

B7H6 抗体及其应用

优先权信息

5 本申请请求 2021 年 12 月 07 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号为 202111485380.9 的专利申请的优先权和权益，并且通过参照将其全文并入此处。

技术领域

本发明涉及抗体领域，具体地，涉及一种能够结合 B7H6 的抗体或其抗原结合片段及用途。

10 背景技术

NK 细胞是机体中非常重要的一种固有样淋巴细胞，在抗病毒、抗肿瘤中发挥重要作用。NK 细胞表面表达多种活化性受体，包括 NKp30、NKG2D 等，识别并结合肿瘤细胞表面表达的配体，这些配体都是由自身基因编码的，在细胞恶性转化（肿瘤）等条件下表达在细胞表面。

15 NKp30 是种重要的 NK 细胞活化性受体，与其配体结合后，传递活化信号，促进 NK 细胞杀伤肿瘤。B7H6 是已知的唯一一种膜蛋白形式表达的 NKp30 配体，B7-H6 在多种肿瘤组织如黑色素瘤、肝癌等高表达，在正常组织中不表达，具有肿瘤特异性。

肿瘤微环境中 TGF- β 等细胞因子下调 NK 细胞表面 NKp30 表达，造成 NK 细胞无法利用 NKp30-B7H6 相互作用精准识别、灭杀肿瘤，进而造成肿瘤免疫逃逸。因而提供一种靶向 B7H6 的治疗性抗体药物十分必要。

20

发明内容

本发明的目的是克服现有技术的不足，提供一种能够与人及猴 B7H6 结合、并促进 B7H6 与 NKp30 结合的 B7H6 抗体及其用途。

本发明提供的抗体通过促进 B7H6 与 NKp30 的结合，促进 NK 细胞的抗癌功能。

25 在一方面，本发明提供了一种能够结合 B7H6 的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包括重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3，以及轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3，其中，

所述重链 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一；

30 所述重链 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一；

所述重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一；

35 所述轻链 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一；

所述轻链 CDR2 包含自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一；以及

所述轻链 CDR3 含选自 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一。

40 在某些实施例中，所述的抗体或其抗原结合片段包含：

1) 具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的重链 CDR1，具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的重链 CDR2，具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的重链 CDR3，具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的轻链 CDR1，具有 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列的轻链 CDR2，具有 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列的轻链 CDR3；或

45 2) 具有 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的重链 CDR1，具有 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的重链 CDR2，具有 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的重链 CDR3，具有 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的轻链 CDR1，具有 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的轻链 CDR2，具有 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的轻链 CDR3。

在某些实施例中，所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，(i)所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一至少 80%同源性的氨基酸序列；和/或，(ii)所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一至少 80%同源性的氨基酸序列。

在某些实施例中，所述重链可变区包含与选自(i)中的重链可变区至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列；所述轻链可变区包含与选自(ii)中的轻链可变区至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列。

在某些实施例中，所述抗体或其抗原结合片段包括：

1) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列，以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列；

2) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列；

3) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列；或

4) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列，以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在某些实施例中，所述抗体或其抗原结合片段包括：

1) 所述重链如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，以及所述轻链如 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列；

2) 所述重链如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，以及所述轻链如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；

3) 所述重链如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，以及所述轻链如 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列；或

4) 所述重链如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，以及所述轻链如 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

在某些实施例中，所述的分离的抗体是 IgG1、IgG2 或 IgG4。

在某些实施例中，所述抗体为单克隆抗体、鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体人改造抗体、人抗体、Fv、单链抗体(scFv)、Fab、Fab'，Fab'-SH 或者 F(ab')₂。

在某些实施例中，所述抗体或其抗原结合片段能够结合 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供了一种免疫缀合物，该免疫缀合物含有治疗剂以及与治疗剂偶联的上述的抗体或其抗原结合片段。

在又一方面，本发明提供了一种组合物，其中，所述组合物含有上述的抗体或其抗原结合片段、和/或上述的免疫缀合物、以及药学上可接受的载体。

在再一方面，本发明提供了一种用于检测样品中 B7H6 的试剂盒，该试剂盒含有上述抗体或其抗原结合片段。

在又一方面，本发明提供了上述的抗体或其抗原结合片段在制备用于检测样品中 B7H6 的试剂中的用途。

在再一方面，本发明提供了上述的抗体或其抗原结合片段在制备用于预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病的药物中的用途，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病，

任选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

在又一方面，本发明提供了一种核酸，其包含编码上述的抗体或其抗原结合片段的核酸。

在再一方面，本发明提供了一种重组载体或转化子，其含有上述的核酸。

在一个方面，本发明提供了一种重组细胞，所述重组细胞携带前面所述的核酸、表达载体或转化子

95 或表达前面所述的抗体或其抗原结合片段。

在另一个方面，本发明提供了一种药物，包括前面所述的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、组合物、药物、核酸、重组载体或转化子或重组细胞。

在又一方面，本发明提供了前面所述的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、组合物、药物、核酸、重组载体或转化子或重组细胞在治疗和/或预防 B7H6 介导的疾病中的用途。如前所述，所述抗体或其抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，进而促进 B7H6 与 NKp30 的相互作用，加强 NK 细胞抗癌功能，因此，所述抗体或其抗原结合片段，以及能够在合适的条件下表达获得所述抗体或其抗原结合片段的物质均能够有效预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病。

在另一方面，本发明提出了一种治疗和/或预防 B7H6 介导的疾病的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括向受试者施用以下中的至少之一：1) 前面所述的抗体或其抗原结合片段；2) 前面所述的免疫缀合物；3) 前面所述的组合物；4) 前面所述的药物；5) 前面所述的核酸；6) 前面所述的重组载体或转化子；和 7) 前面所述的重组细胞。如前所述，所述抗体或其抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，进而促进 B7H6 与 NKp30 的相互作用，加强 NK 细胞抗癌功能，因此，所述抗体或其抗原结合片段，以及能够在合适的条件下表达获得所述抗体或其抗原结合片段的物质，或者包含所述抗体或其抗原结合片段的物质均能够有效预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病，根据本发明实施例的方法能够有效预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病。

在又一方面，本发明提供了一种诊断受试者是否患有 B7H6 介导的疾病的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括使用下列中的至少之一对待测样品中的 B7H6 进行检测：1) 前面所述的抗体或其抗原结合片段；2) 前面所述的核酸；3) 前面所述的重组载体或转化子；和 4) 前面所述的重组细胞，基于所述 B7H6 的检测结果，确定所述待测样品中 B7H6 的含量。如前所述，本发明实施例的抗体或抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，因此，所述抗体或抗原结合片段可用于检测 B7H6，而 B7H6 介导多种疾病，因此，根据受试者来源的生物样品中含有的所述 B7H6 的水平可以判断所述受试者是否患有 B7H6 介导的疾病。此外，还可以利用上述物质监控受试者待测样品中的 B7H6 的含量，即上述物质也可以用于对患有 B7H6 介导的疾病的受试者进行疾病分期，也可以用于 B7H6 介导的疾病的预后评估。

在再一方面，本发明提供了下列中的至少之一在诊断受试者是否患有 B7H6 介导的疾病中的用途：1) 前面所述的抗体或其抗原结合片段；2) 前面所述的核酸；3) 前面所述的重组载体或转化子；和 4) 前面所述的重组细胞。如前所述，本发明实施例的抗体或抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，因此，所述抗体或抗原结合片段可用于检测 B7H6，而 B7H6 介导多种疾病，因此，根据受试者来源的生物样品中含有的所述 B7H6 的水平可以判断所述受试者是否患有 B7H6 介导的疾病。

通过上述技术方案，本发明提供了能够结合人及猴 B7H6 的抗 B7H6 抗体或其抗原结合片段。本发明的抗体或其抗原结合片段具有以下特性的至少一种：能够结合人及猴 B7H6；能够促进 B7H6 与 NKp30 的相互作用；能够促进 NK 细胞抗癌功能。

本发明的其它特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

130

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

135 附图是用来提供对本发明的进一步理解，并且构成说明书的一部分，与下面的具体实施方式一起用于解释本发明，但并不构成对本发明的限制。在附图中：

图 1 为根据本发明具体实施方式的鼠源 B7H6 抗体结合人 B7H6 的 ELISA 结果图；

图 2 为根据本发明具体实施方式的鼠源 B7H6 抗体结合 HL60- B7H6 细胞的结果图；

图 3 为根据本发明具体实施方式的人源化 B7H6 抗体结合人 B7H6 的 ELISA 结果图；

图 4 为根据本发明具体实施方式的人源化 B7H6 抗体结合 HL60- B7H6 细胞的结果图；

140 图 5 为根据本发明具体实施方式的人源化 B7H6 抗体结合 CHO-K1-cyno B7H6 细胞的结果图；

图 6 为根据本发明具体实施方式的人源化 B7H6 抗体结合猴 B7H6 的 ELISA 结果图；

图 7 为根据本发明具体实施方式的 B7H6 抗体促进受体 NKp30 结合的结果图；

图 8 为根据本发明具体实施方式的 B7H6 抗体介导补体依赖的细胞毒效应的结果图；

图 9 为根据本发明具体实施方式的 B7H6 抗体促进裸鼠对抗人急性髓系白血病 U-937 肿瘤的结果图。

145

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明，并不用于限制本发明。

在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值，这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说，各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间，以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围，这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

为了更容易理解本发明，以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义，否则本文中使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

在本发明中，在未作相反说明的情况下，使用的术语抗原结合片段也即“抗体片段”，抗体片段通常是指抗原结合性抗体片段，可以包括完整抗体的一部分，一般是抗原结合区或可变区，抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 scFv，双抗体，线性抗体，单链抗体分子等。

术语“互补决定区”或“CDR”或“CDR 序列”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸序列，例如，通常包括：轻链可变区中 23-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)附近，和重链可变区中 31-35B(H1)、50-65(H2)和 95-102(H3)附近的氨基酸残基（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)）；和/或来自“高变环”（例如，轻链可变区中 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)，和重链可变区中 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3)附近的氨基酸残基（Chothia 和 Lesk J.Mol.Biol.196: 901-917(1987)）。

术语“保守修饰形式的氨基酸序列”指这样的氨基酸修饰，它不显著影响或改变包含该氨基酸序列的抗体的结合特性，该修饰包括氨基酸置换、增加和缺失。修饰可通过例如定点诱变和 PCR 介导的诱变等标准技术引入本发明的抗体中。保守氨基酸置换系其中的氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的置换。在本领域中已经确定具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（如赖氨酸、精氨酸、组氨酸），具有酸性侧链的氨基酸（如天冬氨酸、谷氨酸），具有不带电的极性侧链的氨基酸（如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸），具有非极性侧链的氨基酸（如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸），具有β-支化侧链的氨基酸（如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）、和具有芳香侧链的氨基酸（如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，本发明的抗体的 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替代，并且使可用此处说明的功能测定方法对经改变的抗体的保留功能进行测试。优选的是，保守修饰在数目上不超过 1 个或 2 个。

对于多肽而言，术语“实质同源性”表示，两个多肽或其指定序列在最佳比对及比较（其中适当插入或缺失核苷酸）时有至少约 80%的氨基酸、通常至少约 90%至 95%、且更优选至少约 98%至 99.5%的氨基酸相同。

两条序列之间的同一性%在最佳比对序列时随这些序列所共享的相同位置数而变化（即同源性% = 相同位置数/总位置数×100），其中最佳比对系考虑到为达成两条序列的最佳比对而需要引入的空位数及

