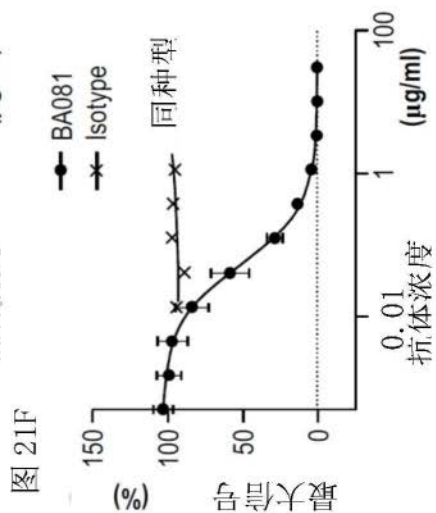
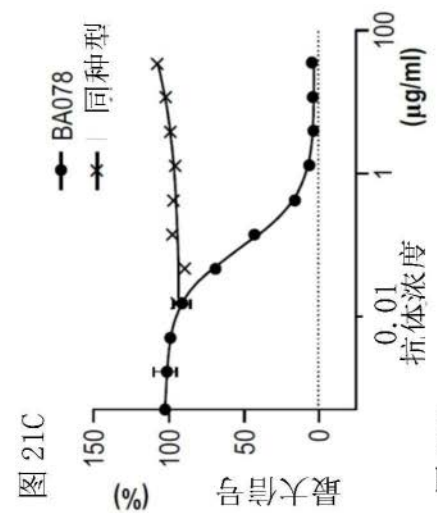
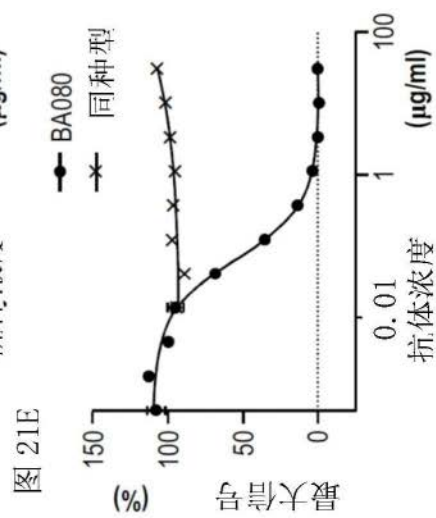
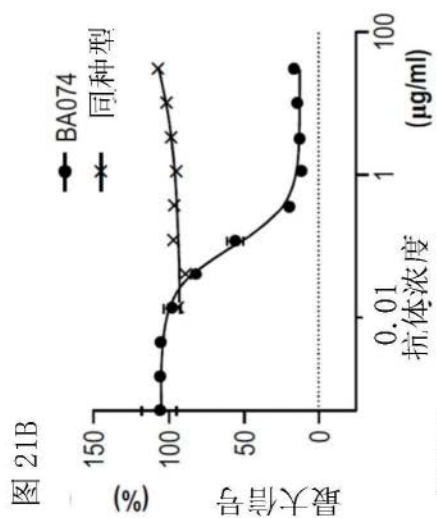
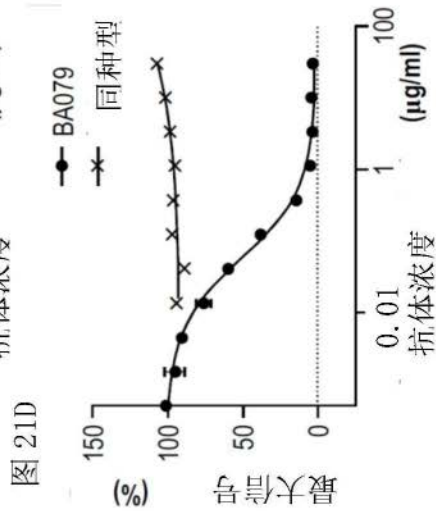
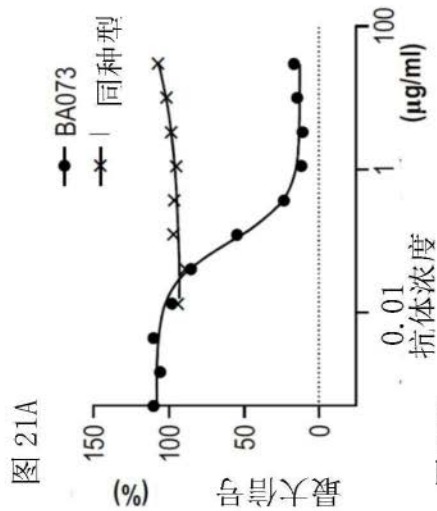


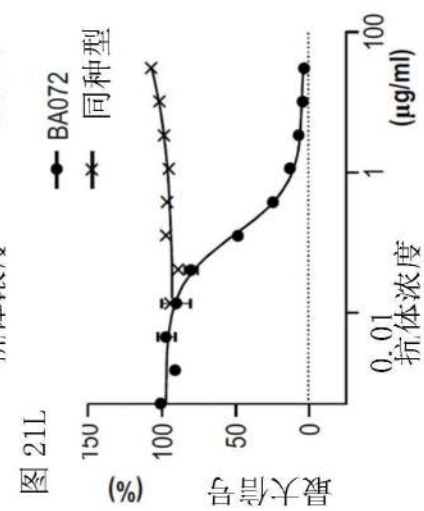
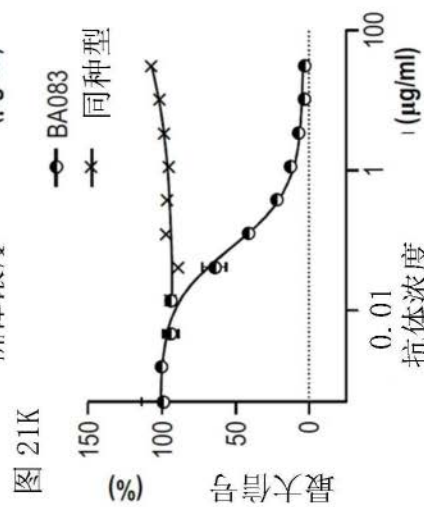
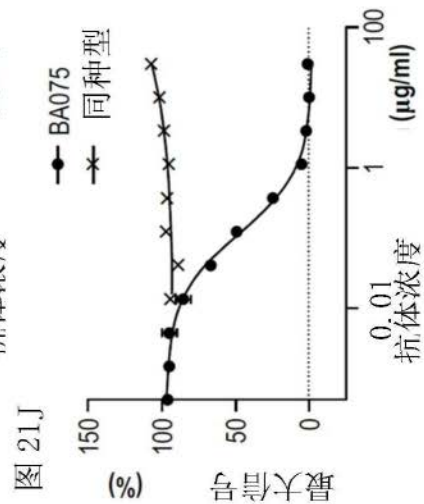
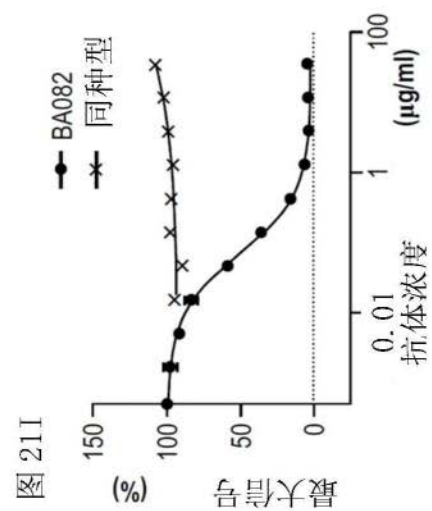
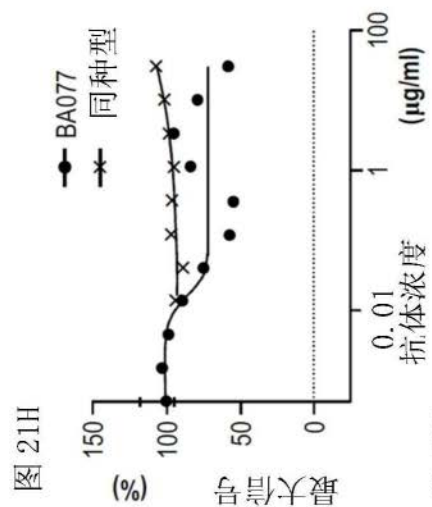
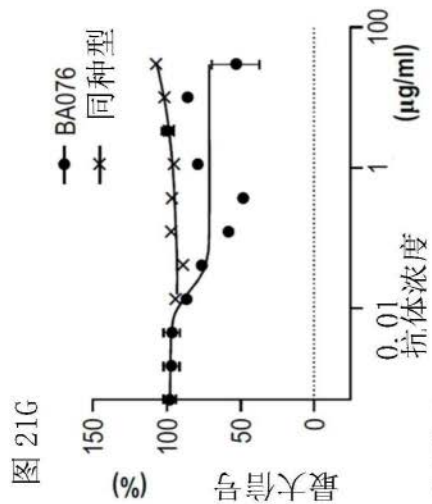
图 20G 和图 20H 显示了 PVR-Fc 和表达食蟹猴 CD96 的同种型 1 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达食蟹猴 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



PVR-Fc 和表达食蟹猴 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞之间的结合被抗 CD96 抗体阻断



