

(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
2024年12月12日 (12.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/251260 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/098089

(22) 国际申请日: 2024年6月7日 (07.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310675844.5 2023年6月8日 (08.06.2023) CN

(71) 申请人: 江苏迈威康新药研发有限公司 (JIANGSU MABWELL HEALTH PHARMACEUTICAL R & D CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。迈威(上海)生物科技股份有限公司(MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区李冰路576号(张江创想园)3号楼4楼, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 方鹏(FANG, Peng); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。谭小钊(TAN, Xiaodong); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。游猛(YOU, Meng); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。曹雨霞(CAO, Yuxia); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。王璐(WANG, Lu); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。奚钊(XI, Zhao); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。施磊(SHI, Lei); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼,

Jiangsu 225300 (CN)。朱晓红(ZHU, Xiaohong); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(54) Title: ANTIBODY BINDING TO NECTIN-4 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合Nectin-4的抗体及其用途

(57) Abstract: Provided are an antibody and an antigen-binding fragment that specifically bind to Nectin-4, and a test kit containing the antibody or antigen-binding fragment. Also provided are a nucleic acid encoding the antibody, a host cell containing the nucleic acid, and a method for preparing the antibody. Also provided are uses of the antibody specifically binding to Nectin-4 in diagnosis and prognosis.

(57) 摘要: 提供特异性结合Nectin-4的抗体和抗原结合片段, 以及包含所述抗体或抗原结合片段的试剂盒。还涉及编码所述抗体的核酸、包含所述核酸的宿主细胞, 以及制备所述抗体的方法。还涉及所述特异性结合Nectin-4的抗体的诊断和预后用途。



WO 2024/251260 A1

结合 Nectin-4 的抗体及其用途

技术领域

本发明涉及抗体医疗领域。具体而言，本发明涉及特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段以及含有所述抗体或抗原结合片段的试剂盒。此外，本发明涉及编码所述抗体的核酸及包含所述核酸的宿主细胞，以及制备所述抗体的方法。本发明还涉及所述结合 Nectin-4 的抗体的诊断和预后用途。

背景技术

Nectin-4（也称为“脊髓灰质炎病毒受体样分子 4（PVRL4））是一个分子量约为 66KD 的 I 型跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族中 Nectin 家族的成员，其细胞外结构域由三个 Ig 样结构域（VCC 型）组成，与钙粘蛋白一起参与粘附连接的形成和维持。

Nectin-4 特异性表达于胚胎、胎盘以及肿瘤细胞中，在正常组织器官中不表达或者表达水平极低，是临床上一类经典的肿瘤标志物，也是抗体偶联药物（ADC）的理想靶点。靶向 Nectin-4 的抗体偶联药物与肿瘤细胞表面过度表达的 Nectin-4 结合，形成 ADC-受体结合物；然后，ADC 经靶点介导的内吞作用进入细胞内，之后在溶酶体中被组织蛋白酶切断连接子，释放出毒性小分子，实现肿瘤细胞的特异性杀灭。靶向 Nectin-4 的 PADCEV™（别名：enfortumab vedotin-ejfv；中文名：维汀-恩弗妥单抗）是一种 ADC 药物，该 ADC 药物由靶向 Nectin-4 蛋白的人 IgG1 单克隆抗体恩弗妥单抗（enfortumab）与细胞毒制剂 MMAE(monomethyl auristatin E, 单甲基奥瑞他汀 E, 一种微管破坏剂)偶联而成(Pia M. Challita-Eid 等(2016)Cancer Res.76(10):3003-13)。已获 FDA 批准用于治疗局部晚期或转移性尿路上皮癌。但是，靶向 Nectin-4 的 PADCEV™仅用于治疗应用，且不能用于免疫组化(IHC)染色，因此不具有诊断价值。

本领域需要特异性识别 Nectin-4 的抗 Nectin-4 抗体，其能够高灵敏地检测（例如，通过 IHC 检测）样品中 Nectin-4 的存在和/或表达水平，由此来诊断疾病或评估预后，这对于提高癌症患者的生存率、延长生存期、避免过度化疗和提高生存质量有着重大意义。因此，在诊断和预后中使用特异性好、灵敏度高的抗 Nectin-4 抗体具有极高的应用价值。

发明内容

本发明提供了特异性好、灵敏度高的抗 Nectin-4 抗体，其能够可靠和灵敏地检测 Nectin-4。本发明的特异性结合 Nectin-4 的抗体或抗原结合片段具有以下一个或多个特性：

- (a) 在 ELISA 测定法中测量，具有仅与 Nectin-4 特异性结合的能力，与 Nectin 家族成员 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Nectin-like-1、Nectin-like-2、Nectin-like-3、Nectin-like-4、Nectin-like-5 均无特异性结合；
- (b) 在流式细胞术测定法中测量，具有结合细胞上表达的 Nectin-4 分子的能力；
- (c) 在 Western 印迹法中测量，能够特异性检测 Nectin-4 蛋白；并且在添加过量的 Nectin-4 蛋白时，与膜上 Nectin-4 蛋白的结合被抑制；和/或

(d) 在免疫组织化学染色中，特异性染色表达 Nectin-4 分子的组织，例如，所述组织选自扁桃腺、唾液腺、大脑、小脑、胎盘、膀胱、肺、乳腺、食道、喉、胸腺、心脏、胃、小肠、结肠、直肠、输尿管、卵巢、输卵管、子宫颈、子宫内膜、皮肤、肾脏、前列腺、胰腺、甲状腺、脾脏和肝脏。

因此，在第一方面，本发明提供了特异性结合 Nectin-4 的抗体或抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(a) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR1 或 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR2 或 SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR3 或 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1 或 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 9 所示的 LCDR2 或 SEQ ID NO: 9 所示的 LCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR3 或 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；

(b) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR1 或 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR2 或 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR3 或 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1 或 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 19 所示的 LCDR2 或 SEQ ID NO: 19 所示的 LCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR3 或 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；或

(c) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 25 所示的 HCDR1 或 SEQ ID NO: 25 所示的 HCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 26 所示的 HCDR2 或 SEQ ID NO: 26 所示的 HCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR3 或 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 28 所示的 LCDR1 或 SEQ ID NO: 28 所示的 LCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 29 所示的 LCDR2 或 SEQ ID NO: 29 所示的 LCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR3 或 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体。

在一些实施方案中，所述氨基酸变化是保守的氨基酸修饰。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 Nectin-4 的抗体或抗原结合片段包含

(a) 重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含 SEQ ID NO: 3 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列，且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 4 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列；

(b) 重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含 SEQ ID NO: 13 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列，且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 14 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列；或

(c) 重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 的序列或与其具有至

少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列，且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 Nectin-4 的抗体的抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链 Fv、单链 Fab 或双体抗体(diabody)。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 Nectin-4 的抗体或抗原结合片段包含

(a) SEQ ID NO: 1 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链序列，以及 SEQ ID NO: 2 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链序列；例如，SEQ ID NO: 1 所示的重链序列，以及 SEQ ID NO: 2 所示的轻链序列；

(b) SEQ ID NO: 11 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链序列，以及 SEQ ID NO: 12 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链序列；例如，SEQ ID NO: 11 所示的重链序列，以及 SEQ ID NO: 12 所示的轻链序列；或

(c) SEQ ID NO: 21 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链序列，以及 SEQ ID NO: 22 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链序列；例如，SEQ ID NO: 21 所示的重链序列，以及 SEQ ID NO: 22 所示的轻链序列。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 Nectin-4 的抗体或抗原结合片段为鼠抗体或兔抗体。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 Nectin-4 的抗体或抗原结合片段是 IgG 类抗体。

在第二方面，本发明提供了编码上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或抗原结合片段的核酸、包含所述核酸的载体（优选地，表达载体）、包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一些实施方案中，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如，选自大肠杆菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在一些实施方案中，所述宿主细胞是 HEK 293 细胞或 CHO 细胞。

在第三方面，本发明提供了制备上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在适于表达编码上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养上述第二方面所述的宿主细胞，以及从培养物回收表达的所述抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段。

