

(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
2014 年 12 月 11 日 (11.12.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/194784 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)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/078600

(22) 国际申请日: 2014 年 5 月 28 日 (28.05.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201310221256.0 2013 年 6 月 6 日 (06.06.2013) 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: 季俊虬 (JI, Junqiu); 中国安徽省合肥长江西路 669 号立方厂区, Anhui 230088 (CN)。 张美 (ZHANG, Mei); 中国安徽省合肥望江西路 522 号研究所 2 楼, Anhui 230088 (CN)。 高美华 (GAO, Meihua); 中国安徽省合肥望江西路 522 号研究所 2 楼, Anhui 230088 (CN)。 陈军 (CHEN, Jun); 中国安徽省合肥望江西路 522 号研究所 3 楼, Anhui 230088 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权要求在先申请的优先权 (细则 4.17(iii))
- 发明人资格 (细则 4.17(iv))

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))。

(54) Title: HUMAN ANTIBODY AGAINST ED-B DOMAIN OF FIBRONECTIN AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 人源抗纤连蛋白 ED-B 结构域的抗体及其用途

(57) Abstract: The present invention provides antibody or antibody fragment specifically recognizing and binding to the ED-B domain of fibronectin. Said antibody or antibody fragment can be used for in vitro detection and in vivo localization of ED-B domain, and also can be used for tumor targeted therapy.

(57) 摘要: 本发明提供一种特异识别并结合纤连蛋白 Fibronectin 中 ED-B 结构域的抗体或抗体片段, 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。



WO 2014/194784 A1

人源抗纤连蛋白 ED-B 结构域的抗体及其用途

发明领域

本发明涉及单克隆抗体技术，噬菌体展示技术，以及基因重组技术，尤其是结合纤连蛋白（fibronectin, FN）的 ED-B 结构域的抗体或抗体片段。另外本发明还涉及该单克隆抗体的制备方法及含有该单克隆抗体的药物组合物。

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。

纤连蛋白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、蜕膜细胞及绒毛外滋养细胞等表达，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，ED-B 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 ED-B 结构域的 FN(B+) 和不含 ED-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，故又称癌胚基因。如胃癌、结直肠癌、肺癌、乳腺癌等细胞中高表达含 ED-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+) 在多种肿瘤组织血管中高表达，而在成年人的正常组织中不表达，是肿瘤组织的一种标志性蛋白。

因此，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。

说明书

针对 ED-B 的抗体筛选或药物开发已有 20 多年的历史。比如通过杂交瘤技术获得的鼠源单抗 BC-1(Carnemolla, Leprini et al. 1992), 它可以特异性的识别人新生血管的 FN(B+), 而不与 FN(B-)发生交叉反应。

另外, 通过小鼠免疫和借助噬菌体展示技术的亲和力成熟, 获得的 Fab 形式的鼠源抗体 MOR03255, 其最高亲和力达到 30 pM。MOR03255 具有中和抗体的特征, 通过与 ED-B 的结合抑制人真皮微血管内皮细胞(HDMVE)与胞外基质的黏附, 从而抑制新生血管的形成, 使肿瘤组织因缺少血管而营养匮乏, 在活体实验中体现出显著的抑制肿瘤生长的效果。

但研究证明, 鼠源抗体药物在人体内应用时会产生严重的人抗鼠抗体(HAMA)反应, 还可能产生其他副作用, 比如变态反应、血液疾病、肾脏受损, 另外抗体的半衰期短, 影响抗体的治疗效果。因此, 鼠源抗体 BC-1 及 MOR03255 具有一定的局限性。现在鼠源抗体已逐渐被人源化抗体和全人源抗体代替。

由于人与小鼠 ED-B 的氨基酸序列 100%同源, 小鼠免疫系统会将人 ED-B 当作自身蛋白, 难以对人 ED-B 结构域产生免疫反应, 因此针对 ED-B 的鼠源抗体开发往往事倍功半。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, 通过筛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 等(Carnemolla, Neri et al. 1996, Pini, Viti et al. 1998), 这些抗体均具备了高度的特异性, 并且经 BIAcore 检测, 亲和力分别达到 $5.4 \times 10^{-8} \text{M}$, $1.1 \times 10^{-9} \text{M}$, $8.7 \times 10^{-10} \text{M}$ 。尤其是抗体 L19 的临床研究, 充分证明了针对 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。

我们通过抗体的基因合成及噬菌体展示技术, 筛选到特异性的单链抗体, 可以直接识别单独的 ED-B 结构域和 FN(B+), 也可以识别其他蛋白与 ED-B 结构域的融合形式, 如 GST-ED-B 等。筛选到的抗体亲和力不需进行亲和力成熟, 即优于已公开的其他抗 ED-B 的人源单链抗体。另外经过 BIAcore 检测, 所得抗体与抗原结合后几乎不解离。这些特征显示所得抗体可以与 ED-B 结合, 并且极高的亲和力使抗体在与抗原结合后难以解离, 使抗体可以靶向至组织中表达 FN(B+)部位并高度富集, 而难以再次解离扩散至正常组织中。

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

说明书

融合、与化学药物偶联等，借助所得抗体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。由于全人源抗体是人的同源蛋白，在人体内免疫原性低，一般不易产生 HAMA 反应，因此毒副反应较鼠源抗体低。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；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。

发明内容

发明人经过大量创造性劳动，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 (简称为 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。

因此，本发明提供了一种特异性识别并结合人纤连蛋白 Fibronectin(FN)中 ED-B 结构域的抗体或抗体片段。

在一个特定的实施方式里，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 HTAPLFDY。

在另一个特定的实施方式里，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 QQGRHTP。

在另一个特定的实施方式里，所述的抗体或抗体片段含有具有氨基酸序列 HTAPLFDY 的重链可变区 CDR3 和具有氨基酸序列 HTAPLFDY 的轻链可变区 CDR3。