表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞或 PVR 之间的缀合被亲本抗 CD96 抗体阻断

图 22A

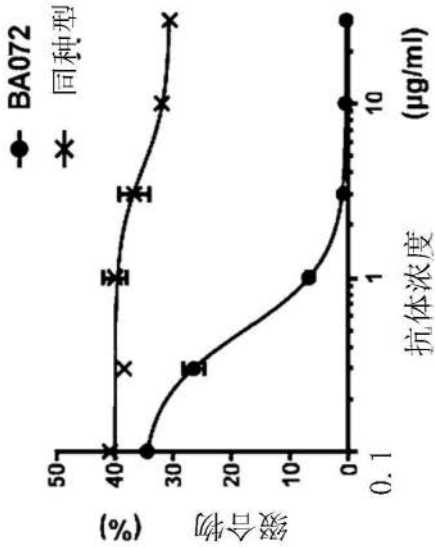


图 22B

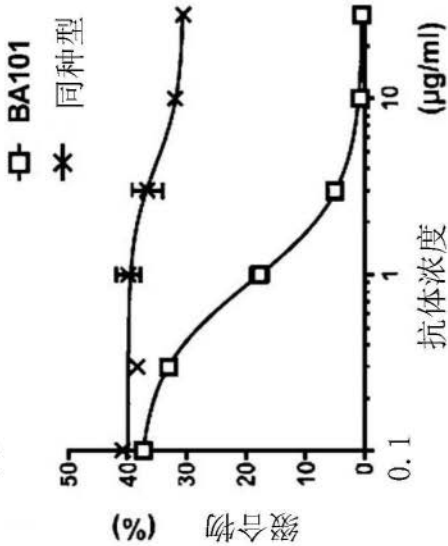
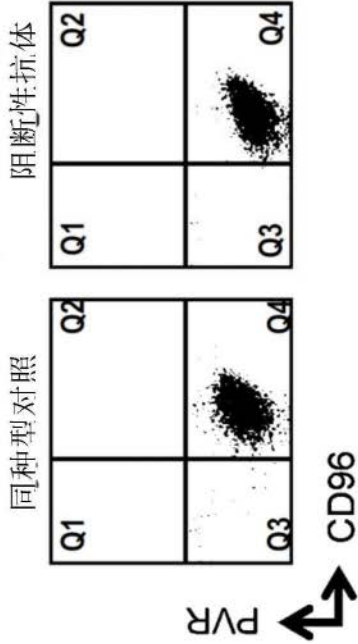


图 22C



表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞或 PVR 之间的缀合被抗 CD96 抗体阻断

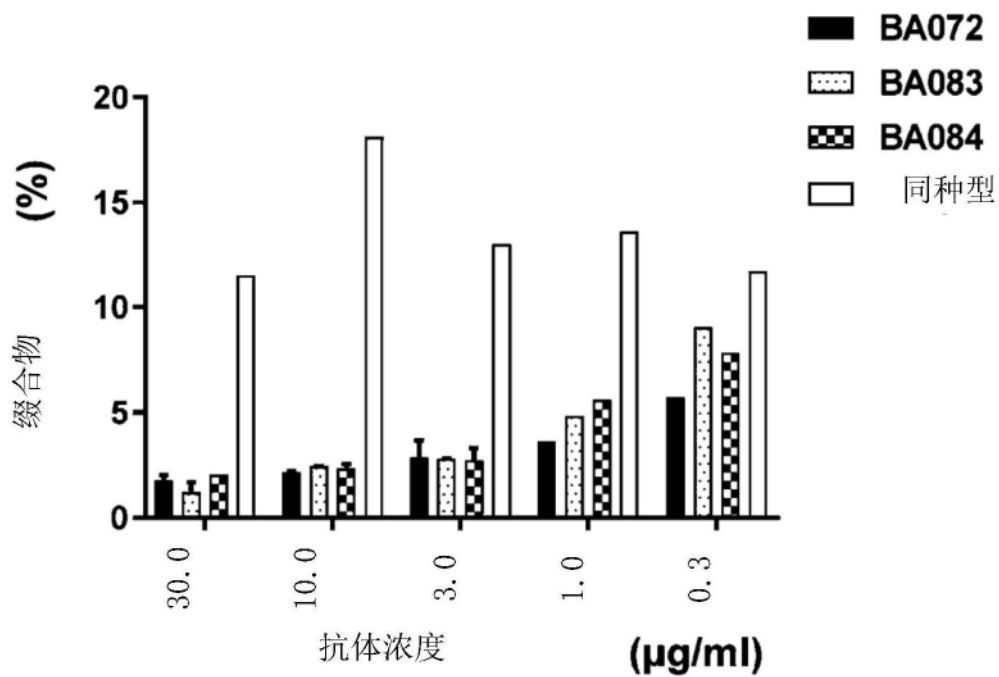


图23

表达人 CD96 的同种型 2 的 CHO 细胞或 PVR 之间的缀合被抗 CD96 抗体阻断

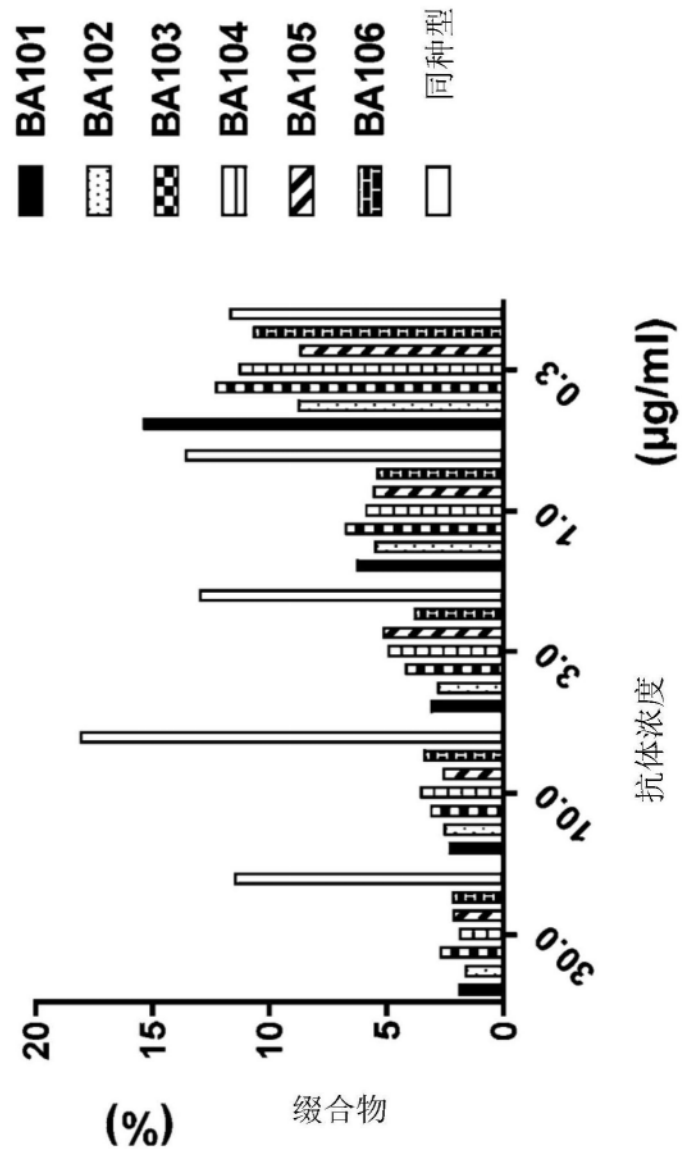
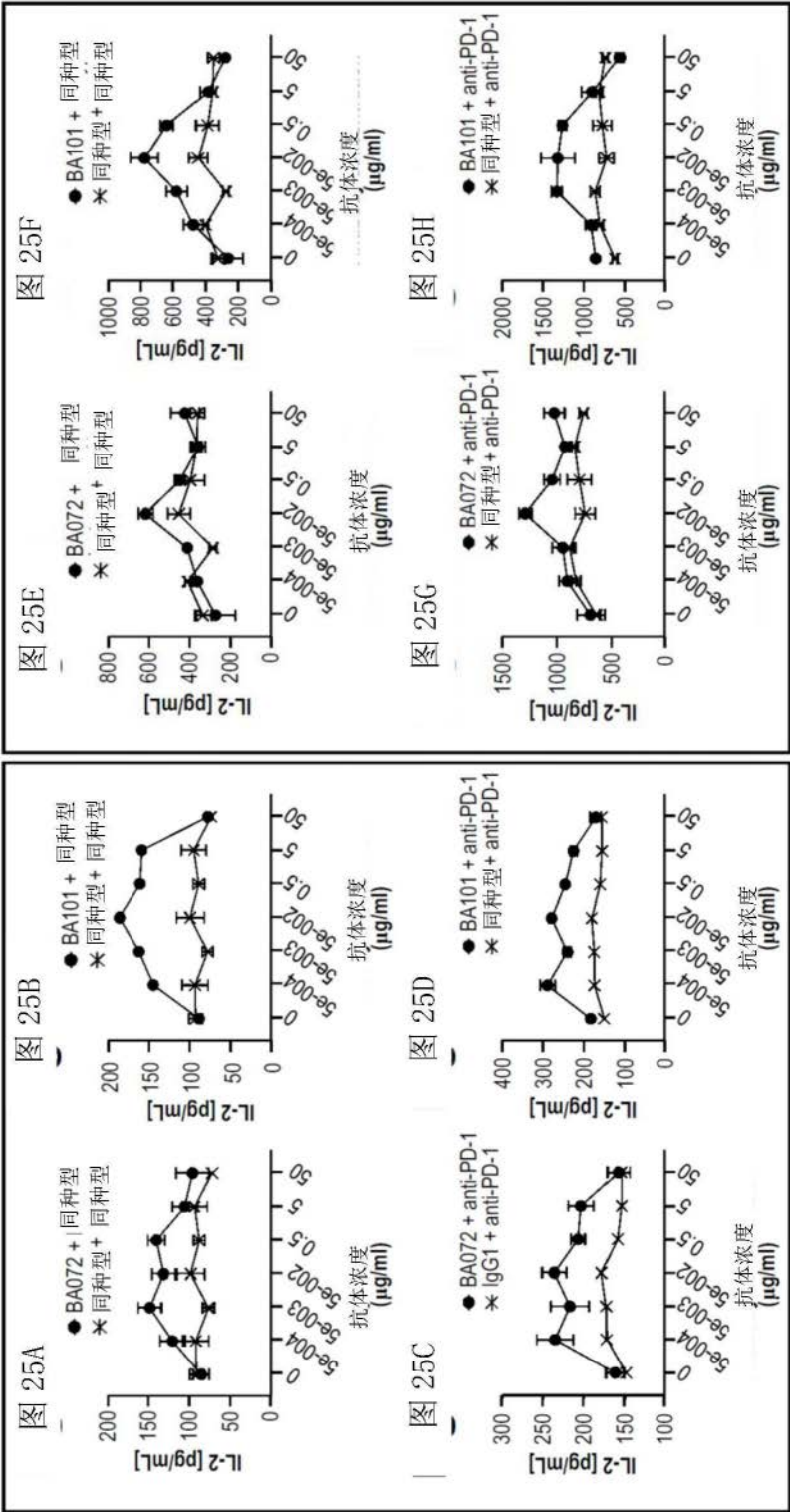