在第四方面，本发明提供了一种试剂盒，其包含上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段。

在第五方面，本发明提供了上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段的用途，用于检测样品中的 Nectin-4 水平。

在第六方面，本发明提供了使用上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段来诊断受试者中的癌症的方法。

在一些实施方案中，本发明提供了使用上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段来确定受试者使用抗 Nectin-4 抗体或者抗 Nectin-4 抗体偶联药物（例如，具有治疗作

用的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段) 治疗的资格的方法。

在一些实施方案中, 本发明提供了使用上述第一方面所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段来预后患有癌症的受试者的方法, 其中所述患有癌症的受试者是已经使用抗肿瘤剂(例如, 抗 Nectin-4 抗体或者抗 Nectin-4 抗体偶联药物(例如, 具有治疗作用的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段)) 治疗后的患有癌症的受试者。

附图说明

结合说明书附图一起阅读时, 将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的, 图中显示了目前优选的实施方案。然而, 应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

图 1: 显示通过 ELISA 法检测抗体 MM11、抗体 R012、抗体 R036 与 Nectin 家族蛋白 (Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Nectin-4、Nectin-like-1、Nectin-like-2、Nectin-like-3、Nectin-like-4、Nectin-like-5) 的结合。

图 2: 显示通过流式细胞术(FACS 法)检测抗体 MM11、抗体 R012、抗体 R036 与 Nectin-4 表达细胞的结合。图中, Blank 为对人前列腺癌细胞(PC-3)仅加入第二抗体, 不加作为第一抗体的抗体 MM11、抗体 R012 或抗体 R036; NC 为仅有 PC-3 细胞和添加空白缓冲液; “PC-3-Nectin4” 为表达 Nectin-4 的 PC-3 细胞株。

图 3: 显示通过 Western 印迹法检测抗体 MM11、抗体 R012、抗体 R036 与表达 Nectin-4 的细胞裂解物的反应性。图中, 泳道 M: 蛋白分子量 Marker; 泳道 1: PC-3 细胞裂解液; 泳道 2: PC-3-Nectin-4 细胞裂解液。图 3 的上方各小图分别显示了抗体 MM11、抗体 R012、抗体 R036 与表达 Nectin-4 的细胞裂解物反应, 且不与不表达 Nectin-4 的细胞裂解物反应; 图 3 的下方小图中 “MM11(Inhibition)” 和 “R012(Inhibition)” 表示细胞裂解物在转膜后分别与 “MM11 抗体” 或 “R012 抗体” 孵育, 且加入过量的重组 Nectin-4 蛋白后的结果; “Gapdh” 表示细胞裂解物在转膜后与抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体孵育的反应, 作为 Western 印迹法的内部参照。

图 4: 显示 Nectin-4 兔单克隆抗体 R012、R036 以及作为阳性对照的 Nectin-4 兔单克隆抗体 EPR15613-68 与具有代表性的正常人组织上免疫组织化学染色结果(比例尺为 200 μm)。

图 5: 显示 Nectin-4 兔单克隆抗体 R012、R036 以及作为阳性对照的 Nectin-4 兔单克隆抗体 EPR15613-68 在人体膀胱癌组织上免疫组织化学染色结果(比例尺为 200 μm)。

图 6: 显示 Nectin-4 兔单克隆抗体 R012、R036 以及作为阳性对照的 Nectin-4 兔单克隆抗体 EPR15613-68 在人体肺癌组织上免疫组织化学染色结果(比例尺为 200 μm)。

图 7: 显示 Nectin-4 兔单克隆抗体 R012、R036 以及作为阳性对照的 Nectin-4 兔单克隆抗体 EPR15613-68 在人体乳腺癌组织上免疫组织化学染色结果(比例尺为 200 μm)。

图 8: 显示 Nectin-4 鼠单抗 MM11 以及作为阳性对照的 Nectin-4 鼠单抗 M22-321b41.1 在具有代表性的正常人组织上免疫组织化学染色结果(比例尺为 100 μm)。

图 9: 显示 Nectin-4 鼠单抗 MM11 以及作为阳性对照的 Nectin-4 鼠单抗 M22-321b41.1 在人体前列腺癌组织上免疫组织化学染色结果(比例尺为 50 μm)。

图 10: 显示 Nectin-4 鼠单抗 MM11 以及作为阳性对照的 Nectin-4 鼠单抗 M22-321b41.1

在人体肺癌组织上免疫组织化学染色结果（比例尺为 50 μm ）。

图 11: 显示 Nectin-4 鼠单抗 MM11 以及作为阳性对照的 Nectin-4 鼠单抗 M22-321b41.1 在人体三阴性乳腺癌组织上免疫组织化学染色结果（比例尺为 50 μm ）。

具体实施方式

在详细描述本发明之前，应了解，本发明不受限于本说明书中的特定方法及实验条件，因为所述方法以及条件是可以改变的。

I. 定义

除非另外限定，否则本文中使用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项。

在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

如本文所用，术语“抗体”指结合抗原的免疫球蛋白分子。抗体的实施方案包括单克隆抗体、多克隆抗体或嵌合抗体。抗体可以属于任何类(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA)。

本公开的示例性抗体是包含由链间二硫键交联的以下四条多肽链组成的免疫球蛋白 G (IgG) 型抗体：两条重链(HC)和两条轻链(LC)。四条多肽链中每条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的约 100-125 个或更多个氨基酸的可变区。每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区组成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区组成。

VH 区和 VL 区可以进一步细分成称为互补决定区(CDR)的高变区，其间散布较保守的区域，称为构架区(FR)。CDR 暴露于蛋白质的表面上并且是抗体的抗原结合特异性的重要区域。每个 VH 和 VL 由从氨基端至羧基端按以下顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 排列的三个 CDR 和四个 FR 组成。重链的三个 CDR 称为“HCDR1、HCDR2 和 HCDR3”并且轻链的三个 CDR 称为“LCDR1、LCDR2 和 LCDR3”。CDR 含有大部分与抗原形成特异性相互作用的残基。可以根据熟知的编号方案将氨基酸残基归属至 CDR，所述方案包括在 Kabat (Kabat 等人, “Sequences of Proteins of Immunological Interest (具有免疫学意义蛋白质的序列),” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))、Chothia (Chothia 等人, “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (免疫球蛋白高变区的规范结构)”, Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani 等人, “Standard Conformations for the canonical structures of immunoglobulins (免疫球蛋白规范结构的标准构象)”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))、North (North 等人, “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations (抗体 CDR 环构象的新聚类)”, Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011))或 IMGT (自 www.imgt.org 可获得的 ImMunoGeneTic 国际数据库; 参见 Lefranc 等人, Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) 中描述的那些。

然而，应该注意，基于不同的编号方案获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所

差异。即不同编号方案下定义的同一种抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此,在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时,所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体,其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列,但是由于应用了不同的编号方案(例如不同的编号方案规则或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

本发明抗体的 CDR 可以根据本领域的任何编号方案或其组合人工地评估确定边界。除非另有说明,否则在本发明中,术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

“抗原结合片段”是比完整或完全抗体的氨基酸残基数要少的完整或完全抗体的一部分或一段,其能结合抗原或与完整抗体(即与抗原结合片段所来源的完整抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链 Fv(scFv)、单链 Fab、双体抗体(diabody)、单结构域抗体(sdAb, 纳米抗体)、骆驼 Ig、Ig NAR、F(ab)₃ 片段、双-scFv、(scFv)₂、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定的 Fv 蛋白(“dsFv”)。所述术语还包括经遗传工程改造的形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)、杂结合抗体(例如双特异性抗体)和其抗原结合片段。更详细的描述也请参见:皮尔斯目录与手册(Pierce Catalog and Handbook),1994-1995(皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.),罗克福德(Rockford),伊利诺伊州(IL)); Kuby, 免疫学杂志, 第 3 版, W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman & Co.), 纽约, 1997。