每一空位的长度来确定。两条序列之间的序列比较及同一性百分数测定可使用数学算法来完成，如下文非限制性实施例中所述。

在不实质性影响抗体活性（保留至少 95% 的活性）的前提下，本领域技术人员可以对本发明的序列
190 替换、添加和/或缺失一个或多个（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或多个）氨基酸，以获得所述抗体或其功能性片段之序列的变体。它们都被视为包括在本发明保护的范围内。如在可变区将具有类似性质的氨基酸进行替换。本发明所述变体的序列可以与参比序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的一致性（或同源性）。本发明所述的序列一致性可以使用序列分析软件测量。例如使用缺省参数的计算机程序 BLAST，尤其是 BLASTP 或 TBLASTN。本发明述及的氨基酸序列均按照 N 端至 C 端的方式示出。
195

如前所述，本发明的抗体可以是全长的（例如，IgG1 或 IgG4 抗体）或可仅包含抗原结合部分（例如，Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段），或可以被修饰以影响功能。本发明包括具有修饰的糖基化模式的抗 B7H6 抗体。在一些应用中，进行修饰以除去不期望的糖基化位点可以是有用的，或在寡糖链上不存在岩藻糖部分以例如增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 功能的抗体。在另一些应用中，可进行半乳糖基化
200 修饰以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。

本文所使用的术语“功能性片段”尤其是指抗体片段如 Fv、scFv(sc 指单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或者双抗体(diabody)、或者通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半寿期的任何片段，所述化学修饰例如添加聚(亚烷基)二醇，如聚乙二醇(“聚乙二醇化，PEG 化”)(被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 或 Fab'-PEG 的聚乙二醇化片段)(“PEG”为聚乙二醇)，所述片段具有
205 B7H6 结合活性。优选地，所述功能性片段将由其来源抗体的重链可变区或轻链可变区的部分序列构成或者包含它们，所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，对于 B7H6，优选至少等于其来源抗体亲和力的 1/100，在更优选方式中至少等于 1/10。这种功能片段将包含最少 5 个氨基酸，优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

如前所述，本发明提供了一种能够结合 B7H6 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，该抗体包括
210 重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3，以及轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3。

根据本发明，所述抗体能够结合 B7H6，特别是 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

本发明的优选实施方式中，为了进一步提高抗体的生物可接受性，还可以对抗体进行人源化，即，所述抗体为嵌合抗体或人源化抗体。术语“嵌合抗体”是指利用重组 DNA 技术，将来自一个物种（如小鼠）的单克隆抗体的恒定区氨基酸序列替换为来自另一个物种（如人）的抗体的恒定区而获得的重组抗体。术语“人源化抗体”是指利用重组 DNA 技术，将来自一个物种（如小鼠）的单克隆抗体的恒定区和
215 和可变区的非 CDR (Fv 骨架区 (FR)) 氨基酸序列全部替换为来自另一个物种（如人）的抗体的恒定区和可变区的非 CDR 氨基酸序列而获得的重组抗体。也即，一个抗体的恒定区被人源化时称为嵌合抗体，而恒定区和可变区的非 CDR 氨基酸序列全部人源化后称为人源化抗体。人源化的方法可以参照常规的抗体工程技术进行，在此不再赘述。

220 本发明提供的人源化抗体的重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 17 所示，轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 18 所示；或者，重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 19 所示，轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 20 所示。

本发明提供的免疫缀合物含有治疗剂以及与治疗剂偶联的如前所述的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段与治疗剂偶联的方式可以为常规的方式。

225 本发明提供的组合物含有如前所述的抗体或其抗原结合片段、和/或上述免疫缀合物、以及药学上可接受的载体。在某些实施方式中，所述组合物包括在时间和/或空间上分开的组合，只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如，所述组合物中所含的成分可以以整体施用于受试者，或者分开施用于受试者。当所述组合物中所含的成分分开地施用于受试者时，各个成分可以同时或依次施用于受试者。

230 术语“药学上可接受的”表明组合物能够给药至受试者而不产生妨碍组合物给药的不良生理反应。例如，“药学上可接受的载体”是指在制备一般安全、无毒、可取的药物组合物中有用的载体，优选地，这些载体或稀释剂的实例包括但不限于：水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、乙醇、聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯、

5%人血清白蛋白，也可以使用脂质体和非水媒介物，例如不挥发油。

235 本发明的组合物也可以相互组合、或与一种或多种其它的治疗化合物组合地给药，例如，与化疗剂组合给药。因此，所述组合物还可以含有化疗剂。本发明的抗体或其抗

原结合片段、或免疫缀合物还可以与第二治疗剂组合，所述第二治疗剂的示例性试剂包括但不限于抑制 B7H6 活性的其他试剂（包括其他抗体或其抗原结合片段、肽抑制剂、小分子拮抗剂等）和/或干扰 B7H6 上游或下游信号转导的试剂。

240 通常，所述抗体或其抗原结合片段以有效量给药，即足以实现期望的治疗和/或预防效果的量，例如，引起与被治疗的疾病相关的症状的预防或缓解的量，所述疾病例如与 B7H6 相关的疾病。给药至受试者的组合物的有效量将取决于疾病的类型和严重程度，以及取决于个体的特征，例如一般健康状态、年龄、性别、体重和对药物的耐受性；还将取决于疾病的严重程度和类型，本领域技术人员将能够根据这些因素等确定合适的剂量。

245 本发明提供的用于检测样品中 B7H6 的试剂盒含有如上所述的抗体或其抗原结合片段。所述样品可以为患有 B7H6 介导的疾病的患者（特别是移植排斥、自身免疫病、感染性疾病或癌症患者，更优选是患有肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种的患者）的组织。所述试剂盒还可以包括常规用于检测 B7H6 的试剂，如包被液等。

250 本发明还提供了如上所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于检测样品中 B7H6 的试剂中的用途。如前所述，所述样品可以为患有 B7H6 介导的疾病患者的组织，在此不再赘述。本发明的抗体或其抗原结合片段与 B7H6 具有良好的亲和性，能够有效地检测样品中的 B7H6。

255 本发明还提供了所述的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、组合物、核酸、重组载体或转化子或重组细胞在制备用于预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病的药物中的用途。优选地，所述 B7H6 介导的疾病为移植排斥、自身免疫病、感染性疾病或癌症。更优选地，所述癌症为表达 B7H6 的癌症。进一步优选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。进一步优选地，所述感染性疾病包括但不限于 HIV 病毒感染和/或乙型肝炎病毒感染。

本发明涉及一种药物，所述药物包括前面所述的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、组合物、核酸、重组载体或转化子或重组细胞。

260 根据本发明的一些具体实施例，上述药物可以包括下列附加技术特征中的至少之一：

根据本发明的一些具体实施例，所述药物包括药学上可接受的载体和有效量的所述抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、组合物、核酸、重组载体或转化子或重组细胞。

265 本发明还涉及一种预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病（如前所述）的方法，该方法包括：将有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、组合物、重组细胞、核酸和药物中的至少一种给药至患者。其中，给药的方式可以为口服给药、经鼻给药、皮内给药、皮下给药、肌内给药或静脉给药或腹腔内给药。如前所述，所述抗体或其抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，进而促进 B7H6 与 NKp30 的相互作用，加强 NK 细胞抗癌功能。因此，所述抗体或其抗原结合片段，以及能够在合适的条件下表达获得所述抗体或其抗原结合片段的物质，或者包含所述抗体或其抗原结合片段的物质均能够有效预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病，根据本发明实施例的方法能够有效预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病。

270 根据本发明的一些具体实施例，上述方法还可以包括下列附加技术特征中的至少之一：

根据本发明的具体实施例，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病。

根据本发明的具体实施例，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

本发明中涉及的“患者”或“受试者”一般指哺乳动物，如灵长类动物和/或啮齿类动物，特别是人或鼠。

275 本领域技术人员可以将编码本发明所述抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子克隆到载体（特别是表达载体）中，进而转化宿主细胞，通过诱导表达可获得所述抗体或其抗原结合片段。因此，本发明还提供了编码上述抗体或其抗原结合片段的（分离的）核酸以及含有该核酸的重组载体和转化子。所述核酸优选为基因工程手段获得的表达盒。

重组载体可以指克隆载体，也可以指表达载体，可以通过将所述核酸与商购的载体（如质粒或病毒载体）可操作地连接而获得，常用的质粒包括 pScTag2、PEE14、pMH3 等。

本发明的表达载体可以含有编码的所述抗体的重链可变区、轻链可变区和/或恒定区的 DNA 序列。然而，也可以分别构建两种表达载体，一种含有重链可变区和恒定区，另一种含有轻链可变区和恒定区，一同转染哺乳动物细胞。在一个优选的实施方式中，所述表达载体进一步含有启动子和编码分泌信号肽的 DNA 序列，以及至少一种用于筛选的抗药基因。

本发明所述宿主细胞可以为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。所述原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核宿主细胞可以为包括巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌，草地粘虫等昆虫细胞，烟草等植物细胞，BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方式中，本发明所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞。

本发明涉及一种重组细胞，所述重组细胞携带前面所述的核酸、重组载体或转化子、或抗体或抗原结合片段。所述重组细胞是通过转染或者转化所述表达载体获得的。根据本发明的实施例，所述重组细胞在合适条件下可高效表达上述抗体，所述抗体或其抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，进一步地，所述抗体或抗原结合片段具有良好的预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病的效果。

需要注意的是，本发明所述重组细胞不受特别限制，可以为原核细胞、真核细胞或噬菌体。所述原核细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核细胞可以为包括巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌，草地粘虫等昆虫细胞，烟草等植物细胞，BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施例中，本发明所述重组细胞优选为哺乳动物细胞，包括 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞，且不包括动物生殖细胞、受精卵或胚胎干细胞。

需要说明的是，本申请说明书中所述的“适合条件”，是指适合本申请所述抗体或其抗原结合片段表达的条件。本领域技术人员容易理解的是，适合抗体或抗原结合片段表达的条件包括但不限于合适的转化或转染方式、合适的转化或转条件、健康的宿主细胞状态、合适的宿主细胞密度、适宜的细胞培养环境、适宜的细胞培养时间。“适合条件”不受特别限制，本领域技术人员可根据实验室的具体环境，优化最适的所述抗体或其抗原结合片段表达的条件。

本发明还涉及前面所述的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、组合物、药物、核酸、重组载体或转化子或重组细胞在治疗和/或预防 B7H6 介导的疾病中的用途。如前所述，所述抗体或其抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，进而促进 B7H6 与 NKp30 的相互作用，加强 NK 细胞抗癌功能，因此，所述抗体或其抗原结合片段，以及能够在合适的条件下表达获得所述抗体或其抗原结合片段的物质均能够有效预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病。

根据本发明的具体实施例，上述治疗和/或预防 B7H6 介导的疾病中的用途还可以包括下列附加技术特征中的至少之一：

根据本发明的具体实施例，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病。

根据本发明的具体实施例，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种诊断受试者是否患有 B7H6 介导的疾病的方法。根据本发明的具体实施例，所述方法包括使用下列中的至少之一对待测样品中的 B7H6 进行检测：1) 前面所述的抗体或其抗原结合片段；2) 前面所述的核酸；3) 前面所述的重组载体或转化子；和 4) 前面所述的重组细胞，基于所述 B7H6 的检测结果，确定所述待测样品中 B7H6 的含量。如前所述，本发明实施例的抗体或抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，因此，所述抗体或抗原结合片段可用于检测 B7H6，而 B7H6 介导多种疾病，因此，根据受试者来源的生物样品中含有的所述 B7H6 的水平可以判断所述受试者是否患有 B7H6 介导的疾病。此外，还可以利用上述物质监控受试者待测样品中的 B7H6 的含量，即上述物质也可以用于对患有 B7H6 介导的疾病的受试者进行疾病分期，也可以用于 B7H6 介导的疾病的预后评估。