图24

在一定剂量范围内，在对两个不同的供体进行的原代 T 细胞：APC 共培养测定法中，通过亲本抗 CD96 引发的 T 细胞反应

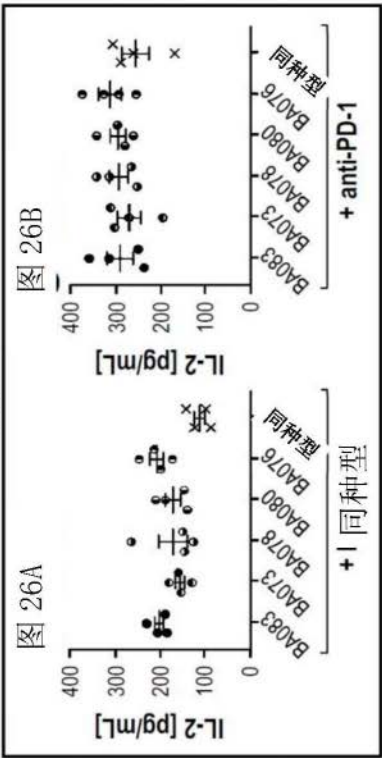
供体 1

供体 2

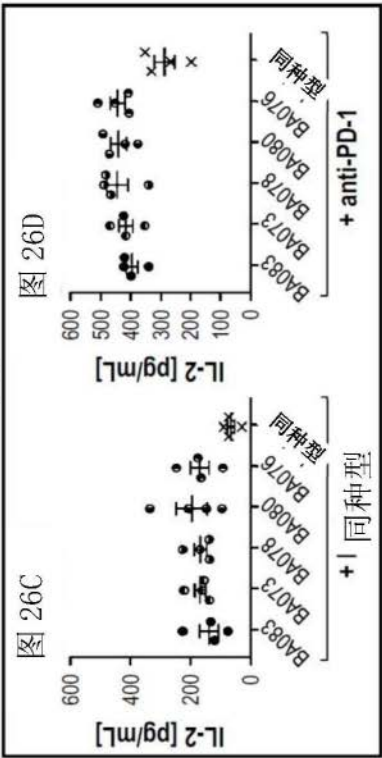


在对三个不同的供体进行的原代 T 细胞：APC 共培养测定法中，通过抗 CD96 抗体引发的 T 细胞反应

供体 1



供体 2



供体 3

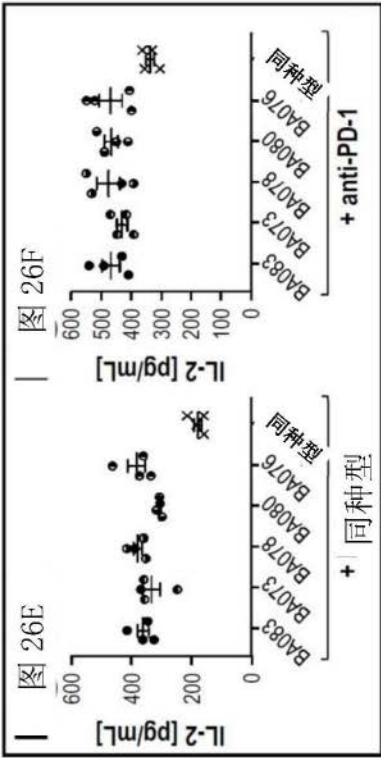
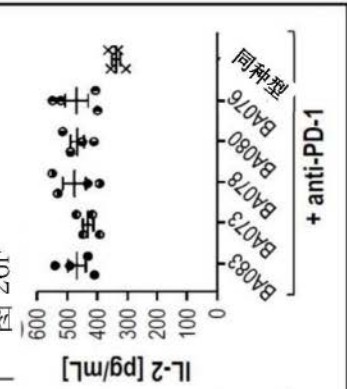
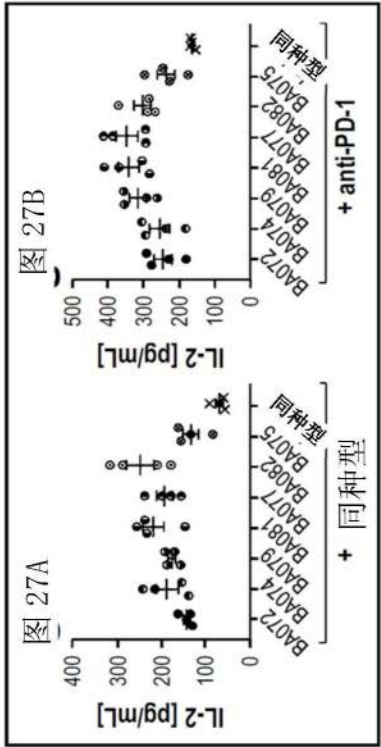