术语“Nectin 家族蛋白”与“Nectin 家族”可互换地使用,是细胞粘附分子,将相邻细胞之间形成物理连接以实现细胞间的通信、迁移和其他重要的细胞过程。Nectin 家族蛋白至少包括 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Nectin-4、Nectin-like-1、Nectin-like-2、Nectin-like-3、Nectin-like-4、Nectin-like-5,其中,Nectin-4 蛋白在健康人体中的表达主要局限于胎盘和胚胎组织。与健康的成人组织相比,许多类型的肿瘤细胞都有 Nectin-4 蛋白高表达。Nectin-4 蛋白是一种肿瘤相关抗原。

当谈及抗原和抗体时使用的术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗体与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)、SPR 或生物膜层干涉技术或本领域已知的其他常规结合测定法测定。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数,将所述序列出于最佳比较目的比对(例如,可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中,为比较目的,所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60%和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在这个位置处是相同的。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在一个优选实施方案中,使用已经集成至 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法(在 <http://www.gcg.com> 可获得),使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在又一个优选的实施方案中,使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在

<http://www.gcg.com> 可获得), 使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6, 确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum 62 评分矩阵。

还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12, 空位罚分 4), 利用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法, ((1989) CABIOS, 4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。

额外地或备选地, 可以进一步使用本文所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索, 以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。

对于多肽序列, “保守性修饰”或“保守的氨基酸修饰”包括对多肽序列的置换、缺失或添加, 它们导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。这类保守性修饰的变体相对于本发明的多态性变体、物种间同源物和等位基因而言是附加的并且不排斥它们。以下 8 组含有互为保守替换的氨基酸: 1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G); 2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E); 3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q); 4)精氨酸(R)、赖氨酸(K); 5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V); 6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W); 7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T); 和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参阅例如, Creighton, *Proteins*(1984))。在一些实施方案中, 术语“保守的氨基酸修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

如本文所用, “载体(vector)”表示构建体, 其能够将一种或多种所关注的基因或序列递送入宿主细胞并且优选在宿主细胞中表达所述基因或序列。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝聚剂相关的 DNA 或 RNA 表达载体、包囊化于脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体以及某些真核细胞, 例如生产细胞。

在本发明中术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用, 并且是指已经引入外源性核酸的细胞, 包括这些细胞的子代。宿主细胞包括“转化子”和“转化的细胞”, 其包括原代转化细胞以及由此来源的子代, 而不考虑传代次数。子代在核酸含量上与亲代细胞可能不完全相同, 但可能含有突变。本文包括与在初始转化的细胞中筛选或选择的细胞具有相同功能或生物学活性的突变子代。

在本文中, “受试者”、“个体”或“对象”指需要缓解、预防、治疗和/或诊断疾病或病症的动物, 优选哺乳动物, 更优选是人。哺乳动物还包括但不限于农场动物、竞赛动物、宠物、灵长类、马、犬、猫、小鼠和大鼠。该术语包括具有疾病或处于具有疾病风险的人受试者。

来自受试者的“生物样品”指从个体或受试者得到的细胞、组织或体液的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织, 像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品; 血液或任何血液组分; 体液, 诸如脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液; 来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物, 诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。肿瘤样品的例子在本文中包括但不限于肿瘤活检、细针吸出物、支气管灌洗液、胸膜液(胸水)、痰液、尿液、手术标本、循环中的肿瘤细胞、血清、血浆、循环中的血浆蛋白质、腹水、衍生自肿瘤或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系, 以及保存的肿瘤样品, 诸如福尔

马林固定的、石蜡包埋的肿瘤组织切片样品或冷冻的肿瘤样品。

术语“参考样品”、“参考细胞”、“参考组织”、“对照样品”、“对照细胞”或“对照组织”是指用于比较目的样品、细胞、组织或标准品水平。在一个实施方案中，参考样品、参考细胞、参考组织、对照样品、对照细胞或对照组织获自同一受试者或个体的机体的健康和/或非患病部分，为健康和/或非患病组织或细胞。在又一个实施方案中，参考样品、参考细胞、参考组织、对照样品、对照细胞或对照组织获自不是受试者的个体的健康组织或细胞。来自“参考样品”、“参考细胞”、“参考组织”、“对照样品”、“对照细胞”或“对照组织”的 Nectin-4 的存在或表达水平称为“参考存在或表达水平”。

术语“第一抗体”是指特异性结合生物样品中的 Nectin-4 的抗体。术语“第二抗体”是指特异性结合第一抗体，从而在第一抗体和后续试剂(如果需要后续试剂的话)之间形成桥连的抗体。

免疫荧光 (Immunofluorescence, IF) 技术是标记免疫技术中发展最早的一种技术。它是根据抗原抗体反应的原理，先将已知的抗原或抗体标记上荧光基团，再用这种荧光抗体 (或抗原) 作为探针检查细胞或组织内的相应抗原 (或抗体)。在组织或细胞内形成的抗原抗体复合物上含有标记的荧光素，利用荧光显微镜观察标本，荧光素受外来激发光的照射而发生明亮的荧光 (黄绿色或橘红色)，可以看见荧光所在的组织细胞，从而确定抗原或抗体的性质、定位，以及利用定量技术测定含量。

免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 法是利用抗原抗体特异性反应，对某个特定蛋白纯化富集的方法，主要过程包括捕获和固定。

免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 是在免疫沉淀的基础上进行的扩展。Co-IP 是利用抗原蛋白质和抗体的特异性结合以及细菌蛋白质的“Protein A/G”特异性地结合到抗体 (免疫球蛋白) 的 Fc 片段的现象开发出来的方法。通常将 Protein A/G 预先结合在 Argarose 珠上，使之与含有抗原蛋白的溶液 (如细胞裂解液) 及针对诱饵蛋白 X 的抗体反应后，Argarose 珠上的 Prorein A/G 通过抗体吸附诱饵蛋白 X，诱饵蛋白 X 通过与靶蛋白 Y 相互作用将靶蛋白 Y 从细胞裂解液中分离出来，从而达到免疫共沉淀的目的。

II. 本发明的特异性结合 Nectin-4 的抗体

本发明提供了特异性结合 Nectin-4 的抗体。在一些实施方案中，本发明的抗体是单克隆抗体，例如，其可以来自任何真核克隆、原核克隆或噬菌体克隆。可以通过杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、B 细胞克隆筛选技术、合成技术 (例如 CDR 移植) 或本领域已知的其他技术组合产生单克隆抗体。

用于产生和纯化抗体的方法是本领域熟知的并且可以在例如 Harlow 和 Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y, 第 5-8 章和第 15 章, ISBN 0-87969-314-2 中找到。例如，可以用 Nectin-4 免疫接种小鼠或兔或其他动物并且可以回收、纯化所产生的抗体，以及使用本领域熟知的常规方法测定氨基酸序列。同样，可以筛选噬菌体文库，从而对数千个 Fab 片段筛选与人 Nectin-4 的相互作用并且可以回收、纯化所产生的相互作用物，以及使用本领域熟知的常规方法测定氨基酸序列。

术语“结合 Nectin-4 蛋白的抗体”、“结合 Nectin-4 的抗体”、“抗 Nectin-4 蛋白抗体”、“抗 Nectin-4 抗体”、“结合 Nectin-4 蛋白的分离的抗体”、“Nectin-4 抗体”和“Nectin-4

蛋白抗体”在本文中可互换地使用，是指这样的本发明的抗体，所述抗体能够以特异地结合 Nectin-4 蛋白，由此所述抗体可以用作靶向 Nectin-4 蛋白的诊断剂和/或检测剂。

本发明的分离的抗 Nectin-4 抗体和抗原结合片段特异性结合 Nectin-4 蛋白，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(a) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR1 或 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR2 或 SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR3 或 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1 或 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 9 所示的 LCDR2 或 SEQ ID NO: 9 所示的 LCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR3 或 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；

(b) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR1 或 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR2 或 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR3 或 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1 或 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 19 所示的 LCDR2 或 SEQ ID NO: 19 所示的 LCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR3 或 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；或

(c) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 25 所示的 HCDR1 或 SEQ ID NO: 25 所示的 HCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 26 所示的 HCDR2 或 SEQ ID NO: 26 所示的 HCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR3 或 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 28 所示的 LCDR1 或 SEQ ID NO: 28 所示的 LCDR1 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO: 29 所示的 LCDR2 或 SEQ ID NO: 29 所示的 LCDR2 的不超过 2 个氨基酸变化的变体、和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR3 或 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR3 的不超过 2 个氨基酸变化的变体；

