(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 4 月 4 日 (04.04.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/062877 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/18 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/108532

(22) 国际申请日: 2018 年 9 月 29 日 (29.09.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710918370.7 2017年9月30日 (30.09.2017) CN

(71) 申请人: 合肥立方制药股份有限公司 (**HEFEI LIFEON PHARMACEUTICAL CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市长江西路669号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。

(72) 发明人: 张美 (**ZHANG, Mei**); 中国安徽省合肥市望江西路522号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。 季俊虬 (**JI, Junqiu**); 中国安徽省合肥市望江西路522号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。 高美华 (**GAO, Meihua**); 中国安徽省合肥市望江西路522号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。 陈军 (**CHEN, Jun**); 中国安徽省合肥市望江西路522号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司 (**NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.**); 中国北京市北三环东路36号北京环球贸易中心C座10层, Beijing 100013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

WO 2019/062877 A1

(54) **Title:** PROTEIN BINDING TO FIBRONECTIN B DOMAIN

(54) 发明名称: 结合至纤维连接蛋白B结构域的蛋白

(57) **Abstract:** The present invention relates to an epitope on a fibronectin B (ED-B) domain, more specifically to an antibody or an antibody fragment of an ED-B domain, and can be widely applied in in-vitro detection and in-vivo positioning of ED-B domains as well as in targeted cancer therapy.

(57) 摘要: 一种纤维连接蛋白B(ED-B)结构域的表位，特异识别并结合纤维连接蛋白ED-B结构域的抗体或抗体片段，其可以广泛用于ED-B蛋白结构域的体外检测和体内定位，也可用于肿瘤靶向治疗。

结合至纤维连接蛋白 B 结构域的蛋白

技术领域

本发明涉及新的纤维连接蛋白 B 结构域的表位，及特异结合其的抗体，特别是单克隆抗体或抗体片段，具有可识别肿瘤或抑制肿瘤生长的生物学活性，或具有杀伤肿瘤细胞的生物学活性。另外，本发明还涉及该抗体的制备方法及含有该抗体的药物组合物。

发明背景

常用的肿瘤治疗方式有化疗与放疗，由于这些治疗方法特异性不高，对正常组织产生显著的毒副作用，在杀死癌细胞的同时，影响正常器官的生理功能，降低患者的免疫能力和生活质量。提高肿瘤治疗药物特异性的一个方法是借助可识别肿瘤细胞标志物的抗体或抗体片段将药物靶向到肿瘤细胞，对肿瘤产生有针对性的杀伤。这首先需要找到能在细胞膜外表面表达的肿瘤标志物，即只在肿瘤细胞表面或细胞外基质中表达但在正常细胞或组织中表达量很少，甚至不表达的蛋白。

纤维连接蛋白或纤连蛋白（FN）是一种多功能的糖蛋白，广泛地存在于细胞外基质、血浆及其他体液中，由上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、肝细胞等表达，参与细胞的粘附、变形与分布，及血管的形成。

FN 的基因约有 75kb，约含 50 个外显子，主要由 I，II，III 型三类同源重复单元构成，B 结构域是包含在 FN 的 III 型重复序列中，由单个外显子编码的包含 91 个氨基酸的完整重复。在 FN 基因表达过程中，有含 B 结构域的 FN(B+)和不含 B 结构域的 FN(B-)两种情况，这两种情况被认为在个体发育过程中发挥着重要作用，FN(B+)在成人正常组织中表达量极少，但在创伤、疾病、伤口愈合特别是肿瘤生长过程中又重新高表达，如胃癌、结直肠癌、肺癌、乳腺癌等细胞中高表达含 B 结构域的 FN(B+)。通过体外免疫组织化学检测和体内靶向定位显示，FN(B+)在成年人的正常组织中不表达，而在多种肿瘤组织血管中高表达，是肿瘤组织的一种标志性蛋白。因此，FN 的 B 结构域也叫额外结构域 B（Extra-domain B，ED-B）。

基于 ED-B 结构域开发出靶向抗体，可用于将候选药物如细胞毒素等靶向至肿瘤部位，可有效抑制或杀伤肿瘤细胞，从而达到治疗目的，并且同

时减少对正常组织的伤害，减少毒副作用。

治疗性抗体的发展方向为全人抗体，全人抗体比鼠源性抗体在临床上体现出很大的优势，比如免疫原性低、抗体在体内的半衰期较长并可借助人免疫球蛋白 Fc 段介导免疫调理、ADCC 及 CDC 效应，进而增强抗体的生物学效应。

由于人与小鼠 ED-B 的氨基酸序列 100%同源，小鼠免疫系统难以对人 ED-B 结构域发生免疫反应而产生抗 ED-B 抗体，比如通过杂交瘤技术获得的鼠源单抗 BC-1(Carnemolla, Leprini et al. J Biol Chem 1992, 24689-24692)，并不能直接识别 ED-B 结构域，而是通过识别与 ED-B 相邻结构域的抗原表位来间接特异性结合 ED-B 阳性的 FN 的。现在借助基因工程技术，直接利用噬菌体展示技术表达人工合成的抗体基因，通过淘选获得具有特定功能的抗体，而不需要借助高等动物体的免疫系统产生，具备了开发全人源重组抗体技术。目前报导的 ED-B 人源抗体有 CGS-1，CGS-2，L19 (Carnemolla, Neri et al. Int J Cancer 1996, 397-405, Pini, Viti et al. J Biol Chem 1998, 21769-21776)，B5 (Ji J, Zhang M, Gao M, et al. HUMAN ANTIBODY AGAINST ED-B DOMAIN OF FIBRONECTIN AND USES THEREOF. WO2014194784A1)等，这些抗体均具备了高度的特异性，并且经 BIAcore 检测，CGS-1、CGS-2、L19 的亲和力分别达到 5.4×10^{-8}M、1.1×10^{-9}M、8.7×10^{-10}M。尤其是抗体 L19 的临床研究，充分证明了针对抗原 ED-B 开发特异性抗体药物，具有显著的抑制或杀伤肿瘤的效果。

发明简述

在一个方面，本发明提供了新的 ED-B 结构域的线性表位，其由选自 VDITDS（SEQ ID NO：76）、TGLEPGIDY（SEQ ID NO：88）和 NSSTIIGYR（SEQ ID NO：81）的氨基酸序列组成。

在一个方面，本发明提供了一种特异性结合选自 VDITDS（SEQ ID NO：76）、TGLEPGIDY（SEQ ID NO：88）和 NSSTIIGYR（SEQ ID NO：81）的表位的分离的抗体或其抗原结合片段。

在一个实施方案中，本发明提供了一种分离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含有 3 个重链互补决定区（HCDR）和 3 个轻链互补决定区（LCDR），其中 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别包含

SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：7 所示的氨基酸序列，以及 LCDR1 包含选自 SEQ ID NO：8、95-118 和 143 所示的氨基酸序列、LCDR2 包含选自 SEQ ID NO：9、119-142 和 144 所示的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列。

在一个实施方案中，本发明所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)，其包含 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列。在一个实施方案中，本发明所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区(VL)，其包含 SEQ ID NO：3 或 145 所示的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%相同性的氨基酸序列。

在一个实施方案中，本发明所述抗体包含 SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14、SEQ ID NO：146、SEQ ID NO：13 的第 1-241 位氨基酸或 SEQ ID NO：13 的第 1-242 位氨基酸所示的氨基酸序列。

在一个方面，本发明提供了包含本发明的分离的抗体或其抗原结合片段的药物组合物，所述药物组合物任选进一步包含融合蛋白、放射性同位素、化学药物和/或纳米颗粒。

在一个方面，本发明提供了本发明的分离的抗体或其抗原结合片段或包含其的药物组合物在制备预防、诊断和治疗癌症的药物中的用途。

在一个实施方案中，所述癌症是表达含 ED-B 结构域的 FN(B+)的癌症，例如选自鼻咽癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、乳腺癌和软组织肉瘤。

在一个方面，本发明提供了包含本发明的分离的抗体或其抗原结合片段的试剂盒，所述试剂盒可用于(i)诊断肿瘤组织的体内分布或病理组织切片，(ii)分析鉴定细胞或蛋白质，或(iii)亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子。

在一个方面，本发明提供了本发明的分离的抗体或其抗原结合片段在制备用于(i)诊断肿瘤组织的体内分布或病理组织切片，(ii)分析鉴定细胞或蛋白质，或(iii)亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子的试剂盒中的用途。

在一个方面，本发明提供了编码本发明的分离的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸分子。

附图说明

图 1 示出 DE2 抗体的重链和轻链可变区氨基酸序列，其中划下划线的氨基酸是 CDR 区，划双下划线的氨基酸在抗体库中是随机序列，划三下划线的氨基酸在 A11 抗体亚库中是随机序列。

图 2 示出通过 ELISA 实验验证 DE2 抗体特异性识别抗原 ED-B 结构域。

图 3 示出通过细胞免疫荧光实验验证 DE2 抗体特异性识别 FN(B+)细胞。图 3A 为阴性对照，细胞为不表达 ED-B 的 CHO-789 细胞，图 3B 的细胞为表达 ED-B 的 CHO-7B89 细胞。抗体为 FITC 标记的 DE2 抗体。

图 4 示出 DE2 抗体在荷瘤小鼠体内的分布。通过小动物活体荧光成像方法，检测到 Cy5.5 标记的 DE2 抗体可特异性分布在 ED-B 高表达的种植瘤组织，而其他组织很难检测到有抗体分布。

图 5 示出 DE2 抗体在实体瘤组织的分布。将 Cy5.5 标记的 DE2 抗体通过为静脉注射到小鼠体内 16 小时后，进行肿瘤组织冰冻切片分析。Cy5.5 标记的抗体主要分布在血管上和肿瘤细胞外基质。

图 6 示出 DE2 抗体与 ED-B 结合的抗原表位。合成多肽序列用水平线条表示，线条粗细表示相对亲和力高低。

图 7 示出 DE2 抗体与 ED-B 结合的抗原表位。与 DE2 抗体结合能力最高的多肽所在区域用浅灰色球形和深灰色球形标识。

发明内容

发明人通过抗体的基因合成及噬菌体展示技术，淘选到特异性的单链抗体，可以直接识别单独的 ED-B 结构域，或含 ED-B 结构域的纤连蛋白 FN（B+），也可以识别其他蛋白与 ED-B 结构域的融合蛋白。经 ELISA 方法检测，所得候选抗体亲和力为 L19 抗体的 16 倍。经 BIAcore 检测，所得抗体亲和力为 L19 的 9 倍。预示所得抗体对 ED-B 抗原有更高的亲和力，更好的靶向作用。所得抗体轻链具有人的 Lambda 链氨基酸序列，有别于 L19 的人 Kappa 链氨基酸序列，丰富了抗 ED-B 的抗体类型。

所得抗体可用于抗肿瘤药物开发，如抗体的放射性同位素标记、与细胞毒素融合、与化学药物偶联、与纳米颗粒偶联等，借助所得抗体的靶向作用使药物高度富集在高表达 FN(B+)的肿瘤组织中针对性杀伤肿瘤细胞，提高药效同时对正常组织伤害较小。所得的单链抗体结构形式可以使抗体

药物小型化，使抗体在人体内的通透性加强，可沿着肿瘤血管到达肿瘤组织内部，产生较好的肿瘤杀伤效果；并且单链抗体可灵活改变为多种形式抗体，如天然抗体结构、迷你抗体(Minibody)、双抗、多抗融合形式等，通过对抗体结构形式的修改，可改变抗体的稳定性、通透性、用途等。另外，所得抗体可以开发为肿瘤诊断试剂用于体内和体外的肿瘤组织检测，或用于其他各类免疫相关试剂开发。

发明人发现纤连蛋白 ED-B 结构域上有两个区域能与抗体以极高的亲和力结合，这两个区域位于 ED-B 结构域的无规则卷曲区。进一步分析发现，ED-B 高亲和力抗体识别 ED-B 的抗原表位由选自下述的 ED-B 多肽片段组成：VDITDS（SEQ ID NO：76），TGLEPGIDY（SEQ ID NO：88），NSSTIIGYR（SEQ ID NO：81）。

发明人得到了一种重组抗含人 ED-B 蛋白结构域的单克隆抗体或抗体片段，其中，所述的抗体片段优选为抗原结合片段，该抗体或抗体片段能与含 ED-B 结构域的纤连蛋白 FN(简写为 FN(B+))有效结合，可用于 FN(B+)的检测与诊断，也可用于高表达 FN(B+)肿瘤的靶向治疗，或与其他抗肿瘤药物进行联合治疗。