图 26F

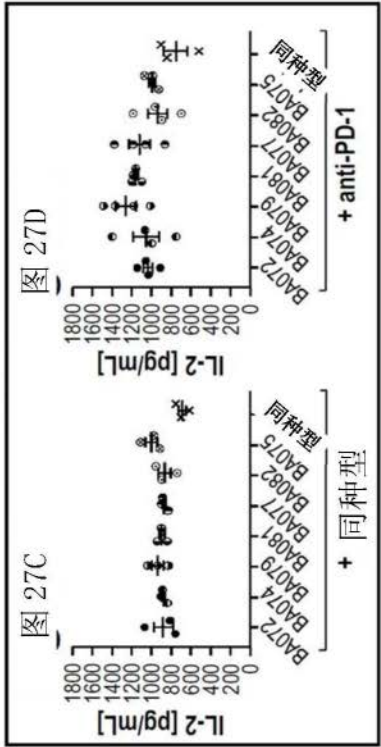


在对三个不同的供体进行的原代 T 细胞：APC 共培养测定法中，通过抗 CD96 抗体引发的 T 细胞反应

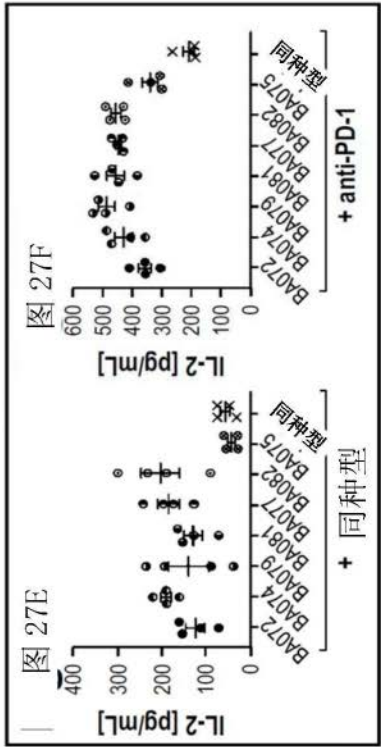
供体 1



供体 2



供体 3



人 CD96⁺ T 细胞报告测定法中的 TCR-NFAT 和 NF κ B 信号传导

图 28A

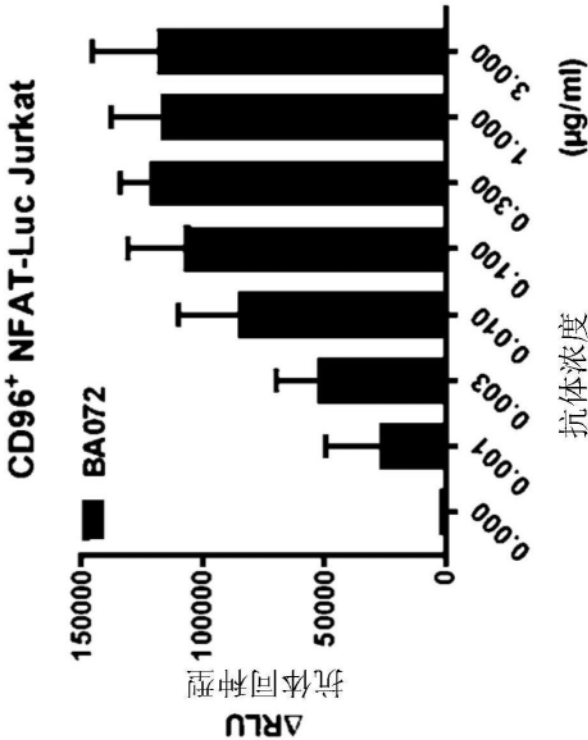
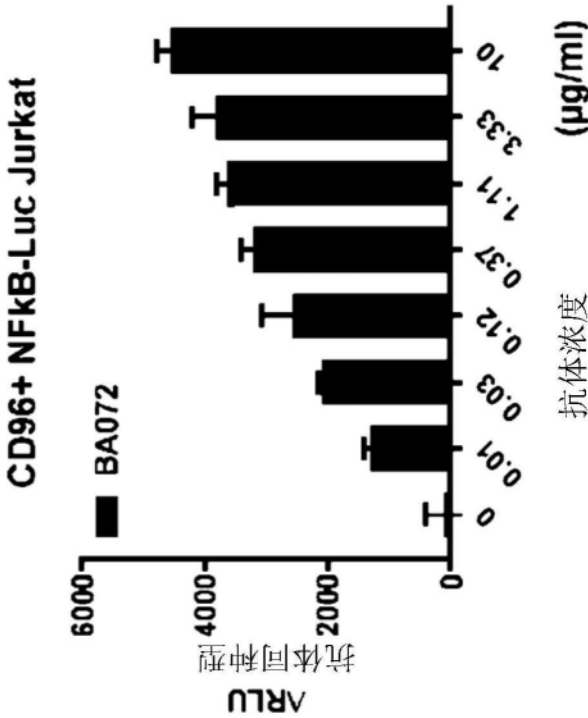


图 28B



人 CD96⁺ T 细胞报告测定法中的 TCR-NFAT 和 NFkB 信号传导

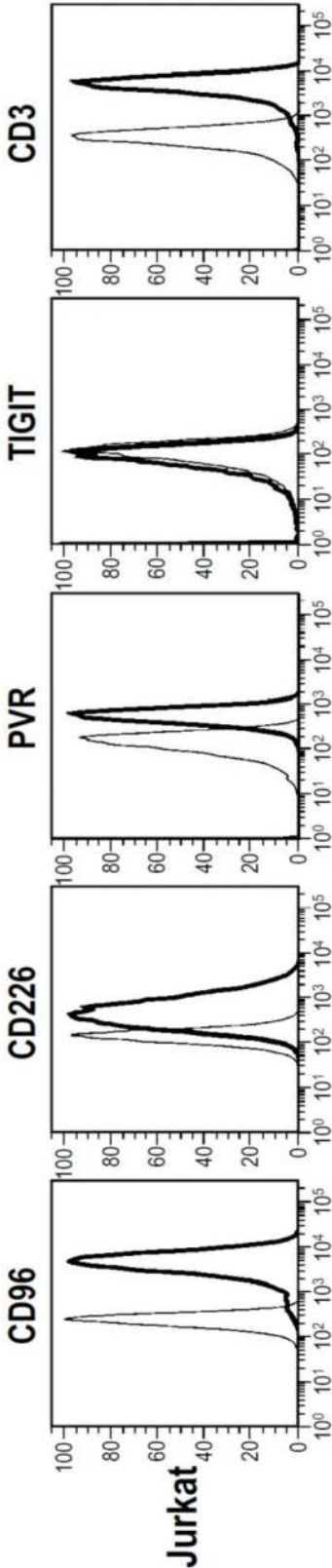


图28C

在具有和不具有 CD226 表达的细胞中的 TCR-NFAT 信号传导

图 29A

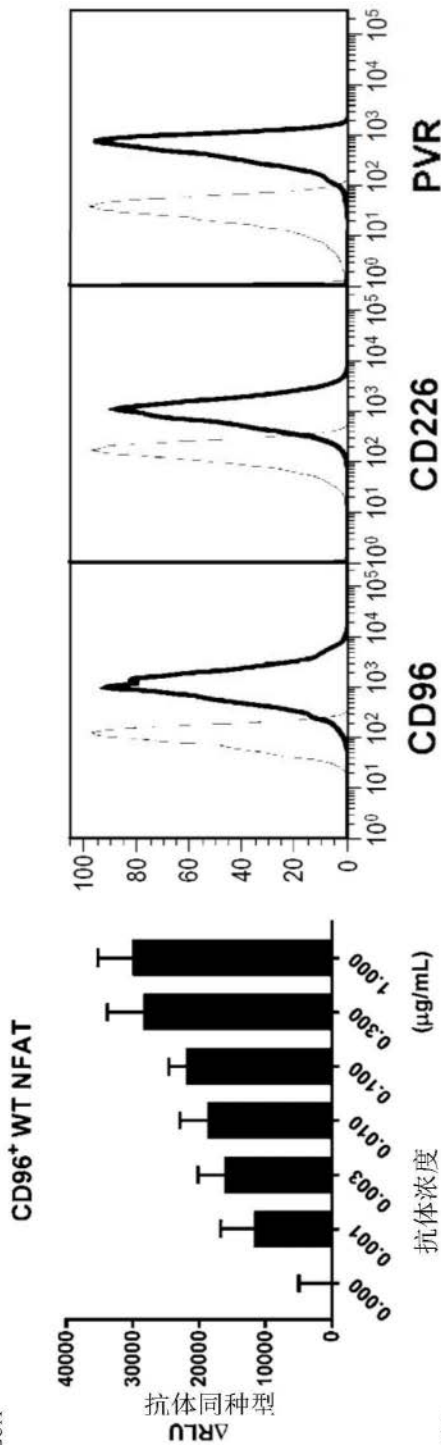
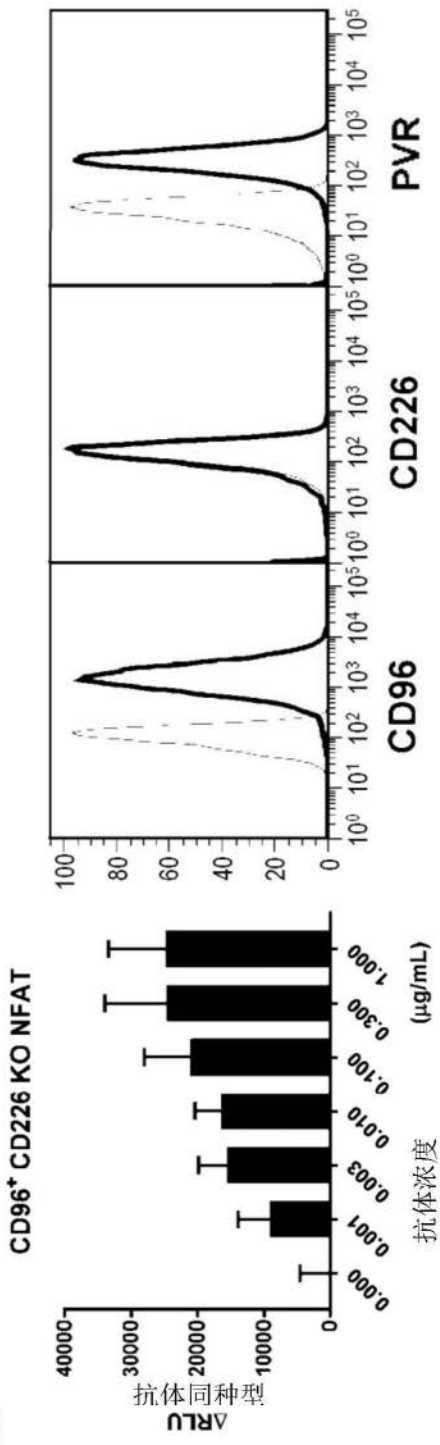


图 29B



抗 CD96 抗体的 Fc 变体对 ADCC 的诱导

图 30A

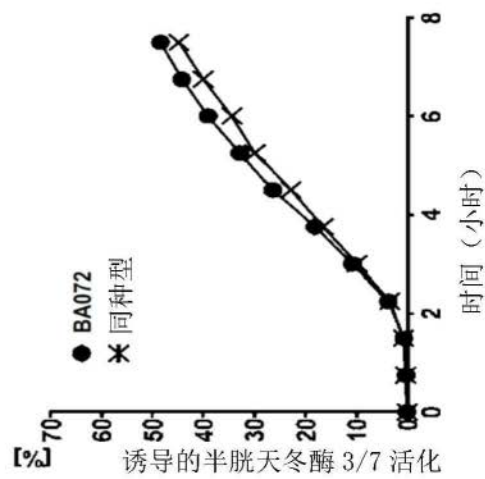


图 30B

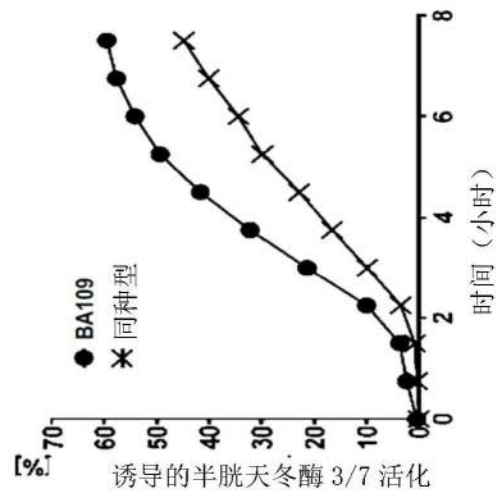
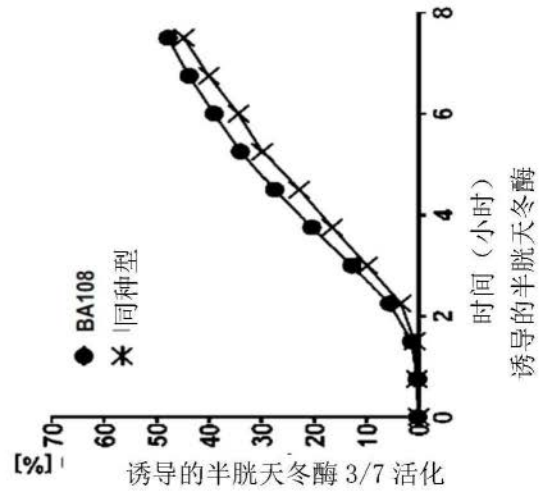