在另一个特定的实施方式里，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:8)，RISPSGSSTYYADSVKG (SEQ ID NO:9)，HTAPLFDY (SEQ ID NO:10)。

在另一个特定的实施方式里，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 RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:11)，

说明书

KASNLAT (SEQ ID NO:12), QQGRHTP (SEQ ID NO:13)。

在另一个特定的实施方式里,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, RISPSGSSTYYADSVKG, HTAPLFDY, 所述 3 个轻链可变区 CDR 的氨基酸序列分别为 RASQSVSSSYLA, KASNLAT, QQGRHTP。

在另一个特定的实施方式里,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式里,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 所示的氨基酸序列。

在另一个特定的实施方式里,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 所示的氨基酸序列。

在另一个特定的实施方式里,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 $1 \times 10^{-8}M$ 或更低、 $1 \times 10^{-9}M$ 或更低、或者 $1 \times 10^{-10}M$ 或更低。

在另一个特定的实施方式里,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式里,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式里,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式里,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式里,所述抗体是人免疫球蛋白 IgG。

另一方面,本发明提供了包含前述抗体或抗体片段的药物组合物。

在一个实施方式里,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、化学药物、纳米颗粒等。在一个特定的实施方式里,所述药物组合物用

说明书

于肿瘤相关疾病的诊断或治疗。

另一方面，本发明提供了前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，本发明提供了前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，所述癌症相关疾病是表达含 ED-B 结构域的 FN(B+) 的癌症。所述癌症可以是鼻咽癌、喉癌、食管癌、贲门癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、黑色素瘤、纤维肉瘤或乳腺癌；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。

另一方面，本发明提供了包含前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前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前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。

另一方面，本发明提供了编码前述抗体或抗体片段的多核苷酸分子。

在一个特定的实施方式里，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。

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 B5) 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 B5 抗体可以是 B5 单链抗体(single-chain antibody fragment, 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 IDNO: 1 所示的氨基酸序列；轻链可变区含有 SEQ IDNO: 3 所示的氨基酸序列。优选地，连接片段含有 SEQ IDNO: 5 所示的氨基酸序列。在一个特定的实施方式里，所述 B5 抗体具有 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

说明书

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 IDNO: 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 IDNO: 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:6 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。

进一步地，本发明还提供了一种治疗肿瘤的药物融合蛋白。这种药物融合蛋白的一个优选方式是 B5-IL2，该药物融合蛋白含有上述单克隆抗体 B5 和具有细胞毒性的人白介素 2(简称 IL2)。其中，单链抗体 B5 和人 IL2 蛋白之间通过连接子片段连接。优选地，连接子片段含有 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。优选地，所述的人 IL2 为人 IL2 的重组蛋白，其是 IL2 去除信号肽后的成熟 IL2。在一个特定的实施方式里，所述融合蛋白具有 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

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。

本文所使用的术语“抗体”、“单链抗体”、“抗体片段”或“免疫球蛋白”是指由抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)组成，重链和轻链之间可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成的单体或多聚体。各可变区可与恒定区连接，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 。

说明书

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，如与其他抗体融合形成双特异性抗体或多特异性抗体，与细胞毒素融合形成免疫毒素。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“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，磷 32 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。

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物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 IDNO:

说明书

1 所示的重链氨基酸序列和 SEQ IDNO: 3 所示的轻链氨基酸序列。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。在一个实施例中,采用的 DNA 含有 SEQ IDNO: 2 所示的核苷酸序列可以编码抗体的重链可变区氨基酸序列,采用的 DNA 含有 SEQ IDNO: 4 所示的核苷酸序列可以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。

将本发明提供的单链抗体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

说明书

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, Beatty et al. 1987)来测定。

本发明的抗体可与多种蛋白融合,或与化学药物、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。

以上对本发明做了具体的描述,但是对于本领域技术人员来说有一点是明显的,即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做各种变化和改动,因此所附权利要求覆盖了所有在本发明范围内的变动。

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。

附图说明

图 1 B5 抗体氨基酸序列。

图 2 采用 ELISA 实验验证抗体对抗原 ED-B 结构域的特异性识别能力。

说明书

图3 细胞免疫荧光实验验证 B5 抗体对 FN(B+)细胞的特异性识别能力,其中, A 为阴性对照, 不加一抗, 二抗为 FITC 标记的兔抗人 IgG 抗体; B 为 B5 抗体与 FN(B+)细胞特异结合, 一抗为 B5 抗体, 二抗为 FITC 标记的兔抗人 IgG 抗体。

图4 Cy5.5 NHS ester 标记的 B5 抗体通过 Balb/c nu 裸鼠尾静脉注射给药 24 小时后的分布情况。

图5 B5 抗体的热稳定性试验。

实施例

实施例1 筛选对人 FN 中 ED-B 结构域特异的人源单链抗体

1) 抗原表达

通过 HEK293 细胞的 cDNA 克隆 FN(B+)、ED-B、FN(789)和 FN(7B89), 并在羧基端融合 6 个组氨酸标签, 经大肠杆菌表达蛋白, 所得重组蛋白用镍柱进行亲和层析柱纯化。FN(7B89)中字母“B”指该表达蛋白含有 ED-B 结构域, “7、8、9”指 FN 中与 EDB 相邻的 3 个结构域, FN(789)则不含 ED-B 结构域。