因此，本发明提供了一种分离的特异性识别并结合人纤连蛋白(FN)中 ED-B 结构域的抗体或抗体片段。在一个特定的实施方案中，本发明提供了一种特异性识别和/或结合由选自下述的 ED-B 多肽片段组成的线性表位的抗体或抗体片段：VDITDS（SEQ ID NO：76），TGLEPGIDY（SEQ ID NO：88），NSSTIIGYR（SEQ ID NO：81）。

在一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有一个重链可变区的CDR3区氨基酸序列，CDR3区含有氨基酸序列RMSYFDY（SEQ ID NO：7）。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有一个轻链可变区的 CDR3 区氨基酸序列，CDR3 区含有氨基酸序列 QSWDGRQP（SEQ ID NO：10）。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有具有氨基酸序列 RMSYFDY（SEQ ID NO：7）的重链可变区 CDR3 和具有氨基酸序列 QSWDGRQP（SEQ ID NO：10）的轻链可变区 CDR3。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有 3 个

重链可变区 CDR，所述 CDR 的氨基酸序列分别为 SYAMS（SEQ ID NO：5），RISPSGSSTYYADSVKG（SEQ ID NO：6），RMSYFDY（SEQ ID NO：7）。

在一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有轻链 CDR1，其包含选自 SEQ ID NO：8、95-118 和 143 所示的氨基酸序列。

在一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有轻链 CDR2，其包含选自 SEQ ID NO：9、119-142 和 144 所示的氨基酸序列。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有 3 个轻链可变区 CDR，所述 CDR 的氨基酸序列分别为：

LCDR1：选自 SEQ ID NO：8、95-118 和 143，例如 SEQ ID NO：8、95、97、99、100、114 或 143 所示的氨基酸序列，

LCDR2：选自 SEQ ID NO：9、119-142 和 144，例如 SEQ ID NO：9、119、121、123、124、138 或 144 所示的氨基酸序列，和

LCDR3：SEQ ID NO：10。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR，其中所述 3 个重链可变区 CDR 的氨基酸序列分别为 SYAMS（SEQ ID NO：5），RISPSGSSTYYADSVKG（SEQ ID NO：6），RMSYFDY（SEQ ID NO：7），所述 3 个轻链可变区 CDR 的氨基酸序列分别为 SGDSLGIFRSGMVS（SEQ ID NO：8），LPTSRPS（SEQ ID NO：9），QSWDGRQP（SEQ ID NO：10）。

在另一个特定的实施方案中，本发明提供了一种分离的特异性识别并结合人纤连蛋白(FN)中 ED-B 结构域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含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)，

所述重链可变区包含：

VH CDR1，其包含 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列，

VH CDR2，其包含 SEQ ID NO：6 所示的氨基酸序列，和

VH CDR3，其包含 SEQ ID NO：7 所示的氨基酸序列，

所述轻链可变区包含：

VL CDR1，其包含 SEQ ID NO：8 或 143 所示的氨基酸序列，

VL CDR2，其包含 SEQ ID NO：9 或 144 所示的氨基酸序列，和

VL CDR3，其包含 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列。

"分离的抗体"指所述抗体(1)不与在其天然状态下伴随其天然相关成分

关联，(2)不含来自相同物种的其它蛋白质，(3)由来自不同物种的细胞表达，或(4)不在天然中发生。因此，经化学合成的多肽或在不同于多肽的天然来源细胞的细胞系统中合成的多肽将会与其天然相关成分"分离"。还可通过分离以使蛋白质实质上不含天然相关成分，即使用本领域众所周知的蛋白质纯化技术。

如本文所用，“抗体”指免疫球蛋白和免疫球蛋白片段，无论天然的或者部分或全部合成(例如重组)产生的，包括其至少包含免疫球蛋白分子的部分可变区并保留全长免疫球蛋白的结合特异性能力的任何片段。因此，抗体包括具有与免疫球蛋白抗原结合结构域(抗体结合位点)同源或基本上同源的结合结构域的任何蛋白。抗体包括合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、胞内抗体以及抗体片段，例如但不限于 Fab 片段、Fab'片段、$F(ab')_2$ 片段、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、Fd 片段、Fd’片段、单链 Fv(scFv)、单链 Fab (scFab)、双抗体、或者上述任何抗体的抗原结合片段。本文所提供的抗体包括任何免疫球蛋白类型(例如 IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY)、任何类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类(例如，IgG2a 和 IgG2b)的成员。

如本文所用，抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”指全长抗体的任何部分，其少于全长，但是至少包含结合抗原的所述抗体的部分可变区(例如一个或多个 CDR 和/或一个或多个抗体结合位点)，并且因此保留结合特异性以及所述全长抗体的至少部分特异性结合能力。因此，抗原结合片段包含与衍生抗体片段的抗体结合相同抗原的抗原结合部分。抗体片段包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物，以及合成产生的衍生物，例如重组产生的衍生物。抗体包括抗体片段，抗体片段的实例包括但不限于 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、单链 Fv (scFv)、Fv、dsFv、双抗体、Fd 和 Fd’片段和单结构域抗体(dAb)片段，包括修饰的片段(参见例如 Methods in Molecular Biology, Vol 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Chapter 1; p 3-25, Kipriyanov；Ward 等人，Nature 341:544-546, 1989 和 Wu, A. M. and P. D. Senter . Nat Biotechnol 23(9): 1137-1146(2005))。所述片段可以包括连接在一起的多条链，例如通过二硫键和/或通过肽接头。

如本文所用，全长抗体是具有两条全长重链(例如 VH-CH1-CH2-CH3 或 VH-CH1-CH2-CH3-CH4)和两条全长轻链(VL-CL)和铰链区的抗体，如通过抗体分泌 B 细胞天然产生的抗体以及合成产生的具有相同结构域的抗体。

如本文所用，dsFv 指具有稳定 VH-VL 对的工程化分子间二硫键的 Fv。

如本文所用，Fab 片段是用木瓜蛋白酶消化全长免疫球蛋白所获得的抗体片段，或者例如通过重组方法合成产生的具有相同结构的片段。Fab 片段包含轻链(包含 VL 和 CL)和另一条链，所述另一条链包含重链的可变结构域(VH)和重链的一个恒定区结构域(CH1)。

如本文所用，$F(ab')_2$ 片段是在 pH 4.0-4.5 下用胃蛋白酶消化免疫球蛋白所导致的抗体片段，或者例如通过重组方法合成产生的具有相同结构的片段。$F(ab')_2$ 片段基本上包含两个 Fab 片段，其中每个重链部分包含额外的几个氨基酸，包括形成连接两个片段的二硫键的半胱氨酸。

如本文所用，Fab'片段是包含 $F(ab')_2$ 片段的一半(一条重链和一条轻链)的片段。

如本文所用，“Fv”是最小抗体片段，其含有完整的抗原识别和抗原结合位点。这个片段由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的紧密非共价缔合的二聚体组成。这两个结构域的折叠产生 6 个超变环(各来自 H 和 L 链的 3 个环)，贡献抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体的抗原结合特异性。单一的可变结构域(或者包含仅三个特异于抗原的 CDR 的一半 Fv)也具有识别和结合抗原的能力。

如本文所用，scFv 片段指包含通过多肽接头以任何顺序共价连接的可变轻链(VL)和可变重链(VH)的抗体片段。接头长度使得两个可变结构域基本不干扰地桥接。示例性接头是分散有一些 Glu 或 Lys 残基以增加溶解性的$(Gly\text{-}Ser)_n$残基。关于 sFv 的综述，可参见 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。

术语“嵌合抗体”是指这样的抗体，其中可变区序列源自一个物种，恒定区序列源自另一物种，如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

术语“双抗体”是指小抗体片段，通过在 VH 与 VL 结构域之间用短接

头(大约 5-10 个残基)构建 sFv 片段而制备，由此获得 V 结构域的链间而不是链内配对，产生二价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。

双特异性抗体是两个“交叉”sFv 片段的异源二聚体，其中两个抗体的 VH 和 VL 结构域存在于不同的多肽链上。参见例如 EP 404,097、WO 93/11161 及 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)。

“人抗体”是指仅包含人类免疫球蛋白序列的抗体。如果人类抗体产生于小鼠中、小鼠细胞中或来源于小鼠细胞的杂交瘤中，则人类抗体可含有鼠碳水化合物链。类似地，“小鼠抗体”或“大鼠抗体”分别是指仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

“人源化”抗体是指非人(例如小鼠)抗体形式，其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段(如 Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$ 或者抗体的其它抗原结合亚序列)，含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地，人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体)，其中接受者抗体的互补决定区(CDR)的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或者兔的 CDR 残基置换。

此外，在人源化中，还可能对 VH 和/或 VL 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变，由此改善抗体的一或多种结合特性(例如亲和性)。可进行例如 PCR 介导的突变引入突变，其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常，引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外，CDR 内的突变通常不超过一个或两个。因此，本发明所述人源化抗体还涵盖 CDR 内包含 1 或 2 两个氨基酸突变的抗体。

通常，免疫球蛋白具有重链和轻链。每条重链和轻链包含恒定区和可变区(这些区也被称为“结构域”)。组合时，重链和轻链可变区特异性结合抗原。轻链和重链可变区含有被三个高变区(也称为“互补决定区”或“CDR”)中断的“框架”区。已经确定了框架区和 CDR 的范围(参见 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，U.S. Department of Health and Human Services，1991，其在此通过引用并入本文)。不同轻链或重链框架区的序列在一个物种内相对保守。

CDR 主要负责与抗原的表位结合。每条链的 CDR 通常称为 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号，并且通常也通过特定 CDR 所处的

链来鉴定。因此，VH CDR3 位于其被发现的抗体重链可变结构域中，而 VL CDR1 是来自其被发现的抗体轻链可变结构域的 CDR1。

提及“VH”或“V_H”是指免疫球蛋白重链的可变区，包括 Fv、scFv、dsFv 或 Fab 的可变区。提及“VL”或“V_L”是指免疫球蛋白轻链的可变区，包括 Fv、scFv、dsFv 或 Fab 的可变区。

如本文中所使用，“单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”是指实质上均质抗体的群体，即除了可少量存在的可能的天然存在的突变以外，构成该群体的抗体分子的氨基酸序列相同。相比之下，常规(多克隆)抗体制剂典型地包括在其可变结构域、尤其 CDR 中具有不同氨基酸序列的许多不同抗体，其通常对不同表位是特异性的。修饰语“单克隆”指示抗体的特征为获得自实质上均质的抗体群体，且不应理解为需要通过任何特定方法产生该抗体。例如，待根据本发明使用的单克隆抗体可通过 Kohler 等人(1975) Nature 256: 495 首先描述的杂交瘤方法制得，或可通过重组 DNA 方法(参见例如美国专利号 4,816,567)制得。“单克隆抗体”也可例如使用 Clackson 等人(1991) Nature 352: 624-628 和 Marks 等人(1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597 中描述的技术分离自噬菌体抗体文库。还参见 Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有一个重链可变区(VH)，所述重链可变区含有 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有一个轻链可变区(VL)，所述轻链可变区含有 SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：145 所示的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%相同性的氨基酸序列。

术语“%相同性”通过在对比窗比较两个最佳比对的序列而确定，其中与参考序列(其不包含添加或缺失)相比，对比窗中的部分多肽序列可以包含添加或缺失(即缺口)，以最佳比对两个序列。“%相同性”如下计算：在两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数除以对比窗中的位置总数，并将结果乘以 100。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段含有一个重链可变区(VH)和一个轻链可变区(VL)，其中所述重链可变区含有 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区含有 SEQ ID NO：3 或 SEQ ID

NO：145 所示的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%相同性的氨基酸序列。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体具有 SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14、SEQ ID NO：146、SEQ ID NO：13 的第 1-241 位氨基酸或 SEQ ID NO：13 的第 1-242 位氨基酸残基所示的氨基酸序列。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体具有 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段是单克隆抗体，平衡结合解离常数(KD)为 1×10^{-8}M 或更低、1×10^{-9}M 或更低、或者 1×10^{-10}M 或更低。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段是单体或多聚体。

在另一个特定的实施方案中，本发明所述的抗体或抗体片段是源自哺乳动物抗体序列，尤其是源自人的抗体序列。

在另一个特定的实施方案中，所述的抗体或抗体片段直接与 ED-B 蛋白结构域结合。特别地，其中 ED-B 蛋白结构域可以为独立的 ED-B 重组蛋白，或 ED-B 蛋白与其他蛋白融合形成的重组蛋白，或含有 ED-B 结构域的天然纤连蛋白。更特别地，其中 ED-B 蛋白结构域可以来自人、小鼠、大鼠、鸡或其他物种。更特别地，其中 ED-B 蛋白结构域可以是糖基化蛋白或非糖基化蛋白。