图 30C



Jurkat 报告细胞系中的抗 CD96 抗体的 Fc 变体的信号传导

图 31A

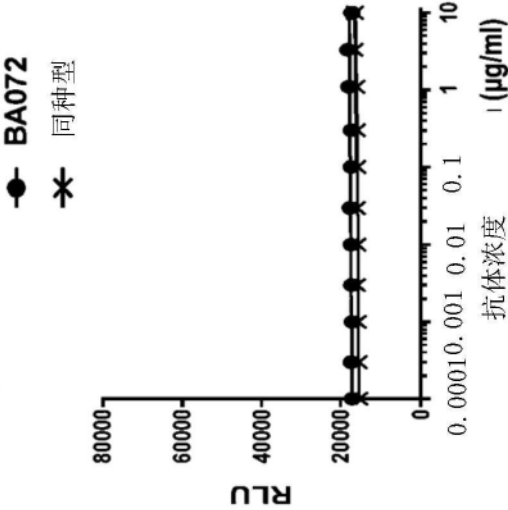


图 31B

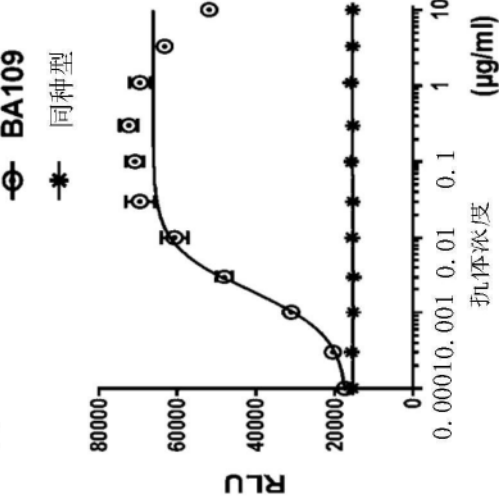
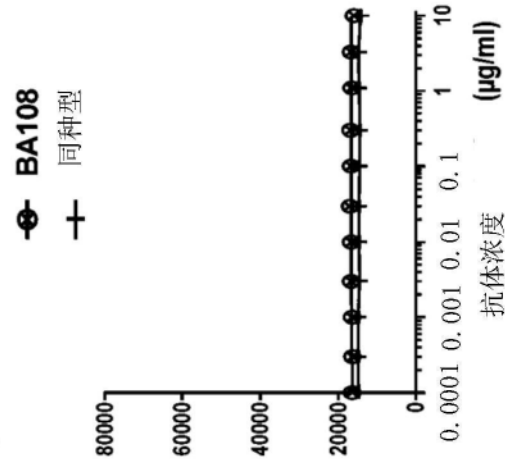


图 31C



在 T 细胞：APC 共培养测定法中抗 CD96 抗体介导的 IL-2 产生

图 32A

供体 1

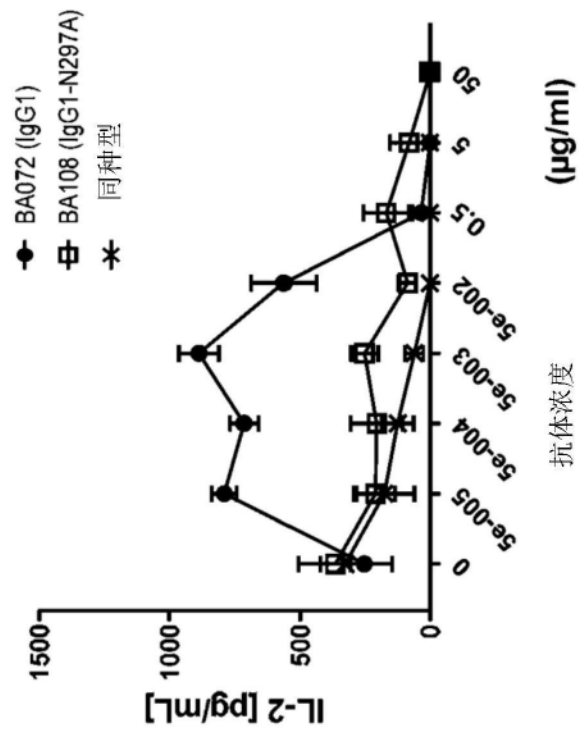
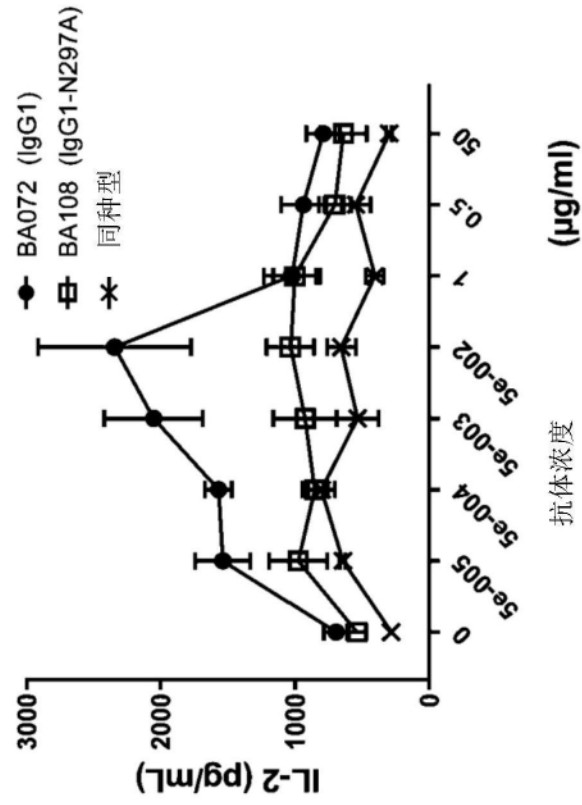