2) 抗体库的构建

设计全人合成抗体库用于筛选针对 ED-B 抗原的单链抗体。以在人类抗体分子中最为常见的 DP47 为重链模板, 以 DPK22 为轻链模板, 用较常用的(G₄S)₃ 肽链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 区根据经验添加形成。抗体库 DNA 模板通过化学合成获得, 合成时 5' 端依次引入 Nco I 和 EcoR I 限制性内切酶酶切位点, 3' 端引入 Not I 位点, 并通过 Nco I 位点和 Not I 位点克隆至 pCANTAB5E 载体中用于构建产生随机抗体库和噬菌体展示, 其中 EcoR I 位点是方便后续的分子克隆。随机抗体库通过在轻链和重链的 CDR3 区两端添加限制性酶切位点, 并借助限制性酶切位点插入 DNA 随机片段实现 CDR3 区的随机化(Marks, Hoogenboom et al. 1991, Hoogenboom and Winter 1992, Nissim, Hoogenboom et al. 1994, Pini, Viti et al. 1998, Silacci, Brack et al. 2005)。

3) 筛选

将抗体库大肠杆菌 TG1 菌液 50 ul 加入到 50ml 新鲜的 2×YT 培养基中于 37℃ 震荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.4-0.5, 加入辅助噬菌体于 37℃ 侵染 30min, PEG 沉淀

说明书

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 0.1% 的 PBST 洗涤 20 次，加入 4ml 对数期的 TG1 细菌，37℃ 静置孵育 1 hr。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 载体中，抗体 DNA 序列与 IgG1Fc 的 DNA 序列在同一个开放阅读框内，使二者能表达出的融合蛋白，其中 IgG1Fc 可用于单链抗体的纯化及提高抗体蛋白的稳定性。

5) 蛋白表达

将获得的含抗体融合蛋白的质粒大量提取后，利用 Invitrogen 的脂质体试剂 Lipofectamine® 2000 将质粒 DNA 转染至 CHO-K1 细胞，借助 pCI-neo 质粒载体的 neo 基因 在含 G418 的选择性培养基中进行连续 4-8 周的选择培养后，经有限稀释法进行克隆化培养，将获得的单克隆细胞继续克隆化培养以获得稳定株。

获得的细胞株经 Hyclone SFM4CHO-Utility 驯化后悬浮表达，经 ELISA 和 SDS-PAGE 实验验证，获得了目标抗体蛋白，抗体蛋白产量约为 100 mg/L。

6) 单克隆抗体的纯化

用 Qiagen 的镍柱亲和层析纯化带 6×His 抗体，Genscript Protein A 亲和柱纯化带 IgG1 恒定区 Fc 的抗体，相应流程按说明书进行。

以此方法，得到了本发明的 B5 抗体，其序列见图 1。

实施例 2 抗体特异性检测

说明书

1) 分子水平特异性检测

构建纤维粘连蛋白 FN 的截短型质粒载体, 分别可表达含结构域 FN(789), FN(7B89), 和独立的 ED-B 结构域蛋白, 并带有 6×His 标签, 经大肠杆菌表达后用 Ni 柱纯化。将三种蛋白作为抗原, 用牛奶封闭后以 B5 抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 抗体为二抗进行 ELISA 检测试验, 实验结果如图 2 所示。结果表明, 抗体 B5 与 L19 均显示对抗原 ED-B 结构域具有特异性识别能力。FN(789)结构域显色数值与不包被抗原的空白对照基本一致, 而与独立的 ED-B 结构域和含 ED-B 结构域的 FN(7B89)均结合。

2) 细胞水平特异性检测

用玻璃底的激光共聚焦细胞培养皿, 加入高表达 FN(B+)的人直肠腺癌 Caco-2 细胞培养至 30%汇合度, 去除培养基并用 PBS 洗涤后加入 B5 抗体和阳性对照, 以 PBS 为阴性对照, 37℃孵育 2 hr, PBS 洗涤 3 次后加入 FITC 标记的兔抗人 IgG 的二抗孵育 1 hr 后用 PBS 洗涤 3 次, 并加入 DAPI 复染。置于激光共聚焦下观察, 阴性对照背景无绿色荧光, B5 及阳性对照组细胞膜均有绿色荧光 (见图 3), 显示 B5 抗体可特异性靶向表达 ED-B 的 Caco-2 细胞。

3) 动物组织分布特异性研究

小鼠移植瘤模型建立: 健康 Bal b/cnu 裸鼠在 SPF 级屏障系统中饲养至 20 g/只, 在小鼠背部皮下植入人咽鳞癌细胞 FaDu 的移植瘤组织块约 1mm³, 继续饲养。

抗体药物的荧光标记: 在 B5 抗体上标记 Cy5.5 NHS ester 荧光染料, 抗体蛋白与荧光染料分子的标记比为 1: 1。

给药方法: 待肿瘤生长至直径达到约 5mm 时, 按 5mg/kg 体重给入 Cy5.5 标记的抗体, 用 Xenogen 小动物活体成像系统观察抗体在体内的分布情况, 给药后每天观察一次。

实验结果如图 4 所示。抗体药物在给药后 24 小时即大量富集在肿瘤组织中, 其他组织未检测到 Cy5.5 荧光染料分布, 且给药后肿瘤组织中的荧光能维持 7 天以上。

实施例 3 抗体亲和力测定。

说明书

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, Beatty et al. 1987), 0.1 ug/ul ED-B 抗原按 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 10ug/ml, 室温反应 1h 后加入辣根过氧化物没标记的兔抗人 IgG 抗体反应 1hr, 加入四甲基联苯胺(TMB)显色到适当深度后, 用 2M H₂SO₄ 终止, 测定 OD450 光吸收值

经计算, 结果显示 B5 抗体平衡解离常数 KD 为 1.8 nM。L19 抗体平衡解离常数 KD 为 6.0 nM, 即 B5 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 (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 10 ug/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, B5 抗体可特异的结合于 ED-B 抗原上, 但结合后 B5 与芯片表面的 EDB 几乎不解离, 超过仪器的检测限, 提示二者可以稳定结合。而 L19 抗体经 BIAcore3000 测得的平衡解离常数为 0.4nM。

实施例 4 抗体在血浆中的稳定性试验

将 B5 用 Bal b/c 小鼠血浆分别稀释至 1ng/ul 和 0.1ng/ul, 并分装到 EP 管中, 每管 100ul, 于 37℃水浴 0、4、8、24hr, 同时取出做 ELISA 检测。