在一个特定的实施方案中，所述的抗体片段可以是单价小分子抗体如单链抗体、单域抗体、超变区多肽等，Fab，或多价小分子抗体，如双链抗体、三链抗体、微型抗体。

在另一个特定的实施方案中，所述抗体是人免疫球蛋白 IgG。

另一方面，本发明提供了包含本发明所述抗体或抗体片段的药物组合物。

在一个实施方案中，所述药物组合物进一步包含但不限于融合蛋白、放射性同位素、荧光染料、化学药物、纳米颗粒等。在一个特定的实施方案中，所述药物组合物用于肿瘤或癌症相关疾病的诊断或治疗。

另一方面，本发明提供了本发明所述抗体或抗体片段或药物组合物在预防、诊断和治疗癌症相关疾病中的用途。

另一方面，本发明提供了预防、诊断和治疗对象中癌症相关疾病的方

法，包括给予对象治疗有效量或预防有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段或药物组合物。

另一方面，本发明提供了本发明所述抗体或抗体片段或药物组合物在制备预防、诊断和治疗癌症相关疾病的药物中的用途。

特别地，本发明所述癌症相关疾病是表达含 ED-B 结构域的 FN(B+)的癌症。更特别地，所述癌症相关疾病是胃癌、结直肠癌、肺癌或乳腺癌。

如本文所用，“治疗”患有疾病或疾病状况的个体表示所述个体的症状部分或全部缓解，或者在治疗后保持不变。因此，治疗包括预防、治疗和/或治愈。预防指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病发展。治疗还包括所提供的任何抗体或其抗原结合片段以及本文所提供的组合物的任何药学用途。

如本文所用，“治疗有效量”或“治疗有效剂量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量。因此，其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

如本文所用，“疗效”表示由个体的治疗所导致的效果，其改变、通常改良或改善疾病或疾病状况的症状，或者治愈疾病或疾病状况。

如本文所用，“预防有效量”或“预防有效剂量”指在施用于对象时会具有预期的预防效果的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量，例如，防止或延迟疾病或症状的发生或复发，减少疾病或症状发生或复发的可能性。完全预防有效剂量不必通过施用一个剂量发生，并且可以仅在施用一系列剂量之后发生。因此，预防有效量可以在一次或多次施用中施用。

如本文中所使用的，术语“对象”包括人和非人哺乳动物，例如小鼠、大鼠、羊、牛、狗、猫、兔等。

本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物可以利用本领域公知的一种或多种方法通过一种或多种给药途径给药。本领域技术人员应当理解，给药途径和/或方式根据期望的结果而不同。本发明的给药途径包括例如肠胃外给药途径，例如注射或输注。本文使用的短语“肠胃外给药”是指除肠和局部给药以外的给药模式，通常是注射和输注，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、皮内、腹膜内和皮下。或者，本发明的针对

肿瘤的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物也可以通过非肠胃外途径给药，如局部、表皮或粘膜途径给药，例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或表面。

另一方面，本发明提供了包含本发明所述抗体或抗体片段的诊断试剂盒，所述试剂盒可用于诊断肿瘤组织的体内分布、病理组织切片等，或用于分析鉴定细胞、蛋白质等，或用于亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子。本发明进一步提供了本发明所述试剂盒在用于诊断肿瘤组织的体内分布、病理组织切片，分析鉴定细胞、蛋白质，或用于亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子中的用途。本发明更进一步提供了本发明所述试剂盒在制备用于诊断肿瘤组织的体内分布、病理组织切片，分析鉴定细胞、蛋白质，或用于亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子的试剂盒中的用途。

所述药物组合物或试剂盒中本发明的抗体或其抗原结合片段还可以与如细胞毒素、放射性同位素或生物活性蛋白质等治疗性部分缀合。可参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences，第 19 版(Mack Publishing Co.1995)；和 Goodman 和 Gilman 的 The Pharmacological Basis of Therapeutics，第 7 版(MacMillan Publishing Co. 1985)。

另一方面，本发明提供了编码本发明所述抗体或抗体片段的多核苷酸分子。

在一个特定的实施方案中，所述多核苷酸分子含有如 SEQ ID NO：2 所示的编码抗体的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列和如 SEQ ID NO：4 所示的编码抗体的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列。

本文使用常规符号来描述核苷酸序列：单链核苷酸序列的左侧末端是 5'末端；将双链核苷酸序列的左侧方向称为 5'-方向。将 5'至 3'添加核苷酸至新生 RNA 转录物的方向称为转录方向。具有与 mRNA 相同序列的 DNA 链被称为“编码链”，DNA 链上与从该 DNA 转录的 mRNA 具有相同序列并且位于 RNA 转录物 5'末端 5'的序列被称为“上游序列”，DNA 链上具有与 RNA 相同序列并且位于编码 RNA 转录物的 3'末端的 3'的序列被称为“下游序列”。

特别地，本发明提供了一种抗人 ED-B 蛋白结构域的单克隆抗体(简称为 DE2)该抗体为全人源抗体，含有人的重链可变区和轻链可变区，且提供了一种可连接重链可变区和轻链可变区的连接子片段，具体的，本文所述

DE2 抗体可以是 DE2 单链抗体(scFv)，其含有重链可变区、轻链可变区以及连接子，优先的构成方式为抗体重链可变区-连接子-抗体轻链可变区。其中，重链可变区具有 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列；轻链可变区含有 SEQ ID NO：3 所示的氨基酸序列。优选地，连接片段含有$(G_4S)_3S$（SEQ ID NO：11）或$(G_4S)_3$（SEQ ID NO：94）所示的氨基酸序列。在一个特定的实施方案中，所述 DE2 抗体具有 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。

另一方面，本发明也提供了编码上述单克隆抗体的 DNA 分子。

在其中一个实施例中，该 DNA 分子含有 SEQ ID NO：2 所示的编码所述单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列和 SEQ ID NO：4 所示的编码所述单抗轻链可变区的核苷酸序列，以及可选地 SEQ ID NO：12 所示可用于编码连接单克隆抗体重链和轻链可变区的连接子片段的核苷酸序列。

本发明所述的 ED-B 结构域的氨基酸序列可参见 SEQ ID NO：16。

本文所述的“单克隆抗体”也简称为“单抗”，是指一类高度均质性的特异性抗体，即除少数可能存在的天然发生的突变体外，各抗体氨基酸序列和结构是相同的。单克隆抗体只识别一种抗原表位(抗原决定簇)，具有高度的特异性。“单克隆”仅表示抗体来源或组成的一致性，是对抗体特征的一种描述，非特定的生产方法或技术。单克隆抗体可以通过许多公知的方法来制备(Smith et al. (2004) J. Clin. Pathol. 57, 912-917; 和 Nelson et al., J Clin Pathol (2000), 53, 111-117)。例如，单克隆抗体可以通过永生化 B 细胞来制备，例如通过与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞系或者通过用诸如 EBV 的病毒感染 B 细胞。重组技术还可以用来在体外通过用携带编码抗体的核苷酸的人工序列的质粒转化宿主细胞来从宿主细胞的克隆群体制备抗体。

本文所使用的术语“抗体”、“单链抗体”、“抗体片段”或“免疫球蛋白”均含有抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)或其部分。重链和轻链之间可以通过一个共价二硫键连接或通过一个人工合成的多肽连接，形成单体或多聚体。各可变区可以与恒定区连接，也可以与其他的蛋白融合。

本文所述的术语“可变区”表示抗体中某些特定的序列在不同种抗体中存在较大差异，可变区的不同形成了各种抗体可特异性识别特定的抗原或抗原表位。可变区集中在重链和轻链的 N 端，是氨基酸序列变化较大的区域，分子量一般为约 25000 道尔顿。可变区内含有三个互补决定区（CDR，或称超变区），不同 CDR 区之间较保守的部分称为框架区（FR）。CDR

区是抗体识别和结合抗原的区域，直接决定抗体的特异性。

本文所述的抗体恒定区含重链恒定区和轻链恒定区，根据氨基酸序列的差异性分类，重链恒定区可分为 5 类，分别为：IgA，IgD，IgE，IgG，IgM，其中一些可进一步细分亚类；轻链恒定区可分为 2 类，分别为 κ 和 λ。

本文所述的“融合蛋白”是指利用基因工程技术将两种或两种以上天然蛋白或人工修饰后的蛋白串联成一种蛋白，原蛋白之间可以通过人工设计的多肽片段连接或通过肽键直接连接。本文一般特指抗体与其他蛋白的融合形式，比如与其他抗体融合形成双特异性抗体或多特异性抗体；与细胞因子（例如白细胞介素-2（IL-2），白细胞介素-15(IL-15)，白细胞介素-12（IL-12)，肿瘤坏死因子 α(TNFα)）融合形成融合蛋白；与蛋白类毒素和毒素的部分多肽序列或亚基，包括包括植物毒素(例如蓖麻毒素)、细菌毒素（例如霍乱毒素）、动物毒素（例如蜂毒肽）和真菌毒素，形成毒性靶向药物。所采用的技术手段为本领域内的技术人员所熟知。

本文所述抗体与化学药物偶联（Antibody-drug conjugate，ADC）形成新的药物分子是指抗体与化学药物通过共价反应形成的新化合物，所述化学药物包括抗有丝分裂剂、烷基化剂、抗代谢物、抗癌剂、抗血管生成剂、细胞凋亡剂、生物碱、抗生素或其组合。

本文所述“多聚体”指多个蛋白质单体通过共价或非共价形式形成的聚合体。例如人抗体 IgG 一般会以二硫键共价结合形成四聚体。

本文所述“放射性同位素”指具有放射性的核素，常用的同位素有碘 131，碘 125，镥 177 等。利用放射性同位素标记到对抗原具有高特异性、高亲和力的抗体上，制备成具有放射性的免疫治疗药物，注射入体内后可到达靶器官，发挥射线的生物学效应，也可用于诊断。

本文所述“药物组合物”指抗体或抗体片段与其他化学药物或放射性同位素通过化学键交联形成的新药物；也指抗体或抗体片段与其他蛋白质如细胞毒素通过细胞表达出的融合蛋白；也指抗体或抗体片段连接于纳米颗粒表面产生的新靶向制剂；也包括包含上述抗体、抗体片段、新药物、融合蛋白或制剂以及药学上可接受的载体的组合物。

本文所述“试剂盒”主要组成部分是本文所述抗体或抗体融合蛋白，或者在此基础上标记荧光素、放射性同位素、过氧化物酶、碱性磷酸酶等形成的新抗体组合物，试剂盒中可选地包含缓冲液、非本文所述抗体、酶促反

应的底物如二氨基联苯胺（DAB）等，以及相应的支撑物如酶标板、磁珠等。试剂盒可用于诊断肿瘤组织的体内分布、病理组织切片等，或用于分析鉴定细胞、蛋白质等，或用于亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子。

本文所述”诊断”方法是指能对人体体液、血液、组织等反映人体健康状况的物质作出定性、定量的检测，常用的实验技术有免疫组织化学、免疫细胞化学、酶联免疫法等。

本文所述”治疗”方法是指采用抗体或抗体片段及其形成的药物组合体通过静脉注射或病变局部注射等方式进入体内后到达肿瘤组织，发挥药效的过程。

本发明提供了一种可特异性识别 ED-B 蛋白的抗体，该抗体含有 SEQ ID NO：1 所示的重链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：145 所示的轻链可变区氨基酸序列。该抗体也可以采用多种形式发挥其生物学功能，但基本的，抗体片段含有重链的 CDR3 区序列或轻链的 CDR3 区序列。

本发明还提供了抗体的 DNA 序列。在一个实例中，所述 DNA 含有 SEQ ID NO：2 所示的核苷酸序列，其编码抗体重链可变区氨基酸序列，和/或所述 DNA 含有 SEQ ID NO：4 或 147 所示的核苷酸序列，其编码抗体轻链可变区氨基酸序列。

进一步的，本发明还提供了以上单克隆抗体的制备方法。

在获得编码本发明抗体的氨基酸或核苷酸序列后，本领域的技术人员可通过本领域常规的方法来制备本发明的全人源单克隆抗体，例如，可采用本领域技术人员所熟知的杂交瘤技术、基因工程技术制备，可通过杂交瘤细胞株筛选或利用噬菌体抗体库展示技术分离获得。