图 32B

供体 2



在过表达 CD96 的 Jurkat 细胞中的 CD96 内化

图 33A

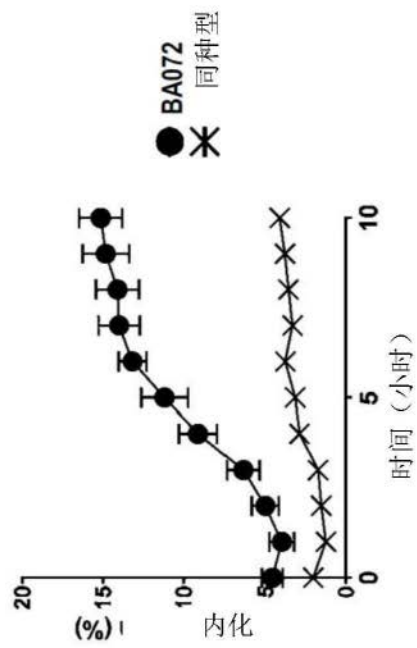


图 33B

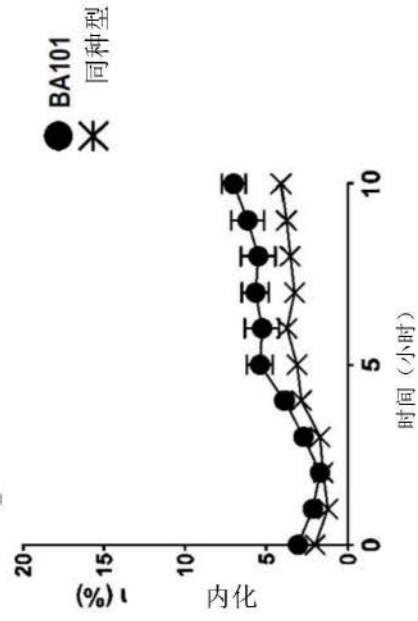


图 33C

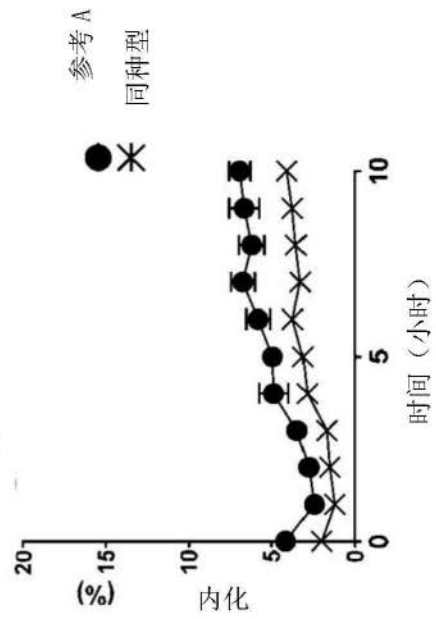
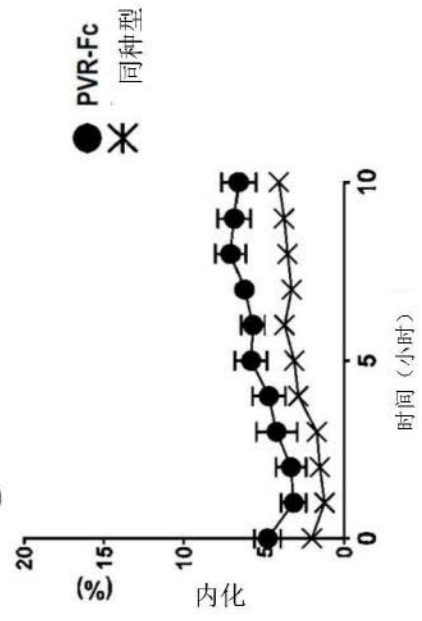
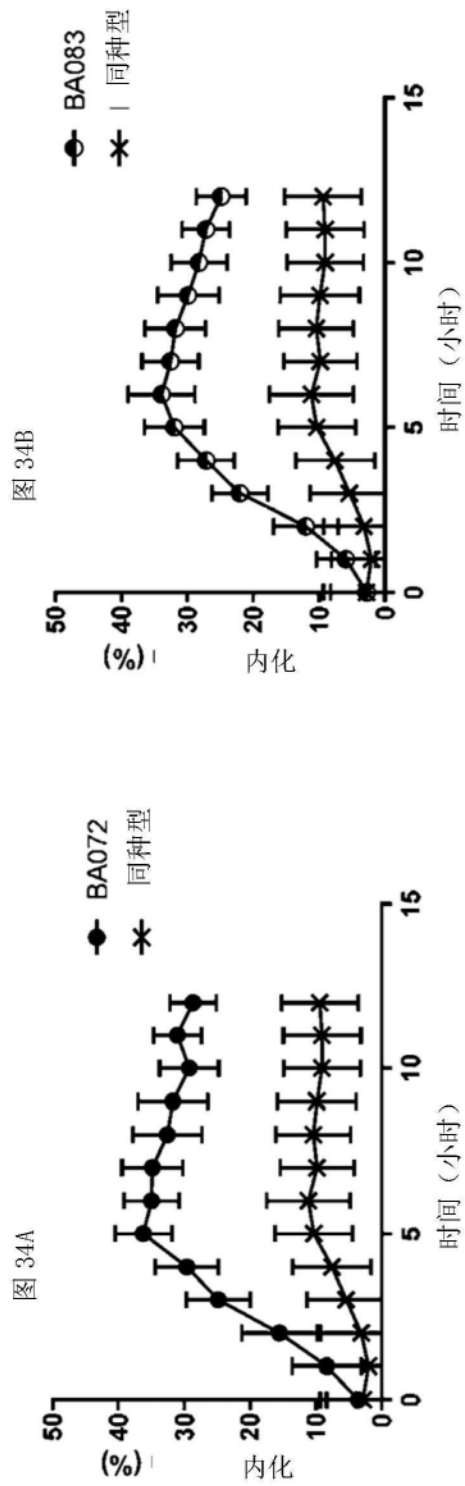


图 33D



在过表达 CD96 的 Jurkat 细胞中的 CD96 内化



在原代 T 细胞中抗 CD96 抗体介导的内化

图 35A

供体 1

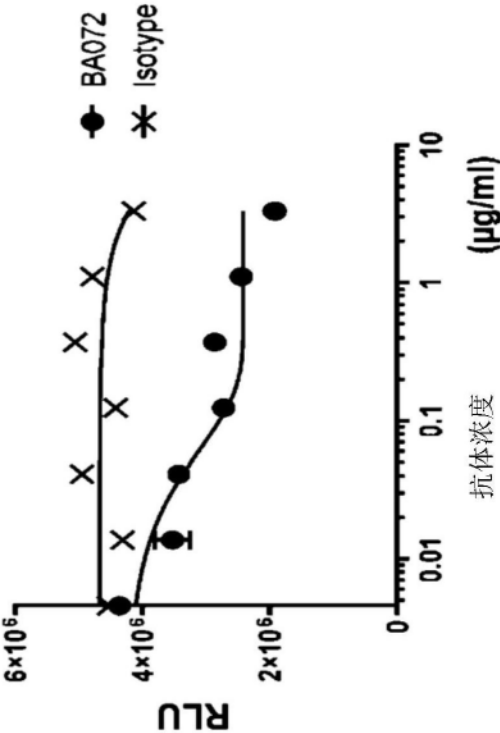
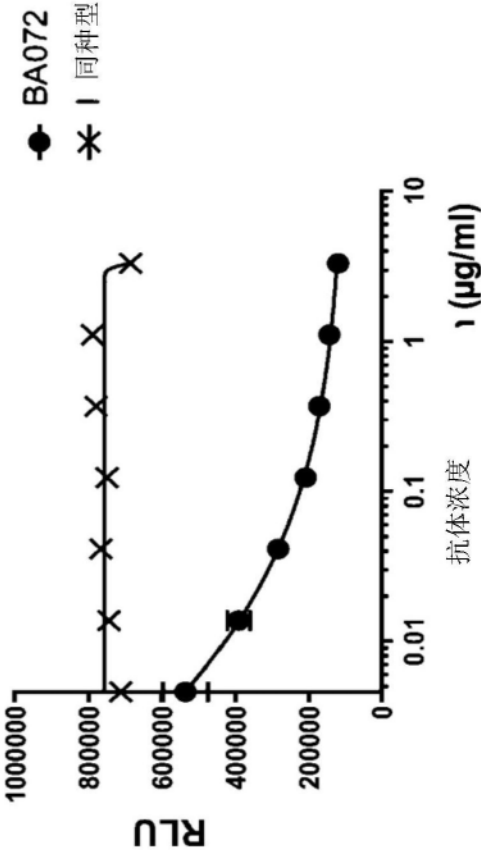