根据本发明的具体实施例，上述方法还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一：

根据本发明的具体实施例，所述待测样品中 B7H6 的含量不低于患病的最低标准是待测样品来源于

325 患有 B7H6 介导的疾病的患者的指示。所述最低标准的值可以通过对大量患有所述 B7H6 介导的疾病的个体和大量健康个体的待测样本中的 B7H6 的含量进行差异比较分析、以及验证，而确定下来。

根据本发明的具体实施例，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病。

根据本发明的具体实施例，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

330 根据本发明的具体实施例，所述待测样品包括下列中的至少之一：组织、细胞、血液、血清、汗液、粪便和尿液。

在本发明的另一方面，本发明提出了下列中的至少之一在诊断受试者是否患有 B7H6 介导的疾病中的用途：1) 前面述的抗体或其抗原结合片段；2) 前面所述的核酸；3) 前面所述的重载体或转化子；和 4) 前面所述的重组细胞。如前所述，本发明实施例的抗体或抗原结合片段能够有效与 B7H6 进行结合，因此，所述抗体或抗原结合片段可用于检测 B7H6，而 B7H6 介导多种疾病，因此，根据受试者来源的生物样品中含有的所述 B7H6 的水平可以判断所述受试者是否患有 B7H6 介导的疾病。

根据本发明的具体实施例，上述用途还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一：

根据本发明的具体实施例，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病。

根据本发明的具体实施例，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

340 本发明所涉及的序列说明详见表 1。

表 1 氨基酸序列说明表

SEQ ID NO:	序列	说明
1	GYTFTSYY	12F5 HCDR1
2	INPSNGGT	12F5 HCDR2
3	TRTLYYGNDWYFDV	12F5 HCDR3
4	SSVNY	12F5 LCDR1
5	DTS	12F5 LCDR2
6	QQWSSNPVT	12F5 LCDR3
7	GYTFTDYN	12G4 HCDR1
8	INPNNGGT	12G4 HCDR2
9	ARSEVFYGYADY	12G4 HCDR3
10	QSVDDYDGDSY	12G4 LCDR1
11	AAS	12G4 LCDR2
12	QQSKEDPRT	12G4 LCDR3
13	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYYMYWVKQRPGQGLEWIGEINPSNGGTNFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRITYYGNDWYFDVWGAGTTVTVSS	鼠源 12F5 重链可变区
14	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPVTFGAGTKLELK	鼠源 12F5 轻链可变区
15	EVLLQQSGPEVVKPGASVKITCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTLYNQKFRGRVTIVDKSSSTAYMELRSLTSDDTAVYYCARSEVFYGYADYWGQGTTLTVSS	鼠源 12G4 重链可变区
16	DIVLTQSPVSLAVPLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGPPKLLIYAASLTLSGIPVRFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAASYCQQSKEDPRTFGGGTKLEIK	鼠源 12G4 轻链可变区
17	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWI	人源化 12F5

	GEINPSNGGTNFNFKSRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRLLYYGNDWYFDVWGQGTTVTVSS	重链可变区
18	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVNYMHWYQQKPDQSPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPVTFGQGTLKLEIK	人源化 12F5 轻链可变区
19	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQAPGKGLEWIGDINPNNGGTLYNQKFRGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARESEVFGYNYADYWGQGTTVTVSS	人源化 12G4 重链可变区
20	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDDYDGSYMNWYLQKPGQPPQLLIYAASTLHSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSKEDPRTFGQGTKLEIK	人源化 12G4 轻链可变区
21	MTWRAAASTCAALLILLWALTTEGDLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQPLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGDHQAERFGAIVSPWRLKSGDASLRPLPGIQLEEAGEYRCEVVVTPPLKAQGTQVLEVVASPARLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHIEISEDVITGPTIKNMDGTFNVTSCCLKLNSSQEDPGTVYQCVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFSIHWWPISFIGVGLVLLIVLPWKKICNKSSSAYTPLKCILKHWNSFDTQTLKKEHLIFFCTRAWPSYQLQDGEAWPPEGSVNINTIQQLDVFCRQEGKWSEVPYVQAFFALRDNPDLCQCCRIDPALLVTSGKSIDDNSTKSEKQTPREHSDAVPDAPILPVSPIEWEPPATTSTTPVLSSQPPTLLPLQ	B7H6 蛋白
22	DLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQPLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGDHQAERFGAIVSPWRLKSGDASLRPLPGIQLEEAGEYRCEVVVTPPLKAQGTQVLEVVASPARLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHIEISEDVITGPTIKNMDGTFNVTSCCLKLNSSQEDPGTVYQCVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFSLEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	重组 B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白
23	DLKVEMMARGIQATRLNDSVTISCKVIYSQPLNITSMGITWFRKSLTDKEVKVFEFFGDHQAERFGANVSLWRLKSGDASLKLPGVQLEEAGEYRCEVVVTPPLKAQGTQVQLKVVASPTSRLFQDQAVVKENEGKYMCESSRFYPKDINITWEKWTQKSPHHVVISENVITGPTIKNMDGTFNITSYLKLNSSQEDPGTVYRCVIRHESLHTPVSIDFILTAQQSLSEPEKTDPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	重组 食蟹猴 B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白
24	MAWRAASSACAAPLLLWCALMTAGDLKVEMMARGIQATRLNDSVTISCKVIYSQPLNITSMGITWFRKSLTDKEVKVFEFFGDHQAERFGANVSLWRLKSGDASLKLPGVQLEEAGEYRCEVVVTPPLKAQGTQVQLKVVASPTSRLFQDQAVVKENEGKYMCESSRFYPKDINITWEKWTQKSPHHVVISENVITGPTIKNMDGTFNITSYLKLNSSQEDPGTVYRCVIRHESLHTPVSIDFILTAQQSLSEPEKTDIFSIIYGWLFISFIAAGLILLIVLIHWKKVPLREEEGRN	食蟹猴 B7H6 蛋白

25	WVSQPPEIRTLEGSSAFLPCSFNASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRNGT PEFRGRLAPLASSRFLHDHQAELHIRDVRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTG NGTRLVVEKEHPQLGENLYFQSLEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	重 组 NKp30 胞外区 Fc 融 合蛋白
26	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYMYWVKQRPGQGLEWI GEINPSNGGTNFNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRTL YYGNDWYFDVWGAGTTVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTI KPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCK VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	鼠源 12F5 重 链
27	QIVLTQSPAISASPGKEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQKSGTSPKRWIYDT SKLASGVPARFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPVTFGAGT KLELKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS PIVKSFNRECE	鼠源 12F5 轻 链
28	EVLLQQSGPEVVKPGASVKITCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIG DINPNNGGTLYNQKFRGRVTLIVDKSSSTAYMELRSLTSDDTAVYYCARSE VFYGNADYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVK GYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	鼠 源 12G4 重链
29	DIVLTQSPVSLAVPLGQRATISCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGPPKL LIYAASSTLHSGIPVRFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAASYCQQSKEDPRTF GGGTLKLEIKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHK TSTPIVKSFNRECE	鼠 源 12G4 轻链
30	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMYWVRQAPGQGLEWI GEINPSNGGTNFNEKFKSRVTLTVDKSISTAYMELSLRSLSDDTAVYYCTRTL YYGNDWYFDVWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	人源化 12F5 重链

	VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
31	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVNYMHWYQQKPDQSPKRLIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPVTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	人源化 12F5 轻链
32	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNMDWVRQAPGKGLEWI GDINPNNGGTLYNQKFRGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARS EVFYGNVADYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	人源化 12G4 重链
33	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVYDGDGSMNWYLQKPGQPPQLL IYAASLTLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQSKEDPRTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	人源化 12G4 轻链

编码本发明的抗体的重链和/或轻链的核酸在本发明的范围内，根据重链和/或轻链的氨基酸序列，本领域技术人员能够很容易得到相应的核酸序列，如表 2 所示。

345

表 2 核苷酸序列说明表

SEQ ID NO:	序列	说明
34	GGGTACACATTTACCAGCTACTAT	12F5 HCDR1
35	ATTAATCCATCTAACGGGGGAACC	12F5 HCDR2
36	ACTAGGACCCTGTATTACGGTAACGACTGGTATTTTCGATGTG	12F5 HCDR3
37	TCTTCTGTAACTAT	12F5 LCDR1
38	GACACCTCC	12F5 LCDR2
39	CAGCAATGGAGCAGTAATCCAGTCACA	12F5 LCDR3
40	GGGTACACATTTACAGACTACAAT	12G4 HCDR1
41	ATCAATCCAAACAATGGCGGTACC	12G4 HCDR2
42	GCTCGCTCTGAAGTCTTTTATGGGAATTATGCTGACTAC	12G4 HCDR3
43	CAGAGCGTGGACTATGATGGCGACAGCTAT	12G4 LCDR1
44	GCCGCCTCC	12G4 LCDR2
45	CAGCAGAGCAAAGAGGATCCTAGAACCC	12G4 LCDR3
46	CAGGTGCAGTTGCAACAATCTGGTGCAGAGCTGGTGAAACCTGGTGCA TCAGTGAAGCTTTCATGTAAAGCTTCCGGGTACACATTTACCAGCTACTA TATGTACTGGGTAAAGCAGCGTCTGGACAGGGTCTGGAGTGGATCGGC GAGATTAATCCATCTAACGGGGGAACCAACTTTAACGAAAAGTTCAAGT CTAAGGCTACACTGACAGTCGATAAATCCTCATCCACCGCCTACATGCA GCTCTCTTCTCTGACTTCAGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCACTAGG ACCCTGTATTACGGTAACGACTGGTATTTTCGATGTGTGGGGTGCCGGTAC	鼠源 12F5 重 链可变区