如本文中所用，术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”指由融合产抗体的淋巴细胞和不产抗体的癌细胞而产生的细胞或细胞系(通常为骨髓瘤或淋巴瘤细胞)。如本领域普通技术人员所知的，杂交瘤可增殖并持续供应产生特定单克隆抗体。用于产生杂交瘤的方法为本领域已知的(见例如，Harlow & Lane，1988)。当提及术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”时，其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。

将本发明提供的单链抗体核苷酸序列克隆到蛋白表达载体中，或将抗

体重链核苷酸序列和轻链核苷酸序列分别克隆到不同的表达载体或同一载体中，均可获得本发明的 ED-B 单克隆抗体。

本文所述的蛋白表达载体，包括但不限于原核细胞蛋白表达载体、酵母细胞蛋白表达载体、昆虫细胞蛋白表达载体、植物细胞蛋白表达载体和哺乳动物细胞蛋白表达载体，载体中含有用于在相应宿主细胞中表达蛋白所需的作用元件，如启动子、终止子、抗性筛选片段等。

编码本发明单克隆抗体的 DNA 序列可采用本领域技术人员熟知的手段获得，如根据氨基酸序列推测 DNA 序列，或通过提取 mRNA 来反转录获得，或直接采用人工合成的方法获得。然后通过酶切连接等技术手段将这些 DNA 序列插入到表达载体中，并且抗体的 DNA 序列处在适当的读码框内，具有必要的起始密码子和终止密码子。本发明所采用的表达载体是本领域技术人员熟知的各种商业化的表达载体。

将构建好的表达载体转化或转染到匹配的宿主细胞中，在适当的培养条件下即可表达出抗体蛋白。

“宿主细胞”包括原核细胞、真核细胞等。在本发明中，优选真核宿主细胞，更优选哺乳动物细胞，这些细胞可通过商业途径或合作单位获得，其中包括但不限于，中华仓鼠卵巢细胞（CHO），人胚肾细胞（HEK293）、非洲绿猴肾细胞（Vero）、幼仓鼠肾细胞（BHK），非洲绿猴肾细胞（COS）及其他多种永生化细胞系。本发明一般采用 CHO 细胞和 HEK293 细胞作为宿主细胞，这些细胞株在本领域内已被公认为能为蛋白质分子提供正确的翻译和蛋白折叠、二硫键形成、糖基化等修饰，且接近人源蛋白的天然状态。但本领域的技术人员熟知的，上述提到的各种细胞系及其亚型均可表达本发明所述的抗体或融合蛋白

表达载体转化或转染宿主细胞的方法有电穿孔技术、脂质体介导、磷酸钙沉淀、PEI 介导等方法，本领域内的技术人员可根据不同的宿主细胞及目的采用合适的转染方法。如采用 PEI 介导含抗体核苷酸序列的载体转染 HEK293 细胞，而采用 Invitrogen 公司的脂质体来转染 CHO 细胞用于构建稳定表达抗体的细胞株。

本发明所述抗体的纯化根据蛋白质的特性或采用的蛋白标签决定，如抗体中含有抗体的恒定区片段，可采用 Protein A 亲和层析方法，若含有 6× 组氨酸标签，则可采用镍柱亲和层析，或可采用离子交换层析、疏水层析、

分子筛层析、透析、凝胶电泳等方法，本领域技术人员采用常规分离纯化方法就可以得到本发明所述的抗体或含有抗体的融合蛋白。

本发明所述的抗体可采用多种方法鉴定，比如酶联免疫吸附法（ELISA）、蛋白质印迹法（Western Blot）鉴定，亲和力检测可采用 BIAcore 技术或 Scatchard 分析法(Beatty et al. J Immunol Methods 1987, 173-179)来测定。

本发明所述的抗体或抗体片段可用荧光染料或放射性同位素等化学物质标记用于生物体内或体外的示踪。其中一个具体案例是将抗体用 Cy5.5 荧光染料标记后，可通过荧光成像仪分析所标记抗体在小鼠体内的分布或代谢情况，也可通过本方法检测到小鼠体内 ED-B 高表达的实体肿瘤位置。

本发明所述的抗体或抗体片段可用荧光染料或具有生物活性的酶类标记，用于体外检测或实验研究。其中一个具体案例是将抗体用 FITC 荧光染料标记后，用于检测组织或细胞的 ED-B 的表达情况。特别的，本发明的抗体也可以不用做任何标记，借助带荧光染料或具生物活性酶类标记的二抗实现上述的检测，与此相关的抗体应用方法和实验技术，本领域内的技术人员可以通过常规技术手段实现。

本发明所述的抗体或抗体片段可与多种蛋白融合，或与化学药物、放射性同位素、纳米颗粒等偶联，发挥靶向作用，形成靶向药物。本发明的抗体或抗体片段及相应的靶向药物的药效可通过细胞水平、活体水平验证，本领域技术人员可以通过常规药物实验方法实现。

除非特别指出，本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文引用的所有参考文献，包括专利、专利申请、文章、教科书、公开出版物、GenBank 序列、网站以及其他公开材料等及其中引用的参考文献均以其全文并入本文参考。如果发生冲突，以本说明书(包括术语解释)为准。在不脱离本发明的设计思路和保护范围的前提下可对本发明上述的具体描述或实施方案进行各种变化和改动，这对于本领域技术人员而言是明显的，所附权利要求覆盖了所有在本发明范围内的变动。

另外除非特别需要，单数术语应包括复数，复数术语应包括单数。类似地，除非上下文另有明确指示，词语“或”旨在包括“和”。 本发明所述技术和方法通常根据本领域熟知的及在本说明书引用的参考文献所述的常规

方法进行。还应该理解的是，给出的核酸或多肽的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值是近似的，并且仅供描述。

下面结合实施例进一步描述本发明。然而应当理解，列举这些实施例是为了起说明作用，并不是用来限制本发明。

实施例

本发明通过下述实施例进一步阐明，但任何实施例或其组合不应当理解为对本发明的范围或实施方案的限制。本发明的范围由所附权利要求书限定，结合本说明书和本领域一般常识，本领域普通技术人员可以清楚地明白权利要求书所限定的范围。在不偏离本发明的精神和范围的前提下，本领域技术人员可以对本发明的技术方案进行任何修改或改变，这种修改和改变也包含在本发明的范围内。

实施例 1：淘选对人 FN 中 ED-B 结构域特异的人源单链抗体

1）将 ED-B 基因（SEQ ID NO：16）利用常规分子克隆方法通过 EcoRI 和 NotI 限制性内切酶酶切位点克隆至 pET-22b(+)（Novagen）中，用大肠杆菌进行蛋白表达。在 ED-B 的 C 端引入 6 个组氨酸的标签，并可利用这个标签进行亲和层析获得纯品蛋白。通过同样方式表达和纯化 FN 中其他 III 型结构域，FN-789（含 FN-7、FN-8、FN-9）和 FN-7B89（含 FN-7、ED-B、FN-8、FN-9），各序列的获得可参照文献(Leahy, Aukhil et al. Cell 1996, 155-164, Schiefner, Gebauer et al. J Biol Chem 2012, 17578-17588)。

2）抗体库的构建

设计全人合成抗体库用于淘选针对 ED-B 抗原的单链抗体。以在人类抗体分子中最为常见的 DP47（Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. & Winter, G. (1992). The repertoire of human germline VH segments reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. J. Mol. Biol., 227, 776-798）为重链模板，以 DPL11（Williams, S. C. & Winter, G. (1993). Cloning and sequencing of human immunoglobulin V lambda gene segments. Eur. J. Immunol., 23, 1456-1461）为轻链模板，用较常用的$(G_4S)_3S$（SEQ ID NO：11）肽链对应的 DNA 将二者先后连接形成单链抗体库模板，其中轻链和重链的 CDR 区根据经验随机添

加形成。具体的，本抗体库 DNA 模板除重链 CDR3 区和轻链 CDR3 区为随机添加外，其他序列参见 SEQ ID NO：15 所示的 A11 核苷酸序列。本模板通过化学合成获得。随机抗体库构建的引物序列见下表，以上述合成的抗体库模板，分别用一对引物 DP47EcoRback、DP47for 和另一对引物 DP47FR4back、DPL11for 克隆出含随机序列的 DP47 和 DPL11 片段，然后以纯化的 DP47 和 DPL11 为混合模板，以 DP47EcoRback、DPL11NotIfor 为引物，进行 PCR 扩增，得到含随机序列的单链抗体 DNA 片段。单链抗体 DNA 片段中的重链和轻链分别由 DP47 和 DPL11 组成，重链、轻链随机序列分别由 DP47for、DPL11for 引物引入。单链抗体 DNA 片段的 5'和 3'端分别通过 DP47EcoRback、DPL11NotIfor 引物引入 EcoRI 和 NotI 限制性酶切位点，并通过该酶切位点构建到 pCANTAB5E(Amersham Biosciences)质粒载体的多克隆位点中，用于构建产生随机抗体库的质粒，用电穿孔法将质粒转化到大肠杆菌 TG1 中进行下一步的噬菌体抗体库展示和抗体淘选。

引物名称	引物序列
DP47EcoRback	GGCGAATTCCGAAGTGCAGCTGTTG（SEQ ID NO：17）
DP47for	TGCCCTGGCCCCAGTAATCGAAMNNMNNMNNMNNACGCGCACAGTAATATACGGCG（SEQ ID NO：18）
DP47FR4back	TTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTC（SEQ ID NO：19）
DPL11for	TTTAGTGCCACCGCCGAAGACMNNMNNMNNMNNATCCCATGACTGGCAGTAATAATCAGC（SEQ ID NO：20）
DPL11NotIfor	ATAAGAATGCGGCCGCACCCAGCACAGTCAGTTTAGTGCCACCGCCGAAGAC（SEQ ID NO：21）

注：N 为选自 A、C、G 或 T 的任意核苷酸，M 为选自 A、C 的任意核苷酸。

3）噬菌体抗体库展示和抗体淘选

参照 Amersham Biosciences 公司的重组噬菌体淘选用户手册（Expression module/ Recombinant Phage Antibody system product insert, Pharmacia Biotech document XY-040-00-08）进行。简略的，将抗体库大肠杆菌 TG1 菌液 50μl 加入到 50ml 新鲜的 2×YT 培养基中于 37℃震荡培养至 OD 值为 0.4-0.5，加入辅助噬菌体于 37℃侵染 30min，PEG8000（生工生物工程股份有限公司）沉淀后用 10000g 离心 30min，用 PBS 重悬备用，使制备的抗体融合噬菌体库滴度应在 10^{12} CFU/ml 以上。

EDB 抗原（SEQ ID NO：16）包被于 5ml 免疫管，用牛奶封闭后加入

2ml 上述制备的噬菌体抗体库 PBS 溶液，37℃孵育 2 小时，倒掉免疫管中的液体，用含 0.1%吐温-20 的 PBS 洗涤 20 次，加入 4ml 对数期的 TG1 细菌，37℃静置孵育 1 小时。将菌液涂布于含氨苄青霉素和葡萄糖的 SOB 平板上，过夜培养后收集侵染噬菌体的大肠杆菌 TG1 菌液，完成第一轮淘选。将获得的 TG1 菌液再次用于制备抗体融合噬菌体库，进入第二轮淘选。

以 ED-B 为抗原共进行 3 轮淘选，所得的大肠杆菌 TG1 通过合适的比例稀释后涂布至琼脂糖平板上获得单克隆菌落，分别用于表达可溶性的抗体进行 ELISA 检测，选择在包被抗原相同条件下显色最强的噬菌体克隆用于进一步分析。

4）抗体从原核载体向真核载体的克隆

将淘选所得的单链抗体的 DNA 片段通过 EcoR I 和 Not I 酶切后连接至含有人 IgG1 抗体恒定区 Fc 片段 DNA 序列的 pCI-neo(Promega)载体中，抗体 DNA 序列与 IgG1Fc 的 DNA 序列在同一个开放阅读框内，使二者能表达出融合蛋白，其中 IgG1Fc 位于融合蛋白的碳端，可用于单链抗体的纯化及提高抗体蛋白的稳定性。以下实施例 3、实施例 4、实施例 5、实施例 8 所用抗体 DE2-Fc（SEQ ID NO：13）或 L19-Fc，均为带有 IgG1Fc 的单链抗体重组蛋白。