ELISA 检测流程为: FN(7B89)融合蛋白包被酶标板于 4℃过夜, 以 B5-IgG1Fc 为一抗, 室温反应 2 hr, 以辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 作二抗, 四甲基联苯胺 (TMB) 为底物室温显色后用酶标仪 450nm 波长检测。结果显示两种浓度的抗体在小鼠血浆中孵育不同时间后, 其免疫活性变化无统计意义。

以 0.1 ug/ml B5 抗体在血浆中孵育 0 h 为标准, 抗体在不同浓度、不同孵育条件下的活性相对于标准活性的变化情况。可见抗体用血浆稀释至 1 ug/ml 或 0.1

说明书

ug/ml 后, 经 37°C 孵育 4, 8, 24 h 后, 活性与 0 h 比较没有明显降低(见图 5), B5 抗体在 Bal b/c 小鼠血浆中可维持稳定。

实施例 5 单克隆抗体生理活性研究

小鼠移植瘤模型建立: 健康 Bal b/c 小鼠饲养至 20 g/只, 按每只 3×10^6 注射小鼠畸胎瘤细胞 F9 于前肢腋下皮下造模。

给药方法: 待实体肿瘤明显可识别时, 按每只小鼠 30 ug 抗体药物 B5-IL2 经尾静脉注射给药, 3 天后重复给药 1 次。阳性对照为 B5m-IL2, B5m 为 B5 重链 CDR3 区经丙氨酸突变后形成的与 ED-B 无特异性结合的突变抗体。突变方法是将 B5 重链 CDR3 区的氨基酸 HTAPLFDY 突变为丙氨酸 AAAAAAAAAA (SEQ ID NO:14), 其他序列不变, 产生的 B5 抗体突变体命名为 B5m。

肿瘤生长率测定: 每天测量肿瘤大小, 至小鼠肿瘤增大至 1000 mm^3 或达到 14 天后处死。肿瘤体积计算方法: 用游标卡尺测量肿瘤的最大直径 (Length) 和最小直径 (Width), 肿瘤体积 = $\text{width}^2 * \text{length} * 0.5$ 。

实验结果见表 1, 阳性对照组与阴性对照组肿瘤大小无显著差异, 实验组肿瘤平均体积大约为阴性对照组的三倍, 实验组与两组对照的肿瘤体积差别均有统计意义 ($p < 0.05$)。

表 1 Bal b/c 小鼠尾静脉注射 B5-IL2 的治疗效果 ($\bar{x} \pm s, n=6, *p < 0.05$)

组别	肿瘤体积(mm^3)	与对照相比肿瘤体积减小倍数
阴性对照组	0.53 ± 0.13	---
阳性对照组	0.51 ± 0.13	---
实验组	$0.17 \pm 0.07^*$	3 倍

权 利 要 求 书

- 1、一种特异性识别并结合人纤连蛋白 Fibronectin(FN)中 ED-B 结构域的抗体或抗体片段。
- 2、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，其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 HTAPLFDY。
- 3、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，其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 QQGRHTP。
- 4、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，其含有具有氨基酸序列 HTAPLFDY 的重链可变区 CDR3 和具有氨基酸序列 QQGRHTP 的轻链可变区 CDR3。
- 5、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，其含有 3 个重链可变区 CDR，所述 CDR 的氨基酸序列分别为 SYAMS，RISPSGSSTYYADSVKG，HTAPLFDY。
- 6、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，其含有 3 个轻链可变区 CDR，所述 CDR 的氨基酸序列分别为 RASQSVSSSYLA，KASNLAT，QQGRHTP。
- 7、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，其含有 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，RISPSGSSTYYADSVKG，HTAPLFDY，所述 3 个轻链可变区 CDR 的氨基酸序列分别为 RASQSVSSSYLA，KASNLAT，QQGRHTP。
- 8、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，该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 IDNO: 1 所示的氨基酸序列。
- 9、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，该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 所示的氨基酸序列。
- 10、根据权利要求 1 所述的抗体或抗体片段，该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 IDNO: 1 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区含有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
- 11、根据权利要求 1-10 任意一项所述的抗体或抗体片段，该抗体或抗体片段是单克隆抗体，平衡结合解离常数(KD)为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低、或者 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更低。
- 12、根据权利要求 1-10 任意一项所述的抗体或抗体片段，该抗体或抗体片段是单体或多聚体。
- 13、根据权利要求 1-12 任意一项所述的抗体或抗体片段，该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。
- 14、根据权利要求 1-12 任意一项所述的抗体或抗体片段，该抗体或抗体片段直接与 ED-B 蛋白结构域结合。

- 15、根据权利要求 14 所述的抗体或抗体片段，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。
- 16、根据权利要求 14 所述的抗体或抗体片段，其中 ED-B 蛋白结构域可以来自人、小鼠、大鼠、鸡或其他物种。
- 17、根据权利要求 14 所述的抗体或抗体片段，其中 ED-B 蛋白结构域可以是糖基化蛋白或非糖基化蛋白。
- 18、根据权利要求 1-12 任意一项所述的抗体或抗体片段，其中所述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。
- 19、根据权利要求 1-12 任意一项所述的抗体或抗体片段，其中所述抗体是人免疫球蛋白 IgG。
- 20、包含权利要求 1-19 任意一项的抗体或抗体片段的药物组合物。
- 21、根据权利要求 20 所述药物组合物，其进一步包含但不限于融合蛋白、放射性同位素、化学药物、纳米颗粒等。
- 22、根据权利要求 20 或 21 的药物组合物，其用于肿瘤相关疾病的诊断或治疗。
- 23、权利要求 1-19 任意一项所述抗体或抗体片段或权利要求 20-22 任意一项所述药物组合物在预防、诊断和治疗癌症相关疾病中的用途。
- 24、权利要求 1-19 任意一项所述抗体或抗体片段或权利要求 20-22 任意一项所述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。
- 25、权利要求 23 或 24 所述的用途，其中所述癌症相关疾病是表达含 ED-B 结构域的 FN(B+) 的癌症。
- 26、权利要求 25 所述的用途，其中所述癌症相关疾病是胃癌、结直肠癌、肺癌或乳腺癌。
- 27、包含权利要求 1-19 任意一项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。
- 28、权利要求 27 所述的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。
- 29、权利要求 27 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。