	AACAGTGACCGTGTCTCA	
47	CAAATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCAATAATGTCCGCATCTCCTGGTG AGAAAGTGACCATGACTTGTTTCAGCTTCCTCTTCTGTAACTATATGCAC TGGTACCAACAGAAGTCTGGCACCTCCCCAAAGCGGTGGATTTATGACA CCTCCAAGCTGGCTAGCGGGGTACCCGCAAGGTTCTCCGGTTCAGGCA GCGGCACTTCTTACTCCCTGACTATTAGCTCTATGGAGGCAGAGGATGCC GCTACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGTAATCCAGTCACATTGGGG CCGGAACCAAGCTGGAGCTGAAG	鼠源 12F5 轻 链可变区
48	GAAGTTCTGCTTCAGCAGTCTGGCCCAGAAGTTGTTAAGCCAGGAGCC TCCGTGAAAATTACTTGCAAGGCCTCCGGGTACACATTTACAGACTACA ATATGGACTGGGTGAAGCAGTCCCATGGAAAGAGTCTGGAATGGATCGG CGATATCAATCCAAACAATGGCGGTACCTCTATAACCAGAAATTCGCG GACGTGTGACCTTGATCGTCGACAAAAGTAGTTCTACTGCCTACATGGA GCTGCGCAGCCTGACTAGTGACGACACCGCGTCTACTATTGCGCTCGC TCTGAAGTCTTTATGGGAATTATGCTGACTACTGGGGCCAGGGTACCAC TTTGACCGTCTCCAGT	鼠源 12G4 重链可变区
49	GACATTGTGCTGACTCAGAGTCTGTAAAGTCTGGCAGTTCCCCTCGGCC AAAGAGCTACCATTAGTTGTAAGGCTTCCCAGAGCGTGGACTATGATGG CGACAGCTATATGAATTGGTATCAACAGAAGCCAGGACAGCCACCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCCTCCACCCTGCATTACAGGTATCCCTGTGCGATT TTCTGGTAGTGGCTCCGGCACAGATTTACCCCTGAATATCCATCCAGTTG AGGAGGAGGATGCTGCCTCTTACTACTGTCAGCAGAGCAAAGAGGATC CTAGAACCTTCGGCGGTGGCACTAAGCTGGAAATTAAG	鼠源 12G4 轻链可变区
50	GAAGTTCAACTGGTTCAGAGCGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCAGGTGCC AGCGTGAAAGTTAGTTGCAAGGCATCCGGATACACTTTCTACTAGCTATTA TATGTATTGGGTGCGACAGGCCCCAGGGCAAGGTTTGGAGTGGATCGGA GAGATCAATCCTTCAAATGGCGGCACAAATTTCAACGAAAAGTTCAAAT CTCGCGTGACTCTGACAGTGGACAAGTCCATCTCCACAGCATATATGGA GCTGAGCCGGCTTAGATCCGATGACACTGCTGTCTACTATTGTACAAGA ACACTGTACTATGGCAACGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGACAGGGGA CCACTGTGACCGTCTCCAGT	人源化 12F5 重链可变区
51	GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCAGATTTCCAGAGTGTACACCAAAG GAGAAGGTAACAATTACATGCAGTGCCAGCAGTAGCGTGAAGTATATGC ATTGGTATCAGCAGAAACCCGATCAGTCCCCTAAGCGACTGATCTACGAT ACCTCCAAGCTGGCCAGCGGTGTTCCAAGTAGGTTCTCTGGCAGCGGG TCTGGGACAGACTACACTCTCACTATCAACTCTCTGGAAGCTGAGGATG CTGCTACTTATTATTGCCAGCAGTGGAGCTCAAATCCCGTTACCTTTGGC CAGGGTACCAAGCTCGAAATTAAA	人源化 12F5 轻链可变区
52	GAAGTGCAGCTTGACAGAGTGGAGCAGAGGTCAAGAAACCAGGAGC TTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCTCCGGCTATACCTTTACTGATTAC AACATGGACTGGGTCCGTGAGGCTCCTGGAAAAGGACTGGAGTGGATT GGTGACATTAATCCTAATAACGGCGGCACACTTTACAATCAGAAGTTTC GTGGTAGAGTTACACTGACTGTGGATAAATCAATCAGCACCGCCTATATG GAGCTGTCCCGACTGCGGTCCGACGATACTGCAGTGTATTACTGCGCCA GGTCAGAGGTGTTTTACGGTAACCTACGCAGACTATTGGGGCCAGGGGAC AACAGTGACAGTCAGCAGC	人源化 12G4 重链可变区

53	GACATAGTATTGACCCAGACACCATTGTCTTTGAGCGTTACCCCAGGCC AGCCAGCTTCAATATCTTGCAAGGCCTCTCAGTCCGTCGACTATGATGGC GATTCCTACATGAATTGGTACCTCCAAAAGCCAGGCCAACCACCACAGC TGTTGATTTATGCCGCTTCTACACTCCACAGTGGCGTGCCCCGATCGATTT TCAGGATCCGGCTCAGGGACCGATTTCACCCTTAAGATTTCTCGAGTGG AAGCCGAGGATGTGGGCGTGTATTACTGCCAGCAGAGCAAAGAGGATC CTAGAACTTTTGGCCAGGGAACCAAGCTGGAGATTA	人源化 12G4 轻链可变区
54	ATGACGTGGAGGGCTGCCGCCTCCACGTGCGCGCGCTCCTGATTCTGC TGTGGGCGCTGACGACCGAAGGTGATCTGAAAGTAGAGATGATGGCAG GGGGGACTCAGATCACACCCCTGAATGACAATGTCACCATATTCTGCAA TATCTTTTATTCCCAACCCCTCAACATCACGTCTATGGGTATCACCTGGTT TTGGAAGAGTCTGACGTTTGACAAAGAAGTCAAAGTCTTTGAATTTTT GGAGATCACCAGAGGCATTCCGACCTGGAGCCATTGTGTCTCCATGGA GGCTGAAGAGTGGGGACGCCTCACTGCGGCTGCCTGGAATCCAGCTGG AGGAAGCAGGAGAGTACCGATGTGAGGTGGTGGTCACCCCTCTGAAGG CACAGGGAACAGTCCAGCTTGAAGTTGTGGCTTCCCAGCCAGCAGAT TGTTGCTGGATCAAGTGGGCATGAAAGAGAATGAAGACAAATATATGTG TGAGTCAAGTGGGTTCTACCCAGAGGCTATTAATATAACATGGGAGAAG CAGACCCAGAAGTTTCCCATCCCATAGAGATTCTGAGGATGTCATCA CTGGTCCCACCATCAAGAATATGGATGGCACATTTAATGTCAGTGTGCT TTGAAGCTGAACCTCTCTCAGGAAGACCCTGGGACTGTCTACCAGTGTG TGGTACGGCATGCGTCCTTGCCATACCCCTTGAGGAGCAACTTTACCCT GACTGCTGCTCGGCACAGTCTTTCTGAAACTGAGAAGACAGATAATTTT TCCATTCAATTGGTGGCCTATTTCAATTCATTGGTGTGGACTGGTTTATTA ATTGTTTTGATTCCTTGAAAAAGATATGTAACAAATCATCTTCAGCCTAT ACTCCTCTCAAGTGCATTCTGAAACACTGGAACCTCTTGACACTCAGA CTCTGAAGAAAGAGCACCTCATATTCTTTGCACTCGGGCATGGCCGTC TTACCAGCTGCAGGATGGGGAGGCTTGGCCTCCTGAGGGAAGTGTTAAT ATTAATACTATTCAACAACCTAGATGTTTTCTGCAGACAGGAGGGCAAATG GTCCGAGGTTCCCTTATGTGCAAGCCTTCTTTGCCTTGCGAGACAACCCA GATCTTTGTCAGTGTGTGAGAATTGACCCTGCTCTCCTAACAGTTACATC AGGCAAGTCCATAGATGATAATTCCACAAAGTCTGAGAAACAAACCCCT AGGGAACACTCGGATGCAGTTCCGGATGCCCAATCCTTCTGTCTCCC CTATCTGGGAACCTCCTCCAGCCACAACATCAACAACCTCCAGTTCTATC CTCCCAACCCCAACTTTACTGTTACCCCTACAGTAA	B7H6 蛋白
55	GACCTGAAGGTGGAAATGATGGCAGGGGTACTCAGATAACACCTCTC AATGATAATGTCACAATTTTTGTAAACATCTTTACTCTCAGCCACTTAAT ATCACCTCCATGGGAATCACTTGGTTTTGGAAGTCATTGACCTTCGATAA GGAGGTGAAGGTATTTGAGTTTTTCGGGGACCACCAGGAAGCTTTCCG ACCAGGAGCAATTGTGTCCCCTTGCGCTTGAAGTCTGGCGACGCCAG CTTGAGACTTCCTGGAATCCAATTGGAGGAAGCTGGGGAGTACAGATGT GAGGTTGTCTGACTCCTCTGAAAGCTCAGGGTACCGTGCAGTTGGAG GTTGTGCGCTCACCCGCTTCCCGGCTTCTGCTGGACCAGGTTGGAATGA AGGAGAACGAAGATAAGTATATGTGCGAGAGTTCCGGATTTTATCCCGA GGCCATCAACATTACATGGGAGAAACAGACCCAAAAGTTTCCTCACCCC ATTGAAATCAGCGAGGATGTGATTACCGGACCCACCATTAATAATATGG	重组 B7H6 胞 外区 Fc 融合 蛋白

	ATGGCACTTTCAACGTTACCTCATGTTTGAAATTGAACAGTAGTCAGGA AGACCCTGGAACAGTCTATCAGTGCCTGAGACACGCATCCCTCCAT ACACCTCTGCGTTCAAACCTCACTCTCACTGCCGCCAGGCATAGCCTGA GCGAGACCGAGAAGACCGATAACTTCTCTCTGGAGCCTAAGAGCTGCG ACAAGACCCACACCTGTCCACCCTGTCCAGCCCCTGAGCTGCTGGGGG GGCCCTCCGTGTTCCCTTTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTGATGAT CTCTAGAACCCCCGAAGTCACATGCGTGGTGGTAGATGTCTCTCATGAG GACCCCGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGATGGAGTGGAGGTGCATA ACGCCAAGACTAAGCCTAGGGAAGAGCAGTATAATTCAACCTACCGCGT CGTGTCTGTGCTACCGTGTGCATCAAGACTGGCTCAACGGCAAAGA ATACAAGTGCAAGGTCTCTAACAAGGCTCTGCCCCGCTCCCATCGAAAAG ACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAACCCAGGGAGCCCCAAGTCTACACA CTGCCTCCATCACGTGAAGAGATGACTAAAAATCAAGTTAGTTTGACCT GCTTGGTTAAGGGCTTCTATCCATCTGATATAGCAGTCGAATGGGAGAGC AACGGCCAGCCTGAAAACAACCTACAAGACAACCTCCACCCGCTTTGGAC TCCGACGGTAGTTTTTTCCTGTACTCCAACTGACCGTGGATAAGAGCA GATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCATGTTCCGTCATGCATGAAGCTCT CCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTCTCTCCCGGTAAA	
56	GATTTGAAGGTGGAGATGATGGCTCGAGGAATTCAGGCCACCAGACTC AACGACAGCGTCACAATCTCTTGCAAAGTGATCTATAGTCAGCCCCCTCA ACATAACCAGTATGGGAATTACCTGGTTTCGCAAATCACTGACTTTGGAT AAAGAGGTTAAAGTCTTTGAATTTTTTGGCGATCACCAGAAGGCCCTTCA GACCCGGAGCAAATGTGTCCCTGTGGAGGCTGAAGTCTGGCGACGCTA GCCTGAAACTTCCAGGAGTTCAGCTCGAAGAGGCCGCGAGTACAGGT GCGAAGTTGTAGTAACCCCTCTCAAAGCACAGGGCACCGTTCAGCTGA AGTGGTGGCTTCACCTACTTCTAGACTTTTCCAGGATCAGGCCGTGGT TAAGGAGAACGAGGGCAAATATATGTGCGAGTCCTCTCGTTTTATCCCA AAGACATCAATATCACCTGGGAGAAATGGACACAGAAATCACCTACCA CGTTGTAATTAGCGAGAACGTGATCACAGGCCCCACAATAAAGAACATG GACGGAACTTTCAATATAACCTCCTACTTGAAGCTGAACTCCTCTCAAG AAGATCCTGGCACTGTGTATAGATGTGTGATTAGGCACGAGAGCCTCCA CACACCCGTCTCTATTGACTTCATATTGACTGCACCACAGCAGTCTCTGT CTGAACCAGAAAAGACCGATCCAAAATCCTGTGACAAGACTCATACATG TCCTCCTTGTCCAGCACAGAGCTGCTTGGTGGCCCTAGCGTGTTCCTG TTCCCTCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATTTCAAGAACCCCCGAGG TGACTTGTGTGGTCGTGGATGTGAGCCACGAGGATCCTGAAGTCAAATT CAATTGGTACGTTGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAAACCAAGCC ACGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCTGTGCTGAC CGTGTTCATCAGGACTGGCTTAATGGAAAAGAATACAAGTGTAAGGTC TCCAATAAAGCTCTCCCTGCCCAATCGAGAAGACTATCTCTAAGGCTA AAGGACAGCCAAGGGAACCCCAAGGTTTACACACTGCCCCCAAGCCGAG ATGAATTGACAAAAAATCAGGTTTCCTTGACCTGCCTGGTGAAGGGTTT CTACCATCTGATATCGCCGTTGAGTGGGAGAGCAATGGACAGCCTGAG AACAAATTACAAAACAACCCCTCCTGTGTTGGATAGTGATGGCAGCTTCT TTCTGTATTCTAAGCTTACCGTGGATAAGTCTAGATGGCAGCAAGGAAAT	重组食蟹猴 B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白