5）抗体蛋白的真核细胞表达

转染前 1 天接种，初始密度为 50 万/ml，达到 100 万/ml 后，将细胞离心(100g, 5min)。弃上清，用 3mL SFM4Transfx293（Hyclone）润洗细胞，弃上清，以等体积的 SFM4Transfx293 培养基重悬。制备转染复合物：加 60μg DNA 至 1mL 预热 PBS（Hyclone, SH30256.01B）中，轻柔混匀，室温放置，形成溶液 A。加入 120μl PEI（1mg/ml）至 1mL 预热 PBS 中，涡旋混匀，形成溶液 B。将溶液 B 加入溶液 A，枪头轻柔洗打混匀，室温静置 15—25min。将上述转染复合物加入到 20ml 细胞培养体系中，继续培养，次日直接添加等体积蛋白表达培养基 SFM4HEK293（Hyclone, SH30521.02），继续培养。转染 4 天后，可离心（800rmp，10min）收集培养基用于蛋白纯化。纯化蛋白经直接 ELISA（固相载体包被抗原为 ED-B 蛋白，一抗为待测的含 Fc 抗体的细胞培养液，二抗为 HRP 标记的鼠抗人 IgG）和 SDS-PAGE 实验验证，获得了目标抗体蛋白，抗体蛋白产量约为 40mg/L。

6）单克隆抗体的纯化

用 Ni 亲和层析柱(Qiagen)纯化带组氨酸标签的蛋白，Protein A 亲和柱（Genscript）纯化带 IgG1 恒定区 Fc 的抗体，相应流程按厂商说明书进行。

经哺乳动物细胞表达并纯化的抗体蛋白经直接 ELISA（固相载体包被抗原为 ED-B 蛋白，一抗为纯化获得的含 Fc 的抗体，二抗为 HRP 标记的鼠抗人 IgG）检测分析，获得了本发明的 A11 抗体。A11 抗体亲和力（选用 Scatchard 分析方法，见 Beatty et al. J Immunol Methods 1987, 173-179）显著高于 L19，约为 L19 的 3 倍，与 B5 抗体亲和力一致。A11 抗体的氨基酸序列见 SEQ ID NO：14。

实施例 2：抗体亲和力成熟

1）噬菌体 A11 抗体亚库的构建

为获得更高亲和力的抗体突变体，选择 A11 为对象，其编码 DNA 序列为 SEQ ID NO：15。对 A11 抗体的轻链 CDR1：SGDSLGIGSNNYVS（SEQ ID NO：143）、CDR2：DDNKRPS（SEQ ID NO：144）区进行随机化突变，突变方法如下：以 A11 抗体 DNA 序列为模板，以下表中引物 DPL11CDR1back 和 DPL11CDR2for 为引物进行第一轮 PCR 扩增，所得产物经纯化后以引物 DPL11PstIback 和 DPL11AgeIfor 为引物进行第二轮 PCR 扩增，所得产物通过引物引入的酶切位点 PstI 和 AgeI 克隆入噬菌粒载体 pCANTAB5E-A11 载体（即实施例 1 中含有 A11 抗体序列的 pCANTAB5E 质粒载体）中，形成全合成噬菌体单链抗体亚库。

DPL11PstIback	ATCACCATCTCCTGCAGCGGTGATAGCCTGGGTATT（SEQ ID NO：22）
DPL11CDR1back	CAGCGGTGATAGCCTGGGTATTNNKNNKNNKNNKNNKGTCT CCTGGTACCAACAGCACC（SEQ ID NO：23）
DPL11CDR2for	GGTTAGAAACGCCTGAGGGGCGMNNMNNMNNMNN ATAAATCATGAGTTTGGGGGCT（SEQ ID NO：24）
DPL11AgeIfor	TTGGAGCCAGAGAACCGGTTAGAAACGCCTGAGGGG CG（SEQ ID NO：25）

注：N 为选自 A、C、G 或 T 的任意核苷酸，M 为选自 A、C 的任意核苷酸，K 为选自 T、G 的任意核苷酸。

2）抗体亚库高亲和力突变体的淘选

利用本实施例中构建的 A11 抗体亚库，以原核表达的 ED-B 为抗原，进行四轮固相淘选。对后三轮淘选的产物进行单克隆噬菌体展示，并通过

原核可溶性表达的抗体蛋白进行 ELISA 初步鉴定阳性克隆。通过 HEK293T（得自博士德生物工程有限公司）细胞真核表达的抗体蛋白进行进一步的活性鉴定。具体淘选、抗体表达、阳性克隆鉴定方法同实施例 1。

3）淘选结果

将淘选获得的显色最强的噬菌体阳性克隆，挑选 50 个测序，获得 47 个测序图谱，共 24 种不同序列。其中 32 个序列有重复，CB3、DE2、CA5 重复数最高，CA12、CD1 次之，另有 15 个序列为单序列。增加测序样本数可提高富集重复序列数。

序列名称	LCDR1 突变残基	SEQ ID NO：	LCDR2 突变残基	SEQ ID NO：	富集个数
CB3	AWSSA	26	SASE	50	5
DE2	FRSGM	27	LPTS	51	5
CA5	RAFTP	28	QSHW	52	5
CA12	RLPPG	29	SNTT	53	4
CD1	SRSTY	30	SAEL	54	4
CB2	PGFSP	31	SYRS	55	3
CA1	HMPPY	32	SSQH	56	2
CD7	LARSP	33	SHGR	57	2
DE1	LWLSP	34	WSND	58	2
DF3	AWSSS	35	FRVS	59	1
CB4	CPLVS	36	SAYL	60	1
DF1	FLPGR	37	DLMS	61	1
DH3	GWSGS	38	LKSQ	62	1
DE10	LGSGP	39	LPTF	63	1
CA2	LRPAP	40	ANEL	64	1
CD4	PARSP	41	PRTP	65	1
DG2	PSFSP	42	PNAR	66	1
CA3	PWVSG	43	PSDH	67	1
CB7	RLFLP	44	ASQS	68	1
CC3	SRSRY	45	SAEL	69	1
CB1	SRSTY	46	SAKL	70	1
CC2	TQSKY	47	SAEL	71	1
DE4	VRSLG	48	LNGR	72	1
DE6	WLCGP	49	LPRS	73	1

经 HEK293T 表达获得抗体后用于 ELISA 亲和力检测（见 Beatty et al. J Immunol Methods 1987, 173-179），优选亲和力较高的抗体作为候选抗体。ELISA 方法测定突变体抗体的相对亲和力，所有获得的新抗体均可与 ED-B

特异性结合，亲和力与 A11 相当或显著高于 A11，其中 DE2 抗体亲和力最高且多次重复试验结果稳定，CB3、CA5、CD1、CB2 抗体亲和力基本一致且略低于 DE2。将 DE2 抗体列入候选抗体，进行进一步分析。

根据所用引物序列，可知上述抗体的轻链 CDR1 和 CDR2 的序列如下表所示。

序列名称	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:
CB3	SGDSLGI**AWSSA**VS	95	**SASE**RPS	119
DE2	SGDSLGI**FRSGM**VS	96	**LPTS**RPS	120
CA5	SGDSLGI**RAFTP**VS	97	**QSHW**RPS	121
CA12	SGDSLGI**RLPPG**VS	98	**SNTT**RPS	122
CD1	SGDSLGI**SRSTY**VS	99	**SAEL**RPS	123
CB2	SGDSLGI**PGFSP**VS	100	**SYRS**RPS	124
CA1	SGDSLGI**HMPPY**VS	101	**SSQH**RPS	125
CD7	SGDSLGI**LARSP**VS	102	**SHGR**RPS	126
DE1	SGDSLGI**LWLSP**VS	103	**WSND**RPS	127
DF3	SGDSLGI**AWSSS**VS	104	**FRVS**RPS	128
CB4	SGDSLGI**CPLVS**VS	105	**SAYL**RPS	129
DF1	SGDSLGI**FLPGR**VS	106	**DLMS**RPS	130
DH3	SGDSLGI**GWSGS**VS	107	**LKSQ**RPS	131
DE10	SGDSLGI**LGSGP**VS	108	**LPTF**RPS	132
CA2	SGDSLGI**LRPAP**VS	109	**ANEL**RPS	133
CD4	SGDSLGI**PARSP**VS	110	**PRTP**RPS	134
DG2	SGDSLGI**PSFSP**VS	111	**PNAR**RPS	135
CA3	SGDSLGI**PWVSG**VS	112	**PSDH**RPS	136
CB7	SGDSLGI**RLFLP**VS	113	**ASQS**RPS	137
CC3	SGDSLGI**SRSRY**VS	114	**SAEL**RPS	138
CB1	SGDSLGI**SRSTY**VS	115	**SAKL**RPS	139
CC2	SGDSLGI**TQSKY**VS	116	**SAEL**RPS	140
DE4	SGDSLGI**VRSLG**VS	117	**LNGR**RPS	141
DE6	SGDSLGI**WLCGP**VS	118	**LPRS**RPS	142

另外，由上述结果说明，若候选抗体的 CDR3 区不变，通过对非 CDR3 区（如轻链 CDR1、CDR2 区或重链 CDR1、CDR2 区）修改后，抗体的亲和力会发生改变，并有部分突变体的亲和力会显著提高。对抗体的 CDR 区进行单点突变一般不会改变抗体的特异性，具体的如 A11 抗体亲和力成熟后的抗体 CD1 和 CC3 轻链 CDR1 区。同样的，对抗体的 CDR 区进行多点突变一般不会改变抗体的特异性，具体的如 A11 抗体亲和力成熟后的抗体 CB1 和 CC3 轻链 CDR1 区。但对候选抗体 CDR 区的突变可能会改变抗体的亲和力。

实施例 3：抗体的免疫荧光标记

1）抗体的 FITC 标记

抗体溶解在 0.1M 碳酸盐缓冲液（PH=9.5）中，终浓度为 2mg/ml。在避光条件下新鲜配制 FITC 的 DMSO 溶液，终浓度为 1mg/ml。按抗体与 FITC 的质量比为 10：1，将 FITC 间隔、缓慢加入蛋白溶液中，边加边搅动使其与抗体混合均匀；全部加完后，混合 1 小时，转入黑暗中反应过夜(4℃冰箱内)。加 5mol/L NH_4Cl 至终浓度 50mM，4℃混合 2 小时以终止反应。采用 GE 公司 HiTrap Desalting 除盐预装柱，经 Sephadex G-25 填料快速除盐后按需保存，荧光染料使用过程需避光。

2）抗体的 Cy5.5 NHS Ester 标记

抗体溶解在 0.1M 碳酸盐缓冲液（PH=9.0）中，终浓度为 2mg/ml。在避光条件下新鲜配制 Cy5.5 NHS Ester（GE Healthcare）的 DMSO 溶液，终浓度为 1mg/ml。按抗体与 Cy5.5 NHS Ester 质量比为 10:1，将 Cy5.5 NHS Ester 间隔、缓慢加入蛋白溶液中，边加边搅动使其与抗体混合均匀；全部加完后，室温避光反应 4 小时。采用 GE 公司 HiTrap Desalting 除盐预装柱，经 Sephadex G-25 填料快速除盐后按需保存。整个荧光染料使用过程需避光。

实施例 4：抗体的特异性检测

1）分子水平特异性检测

将 FN-789，FN-7B89 和 ED-B（同实施例 1）三种蛋白作为抗原，用牛奶封闭后以 DE2 抗体为一抗，辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 抗体为二抗，TMB 为底物进行 ELISA 检测试验，实验结果显示（图 2），DE2 抗体可特异性结合 ED-B 蛋白和含有 ED-B 结构域的 FN-7B89 蛋白，但不能与不含 ED-B 的 FN-789 蛋白结合。

2）细胞水平特异性检测

构建羧基端含整合蛋白 alpha-IIb 跨膜区 W968-K989（Li, R., et al. (2004). J Biol Chem 279(25): 26666-26673）的 FN-7B89 于 pCI-neo 质粒中，瞬时转染 CHO-K1 细胞（博士德生物工程有限公司），得到跨膜表达 FN-7B89 的 CHO-K1 细胞株，命名为 CHO-7B89，其细胞膜表面 ED-B 表达阳性。构

建跨膜表达 FN-789 的 CHO-K1 细胞株，命名为 CHO-789，其显示 ED-B 阴性。

CHO-7B89 和 CHO-789 各 10mL（200×10^4/mL）600rpm 离心 5min；弃上清，37℃ PBS（Hyclone, SH30256.01B）洗涤 1 遍，100 目过滤得单细胞悬液。计数，PBS 重悬细胞，分别分为 8 组，每组 100 万细胞。如实施例 3 所述标记抗体。