其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或取代，例如，所述氨基酸变化是保守氨基酸取代。所述 CDR 是根据 Kabat 编号方案的 CDR。

在一些实施方案中，本发明的分离的抗 Nectin-4 蛋白抗体或抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含 SEQ ID NO: 3 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列，且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 4 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列；

(b) 重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含 SEQ ID NO: 13 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列，且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 14 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列；或

(c) 重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列，且轻链可

变区包含 SEQ ID NO: 24 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列。

在一些实施方案中，本发明的抗体结合哺乳动物 Nectin-4，例如人 Nectin-4。在一些实施方案中，本发明的 Nectin-4 抗体与 Nectin-4 的一个或多个胞外结构域结合。

在一些实施方案中，本发明的抗体具有以下一个或多个特性：

(a) 在 ELISA 测定法中测量，具有仅与 Nectin-4 特异性结合的能力，与 Nectin 家族成员 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Nectin-like-1、Nectin-like-2、Nectin-like-3、Nectin-like-4、Nectin-like-5 均无特异性结合；

(b) 在流式细胞术测定法中测量，具有结合细胞上表达的 Nectin-4 分子的能力；

(c) 在 Western 印迹法中测量，能够特异性检测 Nectin-4 蛋白；并且在添加过量的 Nectin-4 蛋白时，与膜上 Nectin-4 蛋白的结合被抑制；和/或

(d) 在免疫组织化学染色中，特异性染色表达 Nectin-4 分子的组织，例如，所述组织选自扁桃腺、唾液腺、大脑、小脑、胎盘、膀胱、肺、乳腺、食道、喉、胸腺、心脏、胃、小肠、结肠、直肠、输尿管、卵巢、输卵管、子宫颈、子宫内膜、皮肤、肾脏、前列腺、胰腺、甲状腺、脾脏和肝脏。

III. 本发明的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面，本发明提供了编码以上任何 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段或其任一条链的核酸。在一个实施方案中，提供了包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体。在一个实施方案中，提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。

本发明还涵盖与以上所述核酸在严格性条件下杂交的核酸或与以上所述核酸相比编码具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的多肽序列的核酸。

在一个实施方案中，提供包含以上所述核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、 λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

一旦已经制备了用于表达的表达载体或 DNA 序列，则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的，例如，原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质的转染或其他常规技术。在原生质体融合的情况下，将细胞在培养基中培育并且筛选适宜的活性。用于培养所产生的转染细胞和用于回收产生的抗体分子的方法和条件是本领域技术人员已知的并且可以基于本说明书和现有技术已知的方法，根据使用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞变动或优化。

IV. 本发明的抗体的生产和纯化

在一个实施方案中，本发明提供了制备 Nectin-4 抗体的方法，其中所述方法包括在适于表达编码所述 Nectin-4 抗体的核酸的条件下培养包含编码所述 Nectin-4 抗体的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞，以及任选地分离所述 Nectin-4 抗体。在某个实施方案中，所述方法还包括从所述宿主细胞或宿主细胞培养物回收 Nectin-4 抗体。

为了重组产生本发明的抗体，首先分离编码本发明 Nectin-4 抗体的核酸，并将所述核酸插入载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序，例如通过使用能够与编码本发明 Nectin-4 抗体的核酸特异性结合的寡核苷酸探针进行。

如本文所述制备的本发明的抗体可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体的纯度，所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

V. 本发明抗体的活性测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的 Nectin-4 抗体鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

在一些实施方案中，对本发明的抗体测试其抗原结合活性，例如通过已知的方法诸如 ELISA、Western 印迹、FACS 等来进行。

供任何上述体外测定法使用的细胞包括天然表达 Nectin-4 的细胞或经改造而表达 Nectin-4 细胞系。所述经改造而表达 Nectin-4 细胞系是正常情况下不表达 Nectin-4 的、将编码 Nectin-4 的 DNA 转染入细胞之后表达 Nectin-4 的细胞系。

VI. 用于诊断和检测的方法和试剂盒

在一些实施方案中，本文中提供的任何 Nectin-4 抗体可以用于检测 Nectin-4 在生物样品中的存在和/或水平。

术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法。在一些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中，生物样品来自过度增生性或癌性病灶。

在一个实施方案中，提供了用于诊断或检测方法中的 Nectin-4 抗体，出于诊断或评估预后的目的，检测和/或评价 Nectin-4 的存在和/或水平，例如，旨在确定给定治疗方案的功效。

在一个方面，提供检测 Nectin-4 在生物样品中的存在和/或水平的方法。在一些实施方案中，所述方法包括检测 Nectin-4 蛋白在生物样品中的存在和/或水平。

在一些实施方案中，Nectin-4 是人 Nectin-4。在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的 Nectin-4 抗体在允许 Nectin-4 抗体与 Nectin-4 结合的条件下接触，并检测在 Nectin-4 抗体和 Nectin-4 之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在 Nectin-4。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，Nectin-4 抗体被用于选择适合利用治疗用 Nectin-4 抗体治疗的受试者，例如其中 Nectin-4 是用于选择所述受试者的生物标志物。

在一个实施方案中，可以使用本发明的抗体诊断表达 Nectin-4 蛋白的癌症或肿瘤，例如评价对象中表达 Nectin-4 蛋白的实体瘤(例如，多个器官系统的肉瘤和癌，如侵袭食管、肺、乳房、卵巢、淋巴样、胃肠道的(例如，结肠)、肛门、生殖器和生殖泌尿道(例如，肾、膀胱上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、中枢神经系统(例如，脑、神经的或神经胶质细胞)、头和颈、皮肤(例如，黑素瘤)、鼻咽(例如，分化或未分化的转移性或局部复发性鼻咽癌)和胰的那些癌、以及腺癌，包括恶性肿瘤)、血液学癌(例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤，例如，多发性骨髓

瘤)的治疗或进展、其诊断和/或分期。在一些实施方案中,用抗 Nectin-4 抗体诊断的癌可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌,例如,包括但不限于表达 Nectin-4 蛋白的原位癌、转移性癌。在一些实施方案中,癌选自结肠癌、直肠癌、结直肠癌、食管癌、皮肤癌、尿路上皮癌、卵巢癌、胰腺癌、膀胱癌,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、乳腺癌、胃癌、肝细胞癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、黑素瘤、胶质母细胞瘤、肾细胞癌、前列腺癌。

在一些实施方案中,提供标记的 Nectin-4 抗体。标记包括但不限于被直接检测的标记(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记),以及被间接检测的标记,如酶或配体,例如,通过酶促反应或分子相互作用。标记的示例性标记包括但不限于,放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I , 荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,丹酰(dansyl),伞形酮(umbelliferone),萤光素酶(luciferase),例如,萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号 4,737,456),荧光素,2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HR),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶解酶,糖类氧化酶,例如,葡萄糖氧化酶,半乳糖氧化酶,和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,以及利用过氧化氢氧化染料前体的酶如 HR,乳过氧化物酶,或微过氧化物酶(microperoxidase),生物素/亲和素,自旋标记,噬菌体标记,稳定的自由基,等等。

在本文中提供的任何发明的一些实施方案中,样品是在用 Nectin-4 抗体治疗之前获得的。在一些实施方案中,样品是在癌症已经转移之后获得的。在一些实施方案中,样品是福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的样品。在一些实施方案中,样品是活检(例如芯活检),手术标本(例如来自手术切除的标本),或细针吸出物。

在一些实施方案中,在治疗之前,例如,在起始治疗之前;或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 Nectin-4。

在一些实施方案中,本发明提供了诊断受试者的 Nectin 4 相关疾病,例如,癌症的方法,所述方法包括:

1) 将来自所述受试者的生物样品与作为捕获剂的本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段接触,其中所述生物样品是受试者的组织样品、细胞样品或体液样品,例如,肿瘤或健康组织的组织样品、血液、血清、尿液、唾液、组织液样品,例如,肿瘤或健康组织的组织切片(如,石蜡切片或冰冻切片)样品;