	GTGTTTTCTGCAGCGTAATGCACGAAGCACTTCATAATCATTATACACA GAAGTCTCTCTCTCTTAGCCCAGGGAAG	
57	ATGGCATGGAGAGCTGCATCTTCCGCTTGTGCTGCTCCTTTGCTTCTGTG GTGTGCTTTGATGACTGCCGGAGACCTGAAAGTCGAAATGATGGCTAGA GGAATCCAAGCTACTCGCCTGAATGATAGTGTGACAATCTCATGTAAAGT AATTTATTCCCAGCCTTTGAACATCACCTCTATGGGCATTACCTGGTTTC GCAAGAGTCTCACCTGGATAAAGAGGTAAAAGTGTTGAGTTCTTTGG AGACCATCAAAAAGCTTTCCGCCCTGGAGCTAATGTGAGCCTTTGGCGC CTGAAGAGTGGAGACGCCAGTCTGAAATTGCCTGGTGTGCAGCTCGAA GAGGCTGGTGAATATAGGTGCGAAGTGGTGGTGAATCCTCTGAAGGCTC AGGGGACCGTCCAGCTTAAAGTGGTGGCCAGTCCTACCAGTCGCCTGTT TCAGGACCAGGCAGTGGTCAAGGAGAACGAAGGTAAATATATGTGTGA ATCTTCTCGTTTCTACCCAAAGGATATTAATATCACCTGGGAGAAGTGGA CCCCAAAAGAGCCACACCATGTGGTCATCTCAGAGAATGTGATACCCGG CCCCACCATCAAGAATATGGATGGAACCTTCAATATCACATCTTACCTGA AGCTGAATTCAAGCCAAGAGGATCCTGGAACCGTATATAGGTGCGTCAT CAGACATGAGAGCCTCCACACACCCGTGAGCATCGACTTCATTCTGACA GCTCCACAGCAGAGTCTCAGTGAACCTGAGAAAACAGACATTTTTTCTA TCTATGGGTGGCTTTTTTCTTTTATCGCCGCTGGGCTGATCTTGCTGATCG TGCTCATCCACTGGAAAAAAGTGCCACTGCGAGAAGAAGAAGGCAGAA AAC	食蟹猴 B7H6 蛋白
58	TGGGTGAGTCAACCACCTGAGATTAGAACTCTGGAGGGCAGCTCTGCAT TCTTGCCATGCTCCTTCAACGCAAGTCAGGGGAGGCTGGCTATCGGTTTC CGTAACATGGTTTAGGGATGAGGTGGTGCCAGGAAAAGAAGTGAGGAA CGGAACCCAGAGTTTACAGAGGAAGACTGGCCCCCTCTGGCAAGTTCCCG CTTTCTGCATGATCACCAAGCCGAACCTTACATTCGCGACGTCAGGGGG CACGACGCATCTATATACGTGTGCAGAGTGGAGGTGCTTGGTCTGGGTG TGGGCACCCGAAACGGCACTCGACTCGTCGTTGAGAAAGAGCATCCAC AGCTGGGAGAAAAATCTGTACTTTTACAGAGCCTCGAACCTAAGTCTTGTGA CAAGACCCATACCTGTCCTCCCTGTCCTGCTCCTGAACTGTTGGGGGGC CCCTCTGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACACTGATGATTA GCAGGACACCAGAAAGTCACATGTGTCGTGGTTGATGTGTCCACGAGG ATCCCCGAGGTTAAATTTAATTGGTATGTGGACGGTGTGAGGTGCATAAC GCCAAGACCAAGCCTCGAGAAGAGCAGTACAATTCCACTTATAGGGTA GTCTCCGTATTGACCGTGCTCCATCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGT ACAAATGCAAGGTCTCCAATAAGGCCCTTCCAGCCCCAATTGAAAAGAC TATTTCAAAGGCCAAGGGGCAACCCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTT CCTCCCTCACGTGAGGAGATGACAAAGAACCAAGTGAGTCTGACATGT CTCGTGAAAGGCTTTTACCCTTCAGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGCA ACGGCCAACCCGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCGTGCTGGACA GCGATGGGTCTTTCTTTCTCTACAGCAAGCTGACTGTGGACAAAAGTCG CTGGCAGCAAGGCAATGTCTTCAGCTGCTCTGTGATGCACGAAGCCCTC CATAATCATTATACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCCAGGAAAG	重组 NKp30 胞外区 Fc 融 合蛋白

59	CAGGTGCAGTTGCAACAATCTGGTGCAGAGCTGGTGAAACCTGGTGCA TCAGTGAAGCTTTCATGTAAAGCTTCCGGGTACACATTTACCAGCTACTA TATGTACTGGGTAAAGCAGCGTCTGGACAGGGTCTGGAGTGGATCGGC GAGATTAATCCATCTAACGGGGGAACCAACTTTAACGAAAAGTTCAAGT CTAAGGCTACACTGACAGTCGATAAATCCTCATCCACCGCCTACATGCA GCTCTCTTCTGACTTCAGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCACTAGG ACCCTGTATTACGGTAACGACTGGTATTTTCGATGTGTGGGGTGCCGGTAC AACAGTGACCGTGTCTCAGCCAAAACAACAGCCCCCTAGTGTATATCCA CTTGCCCCGTCTGCGGCGACACTACAGGGTCTTCTGTGACACTCGGGT GTCTGGTCAAGGGGTATTTCCCTGAGCCAGTGACCCTCACTTGAACTC AGGCTCCCTTTCTAGCGGCGTCCACACATTTCCAGCCGTGCTTCAGTCT GATCTGTATACCCTGAGCAGCAGCGTGACCGTCACCTCCTCCACATGGC CTTCACAAAGCATAACTTGTAATGTGCGCCACCCTGCCTCATCTACCAAA GTCGACAAGAAGATCGAGCCTCGAGGCCCCACTATCAAACCCTGTCCA CCCTGTAAAGTGCCCCGCTCCAAACTTGCTGGGCGGACCATCCGTTTTC TCTTCCCTCCAAAGATCAAAGACGTGCTGATGATTTCACTCAGCCCTATT GTCACCTTGTGTAGTGGTGGACGTGTCAGAAGATGATCCTGACGTGCAGA TTTCTGGTTTGTCAACAATGTTGAGGTGCATACAGCTCAGACACAGAC CCACCGCGAAGATTATAACTCTACTTTGAGGGTCGTTTCCGCCCTGCCAA TTCAGCACCAGGACTGGATGTCTGGAAAGGAATTCAAATGTAAAGTGAA TAATAAGGACCTCCCCGCTCCCATCGAACGGACTATCTCTAAGCCTAAA GGGAGCGTACGAGCTCCTCAGGTGTATGTCCTGCCCCCCCCAGAGGAA GAAATGACCAAGAAACAGGTGACCCTTACCTGTATGGTTACTGACTTTA TGCTTGAGGACATCTATGTAGAGTGGACCAACAACGGGAAGACTGAGT TGAACACAAAAACACAGAACCTGTGCTTGATAGTGATGGTTCTTATTT CATGTATAGCAAGCTCAGAGTCGAAAAAAAAAACTGGGTGGAACGCAA TTCTTACTCCTGTTCCGTGGTGCACGAGGGGTTGCACAATCACCACACT ACAAAAAGCTTCAGTAGGACCCCCGGAAG	鼠源 12F5 重链可变区
60	CAAATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCAATAATGTCCGCATCTCCTGGTG AGAAAGTGACCATGACTTGTTTCAGCTTCCTCTTCTGTAACTATATGCAC TGGTACCAACAGAAGTCTGGCACCTCCCCAAAGCGGTGGATTTATGACA CCTCCAAGCTGGCTAGCGGGGTACCCGCAAGGTTCTCCGGTTCAGGCA GCGGCACTTCTTACTCCCTGACTATTAGCTCTATGGAGGCAGAGGATGCC GCTACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGTAATCCAGTCACATTGGGG CCGGAACCAAGCTGGAGCTGAAGCGAGCTGATGCAGCTCCCACAGTAT CTATTTTTTCTCCATCTTCTGAGCAGCTCACATCTGGTGGGGCCTCCGTG GTCTGCTTCTTGAATAACTTCTATCCTAAGGACATTAACGTGAAATGGAA GATCGACGGATCCGAACGGCAGAACGGAGTGCTTAACAGCTGGACCGA CCAGGATAGTAAGGATTCTACATATTCATGTCTTCCACCCTCACACTCA CAAAGGACGAGTATGAGAGACACAACAGCTACACATGTGAAGCCACTC ACAAAACCTCCACATCTCCAATTGTGAAGTCCTTTAATAGGAATGAGTG T	鼠源 12F5 轻链可变区
61	GAAGTTCTGCTTCAGCAGTCTGGCCCAGAAGTTGTTAAGCCAGGAGCC TCCGTGAAAATTACTTGCAAGGCCTCCGGGTACACATTTACAGACTACA ATATGGACTGGGTGAAGCAGTCCCATGGAAAGAGTCTGGAATGGATCGG CGATATCAATCCAAACAATGGCGGTACCCTCTATAACCAGAAATTCGCG	鼠源 12G4 重链可变区