样本 1：抗体为 FITC 标记的 L19-Fc，浓度为 50ng/μl 共 100μl。

样本 2：抗体为 FITC 标记的 DE2-Fc，浓度为 50ng/μl 共 100μl。

加入标记抗体，室温孵育 1 小时，800rpm 离心 5min，用 1ml 冷的 PBS 重悬细胞，800rpm 离心 5min，洗去未结合抗体，重复洗涤一次。加入抗荧光淬灭封片剂（博士德生物工程有限公司）保护细胞形态。荧光显微镜检测。

结果显示（图 3），DE2 抗体可特异性与 CHO-7B89 细胞特异性结合，但与 CHO-789 细胞的实验结果显示为阴性。现象与 L19 抗体一致。

实施例 5：抗体亲和力测定

1)用 ELISA 方法测定 ED-B 抗原抗体的绝对亲和力

亲和力测定选用 Scatchard 分析方法(Beatty et al. J Immunol Methods 1987, 173-179)，0.1μg/μl ED-B 抗原按 1：1，1：2，1：4，1：8 倍 4 个浓度梯度稀释后包被酶标板，并于 4℃过夜后用 4%脱脂奶粉封闭。加入 3 倍梯度稀释的单链抗体，抗体起始浓度 10μg/ml，室温反应 1 小时后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 抗体反应 1 小时，加入四甲基联苯胺(TMB)显色到适当深度后，用 2M H_2SO_4 终止，测定 OD450 光吸收值。

经计算，结果显示 DE2 抗体平衡解离常数 KD 为 0.37nM，CC3 抗体平衡解离常数 KD 为 1.18 nM。L19 抗体平衡解离常数 KD 为 6.00nM，即 DE2、CC3 抗体亲和力高于 L19。

2）用 Biocore3000 测定 ED-B 抗原抗体的绝对亲和力。

选用单层羧基芯片 CM5（GE, BR100012）（与蛋白的氨基偶联），包被用 pH=4 的醋酸缓冲液稀释抗原 EDB(浓度 10μg/ml)为固定相。用 1M pH=8.5 的乙醇胺-HCl 缓冲液以封闭芯片。

动力学常数测定时，选择合适的抗体浓度梯度，往下 1:2 梯度稀释，共

八个浓度作为流动相，每个浓度平行进样三次，用 BIAcore3000 检测二者动态的结合与解离的情况。

经检测，DE2 抗体的平衡解离常数 K_d 为 93.6 pM；CC3 抗体的平衡解离常数 K_d 为 325 pM。。

而已报导的 L19 抗体亲和力经 BIAcore 检测值为 k_{on} 为 1.1×10^{5}，k_{off} 为 9.6×10^{-5}，$K_d=8.7\times10^{-10}$M，即 L19 亲和力为 872.7 pM(Pini, Viti et al. J Biol Chem 1998, 21769-21776)。用本方法检测 DE2 抗体亲和力也显著高于 L19。

实施例 6：单克隆抗体的分布

（1）单克隆抗体的生物分布

BALB/c Nude 小鼠（6-8 周龄，雌性，SPF 级），将体外培养的小鼠畸胎瘤细胞 F9（得自上海复祥生物科技有限公司）于皮下注射造模，每个植瘤点给予 300 万个 F9 细胞，5 天后小鼠出现实体瘤。在造模后第 9 天通过尾静脉按 10μg/只注射抗体 DE2-Cy5.5（如实施例 3 所述标记抗体），24 小时后用小动物活体成像仪（Xenogen）成像观察。

活体成像（图 4）显示 FN(B+)高表达的 F9 细胞种植肿瘤组织有很强的近红外荧光，在膀胱位置偶见较强近红外荧光，其他部位荧光强度很弱或难以检测，表明 DE2-Cy5.5 荧光染料富集于肿瘤组织。

实验也表明 DE2 抗体在生物体内具有靶向作用，能富集于表达 ED-B 的肿瘤组织中，携带的指示物质如 Cy5.5 可用于分析肿瘤位置和大小等信息，即用于肿瘤诊断。

（2）单克隆抗体的组织分布

将 Cy5.5 标记的 DE2 抗体（如实施例 3 所述标记抗体）10μg 通过为静脉注射到小鼠体内 16 小时后，取肿瘤组织进行冰冻切片，用 DAPI 染细胞核，通过激光共聚焦显微镜分析。Cy5.5 标记的抗体主要分布在肿瘤组织血管壁上和肿瘤细胞外间质（图 5），并可见细胞质中有大量分散的 Cy5.5 荧光颗粒。非肿瘤组织中未见明显的 Cy5.5 标记抗体。

实施例 7：抗体的动物药效

DE2 抗体和白介素-2 的融合蛋白氨基酸序列见 SEQ ID NO：74，经 CHO-K1 细胞表达并纯化后，用于实验验证 DE2 抗体对提高白介素-2 对肿

瘤生长的抑制效果。

约 20 g/只的健康 Bal b/c 小鼠，于前肢腋下注射 3×10^6 个小鼠畸胎瘤细胞 F9，6 天后选择肿瘤体积为 70-100 立方毫米的小鼠用于药效研究。肿瘤体积计算方法为：肿瘤最大直径（毫米）×最小直径（毫米）×最小直径（毫米）×0.5。相对肿瘤体积计算方法为：接种后第 15 天的肿瘤体积与接种后第 6 天肿瘤体积的比值。

给药方法：实验组在肿瘤细胞接种后第 6 天和第 10 天分别按每只小鼠 30μg 抗体药物 DE2-IL2，经尾静脉注射给药。阳性对照组分别在第 6 天和第 10 天通过尾静脉注射 10μg/只人白介素-2（hIL-2）。阴性对照组注射等体积生理盐水，即 50μl/只小鼠。每组均为 7 只小鼠。

实验结果：在接种肿瘤细胞 15 天后，阴性对照组的相对肿瘤体积为 22.0±9.5，阳性对照组的相对肿瘤体积为 16.6±6.1，实验组的相对肿瘤体积为 5.7±4.0。实验组与阴性对照组、阳性对照组的相对肿瘤体积差别均有显著统计意义($p<0.01$)。而阴性对照组和阳性对照组的相对肿瘤体积之间的差异无统计意义。

实验表明 hIL-2 和 DE2-IL2 均可以抑制小鼠畸胎瘤的生长，DE2-IL2 的肿瘤抑制效果比 hIL-2 显著，能使肿瘤生长速度明显变慢。

实施例 8：高亲和力抗体的抗原线性表位分析

根据 ED-B 序列合成长度不等的多肽，多肽一般由 6-10 个氨基酸组成。将合成多肽分别用戊二醛偶联至牛血清白蛋白（BSA），形成多肽-BSA。

取 BSA 适量以 0.1mol/L pH8.5 硼酸缓冲液充分溶解，然后按比例加入一定量合成多肽，混合均匀。BSA 分子与多肽分子结合比例为 1：10。然后边震荡边缓慢加入含 0.3%戊二醛的硼酸缓冲液 1 mL，室温作用 2 小时。为中和未反应完全的戊二醛，在上述反应液中加入甘氨酸 0.25 mL，室温继续中和 30 min。以硼酸缓冲液透析 24 小时，换液 4 次。-20℃保存备用。

将不同的多肽-BSA 稀释至相同浓度，分别包被于酶标板上，以 ED-B 为阳性对照，于 37℃静置 2 小时，用 PBS(pH=7.4)洗涤 3 次后加入 5%的脱脂奶粉于 37℃封闭 1 小时。用 PBS 洗涤 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的 DE2-Fc，37℃孵育 1 小时，用 PBS 洗涤 6 次。加入辣根过氧化物酶底物四甲基联苯胺（TMB），室温避光放置约 15 min，加入 2 mol/L 的硫酸终止

反应。测定 OD450 光吸收值，并比较不同多肽样本吸光值。吸光值高提示与 DE2-Fc 抗体结合能力更强。

结果如下表所示：

多肽编号	多肽在抗原上的位置	多肽序列	SEQ ID NO:	氨基酸数量	多肽与抗体结合能力	备注
EDB111	11-19	VDITDSSIG	75	9	+	
EDB112	11-16	VDITDS	76	6	+++++	抗原表位
EDB113	12-17	DITDSS	77	6	+++	
EDB114	14-21	TDSSIGLR	78	8	++	
EDB115	16-21	SSIGLR	79	6	++	
EDB12	24-34	PLNSSTIIGYR	80	11		
EDB121	26-34	NSSTIIGYR	81	9	+++++	抗原表位
EDB122	29-34	TIIGYR	82	6	+++	
EDB123	27-34	SSTIIGYR	83	8		
EDB124	28-34	STIIGYR	84	7		
EDB125	26-33	NSSTIIGY	85	8		
EDB126	26-32	NSSTIIG	86	7		
EDB14	60-70	VTGLEPGIDYD	87	11	++	
EDB141	61-69	TGLEPGIDY	88	9	++++	抗原表位
EDB142	60-67	VTGLEPGI	89	8	++	
EDB143	64-70	EPGIDYD	90	7	+	
EDB144	62-69	GLEPGIDY	91	8		
EDB145	61-68	TGLEPGID	92	8		
EDB146	62-68	GLEPGID	93	7		

根据检测结果，绘制抗原表位示意图 6 和图 7。图 6 是 DE2 抗体与 ED-B 结合的抗原表位。合成多肽序列用水平线条表示，线条粗细表示相对亲和力高低。图 7 也是 DE2 抗体与 ED-B 结合的抗原表位，其中与 DE2 抗体结合能力最高的多肽所在区域用透视球标识。

实验结果表明 DE2 抗体可以与 ED-B 抗原的多肽片段结合，即 DE2 能识别 ED-B 的线性表位，提示 DE2 能识别并结合变性 ED-B 蛋白或片段。编号为 EDB112 的线性表位 VDITDS（SEQ ID NO：76）是 DE2 抗体识别

的重要区域之一；编号为EDB141的线性表位TGLEPGIDY（SEQ ID NO：88）是DE2抗体识别的重要区域之一；编号为EDB121的线性表位NSSTIIGYR（SEQ ID NO：81）是DE2抗体识别的重要区域之一。

如图7所示，编号为EDB112、EDB141、EDB121均处于ED-B的无规则卷曲区域。多肽EDB112、EDB141空间位置相邻，且与DE2抗体亲和力强。

权利要求

1、一种特异性结合选自 VDITDS（SEQ ID NO：76）、TGLEPGIDY（SEQ ID NO：88）和 NSSTIIGYR（SEQ ID NO：81）的肽的分离的抗体或其抗原结合片段。

2、权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段，其重链互补决定区（CDR）3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，和/或其轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列。

3、权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段，其重链 CDR1 和 CDR2 分别包含 SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：6 所示的氨基酸序列，和/或

其轻链 CDR1 包含选自 SEQ ID NO：8、95-118 和 143 所示的氨基酸序列以及轻链 CDR2 包含选自 SEQ ID NO：9、119-142 和 144 所示的氨基酸序列。

4、权利要求 1-3 任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)，

所述重链可变区包含：

VH CDR1，其包含 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列，

VH CDR2，其包含 SEQ ID NO：6 所示的氨基酸序列，和

VH CDR3，其包含 SEQ ID NO：7 所示的氨基酸序列，

所述轻链可变区包含：

VL CDR1，其包含 SEQ ID NO：8、95、97、99、100、114 或 143 所示的氨基酸序列，

VL CDR2，其包含 SEQ ID NO：9、119、121、123、124、138 或 144 所示的氨基酸序列，和

VL CDR3，其包含 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列。

5、权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其重链可变区包含 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列，和/或其轻链可变区包含 SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：145 所示的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%相同性的氨基酸序列，

任选其中所述抗体或其抗原结合片段具有的平衡结合解离常数(KD)为

1×10^{-8}M 或更低、1×10^{-9}M 或更低、或者 1×10^{-10}M 或更低。

6、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选自单链抗体、单域抗体、超变区多肽、双链抗体、三链抗体、微型抗体、合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、胞内抗体、Fab 片段、Fab'片段、$F(ab')_2$片段、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、Fd 片段、Fd'片段、单链 Fv(scFv)、单链 Fab (scFab)、双抗体，任选所述抗体是人免疫球蛋白 IgG。

7、权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其是单链 Fv(scFv)，其中 VH 包含 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列，并且 VL 包含 SEQ ID NO：3 或 145 所示的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%相同性的氨基酸序列，