30、编码权利要求 1-10 任意一项所述抗体或抗体片段的多核苷酸分子。

31、权利要求 30 所述的多核苷酸分子，其特征在于含有如 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。

Heavy-chain variable region

	CDR 1		CDR 2
1			
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	30	40	50
CAASGFTFS		WVROAPGKGLEWVS	RISPSGSSTYYADSVKG
70			
RFTISRDNSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR	90	110	
		HTAPLFDY	WGQGT
			TLTVSS

Linker

1	
GGGGSGGGGGGGSS	

Light-chain variable region

	CDR 1		CDR 2
1			
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	20	40	50
		WYQQKPGQAPRLLIY	KASNLAT
60			
GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYC	80	100	
		FGQGTKVEIK	

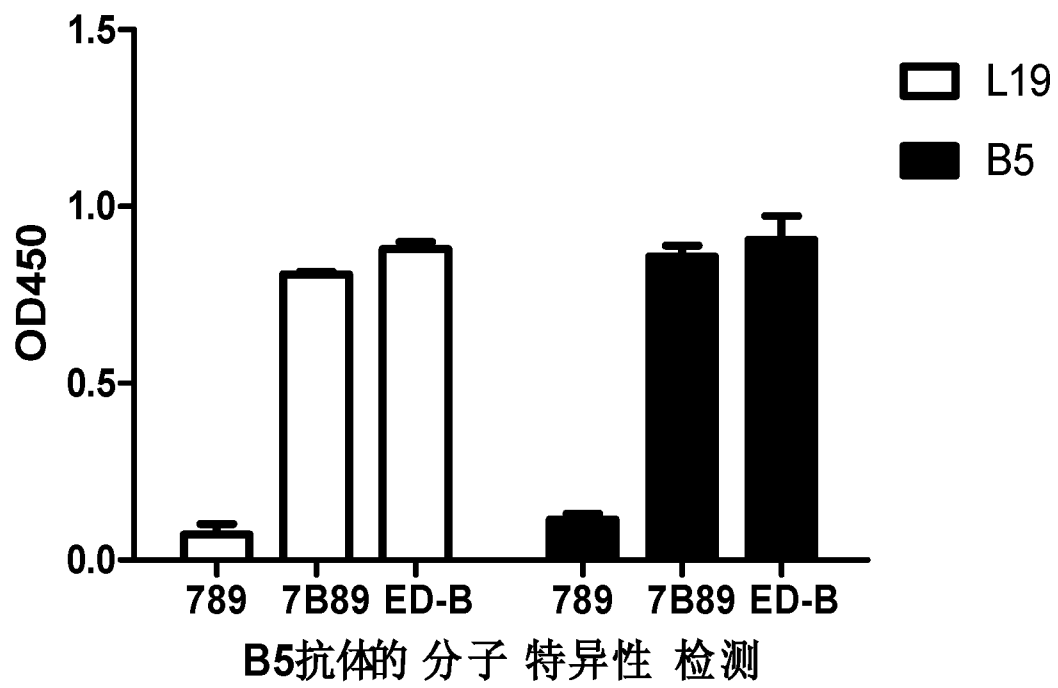


图 2

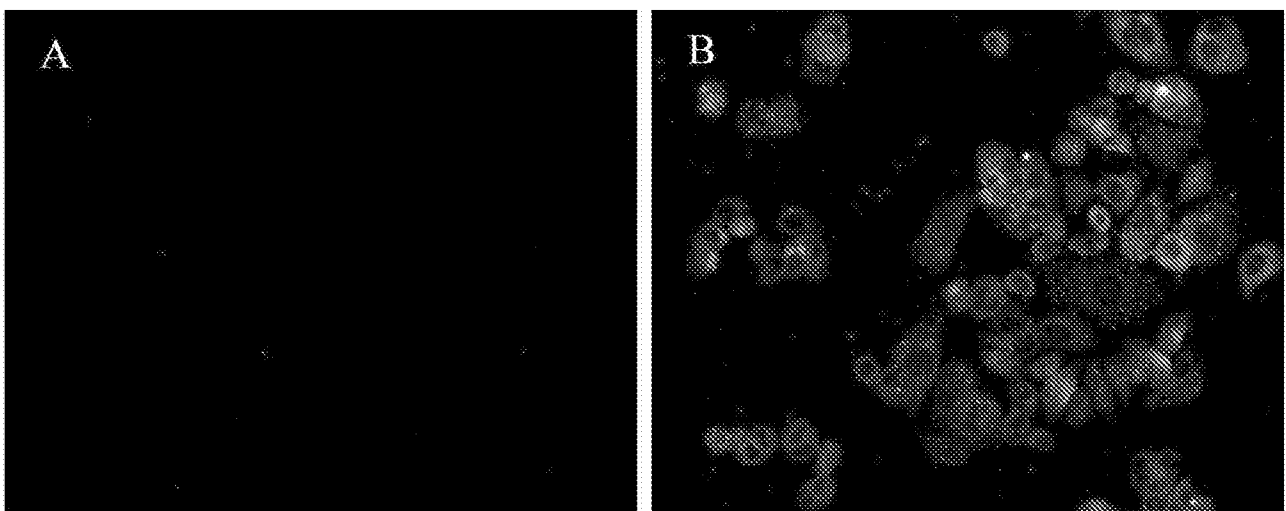


图 3

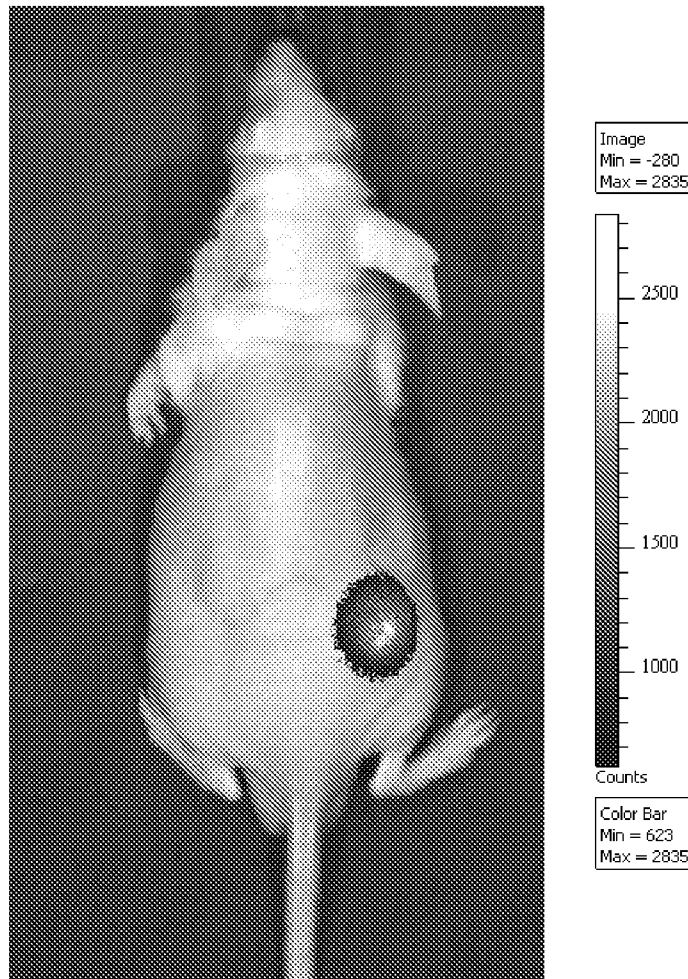


图 4

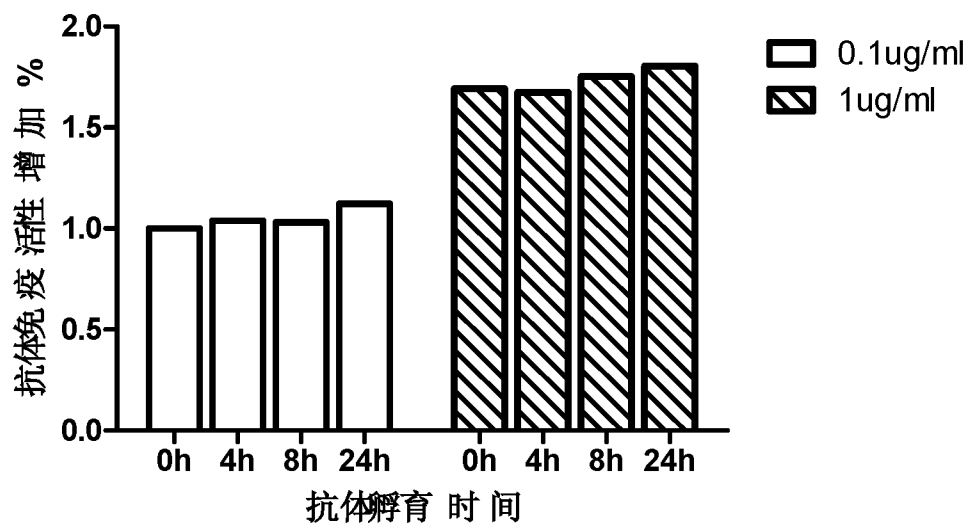


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/078600

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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)

CPRS; CNKI; CNTXT and Keywords: fibronectin, domain B, extra-domain B, antibody, monoclonal antibody, etc.