	GACGTGTGACCTTGATCGTCGACAAAAGTAGTTCTACTGCCTACATGGA GCTGCGCAGCCTGACTAGTGACGACACCGCGTCTACTATTGCGCTCGC TCTGAAGTCTTTTATGGGAATTATGCTGACTACTGGGGCCAGGGTACCAC TTTGACCGTCTCCAGT GCCAAAACAACAGCCCCCTAGTGTATATCCACTTGCCCCGTCTGCGGCG ACACTACAGGGTCTTCTGTGACACTCGGGTGTCTGGTCAAGGGGTATTT CCCTGAGCCAGTGACCCCTCACTTGGAACCTCAGGCTCCCTTTCTAGCGGC GTCCACACATTTCCAGCCGTGCTTCAGTCTGATCTGTATACCCTGAGCAG CAGCGTGACCGTCACCTCCTCCACATGGCCTTCACAAAGCATAACTTGT AATGTCGCCCCACCCTGCCTCATCTACCAAAGTCGACAAGAAGATCGAGC CTCGAGGCCCCACTATCAAACCCTGTCCACCCTGTAAGTGCCCCGCTCC AACTTGCTGGGCGGACCATCCGTTTTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAA GACGTGCTGATGATTTCACTCAGCCCTATTGTCACTTGTGTAGTGGTGGA CGTGTCAGAAGATGATCCTGACGTGCAGATTTCCCTGGTTTGTCAACAAT GTTGAGGTGCATACAGCTCAGACACAGACCCACCGCAAGATTATAACT CTACTTTGAGGGTCGTTTCCGCCCTGCCAATTCAGCACCAGGACTGGAT GTCTGGAAGGAATTCAAATGTAAAGTGAATAATAAGGACCTCCCCGCT CCCATCGAACGGACTATCTCTAAGCCTAAAGGGAGCGTACGAGCTCCTC AGGTGTATGTCCTGCCCCCCCCAGAGGAAGAAATGACCAAGAAACAGG TGACCCCTACCTGTATGGTTACTGACTTTATGCCTGAGGACATCTATGTA GAGTGGACCAACAACGGGAAGACTGAGTTGAACTACAAAAACACAGA ACCTGTGCTTGATAGTGATGGTTCTTATTTCATGTATAGCAAGCTCAGAG TCGAAAAAAGAACTGGGTGGAACGCAATTCTTACTCCTGTTCCGTGGT GCACGAGGGGTTGCACAATCACCACACTACAAAAAGCTTCAGTAGGAC CCCCGGCAAG	
62	GACATTGTGCTGACTCAGAGTCCTGTAAGTCTGGCAGTTCCCCTCGGCC AAAGAGCTACCATTAGTTGTAAGGCTTCCCAGAGCGTGGACTATGATGG CGACAGCTATATGAATTGGTATCAACAGAAGCCAGGACAGCCACCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCCTCCACCCTGCATTCAAGGTATCCCTGTGCGATT TTCTGGTAGTGGCTCCGGCACAGATTTCAACCCTGAATATCCATCCAGTTG AGGAGGAGGATGCTGCCTCTTACTACTGTCAGCAGAGCAAAGAGGATC CTAGAACCCTTCGGCGGTGGCACTAAGCTGGAAATTAAGCGAGCTGATGC AGCTCCCACAGTATCTATTTTCTCCATCTTCTGAGCAGCTCACATCTG GTGGGGCCTCCGTGGTCTGCTTCTTGAATAACTTCTATCCTAAGGACATT AACGTGAAATGGAAGATCGACGGATCCGAACGGCAGAACGGAGTGCTT AACAGCTGGACCGACCAGGATAGTAAGGATTCTACATATTCCATGTCTTC CACCCCTCACACTCACAAGGACGAGTATGAGAGACACAACAGCTACAC ATGTGAAGCCACTCACAAAACCTCCACATCTCCAATTGTGAAGTCCTTT AATAGGAATGAGTGT	鼠源 12G4 轻链可变区
63	GAAGTTCAACTGGTTCAGAGCGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCAGGTGCC AGCGTGAAAGTTAGTTGCAAGGCATCCGGATACACTTTCACTAGCTATTA TATGTATTGGGTGCGACAGGCCCCAGGGCAAGGTTTGGAGTGGATCGGA GAGATCAATCCTTCAAATGGCGGCACAAATTTCAACGAAAAGTTCAAAT CTCGCGTGACTCTGACAGTGGACAAGTCCATCTCCACAGCATATATGGA GCTGAGCCGGCTTAGATCCGATGACACTGCTGTCTACTATTGTACAAGA ACACTGTACTATGGCAACGACTGGTACTTTCGATGTCTGGGGACAGGGGA	人源化 12F5 重链可变区

	CCACTGTGACCGTCTCCAGTGCCAGTACAAAGGGACCATCTGTGTTTCC TCTGGCACCTTCATCTAAGAGCACTTCTGGTGGTACTGCTGCTCTGGGC TGCCCTTGTAAGGACTATTTCCAGAGCCCGTGACCGTCAGTTGGAATT CAGGCGCCCTTACCAGCGGGGTTACACTTTCCAGCTGTGTTGCAGTC TTCAGGGCTTTACAGTCTCAGCAGTGTTGTACCGTCCCTTCCTCCTCAC TGGGCACCCAAACCTATATTTGTAATGTCAACCATAAACCAAGTAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGTCATGTGATAAACTCACAC TTGTCCACCATGCCCTGCTCCCGAACTGTTGGGCGGACCTAGCGTGTTT CTCTTTCCACCCAAACCAAGGATACCCTGATGATCAGCAGGACTCCCG AGGTGACTTGTGTGGTGGTTGACGTGTCCCATGAGGATCCTGAAGTGAA GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTTCTAACGCAAAGACCAA GCCAGGGAAGAGCAGTATAACTCTACTTACCGGGTGGTTTCAGTCTTG ACTGTGTTGCACCAGGACTGGCTGAATGGAAAGGAGTATAAGTGTA GTGAGTAACAAAGCCCTGCCAGCTCCCATGAGAAGACAATCTCAAAA GCTAAGGGTCAGCCCCGCGAACCACAGGTGTATACACTCCCACCTCCC GCGAGGAGATGACCAAAAACAGGTGTCCCTCACCTGCCTGGTCAAGG GATTTTACCCAGCGATATTGCTGTCGAGTGGGAGTCAAACGGTCAGCC CGAGAATAATTATAAACTACCCCTCCCGTGCTTGACAGCGATGGATCTT TCTTCTGTACTCAAACTGACCGTCGACAAATCCCGATGGCAGCAAGG TAACGTGTTCTCTTGACGCGTAATGCACGAGGCTCTTCAATCACTATA CTCAGAAGTCACTCAGCCTTAGTCCTGGAAAG	
64	GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGATTTCCAGAGTGTACACCAAAG GAGAAGGTAACAATTACATGCAGTGCCAGCAGTAGCGTGAACCTATATGC ATTGGTATCAGCAGAAACCCGATCAGTCCCTTAAGCGACTGATCTACGAT ACCTCCAAGCTGGCCAGCGGTGTTCCAAGTAGGTTCTCTGGCAGCGGG TCTGGGACAGACTACACTCTCACTATCAACTCTCTGGAAGCTGAGGATG CTGCTACTTATTATTGCCAGCAGTGGAGCTCAAATCCCGTTACCTTTGGC CAGGGTACCAAGCTCGAAATTAAACGTACAGTTCGACGACCTAGTGTCT TCATCTTTCCCTCCCTCTGACGAGCAGTTGAAGAGCGGAACTGCAAGCGT CGTTTGCCTCCTGAACAATTTCTATCCCCGGGAGGCTAAGGTCCAGTGG AAAGTGGATAATGCTCTCCAGAGCGGTAATCACAAGAGTCTGTTACCG AGCAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAGCTCTACCCTGACACT GTCCAAGGCCGATTACGAGAAACACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTAAC CCACCAGGGCCTGAGTTCCCCAGTGACCAAGTCTTTCAATAGGGGGGA GTGT	人源化 12F5 轻链可变区
65	GAAGTGCAGCTTGTACAGAGTGGAGCAGAGGTCAAGAAACCAGGAGC TTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCTCCGGCTATACCTTTACTGATTAC AACATGGACTGGGTCCGTCAGGCTCCTGGAAAAGGACTGGAGTGGATT GGTGACATTAATCCTAATAACGGCGGCACACTTTACAATCAGAAGTTTC GTGGTAGAGTTAACTGACTGTGGATAAATCAATCAGCACCGCCTATATG GAGCTGTCCCGACTGCGGTCCGACGATACTGCAGTGTATTACTGCGCCA GGTCAGAGGTGTTTTACGGTAACTACGCAGACTATTGGGGCCAGGGGAC AACAGTGACAGTCAGCAGCGCCAGTACAAAGGGACCATCTGTGTTTCC TCTGGCACCTTCATCTAAGAGCACTTCTGGTGGTACTGCTGCTCTGGGC TGCCCTTGTAAGGACTATTTCCAGAGCCCGTGACCGTCAGTTGGAATT CAGGCGCCCTTACCAGCGGGGTTACACTTTCCAGCTGTGTTGCAGTC	人源化 12G4 重链可变区

	TTCAGGGCTTTACAGTCTCAGCAGTGTTGTACCGTCCCTTCCTCCTCAC TGGGCACCCAAACCTATATTTGTAATGTCAACCATAAACCAAGTAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCATGTGATAAACTCACAC TTGTCCACCATGCCCTGCTCCCGAACTGTTGGGCGGACCTAGCGTGTTT CTCTTTCCACCCAAACCAAGGATACCCTGATGATCAGCAGGACTCCCG AGGTGACTTGTGTGGTGGTTGACGTGTCCCATGAGGATCCTGAAGTGAA GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTTTCATAACGCAAAGACCAA GCCCAGGGAAGAGCAGTATAACTCTACTTACCGGGTGGTTTCAGTCTTG ACTGTGTTGCACCAGGACTGGCTGAATGGAAAGGAGTATAAGTGTA GTGAGTAACAAAGCCCTGCCAGCTCCCATTGAGAAGACAATCTCAAAA GCTAAGGGTCAGCCCCGCGAACCACAGGTGTATACACTCCCACCCCTCCC GCGAGGAGATGACCAAAAACCAGGTGTCCCTCACCTGCCTGGTCAAGG GATTTTACCCCAGCGATATTGCTGTGAGTGGGAGTCAAACGGTCAGCC CGAGAATAATTATAAACTACCCCTCCCGTGCTTGACAGCGATGGATCTT TCTTCCTGTACTCAAACTGACCGTCGACAAATCCCGATGGCAGCAAGG TAACGTGTTCTCTTGCAGCGTAATGCACGAGGCTCTTACAATCACTATA CTCAGAAGTCACTCAGCCTTAGTCCTGGAAAG	
66	GACATAGTATTGACCCAGACACCATTGTCTTTGAGCGTTACCCCAGGCC AGCCAGCTTCAATATCTTGCAAGGCCTCTCAGTCCGTCGACTATGATGGC GATTCCTACATGAATTGGTACCTCCAAAAGCCAGGCCAACCACCACAGC TGTTGATTTATGCCGCTTCTACACTCCACAGTGGCGTGCCCGATCGATTT TCAGGATCCGGCTCAGGGACCGATTTCACCCTTAAGATTTCTCGAGTGG AAGCCGAGGATGTGGGCGTGTATTACTGCCAGCAGAGCAAAGAGGATC CTAGAACTTTTGGCCAGGGAACCAAGCTGGAGATTAAACGTACAGTCG CAGCACCTAGTGTCTTCATCTTTCCTCCCTCTGACGAGCAGTTGAAGAG CGGAAGTCAAGCGTCGTTTGCCTCCTGAACAATTTCTATCCCCGGGAG GCTAAGGTCCAGTGGAAGTGGATAATGCTCTCCAGAGCGGTAATCAC AAGAGTCTGTTACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAG CTCTACCCTGACACTGTCCAAGGCCGATTACGAGAAACACAAAGTGTAT GCCTGCGAAGTAACCCACCAGGGCCTGAGTTCCCCAGTGACCAAGTCT TTCAATAGGGGGGAGTGT	人源化 12G4 轻链可变区

以下将通过实施例对本发明进行详细描述。实施例或测试例中，未注明具体条件的实验方法的，均按照常规条件进行。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明
350 本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1 抗体的制备