任选所述 scFv 包含 SEQ ID NO：13 的第 1-241 位氨基酸、SEQ ID NO：13 的第 1-242 位氨基酸残基、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14 或 SEQ ID NO：146 所示的氨基酸序列。

8、包含权利要求 1-7 任一项的分离的抗体或其抗原结合片段的药物组合物，所述药物组合物任选进一步包含融合蛋白、放射性同位素、荧光染料、化学药物和/或纳米颗粒，任选所述药物组合物用于诊断或治疗肿瘤或癌症。

9、权利要求 1-7 任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或权利要求 8 所述的药物组合物在制备预防、诊断和治疗肿瘤或癌症相关疾病的药物中的用途，任选所述肿瘤或癌症是表达含 ED-B 结构域的 FN(B+)的肿瘤或癌症。

10、权利要求 8 所述的药物组合物或权利要求 9 所述的用途，其中所述肿瘤或癌症选自鼻咽癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、乳腺癌和软组织肉瘤。

11、包含权利要求 1-7 任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段的试剂盒，所述试剂盒可用于：(i)诊断肿瘤组织的体内分布或病理组织切片，(ii)分析鉴定细胞或蛋白质，或(iii)亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子。

12、权利要求 1-7 任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段在制备用于(i)诊断肿瘤组织的体内分布或病理组织切片，(ii)分析鉴定细胞或蛋白质，或(iii)亲和纯化含有 ED-B 蛋白结构域的细胞或蛋白质分子的试剂盒中的用途。

13、编码权利要求 1-7 任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段的核酸分子。

14、权利要求 13 的核酸分子，其包含：

（a）SEQ ID NO：2 的核苷酸序列，和/或

（b）SEQ ID NO：4 或 147 的核苷酸序列，和/或

（c）与（a）或（b）简并的核苷酸序列。

15、一种分离的肽，由选自 VDITDS（SEQ ID NO：76）、TGLEPGIDY（SEQ ID NO：88）和 NSSTIIGYR（SEQ ID NO：81）的氨基酸序列组成。

重链可变区

1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS 30 CDR 1 SYAMS 40 WVRQAPGKGLEWVS 50 CDR 2 RISPSGSSTYYADSVKG

70 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR 100 CDR 3 RMSYFDY 110 WGQGTLVTVSS

接头

1 GGGGSGGGGSGGGGS 15

轻链可变区

1 QSALTQPASVSGSPGQSITISC 20 CDR 1 SGDSLGIFRSGMVS 35 CDR 2 WYQQHPGKAPKLMIY 50 CDR 2 LPTSRPS

80 GVSNRFSGSKSGNTASITISGLQAEDEADYYC 90 CDR 3 QSWDGRQP 100 VFGGGTKLTVLG 110

图 1

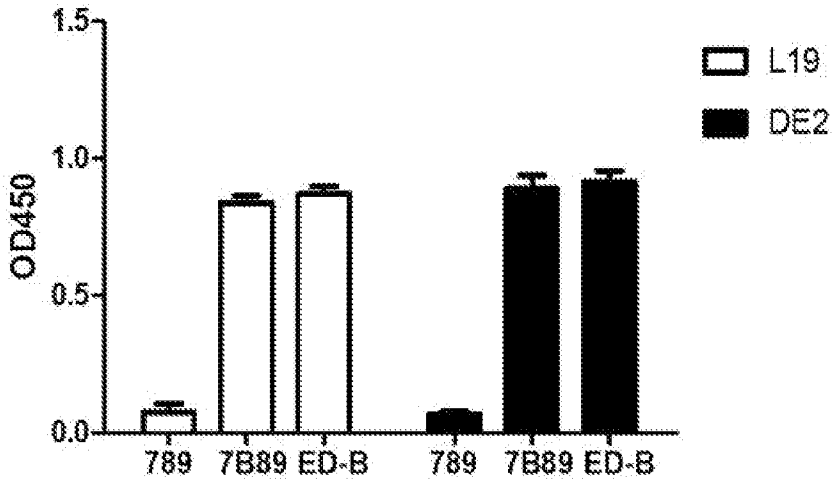


图 2

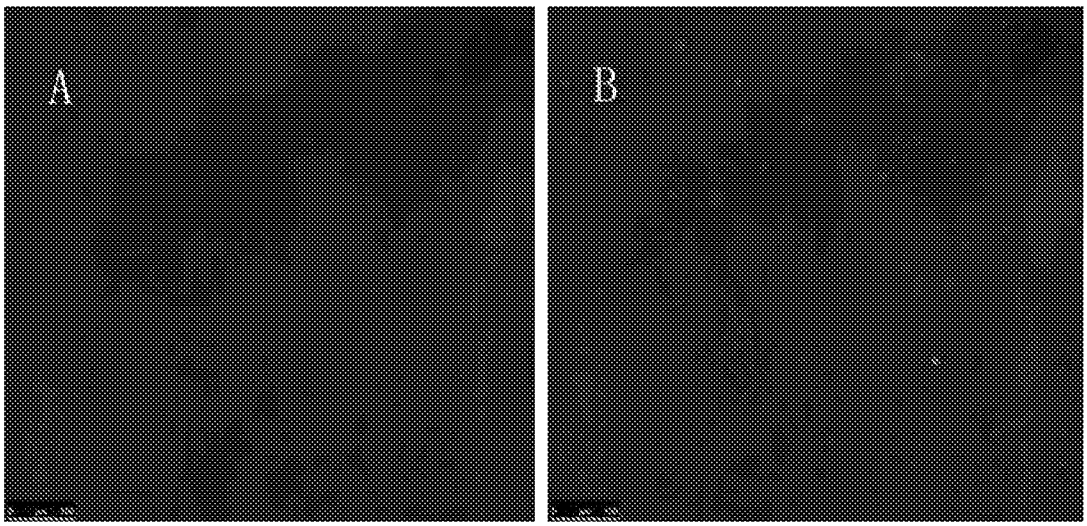


图 3



图 4

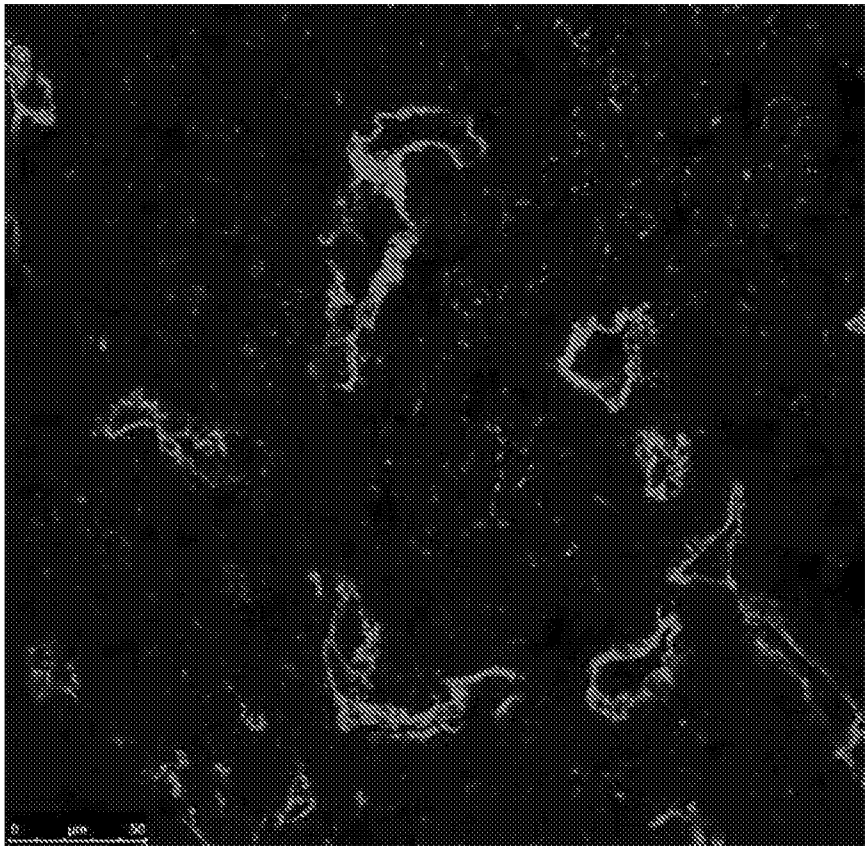


图 5

SEQ ID NO：16：

1 10 20 30
EVPQLTDLSFVDITDSSIGLRWTPLNSSTIIGYRITV
40 50 60 70
VAAGEGIPIFEDFVDSSVGYYTVTGLEPGIDYDISVI
80 90
TLINGGESAPTTLTQQT

图 6

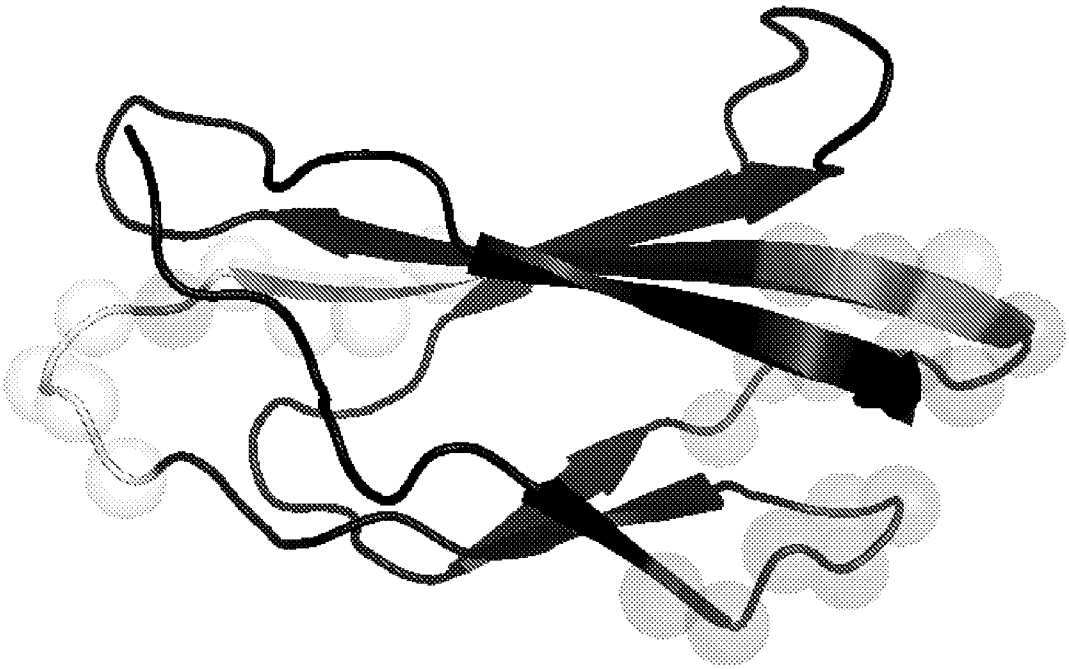


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/108532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61P; G01N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; Uniprot; EBI-EMBL; Google; 纤维连接蛋白, 纤连联蛋白, B结构域, 额外结构域, FN, Extra-domain B, ED-B, 抗体, antibody, SEQ ID NOs: 1-10, 95-145

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/176663 A1 (EIDGENOSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCULE) 18 September 2003 (2003-09-18) abstract, and embodiments 1-3 and table 2	1-15
X	WO 2007/054120 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT ET AL.) 18 May 2007 (2007-05-18) abstract, tables 3A and 3B, and claims 1-66	1-15
A	CN 104395342 B (HEFEI LIFEON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 04 July 2017 (2017-07-04) entire document	1-15
A	WO 97/45544 A1 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL ET AL.) 04 December 1997 (1997-12-04) entire document	1-15
A	CN 1219968 A (FEIROGAN CO., LTD.) 16 June 1999 (1999-06-16) entire document	1-15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 November 2018	**07 January 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing** **100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/108532

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VENTURA, E. et al. "PLOS ONE." *C6: A Monoclonal Antibody Specific for a Fibronectin Epitope Situated at the Interface between the Oncofoetal Extra-Domain B and the Repeat III8.*, Vol. 11, No. (2), 11 February 2016 (2016-02-11), pp. 1-9	1-15
A	MENRAD, A. et al. "ED-B Fibronectin as a Target for Antibody-Based Cancer Treatments." *EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS.*, Vol. 9, No. (3), 10 June 2005 (2005-06-10), pp. 491-500	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/108532