2) 检测本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段与来自所述受试者的生物样品的结合;和任选地

3) 测定来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平,任选地,将来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平与 Nectin-4 的参考存在或表达水平进行比较;

检测到 Nectin-4 和/或检测到所述样品中 Nectin-4 的表达水平显著高于参考水平指示受试者的 Nectin-4 相关疾病,例如,癌症;

任选地,其中 Nectin-4 的存在或表达水平使用免疫组织化学(IHC)方法、Western 印迹测定、荧光激活的细胞分选(FACS)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)检测。

在一些实施方案中,本发明提供了确定受试者使用抗 Nectin-4 抗体或者抗 Nectin-4 抗体

偶联药物（例如，所述抗 Nectin-4 抗体是治疗用抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段）治疗的资格的方法，所述方法包括：

1) 将来自所述受试者的生物样品与作为捕获剂的本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段接触，其中所述生物样品是受试者的组织样品、细胞样品或体液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织样品、血液、血清、尿液、唾液、组织液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织切片（如，石蜡切片或冰冻切片）样品；

2) 检测本发明的抗体或其抗原结合片段与来自所述受试者的生物样品的结合；和任选地

3) 测定来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平，任选地，将来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平与 Nectin-4 的参考存在或表达水平进行比较；

检测到 Nectin-4 和/或检测到所述样品中 Nectin-4 的表达水平高于参考水平指示受试者可以使用抗 Nectin-4 抗体或者抗 Nectin-4 抗体偶联药物（例如，所述抗 Nectin-4 抗体是治疗用抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段）治疗；

任选地，其中 Nectin-4 的存在或表达水平使用免疫组织化学(IHC)方法、Western 印迹测定、荧光激活的细胞分选(FACS)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)检测。

在一些实施方案中，本发明提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法，其包括诊断癌症或确定患者用抗 Nectin-4 抗体治疗的资格的在先步骤，所述在先步骤包括使用如本文公开的抗 Nectin-4 抗体对来自受试者的生物样品进行免疫组织化学(IHC)测定、ELISA 测定、流式细胞术(FACS)测定、Western 印迹、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)，例如，所述在先步骤包括：

1) 将所述生物样品与作为捕获剂的本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段接触，其中所述生物样品是受试者的组织样品、细胞样品或体液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织样品、血液、血清、尿液、唾液、组织液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织切片（如，石蜡切片或冰冻切片）样品；

2) 检测所述抗体或其抗原结合片段与所述生物样品的结合；和任选地

3) 测定所述生物样品中 Nectin-4 的表达，其中将所述生物样品中 Nectin-4 的表达水平与 Nectin-4 的参考表达水平进行比较；

任选地，其中 Nectin-4 的表达水平使用免疫组织化学(IHC)方法、Western 印迹测定、荧光激活的细胞分选(FACS)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)检测。

在一些实施方案中，本发明提供了预后患有癌症的受试者的方法。其中所述患有癌症的受试者已使用抗肿瘤剂治疗，所述抗肿瘤剂包括但不限于代谢抑制剂、抗生素抗癌剂、植物生物碱系抗癌剂、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤烷化剂、单克隆抗体、ADC 等，所述方法包括：

1) 将来自使用抗肿瘤剂（例如，抗 Nectin-4 抗体或者抗 Nectin-4 抗体偶联药物（例如，所述抗 Nectin-4 抗体是治疗用抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段））治疗后的受试者的生物样品与作为捕获剂的本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段接触，其中所述生物样品是受试者的组织样品、细胞样品或体液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织样品、血液、血

清、尿液、唾液、组织液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织切片（如，石蜡切片或冰冻切片）样品；

2) 检测本发明的抗体或其抗原结合片段与来自所述受试者的生物样品的结合；

3) 测定来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平，

检测到 Nectin-4 和/或检测到所述样品中 Nectin-4 的表达水平高于参考水平指示不良预后；或者，样品中不存在 Nectin-4 或检测到 Nectin-4 水平低于参考存在或表达水平表明预后良好，

任选地，其中 Nectin-4 的存在或表达水平使用免疫组织化学(IHC)方法、Western 印迹测定、荧光激活的细胞分选(FACS)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)检测。

在一些实施方案中，本发明还提供了包含本发明的抗 Nectin-4 抗体的试剂盒，以及任选地指导使用该试剂盒的包装插页。

在一些实施方案中，提供了一种治疗肿瘤的方法，所述方法包括：对受试者(例如，样品)(例如，包含癌细胞的受试者样品)检验 Nectin-4 的存在，因而确定 Nectin-4 值，将 Nectin-4 值与对照值（例如健康个体的样品中的 Nectin-4 的值）比较，并且如果 Nectin-4 值大于对照值，则向受试者施用治疗有效量的任选地与一种或多种其他疗法组合的 Nectin-4 抗体(例如，治疗用抗 Nectin-4 抗体)，由此治疗肿瘤。

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

实施例

实施例 1. Nectin-4 抗体的制备与测序

本发明的 Nectin-4 抗体可以通过以下记载的方法来制备。但是，本发明的 Nectin-4 抗体的制备方法并不受本实施例记载的方法限定，也可以通过本领域已知的其他方法制备。

使用人 Nectin-4 片段，例如，含有人 Nectin-4 (SEQ ID NO:31)胞外结构域的片段作为免疫用抗原。抗原首次免疫是与弗氏完全佐剂(CFA)一起应用。加强免疫是使用弗氏不完全佐剂(IFA)。皮下施用含抗原的乳剂。

1.1. 通过杂交瘤方法制备：

使用重组 Nectin-4 胞外蛋白（参见 UniProt 数据库登记号 Q96NY8，第 32-349 位(SEQ ID NO:32)，使用哺乳动物细胞表达系统制备）免疫 Balb/c 小鼠，当经免疫小鼠血清具有较高的抗 Nectin-4 抗体滴度后，无菌取小鼠脾脏，制备脾细胞悬液，并与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，融合后的细胞用 HAT 培养基重悬后，分装至 96 孔细胞培养板。置 37°C，5% CO₂ 培养箱内培养，以形成杂交瘤细胞系。筛选获得免疫组织化学测试最优的 Nectin-4 鼠单克隆抗体，命名为 MM11。

抗体 MM11 的序列信息如下，重链恒定区为小鼠 IgG1 型抗体序列，重链可变区和轻链可变区以斜体和下划线示出，根据 KABAT 命名系统定义的互补决定区 (CDR) 序列进一步以粗体示出。

重链氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNFYWNWIRQFPGNRLEWMGYISYDGSNNY

*NPSLKNRISISRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCVRADYWGQGLVTVSA*AKTTPPSVYPLAP
GSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST
WPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTVC
VVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR
VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN
GQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHS
PGK (SEQ ID NO: 1)

轻链氨基酸序列

DTVMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLESSDGHAYLNWYLOKPGOSPOLLIIYRVSNRFS
GVLHRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCLQFTHVPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPS
SEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO: 2)

1.2. 通过噬菌体展示技术制备:

使用重组 Nectin-4 胞外蛋白 (参见 UniProt 数据库登记号 Q96NY8, 第 32-349 位) 免疫日本大耳白兔。自经免疫兔的血液获得单核的细胞, 随后, 从单核的细胞提取总 RNA, 产生 Nectin-4 兔抗体的 cDNA 基因文库。从 Nectin-4 兔抗体的 cDNA 基因文库形成噬菌体文库, 实施生物淘洗, 筛选到免疫组织化学测试良好的 Nectin-4 兔单克隆抗体, 分别命名为 R012 和 R036。

抗体 R012 和抗体 R036 的序列信息如下, 重链恒定区为兔 IgG 抗体序列, 重链可变区和轻链可变区以斜体和下划线示出, 根据 KABAT 命名系统定义的互补决定区 (CDR) 序列进一步以粗体示出:

抗体 R012

重链氨基酸序列

SKSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYAMSWVRQAPGKGLEIYIGIISGRGTTYASW
LKGRFTISKSTTTVDLKITSPTEEDTATYFCARDAGISDVYTGYNLWGQGLVTVSSGQPKAPS
VFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVV
SVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKE
FKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEW
EKNGKAEDNYKTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSI
SRSPGK (SEQ ID NO: 11)