WPI; EPODOC; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT and Keywords: fibronectin, FN, extra-domain B, ED-B, antibody, etc.

National Bio-sequence Retrieval System of Chinese Patent; Genbank; EMBL and retrieved sequences: SEQ ID NOs: 1-15

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9745544 A1 (MEDICAL RES COUNCIL et al.), 04 December 1997 (04.12.1997), see claims 1-29, embodiments 1-6, table 1, and figure 1	1, 11-22, 24-27, 29-30
A	WO 9745544 A1 (MEDICAL RES COUNCIL et al.), 04 December 1997 (04.12.1997), see the whole document	2-10, 31
X	WO 9958570 A2 (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE), 18 November 1999 (18.11.1999), see claims 1-27, embodiments 1-6, tables 1 and 2, and figure 6	1, 11-22, 24-27, 29-30
A	WO 9958570 A2 (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE), 18 November 1999 (18.11.1999), see the whole document	2-10, 31
X	US 2009162372 A1 (MEDAREX INC.), 25 June 2009 (25.06.2009), see claims 1-6, embodiments 1-3, and figure 1, SEQ ID NOs: 1-23	1, 12-22, 24-27, 29-30

☒ 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
24 July 2014 (24.07.2014)

Date of mailing of the international search report
13 August 2014 (13.08.2014)