生成针对人 B7H6 的鼠源单克隆抗体，用纯化的重组 B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白（B7H6-Fc）（重组
355 B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示）作为抗原，免疫 Balb/c 小鼠（9 周龄，购自上海莱斯克，体重 20g 左右）。

免疫小鼠使用纯化抗原和完全弗氏佐剂进行 3 次免疫，通过尾静脉放血后检测免疫应答。通过
ELISA、流式细胞术筛选血清，获取有抗人 B7H6 免疫球蛋白的小鼠。并对有最高的抗 B7H6 免疫球蛋白的小鼠取出脾细胞与鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞（ATCC 编号 CRL-1581）进行融合。融合后的杂交瘤细
360 胞进行抗体筛选，得到鼠单抗。

将候选杂交瘤细胞总数量培养到 106, 800rpm 离心 10 分钟收集细胞, 并以 Trizol 试剂盒(Invitrogen)提取总 RNA; 以总 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA 文库 (Invitrogen), 又以 cDNA 为模板 PCR 扩增杂交瘤细胞的所对应的可变区核酸序列。PCR 扩增反应中所使用的引物序列与抗体可变区第一框架区或信号肽区和恒定区互补(Larrick, J.W., et al., (1990) Scand.J.Immunol., 32, 121-128 和 Coloma, J.J.et al., (1991) BioTechniques, 11, 152-156)。在 50 μ l 反应体系中, 分别加入 cDNA 2 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, 上游及下游引物 2 μ L (5 μ mol), dNTP 2 μ L, Taq 酶 1 μ LL (Takara, Ex Taq), H₂O 38 μ L; 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 进入温度循环, 进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30S, 58 $^{\circ}$ C 退火 45S, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50S, 共 32 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延长 7 min。将扩增产物测序后, 得到鼠单抗的重链和轻链可变区序列 (包括氨基酸序列和核酸序列)。

370 实施例 2: 鼠源 B7H6 抗体 ELISA 结合实验

ELISA 实验被用于检测 B7H6 抗体的结合特性。B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白 (B7H6-Fc) 包被到 96 孔板中, 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和 B7H6 的结合特性。

用 PBS 缓冲液将 B7H6-Fc 融合蛋白 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示) 稀释为 1 μ g/mL, 以 100 μ L/孔的体积加于 96 孔板中, 于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉, 用 PBST (pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20) 缓冲液洗板 6 次后, 加入 200 μ L/孔 PBS/10% BSA, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 洗板 6 次后, 加入 100 μ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释至合适浓度的待测 B7H6 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。移去反应体系, 用 PBST 洗板 6 次后, 以 100 μ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的抗鼠抗体二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后, 加入 80 μ L/孔 TMB (四甲基联苯胺), 于室温孵育 3min, 加入 80 μ L/孔 4M 硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果 (图 1) 表明本发明的鼠源抗体 12F5 (SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27)、12G4 (SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:29) 能够结合 B7H6。

380 实施例 3: 鼠源 B7H6 抗体流式细胞术结合实验

流式细胞术实验被用于检测 B7H6 抗体的结合特性, 于 HL60 细胞 (ATCC 编号 CCL-240) 中过表达 B7H6 蛋白 (HL60-B7H6、SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:54), 表达载体为 pLVX-EF1a-B7H6-IRES-ZsGreen, 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和 B7H6 的结合特性。

HEK293T 细胞按照 5 $\times$ 10⁵ 细胞/孔铺六孔板, 用不含双抗的 DMEM 培养基培养过夜。转染前弃去培养基, 加入 1mL 新鲜的不含双抗的 DMEM 培养基。将 pLVX-EF1a-B7H6-IRES-ZsGreen (pLVX-EF1a-IRES-ZsGreen1 载体的酶切位点 EcoRI 与 BamHI 之间插入有 B7H6 蛋白 (SEQ ID NO: 21) 的编码序列 (SEQ ID NO: 54)、pMD2G、psPAX2 载体 (共 3 μ g) 按照 2:1:1 的比例加入 200 μ l 无血清 DMEM 培养基中, 加入 12 μ g 聚醚酰亚胺 (PEI, Polysciences 有限公司)。混匀后静置 16min, 然后将全部液体加入铺有 HEK293T 细胞的六孔板中。培养 6h 后, 弃去培养基, 加入新鲜的完全 DMEM 培养基培养。转染 48h 后, 收细胞培养上清, 过 0.45 μ m 滤器 (Millipore), 即为病毒上清。将病毒上清全部加入含有 1 $\times$ 10⁴ HL60 细胞的 6 孔板中, 加入终浓度 4 μ g/ml 的聚凝胺 (Sigma), 培养 12h。随后弃尽上清, 加入新鲜的完全 RPMI1640 培养基。所得细胞即为 HL60-B7H6 细胞。

用 PBS 将 HL60-B7H6 细胞稀释为 2 $\times$ 10⁶/mL, 以 100 μ L/管的体积加于 1.5ml EP 管中, 向其中加入 10 μ L/管山羊血清, 于 4 $^{\circ}$ C 封闭 30min。加入 1 μ g/管的 B7H6 抗体, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min。向 EP 管中加入 1mL PBS, 4 $^{\circ}$ C 3500rpm $\times$ 5min 离心, 弃尽上清, 再用 PBS 洗一遍。离心后弃尽上清, 用 100 μ L/管 PBS 重悬细胞, 向其中加入 0.1 μ L/管 Alexa-647 标记的山羊抗小鼠抗体二抗 (Invitrogen), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。用 PBS 洗两遍, 离心后弃尽上清。用 200 μ L/管 PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪进行检测, 结果如图 2 所示, 进一步显示本发明的鼠源抗体 12F5 (SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27)、12G4 (SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:29) 能够结合 B7H6。

400 实施例 4: 小鼠抗体人源化实验

参照 B7H6 抗体轻链可变区序列和重链可变区序列, 选取与其非 CDR 区匹配最好的人源化模板。将鼠源抗体 CDR 区移植到选择的人源化模板上, 替换人源模板的 CDR 区, 得到人源化的抗体。然后, 以鼠源抗体的三维结构为基础, 对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基, 以及对 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变, 得到人源化之后的抗体, 人源化 B7H6 抗体 12F5 重链可变区的

序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 或者, 人源化 B7H6 抗体 12G4 重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 20 所示。

实施例 5: 人源化 B7H6 抗体 ELISA 结合实验

410 ELISA 实验被用于检测人源化 B7H6 抗体的结合特性。B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白 (B7H6-Fc) 包被到 96 孔板中, 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和 B7H6 的结合特性。

用 PBS 缓冲液将 B7H6-Fc 融合蛋白 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示) 稀释为 $1\mu\text{g/mL}$, 以 $100\mu\text{L}$ /孔的体积加于 96 孔板中, 于 4°C 放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉, 用 PBST ($\text{pH}7.2$ PBS 含 0.1% Tween 20) 缓冲液洗板 6 次后, 加入 $200\mu\text{L}$ /孔 PBS/ 10% BSA, 37°C 孵育 2h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 洗板 6 次后, 加入 $100\mu\text{L}$ /孔用 PBST/ 0.05% BSA 稀释至合适浓度的待测 B7H6 抗体, 37°C 孵育 1h。移去反应体系, 用 PBST 洗板 6 次后, 以 $100\mu\text{L}$ /孔用 PBST/ 0.05% BSA 稀释 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的小鼠抗人 IgG (Fab 特异性) 二抗 (Sigma), 37°C 孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后, 加入 $80\mu\text{L}$ /孔 TMB (四甲基联苯胺), 于室温孵育 3min, 加入 $80\mu\text{L}$ 孔 4M 硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果 (图 3) 表明本发明的人源化抗体 h12F5 (SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31)、h12G4 (SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33) 能够结合 B7H6。

实施例 6: 人源化 B7H6 抗体流式细胞术结合实验

流式细胞术实验被用于检测 B7H6 抗体的结合特性, 于 HL60 细胞 (ATCC 编号 CCL-240) 中过表达 B7H6 蛋白 (HL60-B7H6) (如实施例 3 中所示), 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和 B7H6 的结合特性。

425 用 PBS 将 HL60-B7H6 细胞稀释为 $2\times 10^6/\text{mL}$, 以 $100\mu\text{L}$ /管的体积加于 1.5mL EP 管中, 向其中加入 $10\mu\text{L}$ /管小鼠血清, 于 4°C 封闭 30min。加入 $1\mu\text{g}$ /管的 B7H6 抗体, 于 4°C 孵育 30min。向 EP 管中加入 1mL PBS, 4°C $3500\text{rpm}\times 5\text{min}$ 离心, 弃尽上清, 再用 PBS 洗一遍。离心后弃尽上清, 用 $100\mu\text{L}$ /管 PBS 重悬细胞, 向其中加入 $1\mu\text{L}$ /管 Alexa-647 标记的小鼠抗人 IgG-Fc 二抗 (Biolegend), 4°C 避光孵育 30min。用 PBS 洗两遍, 离心后弃尽上清。用 $200\mu\text{L}$ /管 PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪进行检测, 结果如图 4 所示, 进一步显示本发明的人源化抗体 h12F5 (SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31)、h12G4 (SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33) 能够结合 B7H6。

实施例 7: 人源化 B7H6 抗体流式细胞术结合实验

435 流式细胞术实验被用于检测人源化 B7H6 抗体的结合特性, 于 CHO-K1 细胞 (ATCC 编号 CCL-240) 中过表达猴 B7H6 蛋白 (CHO-K1-cyno-B7H6), 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和猴 B7H6 的结合特性。

HEK293T 细胞按照 5×10^5 细胞/孔铺六孔板, 用不含双抗的 DMEM 培养基培养过夜。转染前弃去培养基, 加入 1mL 新鲜的不含双抗的 DMEM 培养基。将 pLVX-EF1a-cynoB7H6-IRES-ZsGreen (pLVX-EF1a-IRES-ZsGreen1 载体的酶切位点 EcoRI 与 BamHI 之间插入有猴 B7H6 蛋白 (SEQ ID NO: 24) 的编码序列 (SEQ ID NO: 57)、pMD2G、psPAX2 载体 (共 $3\mu\text{g}$) 按照 2:1:1 的比例加入 $200\mu\text{L}$ 无血清 DMEM 培养基中, 加入 $12\mu\text{g}$ 聚醚酰亚胺 (PEI, Polysciences 有限公司)。混匀后静置 16min, 然后将全部液体加入铺有 HEK293T 细胞的六孔板中。培养 6h 后, 弃去培养基, 加入新鲜的完全 DMEM 培养基培养。转染 48h 后, 收细胞培养上清, 过 $0.45\mu\text{m}$ 滤器 (Millipore), 即为病毒上清。将病毒上清全部加入含有 1×10^4 CHO-K1 细胞的 6 孔板中, 加入终浓度 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 的聚凝胺 (Sigma), 培养 12h。随后弃尽上清, 加入新鲜的完全 RPMI1640 培养基。所得细胞即为 CHO-K1-cyno B7H6 细胞。