轻链氨基酸序列

OPVLAQLPSASAALGASAKLTCTLSSAHRITYTIAWYQQQQGEAPRYLMMLKSDGSYTKGT
GVPDFRFSGSSGADRYLISSVQAADDEADYICGADDSGGYVFGGGTQLTVTGQPAVTPSVILFPP
SSEELKDNKATLVCLINDFYPGTVKVNWKADGTPVTQGVDTTQPSKQSNKYAASSFLSLS
ANQWKSYSQSVTCQVTHEGHTVEKSLAPAEC (SEQ ID NO: 12)

抗体 R036

重链氨基酸序列

SQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEIYIGIIGRGTYYAIW
AKGRFTISKSTTTVDLKITSPTEEDTATYFCARDAGTTYVGTYYVATGYFNLWGQGLVTVSSGQ

PKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYS
LSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDW
LRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPS
DISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNH
YTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 21)

轻链氨基酸序列

QPVLTPPSASAALGASAKLTCTLSSAHKTYTIAWYQQQQGEAPRYLMILKSDGSYTRGTG
VPDRFSGSSSGADRYLISSVQADDEADYICGADDSGGYVFGGGTQLTIVTGQPAVTPSVILFPPS
SEELKDNKATLVCLINDFYPGTVKVNWKADGTPVTQGVDTTQPSKQSNKYAASSFLSLSA
NQWKSYSVTCQVTHEGHTVEKSLAPAECS (SEQ ID NO: 22)

实施例 2. ELISA 法检测抗体与 Nectin-4 及其同家族蛋白的结合力

为了验证实施例 1 获得的 Nectin-4 抗体的抗原结合特异性，采用酶联免疫吸附测试法 (ELISA) 检测了所述抗体与其他 Nectin 家族蛋白之间是否存在交叉反应。

Nectin 家族蛋白包括如下 9 种蛋白: Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Nectin-4、Nectin-like-1、Nectin-like-2、Nectin-like-3、Nectin-like-4、Nectin-like-5。具体信息如下:

蛋白质名称	备选的名称	重组蛋白来源信息
Nectin-1	CD111, PVRL-1, PRR-1, HIgR, HveC	购自义翘神州, 目录号: 11611-H08H
Nectin-2	CD112, PVRL-2, PRR-2, HveB	购自义翘神州, 目录号: 10005-H08H
Nectin-3	CD113, PVRL-3, PRR-3	购自义翘神州, 目录号: 10852-H08H
Nectin-4	PVRL-4, PRR-4, IgSF receptor LNIR, EDSS1	迈威康自制, CHO 细胞瞬转制备
Nectin-like-1	CADM3, IgSF4B, SynCAM3, TSL1, 脑 Ig 受体 (Brain Ig receptor)	购自义翘神州, 目录号: 11214-H08H
Nectin-like-2	CADM1, IgSF4, SynCAM, TSLC1, SgIgSF	购自义翘神州, 目录号: 11168-H08H
Nectin-like-3	CADM2, IgSF4D, SynCAM2	购自义翘神州, 目录号: 15690-H08H
Nectin-like-4	CADM4, IgSF4C, TSL2	购自义翘神州, 目录号: 16033-H08H
Nectin-like-5	CD155, PVR	购自义翘神州, 目录号: 10109-H08H

如下所述实施 ELISA 测试法:

包被: 将 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Nectin-4、Nectin-like-1、Nectin-like-2、Nectin-like-3、Nectin-like-4、Nectin-like-5 用包被缓冲液 (pH 9.6 的碳酸盐缓冲液) 分别稀释至 5 µg/ml, 100 µl/孔包被 96 孔板, 2-8℃ 过夜;

封闭: 取出板拍干, 用 PBST 以 200 µl/孔洗板 2 次, 拍干。加入 3% BSA/PBST, 200 µl/孔, 室温孵育 1.5h 实施封闭;

加样: 取出板拍干, 用 PBST 以 200 µl/孔洗板 2 次, 拍干。将实施例 1 制备的 Nectin-4 抗体 (抗体 MM11、抗体 R012、抗体 R036) 用 1% BSA/PBST 分别稀释至 10 µg/ml、1 µg/ml、100 ng/ml 和 10 ng/ml, 以 1% BSA/PBST 稀释液作为空白对照, 以 100 µl/孔加入 96 孔板, 室

温孵育 2 h;

加入第二抗体: 取出板拍干, 用 PBST 以 200 μ l/孔洗板 6 次, 拍干。按照 1:20000 比例稀释山羊抗小鼠 IgG-HRP(Jackson, 目录号: 115-035-003)或按照 1:10000 比例稀释山羊抗兔 IgG (H+L)抗体-HRP (ThermoFisher, 目录号: 31460), 100 μ l/孔, 室温孵育 1 h;

显色: 取出板拍干, 用 PBST 以 200 μ l/孔洗板 6 次, 拍干。以 100 μ l/孔加入 TMB 底物, 室温孵育约 5 min;

终止反应和读板: 以 100 μ l/孔加入 1 mol/L H_3PO_4 终止反应并读板。以 650 nm 为参比波长, 读取并记录波长 450 nm 处孔板的吸光度 OD450 nm-OD650 nm。

ELISA 测试结果:

ELISA 测试结果如表 1 和图 1 所示, 鼠抗体 MM11、兔抗体 R012 和兔抗体 R036 与重组人 Nectin-4 蛋白能够特异性结合, 与其他同家族蛋白没有交叉反应。

表 1. 抗体与 Nectin-4 蛋白、Nectin 同家族蛋白的交叉反应结果

抗原	受试抗体样品浓度 (ng/ml)	OD 检测值		
		抗体 MM11	抗体 R012	抗体 R036
Nectin-1	10000	0.012	0.008	0.006
	1000	0.007	0.007	0.006
	100	0.008	0.007	0.007
	10	0.006	0.008	0.007
	0	0.005	0.007	0.007
Nectin-2	10000	0.017	0.008	0.007
	1000	0.008	0.007	0.007
	100	0.007	0.007	0.007
	10	0.014	0.008	0.007
	0	0.007	0.009	0.007
Nectin-3	10000	0.006	0.007	0.008
	1000	0.008	0.007	0.007
	100	0.014	0.007	0.007
	10	0.006	0.008	0.007

抗原	受试抗体样品浓度 (ng/ml)	OD 检测值		
		抗体 MM11	抗体 R012	抗体 R036
	0	0.006	0.008	0.007
Nectin-4	10000	1.971	1.515	1.627
	1000	2.048	1.556	1.643
	100	1.643	1.442	1.480
	10	0.580	0.748	0.730
	0	0.008	0.008	0.007
Nectin-like-1	10000	0.012	0.009	0.008
	1000	0.008	0.010	0.007
	100	0.010	0.008	0.007
	10	0.006	0.008	0.007
	0	0.007	0.008	0.007
Nectin-like-2	10000	0.005	0.009	0.008
	1000	0.008	0.007	0.006
	100	0.007	0.008	0.007
	10	0.007	0.008	0.007
	0	0.006	0.008	0.007
Nectin-like-3	10000	0.032	0.009	0.008
	1000	0.029	0.008	0.007
	100	0.031	0.008	0.007
	10	0.030	0.009	0.008
	0	0.027	0.008	0.007

抗原	受试抗体样品浓度 (ng/ml)	OD 检测值		
		抗体 MM11	抗体 R012	抗体 R036
Nectin-like-4	10000	0.009	0.007	0.006
	1000	0.010	0.007	0.007
	100	0.007	0.008	0.007
	10	0.004	0.008	0.007
	0	0.008	0.008	0.007
Nectin-like-5	10000	0.008	0.008	0.009
	1000	0.008	0.008	0.009
	100	0.007	0.008	0.009
	10	0.006	0.009	0.009
	0	0.011	0.008	0.008