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

Authorized officer

MA, Zhenlian

Telephone No.: (86-10) **62412131**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/078600**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009162372 A1 (MEDAREX INC.), 25 June 2009 (25.06.2009), see the whole document	2-11, 31
X	PINI, A. et al., "Design and Use of a Phage Display Library: Human Antibodies with Subnanomolar Affinity Against a Marker of Angiogenesis Eluted From a Two-Dimensional Gel", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, no. 34, vol. 273, 21 August 1998 (21.08.1998), ISSN: pages 21769-21776, see abstract, page 21770, left-hand column to page 21775, right-hand column, and table II	1, 11-22, 24-27, 29-30
A	PINI, A. et al., "Design and Use of a Phage Display Library: Human Antibodies with Subnanomolar Affinity Against a Marker of Angiogenesis Eluted From a Two-Dimensional Gel", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, no. 34, vol. 273, 21 August 1998 (21.08.1998), ISSN: pages 21769-21776, see the whole document	2-10, 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/078600

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23 and 28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1 (iv)--methods for diagnosing and treating diseases.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/078600

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 9745544 A1	04 December 1997	US 8703143 B2	22 April 2014
		IL 127216 D0	22 September 1999
		CA 2256308 A1	04 December 1997
		TR 9802416 T2	22 February 1999
		AU 2910197 A	05 January 1998
		IS 4883 A	29 October 1998
		HU 0200546 A2	29 July 2002
		GB 9610967 D0	31 July 1996
		BR 9709350 A	04 January 2000
		NO 985459 A	22 January 1999
		ES 2286831 T3	01 December 2007
		KR 20060035812 A	26 April 2006
		PT 906426 E	23 July 2007
		DE 69737683 T2	10 January 2008
		HK 1020990 A1	14 August 2009
		SI 0906426 T1	31 October 2007
		EA 004329 B1	29 April 2004
		DK 0906426 T3	10 September 2007
		PL 188557 B1	28 February 2005
		EP 0906426 A1	07 April 1999
		PL 330075 A1	26 April 1999
		US 7273924 B1	25 September 2007
		KR 20000015964 A	25 March 2000
		IS 2508 B	15 April 2009
		BG 102950 A	31 August 1999
		AU 729081 B2	25 January 2001
		IL 127216 A	26 November 2008
		CZ 295531 B6	17 August 2005
		NO 324904 B1	27 December 2007
		US 2014134182 A1	15 May 2014
		SK 285916 B6	02 November 2007
		KR 20050010081 A	26 January 2005
		CA 2256308 C	13 March 2012
		CN 100447159 C	31 December 2008
		DE 69737683 D1	14 June 2007
		KR 100741452 B1	20 July 2007
		JP 2009050261 A	12 March 2009
		BR 9709350 B1	14 December 2010
		CN 1219968 A	16 June 1999
		AT 361364 T	15 May 2007
		JP 4750912 B2	17 August 2011
		SK 161298 A3	12 July 1999
		CZ 9803815 A3	17 March 1999
		BG 65138 B1	30 March 2007
		NO 985459 D0	23 November 1998
		EP 0906426 B1	02 May 2007
		JP 2000511416 A	05 September 2000
		NZ 333083 A	26 May 2000
		US 2008274099 A1	06 November 2008
WO 9958570 A2	18 November 1999	CN 1303393 A	11 July 2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/078600

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2009162372 A1	25 June 2009	SK 286822 B6	05 June 2009
		EE 05435 B1	15 June 2011
		NZ 508600 A	28 March 2003
		AU 4039899 A	29 November 1999
		DK 1084145 T3	19 December 2005
		WO 9958570 A3	16 March 2000
		NO 20005694 D0	10 November 2000
		EE 200000802 A	17 June 2002
		BR 9910394 B1	02 July 2013
		US 2007189963 A1	16 August 2007
		IS 5708 A	10 November 2000
		AT 301676 T	15 August 2005
		HU 0102992 A3	29 September 2003
		DE 69926630 T2	24 May 2006
		TR 200003317 T2	23 July 2001
		ES 2247802 T3	01 March 2006
		BG 105030 A	28 September 2001
		CN 1250571 C	12 April 2006
		SK 16792000 A3	10 May 2001
		EA 005685 B1	28 April 2005
		IL 139452 D0	25 November 2001
		PL 345845 A1	14 January 2002
		EP 1084145 A2	21 March 2001
		HU 0102992 A2	28 November 2001
		BR 9910394 A	09 January 2001
		AU 759207 B2	10 April 2003
		NO 327732 B1	14 September 2009
		CZ 20004216 A3	16 May 2001
		JP 2002514405 A	21 May 2002
		CA 2333833 A1	18 November 1999
		PL 199353 B1	30 September 2008
		CZ 300495 B6	03 June 2009
		DE 69926630 D1	15 September 2005
		HU 225675 B1	28 June 2007
		CA 2333833 C	25 January 2011
		TW I259837 B	11 August 2006
		NO 20005694 A	10 January 2001
		IS 2522 B	15 July 2009
		EP 1084145 B1	10 August 2005
		None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/078600

A. 主题的分类

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

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))

CPRS; CNKI; CNTXT和关键词: 纤连蛋白, 纤粘连蛋白, 纤粘蛋白, 纤维粘连蛋白, 纤维连接蛋白, 结构域B, 额外域B, 抗体, 单抗等; WPI; EPODOC; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT和关键词: fibronectin, FN, extra-domain B, ED-B, antibody等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-15。

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	WO 9745544 A1 (MEDICAL RES COUNCIL等) 1997年 12月 04日 (1997 - 12 - 04) 参见权利要求1-29, 实施例1-6, 表1, 图1	1、11-22、 24-27、29-30
A	WO 9745544 A1 (MEDICAL RES COUNCIL等) 1997年 12月 04日 (1997 - 12 - 04) 参见全文	2-10、31
X	WO 9958570 A2 (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE) 1999年 11月 18日 (1999 - 11 - 18) 参见权利要求1-27, 实施例1-6, 表1, 表2, 图6	1、11-22、 24-27、29-30
A	WO 9958570 A2 (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE) 1999年 11月 18日 (1999 - 11 - 18) 参见全文	2-10、31
X	US 2009162372 A1 (MEDAREX INC) 2009年 6月 25日 (2009 - 06 - 25) 参见权利要求1-6, 实施例1-3, 图1, SEQ ID NOs:1-23	1、12-22、 24-27、29-30