图 35B

供体 2



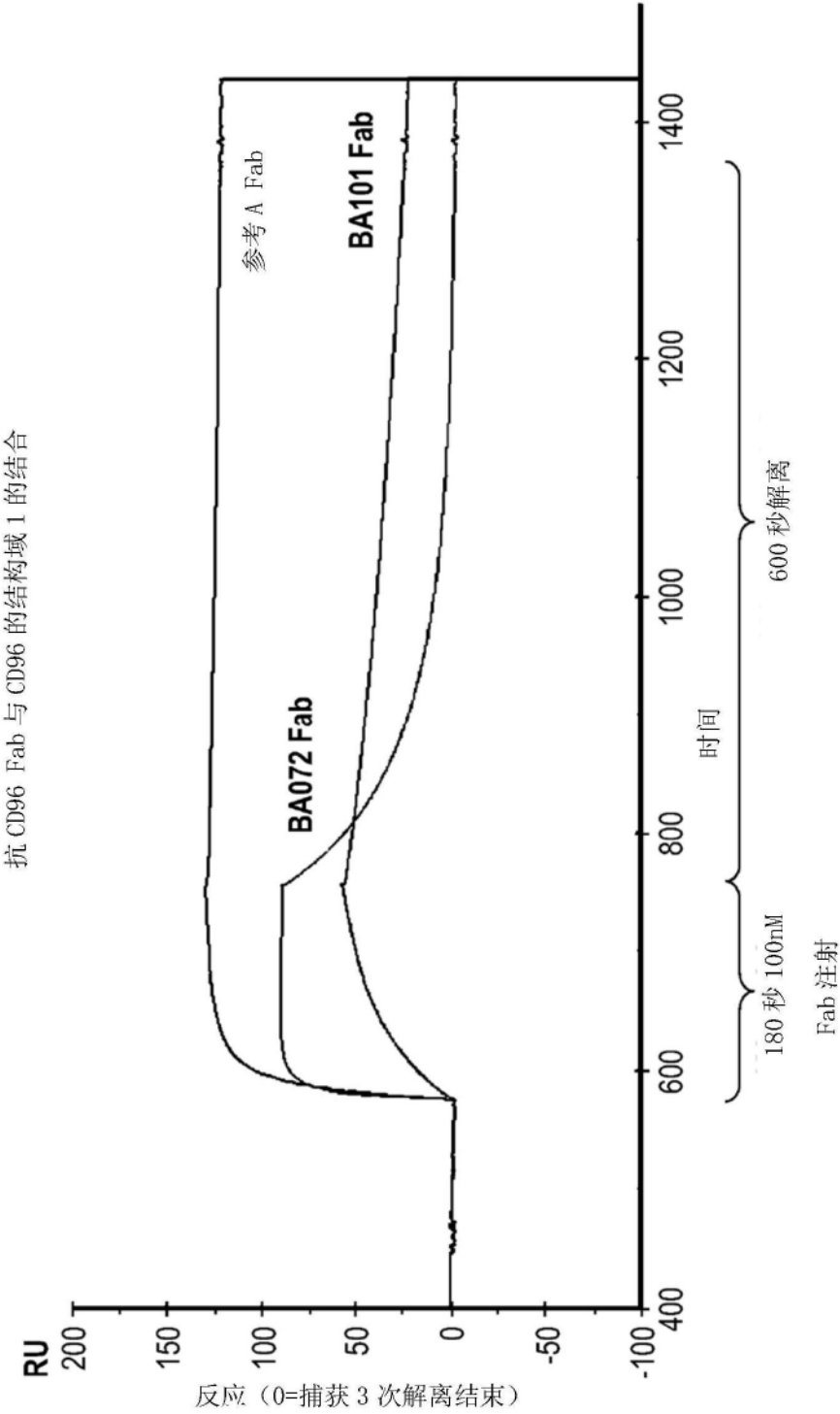


图36A

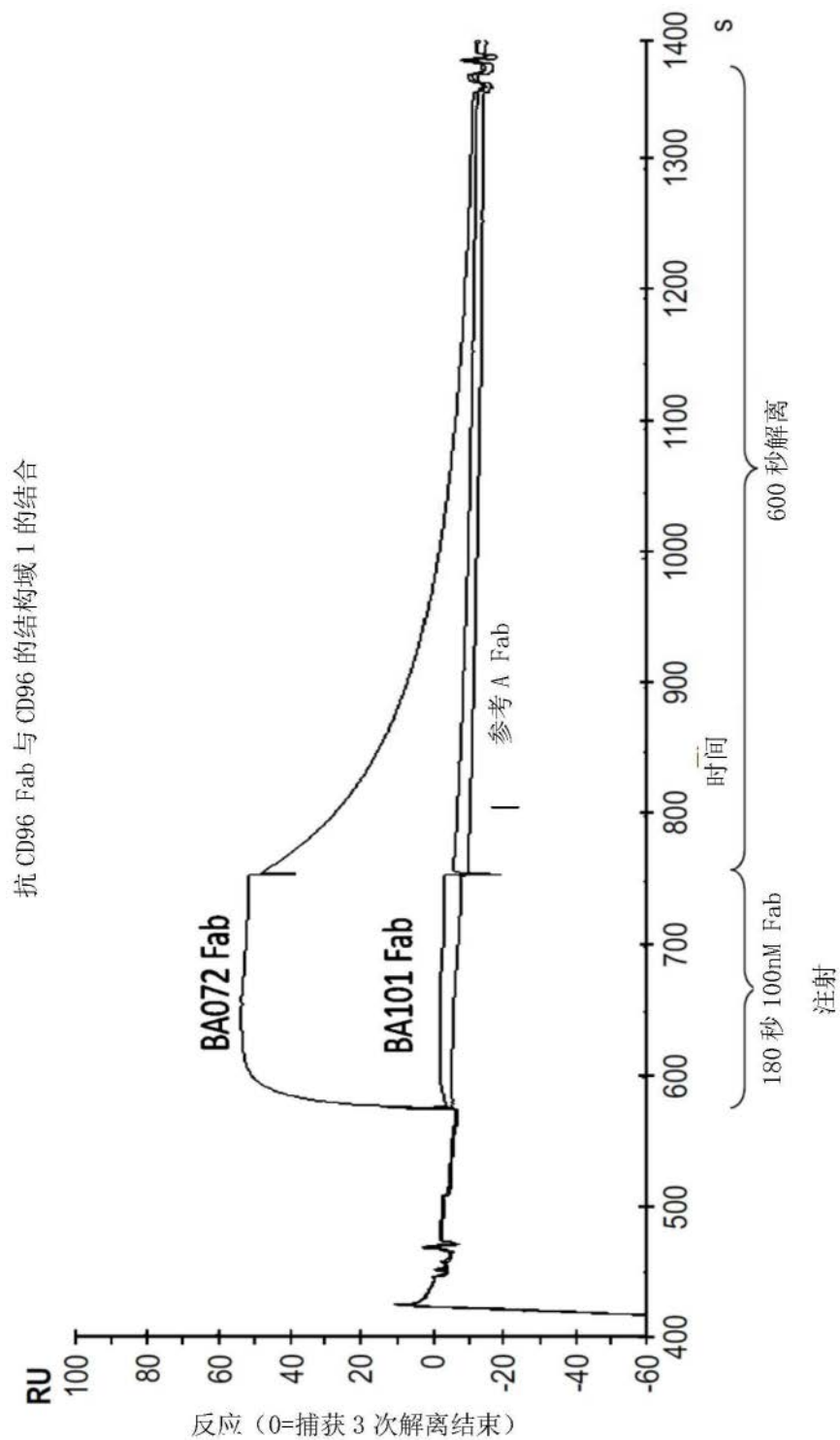


图36B

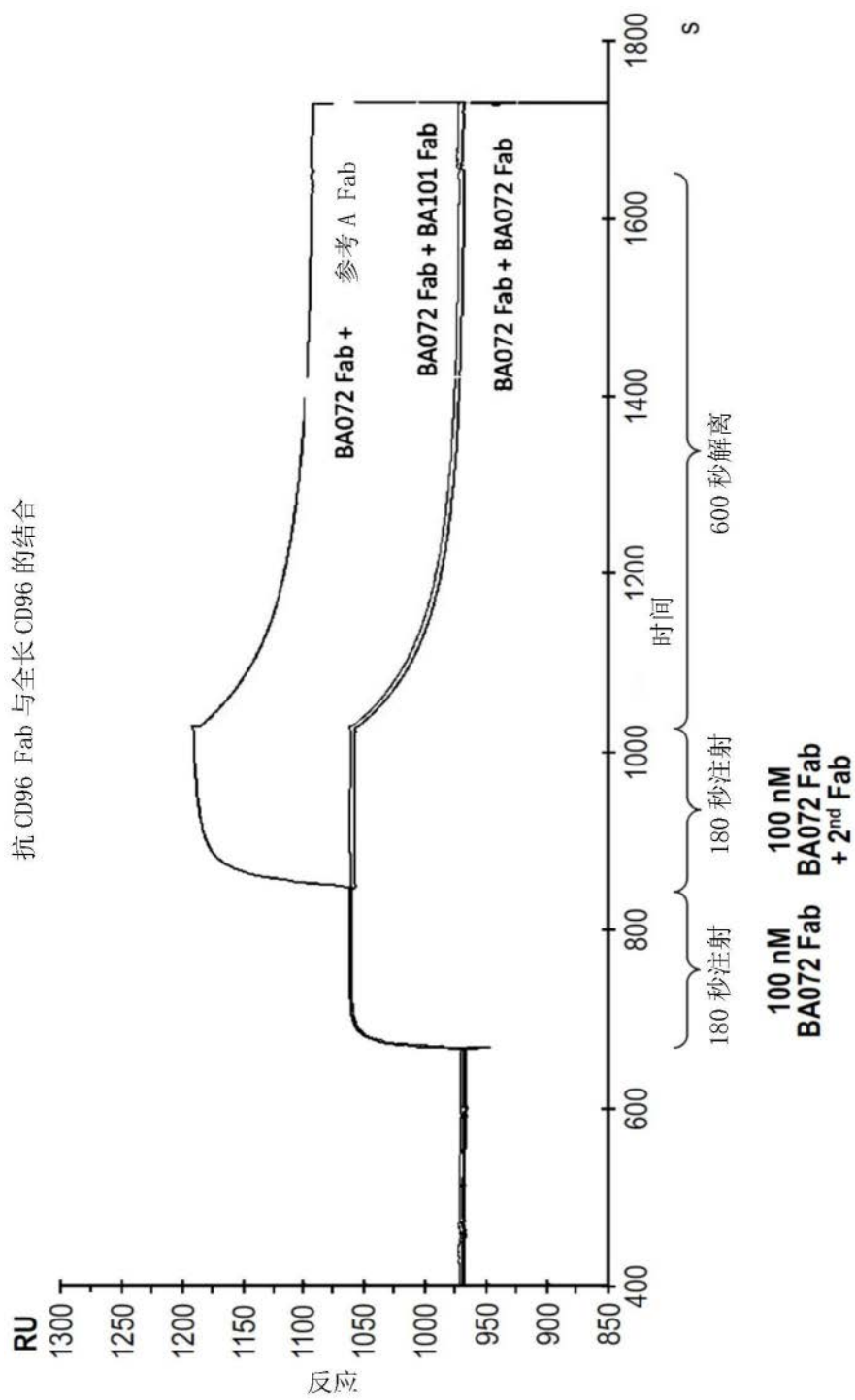