实施例 3. 流式细胞术检测抗体与 Nectin-4 表达细胞结合的分析

为了验证实施例 1 获得的 Nectin-4 抗体与 Nectin-4 表达细胞的结合特异性，采用流式细胞术(FACS)检测了所述抗体与 Nectin-4 表达细胞的结合。

如下所述实施流式细胞术测试法：

细胞处理：

人前列腺癌细胞 (PC-3) 购自 ATCC，其不表达 Nectin-4。使用人前列腺癌细胞 (PC-3) 作为阴性对照。

PC-3-Nectin-4 细胞为迈威康公司构建的基因工程改造细胞株，为表达 Nectin-4 的 PC-3 细胞株。具体而言，将人 Nectin-4 全长基因 (NCBI 基因 ID:81607,1533 bp) 敲入 PC-3 细胞并经单克隆细胞筛选得到稳定转染的高表达 Nectin-4 的细胞株，经流式细胞术检测确认细胞表面高表达 Nectin-4，并将该细胞株命名为 PC-3-Nectin-4 细胞。

取生长至对数期的 PC-3-Nectin 4 细胞和作为阴性对照的 PC-3 细胞，分别经胰酶消化后，200 g 离心 5 min 收集细胞，配制成约 5×10^5 个/ml 的细胞密度，分别吸取 1 ml 细胞悬液至流式管中，即 5×10^5 个细胞/流式管，然后 4℃，350 g 离心 5 min，弃上清，并用预冷的 PBS 清洗两遍，待用。

抗体样品稀释与孵育：

将抗体 MM11、抗体 R012 和抗体 R036 用 PBS 稀释至 5μg/ml，分别取 200μl 抗体稀释液重悬上述各细胞，轻轻混匀，冰上避光孵育，孵育时间为 1h。

加入荧光第二抗体:

将流式管于 4℃, 350g 离心 5 min, 弃上清, 每管加入 1 ml 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 然后加入 500 μl 第二抗体, 对于抗体 MM11, 第二抗体为山羊抗小鼠 IgG Fc-FITC(1:200)(Abcam, 货号 ab150113); 对于抗体 R012 和抗体 R036, 第二抗体为山羊抗兔 IgG H&L-Alexa Flour[®] 488 (1:2000)(Abcam, 货号 ab150077), 重悬细胞, 冰上孵育 60 min。于 4℃, 350g 离心 5 min, 弃上清, 然后每管加入 1 ml 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 重悬于 500 μl PBS 中。

检测:

使用流式细胞仪检测各流式管, 根据仪器相关操作进行, 结果导入相应保存路径中。

FACS 检测结果:

FACS 检测结果如图 2 所示, 使用抗体 MM11、抗体 R012 和抗体 R036 检测 PC-3-Nectin 4 细胞均产生较高的荧光信号, 而检测 PC-3 细胞无明显的荧光信号。结果表明 Nectin-4 抗体 MM11、R012 和 R036 均能够特异性识别并结合 PC-3-Nectin 4 细胞上表达的 Nectin-4, 且不识别细胞上的其他蛋白。

实施例 4. Western 印迹法检测抗体与 Nectin-4 表达细胞裂解物的反应性

使用 Western 印迹法检测实施例 1 获得的 Nectin-4 抗体是否特异性识别 Nectin-4 蛋白。此外, 在 Western 印迹法检测时, 通过添加过量的 Nectin-4 蛋白进行抑制实验, 进一步确认实施例 1 获得的 Nectin-4 抗体的特异性。

如下所述实施 Western 印迹法测试法:

人前列腺癌细胞(PC-3)购自 ATCC, 经流式细胞术检测确认 PC-3 细胞不表达 Nectin-4。

PC-3-Nectin-4 细胞为迈威康公司构建的基因工程改造细胞株, 为表达 Nectin-4 的 PC-3 细胞株。具体而言, 将人 Nectin-4 全长基因 (NCBI 基因 ID:81607,1533 bp) 敲入 PC-3 细胞并经单克隆细胞筛选得到稳定转染的高表达 Nectin-4 的细胞株, 经流式细胞术检测确认细胞表面高表达 Nectin-4, 并将该细胞株命名为 PC-3-Nectin-4 细胞。

蛋白提取: 复苏 PC-3-Nectin 4 细胞和 PC-3 细胞, 在细胞培养箱中分别于细胞培养瓶中生长至合适的细胞密度, 弃去培养基, 加入提前预冷的 PBS 清洗两遍。随后加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液(Radioimmunoprecipitation assay buffer, 放射免疫沉淀法缓冲液)(Thermo, 货号 89901)裂解细胞, 用细胞刮刮下细胞, 冰上裂解 30min 后, 12000rpm, 4℃, 离心 10min。取离心后的上清至新的离心管中, BCA 法测定蛋白含量并调整至合适的浓度。加入 5×上样缓冲液混合均匀后, 97℃金属浴加热 10min 使蛋白完全变性; 使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)) 作为 Western 印迹法的内部参照;

电泳: 两株细胞裂解物上样量为 4.6 μg, 电泳条件: 120V, 80min;

转膜: 采用湿法转膜, 湿法转膜条件: 0.35A, 90min;

封闭: 使用 5% BSA/TBST 室温振荡孵育膜 1 h;

加入第一抗体:

(1) 将实施例 1 制备的 Nectin-4 抗体 (分别为抗体 MM11、抗体 R012、抗体 R036) 用 5% BSA/TBST 稀释至 20ng/ml, 作为第一抗体添加, 2~8℃振荡孵育膜过夜; 或者

(2) 将实施例 1 制备的 Nectin-4 抗体 (分别为抗体 MM11、抗体 R012) 用 5% BSA/TBST

稀释至 20ng/ml, 作为第一抗体添加; 并加入 200 μ g/ml 重组人源 Nectin-4 (迈威康公司, Lot: 20210101) 预孵育 1h, 然后 2~8 $^{\circ}$ C 振荡孵育膜过夜;

加入第二抗体: 复温 30min 后, TBST 洗膜 3 次, 每次 5min, 将作为第二抗体的山羊抗小鼠 IgG-HRP(Jackson, 目录号: 115-035-003)用 5 % BSA/TBST 按 1:50000 比例稀释, 室温振荡孵育 1h; 或者将作为第二抗体的山羊抗兔 IgG (H+L)抗体-HRP (ThermoFisher, 目录号: 31460) 用 5 % BSA/TBST 按 1:25000 比例稀释, 室温振荡孵育 1h;

显色: 第二抗体孵育完成后, TBST 洗膜 3 次, 每次 5min, 加入 1:1 配好的 ECL 发光液显色, 采集发光信号。

Western 印迹法测试结果:

Western 印迹法结果如图 3 所示, 其中作为内部参照的 GAPDH 的检测条带大约在 36kDa 处, 保证了实验结果的准确性和可靠性。在 Nectin-4 阳性表达的细胞中可以发现与抗体 MM11、抗体 R012、抗体 R036 结合的特异性条带, 而在 Nectin-4 阴性表达的细胞中没有特异性条带。

Nectin-4 阳性表达的细胞中与抗体 MM11、抗体 R012 结合的特异性条带在加入过量的重组 Nectin-4 蛋白后消失, 说明抗 Nectin-4 抗体能够特异性与人 Nectin-4 蛋白结合。

实施例 5. Nectin-4 兔单克隆抗体的免疫组织化学染色

选择多个肿瘤组织和正常人体组织样本, 经中性福尔马林固定后, 制备成石蜡组织切片。其中正常人体组织包括多个来源的组织器官; 肿瘤组织包括: 3 例膀胱癌, 2 例肺癌和 3 例乳腺癌组织。

使用抗 Nectin-4 单克隆抗体检测组织样本中 Nectin-4 的表达情况, 以商品化 Nectin-4 兔单抗 (购自 abcam, 克隆号: EPR15613-68) 为阳性对照。所有抗体使用抗体稀释液稀释到工作浓度后使用, 抗体稀释液购自迈杰转化医学研究 (苏州) 有限公司, 货号 P010A01。在全自动免疫组织化学染色系统 (Leica BOND III) 检测免疫组织化学染色情况, 具体程序如下表所示。