☒ 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

2014年 7月 24日

国际检索报告邮寄日期

2014年 8月 13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)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

马振莲

电话号码 (86-10)62412131

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	US 2009162372 A1 (MEDAREX INC) 2009年 6月 25日 (2009 - 06 - 25) 参见全文	2-11、31
X	PINI A. et al. "Design and Use of a Phage Display Library: HUMAN ANTIBODIES WITH SUBNANOMOLAR AFFINITY AGAINST A MARKER OF ANGIOGENESIS ELUTED FROM A TWO-DIMENSIONAL GEL." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第34期卷, 第273卷期, 1998年 8月 21日 (1998 - 08 - 21), ISSN: 第21769-21776页, 参见摘要, 第21770页左栏-21775页右栏, TABLE II, TABLE II	1、11-22、 24-27、29-30
A	PINI A. et al. "Design and Use of a Phage Display Library: HUMAN ANTIBODIES WITH SUBNANOMOLAR AFFINITY AGAINST A MARKER OF ANGIOGENESIS ELUTED FROM A TWO-DIMENSIONAL GEL." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第34期卷, 第273卷期, 1998年 8月 21日 (1998 - 08 - 21), ISSN: 第21769-21776页, 参见全文	2-10、31

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 23、28
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1 (iv)一疾病的诊断和治疗方法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/078600

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 04日	US	8703143	B2	2014年 4月 22日
				IL	127216	D0	1999年 9月 22日
				CA	2256308	A1	1997年 12月 04日
				TR	9802416	T2	1999年 2月 22日
				AU	2910197	A	1998年 1月 05日
				IS	4883	A	1998年 10月 29日
				HU	0200546	A2	2002年 7月 29日
				GB	9610967	D0	1996年 7月 31日
				BR	9709350	A	2000年 1月 04日
				NO	985459	A	1999年 1月 22日
				ES	2286831	T3	2007年 12月 01日
				KR	20060035812	A	2006年 4月 26日
				PT	906426	E	2007年 7月 23日
				DE	69737683	T2	2008年 1月 10日
				HK	1020990	A1	2009年 8月 14日
				SI	0906426	T1	2007年 10月 31日
				EA	004329	B1	2004年 4月 29日
				DK	0906426	T3	2007年 9月 10日
				PL	188557	B1	2005年 2月 28日
				EP	0906426	A1	1999年 4月 07日
				PL	330075	A1	1999年 4月 26日
				US	7273924	B1	2007年 9月 25日
				KR	20000015964	A	2000年 3月 25日
				IS	2508	B	2009年 4月 15日
				BG	102950	A	1999年 8月 31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
				NO	324904	B1	2007年 12月 27日
				US	2014134182	A1	2014年 5月 15日
				SK	285916	B6	2007年 11月 02日
				KR	20050010081	A	2005年 1月 26日
				CA	2256308	C	2012年 3月 13日
				CN	100447159	C	2008年 12月 31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
				BR	9709350	B1	2010年 12月 14日
				CN	1219968	A	1999年 6月 16日
				AT	361364	T	2007年 5月 15日
				JP	4750912	B2	2011年 8月 17日
				SK	161298	A3	1999年 7月 12日
				CZ	9803815	A3	1999年 3月 17日
				BG	65138	B1	2007年 3月 30日
				NO	985459	D0	1998年 11月 23日
				EP	0906426	B1	2007年 5月 02日
				JP	2000511416	A	2000年 9月 05日
				NZ	333083	A	2000年 5月 26日
				US	2008274099	A1	2008年 11月 06日
WO	9958570	A2	1999年 11月 18日	CN	1303393	A	2001年 7月 11日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/078600

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)
		SK 286822 B6	2009年 6月 05日
		EE 05435 B1	2011年 6月 15日
		NZ 508600 A	2003年 3月 28日
		AU 4039899 A	1999年 11月 29日
		DK 1084145 T3	2005年 12月 19日
		WO 9958570 A3	2000年 3月 16日
		NO 20005694 D0	2000年 11月 10日
		EE 200000802 A	2002年 6月 17日
		BR 9910394 B1	2013年 7月 02日
		US 2007189963 A1	2007年 8月 16日
		IS 5708 A	2000年 11月 10日
		AT 301676 T	2005年 8月 15日
		HU 0102992 A3	2003年 9月 29日
		DE 69926630 T2	2006年 5月 24日
		TR 200003317 T2	2001年 7月 23日
		ES 2247802 T3	2006年 3月 01日
		BG 105030 A	2001年 9月 28日
		CN 1250571 C	2006年 4月 12日
		SK 16792000 A3	2001年 5月 10日
		EA 005685 B1	2005年 4月 28日
		IL 139452 D0	2001年 11月 25日
		PL 345845 A1	2002年 1月 14日
		EP 1084145 A2	2001年 3月 21日
		HU 0102992 A2	2001年 11月 28日
		BR 9910394 A	2001年 1月 09日
		AU 759207 B2	2003年 4月 10日
		NO 327732 B1	2009年 9月 14日
		CZ 20004216 A3	2001年 5月 16日
		JP 2002514405 A	2002年 5月 21日
		CA 2333833 A1	1999年 11月 18日
		PL 199353 B1	2008年 9月 30日
		CZ 300495 B6	2009年 6月 03日
		DE 69926630 D1	2005年 9月 15日
		HU 225675 B1	2007年 6月 28日
		CA 2333833 C	2011年 1月 25日
		TW I259837 B	2006年 8月 11日
		NO 20005694 A	2001年 1月 10日
		IS 2522 B	2009年 7月 15日
		EP 1084145 B1	2005年 8月 10日
US 2009162372 A1	2009年 6月 25日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)