445 用 PBS 将 CHO-K1-cynoB7H6 细胞稀释为 $2\times 10^6/\text{mL}$, 以 $100\mu\text{L}$ /管的体积加于 1.5mL EP 管中, 向其中加入 $10\mu\text{L}$ /管小鼠血清, 于 4°C 封闭 30min。加入 $1\mu\text{g}$ /管的人源化 B7H6 抗体, 于 4°C 孵育 30min。向 EP 管中加入 1mL PBS, 4°C $3500\text{rpm}\times 5\text{min}$ 离心, 弃尽上清, 再用 PBS 洗一遍。离心后弃尽上清, 用 $100\mu\text{L}$ /管 PBS 重悬细胞, 向其中加入 $1\mu\text{L}$ /管 Alexa-647 标记的小鼠抗人 IgG-Fc 二抗 (Biolegend), 4°C 避光孵育 30min。用 PBS 洗两遍, 离心后弃尽上清。用 $200\mu\text{L}$ /管 PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪进行检测, 结果如图 5 所示, 进一步显示本发明的抗体 h12F5、h12G4 能够结合猴 B7H6。

实施例 8: 人源化 B7H6 抗体 ELISA 结合实验

ELISA 实验被用于检测人源化 B7H6 抗体的结合特性。猴 B7H6 胞外区 Fc 融合蛋白 (cynoB7H6-Fc)

包被到 96 孔板中, 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和猴 B7H6 的结合特性。

455 用 PBS 缓冲液将 cynoB7H6-Fc 融合蛋白 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示) 稀释为 1 μ g/mL, 以 100 μ L/孔的体积加于 96 孔板中, 于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉, 用 PBST (pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20) 缓冲液洗板 6 次后, 加入 200 μ L/孔 PBS/10% BSA, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 洗板 6 次后, 加入 100 μ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释至合适浓度的待测 B7H6 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。移去反应体系, 用 PBST 洗板 6 次后, 以 100 μ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的小鼠抗人 IgG (Fab 特异性) 二抗 (Sigma), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后, 加入 460 80 μ L/孔 TMB (四甲基联苯胺), 于室温孵育 3min, 加入 80 μ L/孔 4M 硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果 (图 6) 表明本发明的人源化抗体 h12G4 能够结合猴 B7H6。

实施例 9: 体外结合亲和力和动力学实验

Biacore 方法是公认的客观检测蛋白相互间亲和力和动力学的检测方法, 通过 Biacore T200 分析本发明 B7H6 抗体表征亲和力及结合动力学。

465 采用标准氨基偶联法将 B7H6 胞外段 Fc 融合蛋白 (B7H6-Fc) 共价连接至 CM5 (GE) 芯片上。然后将稀释于 PBS 中的一系列浓度梯度的 B7H6 抗体与各个循环进样, 进样后以 10mM NaOH 溶液再生。追踪抗原-抗体结合动力学 3 分钟并追踪解离动力学 10 分钟, 使用 GE 的 BIAevaluation 软件以 1:1 (Langmuir) 结合模型分析所得数据。以此法测定的鼠源 12F5 的 KD 值为 2.2nM, 鼠源 12G4 的 KD 值为 0.15nM。

470 实施例 10: 抗体促进 B7H6 结合 NKp30 能力的筛选

B7H6 抗体是通过和 B7H6 胞外区的结合, 从而促进 B7H6 和其受体 NKp30 的信号通路, 流式细胞术实验被用于检测 B7H6 抗体对受体 NKp30 结合的增强。

用 PBS 将 HL60-B7H6 细胞 (同上) 稀释为 2 $\times$ 10⁶/ml, 以 100 μ L/管的体积加于 1.5mL EP 管中, 向其中加入 10 μ L/管小鼠血清, 于 4 $^{\circ}$ C 封闭 30min。加入 4 μ g/管 NKp30 胞外区 Fc 融合蛋白 (NKp30-Fc, 475 SEQ ID NO:25, 本实验室表达), 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min。加入 B7H6 抗体, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min。向 EP 管中加入 1mL PBS, 4 $^{\circ}$ C 3500rpm $\times$ 5min 离心, 弃尽上清, 再用 PBS 洗一遍。离心后弃尽上清, 用 100 μ L/管 PBS 重悬细胞, 向其中加入 1 μ L/管 647 标记的小鼠抗人抗体二抗 (Biolegend), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。用 PBS 洗两遍, 离心后弃尽上清。用 200 μ L/管 PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪进行检测, 结果如图 7 所示, 可以看出, 本发明的鼠源 12F5 抗体够促进 B7H6 与受体 NKp30 的结合。

480 实施例 11: 补体依赖的细胞毒检测

补体依赖的细胞毒实验, 用于检测 B7H6 抗体杀伤肿瘤细胞的作用。其中, 使用的肿瘤细胞为 HL60-B7H6 细胞。

(1) 肿瘤细胞用无血清 RPMI-1640 培养基重悬, 计数。用完全 RPMI-1640 培养基稀释为 4 $\times$ 10⁵/mL。以 25 μ L/孔的体积将稀释后的细胞加入 96 孔圆底板中

485 (2) 用无血清 RPMI-1640 培养基稀释 B7H6 抗体或对照鼠 IgG, 以 25 μ L/孔的体积将稀释后的 B7H6 抗体或鼠 IgG 加入 96 孔圆底板中。

(3) 用 1mL 超纯水溶解兔补体 (Cedarlane), 然后加入 1mL 无血清 RPMI-1640 培养基, 混匀后作为工作液。以 40 μ L/孔的体积将补体工作液加入 96 孔圆底板中。37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

490 (4) 以 110 μ L/孔的体积将完全 RPMI-1640 培养基加入 96 孔圆底板中, 以 1 μ L/孔的体积向 96 孔圆底板中加入 7-AAD (BD), 混匀。将孔中所有液体转入流式管, 利用流式细胞仪进行检测。结果如图 8 所示, 可以看出, 本发明 B7H6 鼠源 12F5 抗体有补体依赖细胞毒作用。

实施例 12: B7H6 抗体促进小鼠抗癌能力

体内药效实验, 用于检测 B7H6 抗体促进裸鼠抗癌功能。其中, 使用的肿瘤细胞分别为急性髓系白血病 U-937 细胞 (ATCC 编号 CRL-1953.2)。

495 (1) 裸鼠右腹侧皮下荷瘤, 每只鼠 1.5 $\times$ 10⁶ U-937 细胞, 然后将小鼠随机分组。

(2) 第 5、7、9、11、13 天, 为小鼠腹腔注射抗体, 每只鼠 1mg。

(3) 每 2 天测量一次肿瘤体积。

结果如图 9 所示, 可以看出, 本发明的鼠源抗体 12F5 具有抗癌功能。

从以上实验结果可以看出，本发明得到的抗体的能够结合人与猴 B7H6；能够促进 B7H6 和 NKp30 的相互作用；能够促进小鼠抗癌。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于此。在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容，均属于本发明的保护范围。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求书

- 1、一种能够结合 B7H6 的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包括重链 CDR1、
5 重链 CDR2 和重链 CDR3,以及轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3,其中,
所述重链 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一;
所述重链 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一;
10 所述重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一;
所述轻链 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一;
所述轻链 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一;以及
15 所述轻链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一。
- 2、根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述的抗体或其抗原结合片段包含:
1) 具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的重链 CDR1,具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的重链 CDR2,具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的重链 CDR3,具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的轻链 CDR1,具有 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列的轻链 CDR2,具有 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列的轻链 CDR3;或
20 2) 具有 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的重链 CDR1,具有 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的重链 CDR2,具有 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的重链 CDR3,具有 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的轻链 CDR1,具有 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的轻链 CDR2,具有 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的轻链 CDR3。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,(i)所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一至少 80%同源性的氨基酸序列;和/或,(ii)所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列及其保守修饰形式的氨基酸序列至少之一至少 80%同源性的氨基酸序列。
30
- 4、根据权利要求 1-3 任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区包含与选自 (i) 中的重链可变区至少 90%,至少 95%,至少 96%,至少 97%,至少 98%,至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与选自 (ii) 中的轻链可变区至少 90%,至少 95%,至少 96%,至少 97%,至少 98%,至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列。
35
- 5、根据权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包括:
1) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列;
2) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列;
40 3) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列;或
4) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。
- 6、根据权利要求 1-5 任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包括:
45 1) 所述重链如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列,以及所述轻链如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列;
2) 所述重链如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列,以及所述轻链如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列;
50 3) 所述重链如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列,以及所述轻链如 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列;或
4) 所述重链如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列,以及所述轻链如 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列

列。

7、根据权利要求 1-5 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的分离的抗体是 IgG1、IgG2 或 IgG4。

8、根据权利要求 1-5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体为单克隆抗体、鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体人改造抗体、人抗体、Fv、单链抗体（scFv）、Fab、Fab'，Fab'-SH 或者 F(ab')₂。

9、根据权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段能够结合 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

10、一种免疫缀合物，其中，该免疫缀合物含有治疗剂以及与治疗剂偶联的权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

11、一种组合物，其中，所述组合物含有权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、和/或权利要求 10 所述的免疫缀合物、以及药学上可接受的载体。

12、一种用于检测样品中 B7H6 的试剂盒，该试剂盒含有权利要求 1-9 中任一项所述抗体或其抗原结合片段。

13、权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于检测样品中 B7H6 的试剂中的用途。

14、权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于预防和/或治疗 B7H6 介导的疾病的药物中的用途，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病；

任选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

15、一种核酸，其包含编码权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的核酸。

16、一种重组载体或转化子，其含有权利要求 15 中所述的核酸。

17、一种重组细胞，其中，所述重组细胞携带权利要求 15 所述的核酸、权利要求 16 所述的表达载体或转化子、或权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

18、一种药物，其中，包括权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的免疫缀合物、权利要求 11 所述的组合物、权利要求 15 所述的核酸、权利要求 16 所述的重组载体或转化子或权利要求 17 所述的重组细胞。

19、权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的免疫缀合物、权利要求 11 所述的组合物、权利要求 18 所述的药物、权利要求 15 所述的核酸、权利要求 16 所述的重组载体或转化子或权利要求 17 所述的重组细胞在治疗和/或预防 B7H6 介导的疾病中的用途。

20、根据权利要求 19 所述的用途，其中，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病；

任选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

21、一种治疗和/或预防 B7H6 介导的疾病的方法，其中，包括向受试者施用以下中的至少之一：

1) 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

2) 权利要求 10 所述的免疫缀合物；

3) 权利要求 11 所述的组合物；

4) 权利要求 18 所述的药物；

5) 权利要求 15 所述的核酸；

6) 权利要求 16 所述的重组载体或转化子；和

7) 权利要求 17 所述的重组细胞。

22、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病；

任选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。

23、一种诊断受试者是否患有 B7H6 介导的疾病的方法，其特征在于，包括使用下列中的至少一对待测样品中的 B7H6 进行检测：

1) 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

2) 权利要求 15 所述的核酸；

3) 权利要求 16 所述的重组载体或转化子；和

- 4) 权利要求 17 所述的重组细胞，
基于所述 B7H6 的检测结果，确定所述待测样品中 B7H6 的含量。
- 24、根据权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述待测样品中 B7H6 的含量不低于患病的最低标准是待测样品来源于患有 B7H6 介导的疾病的患者的指示。
- 5 25、根据权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病；
任选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。
- 26、下列中的至少之一在诊断受试者是否患有 B7H6 介导的疾病中的用途：
- 1) 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段；
- 10 2) 权利要求 15 所述的核酸；
- 3) 权利要求 16 所述的重组载体或转化子；和
- 4) 权利要求 17 所述的重组细胞。
- 27、根据权利要求 26 所述的用途，其中，所述 B7H6 介导的疾病为癌症或感染性疾病；
任选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。
- 15