图37A

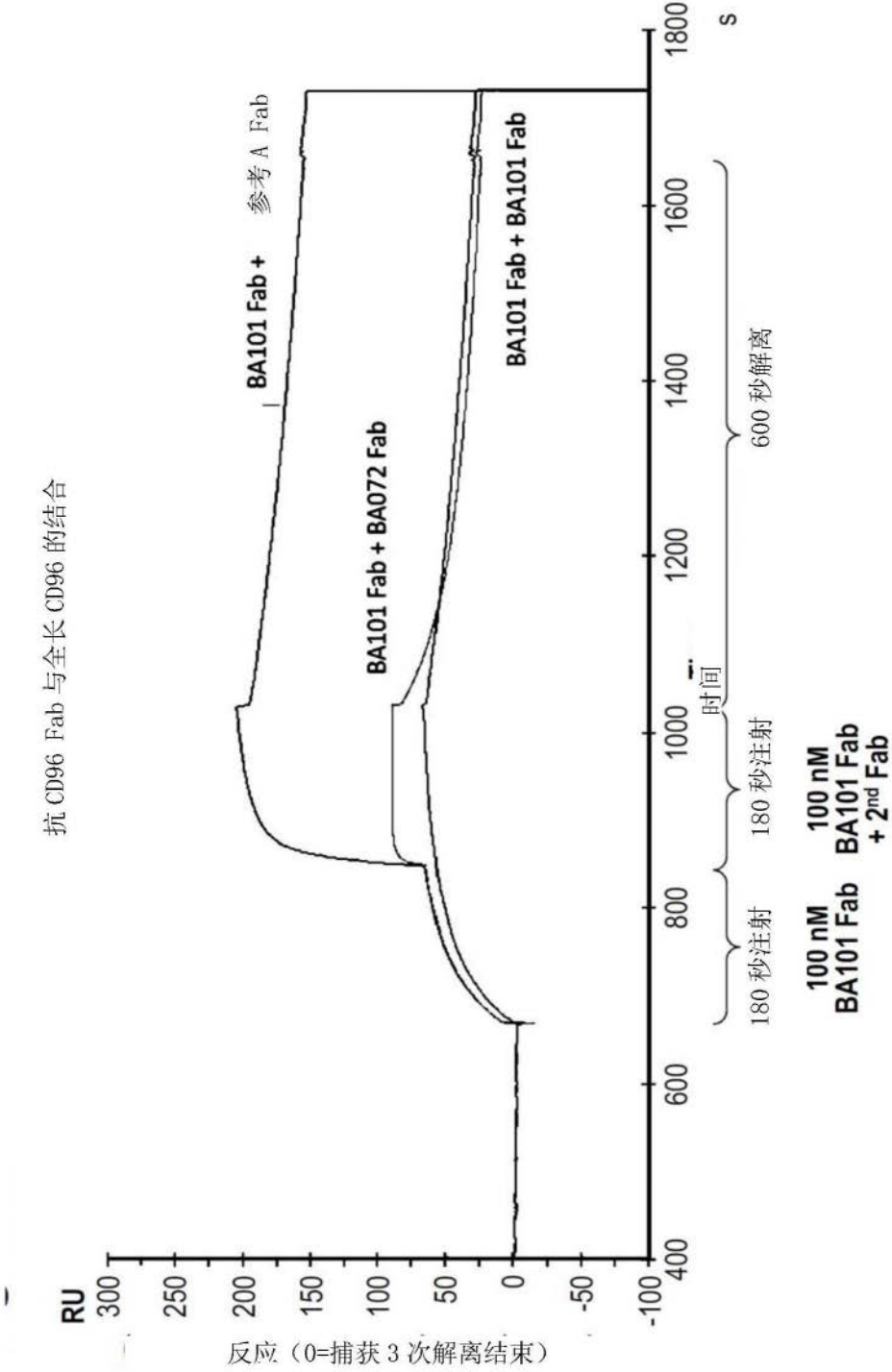


图37B

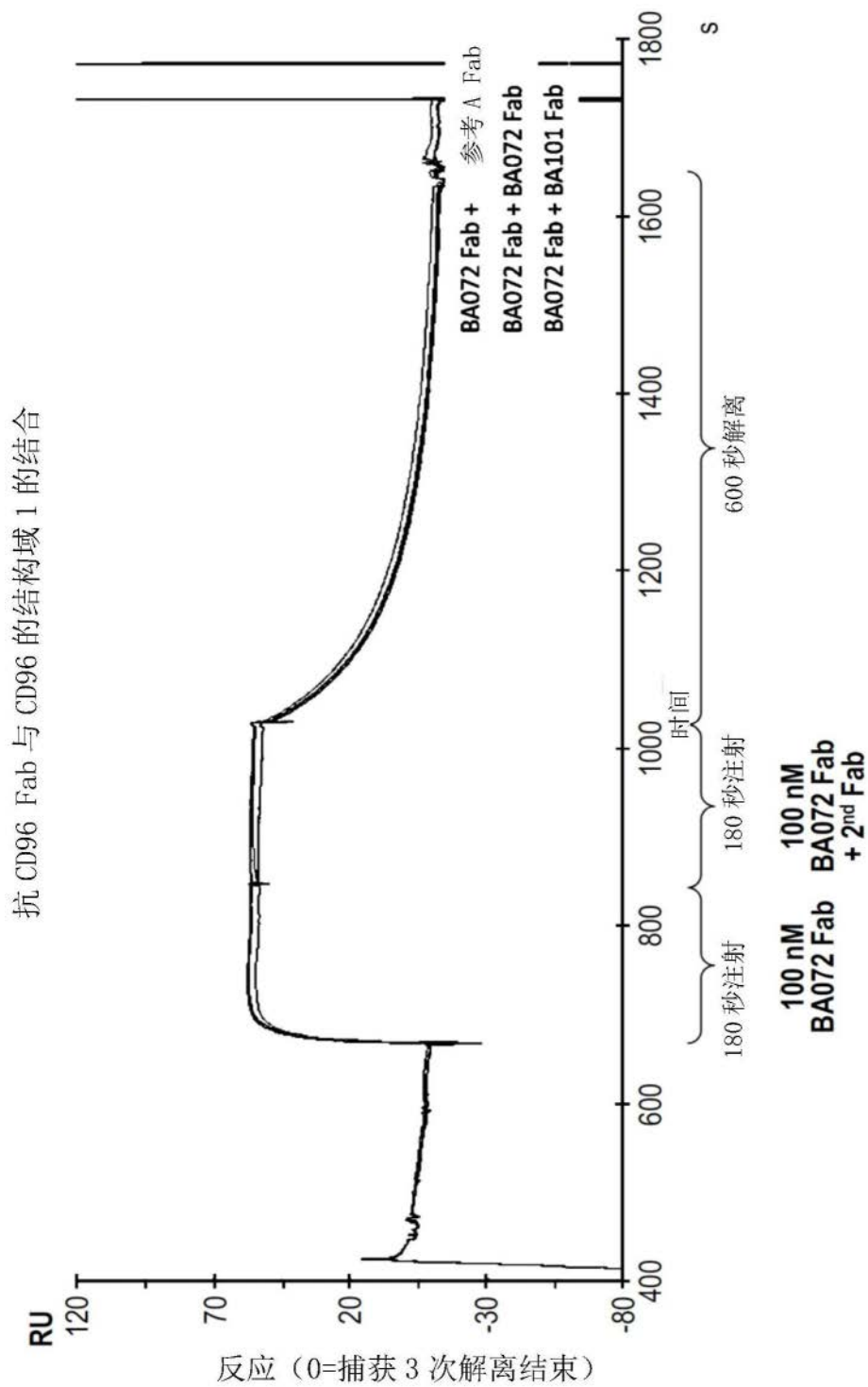


图37C

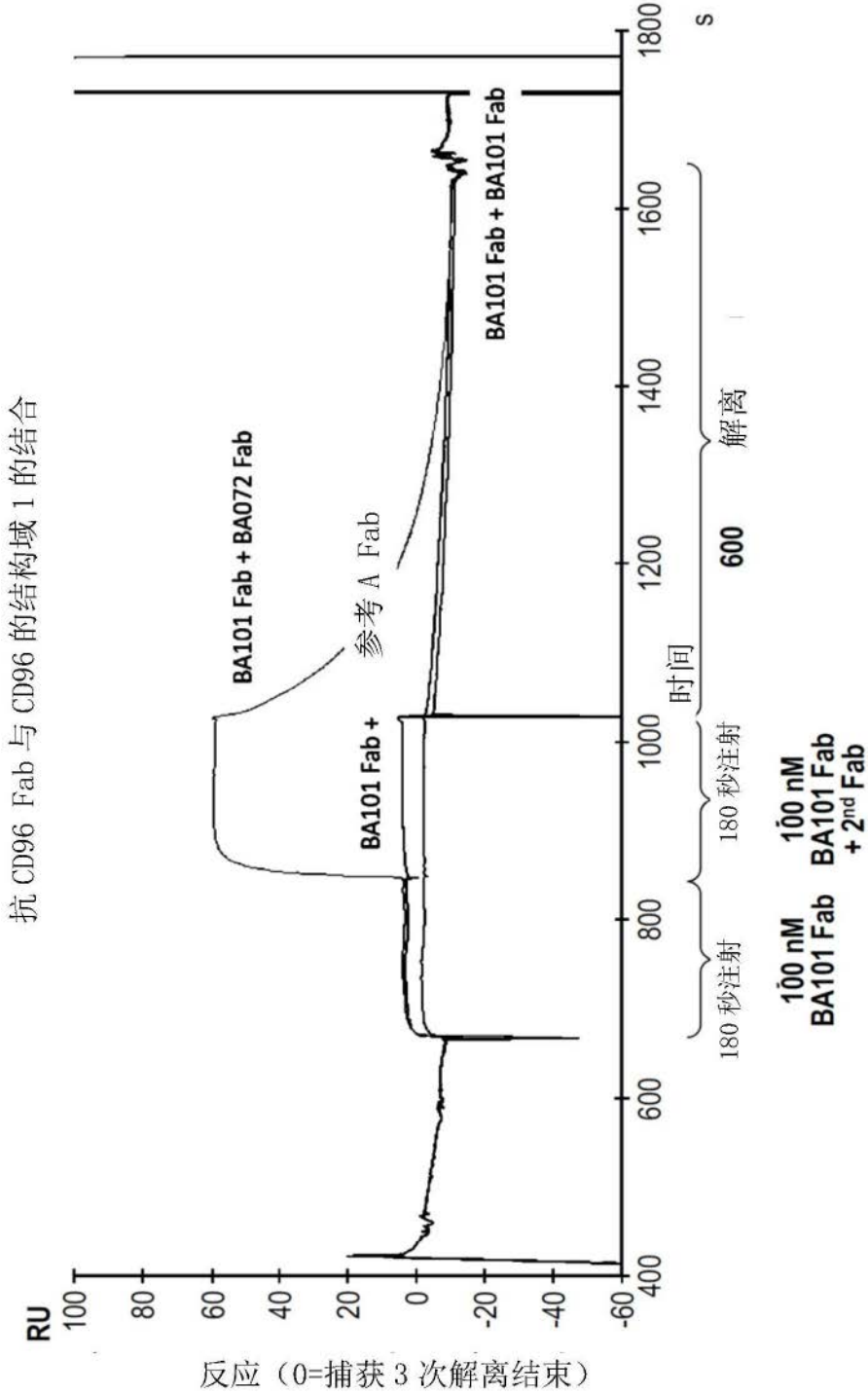


图37D