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/108532

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2003/176663	A1	18 September 2003	None			
WO	2007/054120	A1	18 May 2007	AT	463512	T	15 April 2010
				BR	PI0520677	A2	19 May 2009
				EP	1945767	B1	07 April 2010
				CA	2628552	A1	18 May 2007
				EP	1945767	A1	23 July 2008
				CN	101356271	A	28 January 2009
				DE	502005009389	D1	20 May 2010
				JP	2009514540	A	09 April 2009
CN	104395342	B	04 July 2017	EP	3029065	A1	08 June 2016
				EP	3029065	A4	01 March 2017
				CN	104395342	A	04 March 2015
				WO	2014194784	A1	11 December 2014
WO	97/45544	A1	04 December 1997	US	2014134182	A1	15 May 2014
				NO	324904	B1	27 December 2007
				KR	20050010081	A	26 January 2005
				SI	EP0906426	T1	31 October 2007
				US	9096670	B2	04 August 2015
				SK	285916	B6	02 November 2007
				CN	100447159	C	31 December 2008
				CA	2256308	C	13 March 2012
				DE	69737683	D1	14 June 2007
				KR	100741452	B1	20 July 2007
				JP	2009050261	A	12 March 2009
				JP	4750912	B2	17 August 2011
				AT	361364	T	15 May 2007
				BR	9709350	B1	14 December 2010
				CN	1219968	A	16 June 1999
				EA	199801043	A1	29 April 1999
				US	2008274099	A1	06 November 2008
				BG	65138	B1	30 March 2007
				CZ	9803815	A3	17 March 1999
				NZ	333083	A	26 May 2000
				JP	2000511416	A	05 September 2000
				EP	0906426	B1	02 May 2007
				SK	161298	A3	12 July 1999
				NO	985459	D0	23 November 1998
				IS	4883	A	29 October 1998
				TR	9802416	T2	22 February 1999
				TR	199802416	T2	22 February 1999
				AU	2910197	A	05 January 1998
				US	8703143	B2	22 April 2014
				CA	2256308	A1	04 December 1997
				IL	127216	D0	22 September 1999
				GB	9610967	D0	31 July 1996
				HU	0200546	A2	29 July 2002
				NO	985459	A	22 January 1999
				BR	9709350	A	04 January 2000
				KR	20060035812	A	26 April 2006
				ES	2286831	T3	01 December 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/108532

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		SI 0906426 T1	31 October 2007
		PT 906426 E	23 July 2007
		HK 1020990 A1	14 August 2009
		DE 69737683 T2	10 January 2008
		EA 004329 B1	29 April 2004
		PL 188557 B1	28 February 2005
		DK 0906426 T3	10 September 2007
		PL 330075 A1	26 April 1999
		EP 0906426 A1	07 April 1999
		IS 2508 B	15 April 2009
		KR 20000015964 A	25 March 2000
		BG 102950 A	31 August 1999
CN 1219968 A	16 June 1999	IS 4883 A	29 October 1998
		TR 9802416 T2	22 February 1999
		TR 199802416 T2	22 February 1999
		AU 2910197 A	05 January 1998
		US 8703143 B2	22 April 2014
		CA 2256308 A1	04 December 1997
		IL 127216 D0	22 September 1999
		GB 9610967 D0	31 July 1996
		HU 0200546 A2	29 July 2002
		NO 985459 A	22 January 1999
		BR 9709350 A	04 January 2000
		KR 20060035812 A	26 April 2006
		ES 2286831 T3	01 December 2007
		SI 0906426 T1	31 October 2007
		PT 906426 E	23 July 2007
		HK 1020990 A1	14 August 2009
		DE 69737683 T2	10 January 2008
		EA 004329 B1	29 April 2004
		PL 188557 B1	28 February 2005
		DK 0906426 T3	10 September 2007
		PL 330075 A1	26 April 1999
		EP 0906426 A1	07 April 1999
		IS 2508 B	15 April 2009
		KR 20000015964 A	25 March 2000
		BG 102950 A	31 August 1999
		US 7273924 B1	25 September 2007
		AU 729081 B2	25 January 2001
		IL 127216 A	26 November 2008
		CZ 295531 B6	17 August 2005
		US 2014134182 A1	15 May 2014
		NO 324904 B1	27 December 2007
		KR 20050010081 A	26 January 2005
		SI EP0906426 T1	31 October 2007
		US 9096670 B2	04 August 2015
		SK 285916 B6	02 November 2007
		CN 100447159 C	31 December 2008
		CA 2256308 C	13 March 2012
		DE 69737683 D1	14 June 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/108532

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		WO	9745544	A1	04 December 1997
		KR	100741452	B1	20 July 2007
		JP	2009050261	A	12 March 2009
		JP	4750912	B2	17 August 2011
		AT	361364	T	15 May 2007
		BR	9709350	B1	14 December 2010
		EA	199801043	A1	29 April 1999
		US	2008274099	A1	06 November 2008
		BG	65138	B1	30 March 2007
		CZ	9803815	A3	17 March 1999
		NZ	333083	A	26 May 2000

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2018/108532

A. 主题的分类

C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61P; G01N; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; Uniprot; EBI-EMBL; Google; 纤维连接蛋白，纤连联蛋白，B结构域，额外结构域，FN，Extra-domain B，ED-B，抗体，antibody，SEQ ID NOs：1-10,95-145

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2003/176663 A1 (EIDGENOSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCULE) 2003年 9月 18日 (2003 - 09 - 18) 摘要，实施例1-3，表2	1-15
X	WO 2007/054120 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT 等) 2007年 5月 18日 (2007 - 05 - 18) 摘要，表3A，表3B，权利要求1-66	1-15
A	CN 104395342 B (合肥立方制药股份有限公司) 2017年 7月 4日 (2017 - 07 - 04) 全文	1-15
A	WO 97/45544 A1 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL 等) 1997年 12月 4日 (1997 - 12 - 04) 全文	1-15
A	CN 1219968 A (菲罗根有限责任公司) 1999年 6月 16日 (1999 - 06 - 16) 全文	1-15

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2018年 11月 26日	2019年 1月 7日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 靳春鹏 电话号码 86-（10）-53961947

表 PCT/ISA/210 （第2页）（2015年1月）

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/108532

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	VENTURA, E.等. "PLOS ONE." C6:A Monoclonal Antibody Specific for a Fibronectin Epitope Situated at the Interface between the Oncofoetal Extra-Domain B and the Repeat III8., 第11卷，第2期，2016年 2月 11日 (2016-02-11)， 第1-9页	1-15
A	MENRAD, A. 等. "ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments." EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS., 第9卷，第3期，2005年 6月 10日 (2005-06-10)， 第491-500页	1-15

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/108532

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的:
   ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   ☐ 纸件或图形文件形式
b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的:
c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
   ☐ 附件C/ST.25文本文件形式(细则13之三.1(a))
   ☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三.1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/108532

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
US	2003/176663	A1	2003年 9月 18日	无			
WO	2007/054120	A1	2007年 5月 18日	AT	463512	T	2010年 4月 15日
				BR	PI0520677	A2	2009年 5月 19日
				EP	1945767	B1	2010年 4月 7日
				CA	2628552	A1	2007年 5月 18日
				EP	1945767	A1	2008年 7月 23日
				CN	101356271	A	2009年 1月 28日
				DE	502005009389	D1	2010年 5月 20日
				JP	2009514540	A	2009年 4月 9日
CN	104395342	B	2017年 7月 4日	EP	3029065	A1	2016年 6月 8日
				EP	3029065	A4	2017年 3月 1日
				CN	104395342	A	2015年 3月 4日
				WO	2014194784	A1	2014年 12月 11日
WO	97/45544	A1	1997年 12月 4日	US	2014134182	A1	2014年 5月 15日
				NO	324904	B1	2007年 12月 27日
				KR	20050010081	A	2005年 1月 26日
				SI	EP0906426	T1	2007年 10月 31日
				US	9096670	B2	2015年 8月 4日
				SK	285916	B6	2007年 11月 2日
				CN	100447159	C	2008年 12月 31日
				CA	2256308	C	2012年 3月 13日
				DE	69737683	D1	2007年 6月 14日
				KR	100741452	B1	2007年 7月 20日
				JP	2009050261	A	2009年 3月 12日
				JP	4750912	B2	2011年 8月 17日
				AT	361364	T	2007年 5月 15日
				BR	9709350	B1	2010年 12月 14日
				CN	1219968	A	1999年 6月 16日
				EA	199801043	A1	1999年 4月 29日
				US	2008274099	A1	2008年 11月 6日
				BG	65138	B1	2007年 3月 30日
				CZ	9803815	A3	1999年 3月 17日
				NZ	333083	A	2000年 5月 26日
				JP	2000511416	A	2000年 9月 5日
				EP	0906426	B1	2007年 5月 2日
				SK	161298	A3	1999年 7月 12日
				NO	985459	D0	1998年 11月 23日
				IS	4883	A	1998年 10月 29日
				TR	9802416	T2	1999年 2月 22日
				TR	199802416	T2	1999年 2月 22日
				AU	2910197	A	1998年 1月 5日
				US	8703143	B2	2014年 4月 22日
				CA	2256308	A1	1997年 12月 4日
				IL	127216	D0	1999年 9月 22日
				GB	9610967	D0	1996年 7月 31日
				HU	0200546	A2	2002年 7月 29日
				NO	985459	A	1999年 1月 22日
				BR	9709350	A	2000年 1月 4日
				KR	20060035812	A	2006年 4月 26日
				ES	2286831	T3	2007年 12月 1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/108532

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
				SI	0906426	T1	2007年 10月 31日
				PT	906426	E	2007年 7月 23日
				HK	1020990	A1	2009年 8月 14日
				DE	69737683	T2	2008年 1月 10日
				EA	004329	B1	2004年 4月 29日
				PL	188557	B1	2005年 2月 28日
				DK	0906426	T3	2007年 9月 10日
				PL	330075	A1	1999年 4月 26日
				EP	0906426	A1	1999年 4月 7日
				IS	2508	B	2009年 4月 15日
				KR	20000015964	A	2000年 3月 25日
				BG	102950	A	1999年 8月 31日
CN	1219968	A	1999年 6月 16日	IS	4883	A	1998年 10月 29日
				TR	9802416	T2	1999年 2月 22日
				TR	199802416	T2	1999年 2月 22日
				AU	2910197	A	1998年 1月 5日
				US	8703143	B2	2014年 4月 22日
				CA	2256308	A1	1997年 12月 4日
				IL	127216	D0	1999年 9月 22日
				GB	9610967	D0	1996年 7月 31日
				HU	0200546	A2	2002年 7月 29日
				NO	985459	A	1999年 1月 22日
				BR	9709350	A	2000年 1月 4日
				KR	20060035812	A	2006年 4月 26日
				ES	2286831	T3	2007年 12月 1日
				SI	0906426	T1	2007年 10月 31日
				PT	906426	E	2007年 7月 23日
				HK	1020990	A1	2009年 8月 14日
				DE	69737683	T2	2008年 1月 10日
				EA	004329	B1	2004年 4月 29日
				PL	188557	B1	2005年 2月 28日
				DK	0906426	T3	2007年 9月 10日
				PL	330075	A1	1999年 4月 26日
				EP	0906426	A1	1999年 4月 7日
				IS	2508	B	2009年 4月 15日
				KR	20000015964	A	2000年 3月 25日
				BG	102950	A	1999年 8月 31日
				US	7273924	B1	2007年 9月 25日
				AU	729081	B2	2001年 1月 25日
				IL	127216	A	2008年 11月 26日
				CZ	295531	B6	2005年 8月 17日
				US	2014134182	A1	2014年 5月 15日
				NO	324904	B1	2007年 12月 27日
				KR	20050010081	A	2005年 1月 26日
				SI	EP0906426	T1	2007年 10月 31日
				US	9096670	B2	2015年 8月 4日
				SK	285916	B6	2007年 11月 2日
				CN	100447159	C	2008年 12月 31日
				CA	2256308	C	2012年 3月 13日
				DE	69737683	D1	2007年 6月 14日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/108532

检索报告引用的专利文件	公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
		WO	9745544	A1	1997年 12月 4日
		KR	100741452	B1	2007年 7月 20日
		JP	2009050261	A	2009年 3月 12日
		JP	4750912	B2	2011年 8月 17日
		AT	361364	T	2007年 5月 15日
		BR	9709350	B1	2010年 12月 14日
		EA	199801043	A1	1999年 4月 29日
		US	2008274099	A1	2008年 11月 6日
		BG	65138	B1	2007年 3月 30日
		CZ	9803815	A3	1999年 3月 17日
		NZ	333083	A	2000年 5月 26日