表 2. Nectin-4 兔单克隆抗体的免疫组织化学染色程序

步骤	试剂	时间/温度	试剂来源	货号
脱蜡	脱蜡液	默认时间/72 $^{\circ}$ C	Leica	AR9222
抗原修复	抗原修复缓冲液	20 分钟/100 $^{\circ}$ C	Leica	AR9640
灭活	过氧化物酶灭活试剂	5 分钟/室温	Leica	DS9800
第一抗体孵育	EPR15613-68、R012、R036, 均为 1 μ g/ml	15 分钟/室温	EPR15613-68 购自 abcam, R012 和 R036 为发明人制备	N/A
第二抗体孵育	山羊抗兔 IgG-polymer HRP	8 分钟/室温	Leica	DS9800
显色	DAB 显色试剂	10 分钟/室温	Leica	DS9800
苏木素复	苏木素染色液	5 分钟/室温	Leica	DS9800

染				
---	--	--	--	--

注：过氧化物酶灭活试剂、山羊抗兔 IgG-polymer HRP、DAB 显色试剂、苏木素染色液均包含在 Leica 的 BOND Polymer Refine Detection 试剂盒中，货号 DS9800，所有试剂均已稀释至工作浓度，直接使用即可。

免疫组织化学染色结果如表 3、图 4、图 5、图 6 和图 7 所示，在不同 Nectin-4 表达水平的正常组织和肿瘤组织上，EPR15613-68、R012 和 R036 这三个抗体表现基本一致，靶蛋白 Nectin-4 定位于细胞膜和/或细胞浆上，符合文献报告的蛋白定位，而且不产生非特异性染色。正常组织中胎盘的滋养层细胞、皮肤的上皮和扁桃体的隐窝上皮呈明显的 Nectin-4 染色阳性，其余正常组织器官基本呈阴性。大部分肿瘤组织中肿瘤细胞呈 Nectin-4 阳性，小部分呈 Nectin-4 阴性，而肿瘤组织中的正常细胞呈 Nectin-4 阴性。

表 3. Nectin-4 兔单克隆抗体在正常人体组织上的免疫组织化学染色结果

组织名称	样本数量	染色结果		
		EPR15613-68	R012	R036
小肠	3	阴性	阴性	阴性
结肠	3	阴性	阴性	阴性
肝脏	3	阴性	阴性	阴性
唾液腺	3	弱阳性	阴性	阴性
卵巢	3	阴性	阴性	阴性
胰腺	2	阴性	弱阳性	阴性
皮肤	3	上皮阳性	上皮阳性	上皮阳性
胃	3	阴性	阴性	阴性
大脑	3	阴性	阴性	阴性
小脑	3	阴性	阴性	阴性
心脏	3	阴性	阴性	阴性
甲状腺	3	阴性	阴性	阴性
脾脏	3	阴性	阴性	阴性
扁桃体	3	隐窝上皮阳性	隐窝上皮阳性	隐窝上皮阳性
胸腺	3	阴性	阴性	阴性
肺	3	阴性	阴性	阴性

实施例 6. Nectin-4 鼠单克隆抗体的免疫组织化学染色

选择多个肿瘤组织和正常人体组织样本，经中性福尔马林固定后，制备成石蜡组织切片。其中正常人体组织包括多个来源的组织器官；肿瘤组织包括：3 例前列腺癌，3 例肺癌和 3 例三阴性乳腺癌组织。使用抗 Nectin-4 单克隆抗体检测组织样本中 Nectin-4 的表达情况，以鼠单抗 M22-321b41.1 为阳性对照，M22-321b41.1 是已申请专利的 Nectin-4 鼠单克隆抗体，专利公开号为 CN111051345A，所有抗体使用抗体稀释液稀释到工作浓度后使用，抗体稀释液购自迈杰转化医学研究（苏州）有限公司，货号 P010A01。在全自动免疫组织化学染色系统（Leica BOND III）检测免疫组织化学染色情况，具体程序如下表所示。

表 4. Nectin-4 鼠单克隆抗体的免疫组织化学染色程序

步骤	试剂	时间/温度	试剂来源	货号
脱蜡	脱蜡液	默认时间/72℃	Leica	AR9222
抗原修复	抗原修复缓冲液	20 分钟/100℃	Leica	AR9640
灭活	过氧化物酶灭活试剂	5 分钟/室温	Leica	DS9800
第一抗体 孵育	抗体 M22-321b41.1 或 MM11, 均为 1 μg/ml	15 分钟/室温	抗 体 M22-321b41.1 和 MM11 为发 明人制备	N/A
第一抗体 后的试剂 孵育	兔抗鼠 Post-primary	8 分钟/室温	Leica	DS9800
第二抗体 孵育	山 羊 抗 兔 IgG-polymer HRP	8 分钟/室温	Leica	DS9800
显色	DAB 显色试剂	10 分钟/室温	Leica	DS9800
苏木素复 染	苏木素染色液	5 分钟/室温	Leica	DS9800

注：过氧化物酶灭活试剂、兔抗鼠 Post-primary、山羊抗兔 IgG-polymer HRP、DAB 显色试剂、苏木素染色液均包含在 Leica 的 BOND Polymer Refine Detection 试剂盒中，货号 DS9800，所有试剂均已稀释至工作浓度，直接使用即可。

免疫组织化学染色结果如表 5、图 8、图 9、图 10 和图 11 所示，在正常组织上，抗体 M22-321b41.1 和抗体 MM11 表现基本一致，正常组织中部分个体的唾液腺和皮肤上皮呈微弱的 Nectin-4 染色阳性，扁桃体隐窝上皮和肺部的支气管呈明显的 Nectin-4 阳性，其余正常组织器官基本为阴性。大部分肿瘤组织中肿瘤细胞呈 Nectin-4 阳性，而肿瘤组织中的正常细胞呈 Nectin-4 阴性。在不同 Nectin-4 表达水平的肿瘤组织上，抗体 MM11 和抗体 M22-321b41.1 染色后，靶蛋白 Nectin-4 均定位于细胞膜和/或细胞浆上，符合文献报告的蛋白定位，而且不产生非特异性染色。在部分肿瘤组织中，尤其是三阴性乳腺癌上，抗体 MM11 的染色信号明显强于抗体 M22-321b41.1。

表 5. Nectin-4 鼠单克隆抗体在正常人体组织上的免疫组织化学染色结果

组织名称	样本数量	染色结果	
		M22-321b41.1	MM11
小肠	3	阴性	阴性
结肠	3	阴性	阴性
肝脏	3	阴性	阴性
唾液腺	3	2 例阴性，1 例阳性	2 例阴性，1 例阳性
卵巢	3	阴性	阴性
胰腺	2	阴性	阴性

皮肤	3	2 例阴性, 1 例阳性	2 例阴性, 1 例阳性
胃	2	阴性	阴性
大脑	3	阴性	阴性
小脑	3	阴性	阴性
心脏	3	阴性	阴性
甲状腺	3	阴性	阴性
脾脏	3	阴性	阴性
扁桃体	3	隐窝上皮阳性	隐窝上皮阳性
胸腺	3	阴性	阴性
肺	3	2 例阴性, 1 例阳性	2 例阴性, 1 例阳性

以上描述了本发明的示例性实施方案, 本领域技术人员应当理解的是, 这些公开内容仅是示例性的, 在本发明的范围内可以进行各种其它替换、适应和修改。因此, 本发明不限于文中列举的具体实施方案。

示例性序列

序列编号	描述	氨基酸序列
SEQ ID NO: 1	抗体 MM11 重链	<u>DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNFIYWNWIRQ</u> <u>FPGNRLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISISRDTSKNQF</u> <u>FLKLNSVTTEDTATYYCVRADYWGQGTLVTVSAAKTTPPS</u> VYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTC NVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP PKPKDVLITLTPKVTCCVVDISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEF KCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQM AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQ PIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGL HNHHTEKSLSHSPGK
SEQ ID NO: 2	抗体 MM11 轻链	<u>DTVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLESSDGHAYLN</u> <u>WYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGLHFRFSGSGSGTDFTL</u> <u>KISRVEAEDLGYYFCLQFTHVPFTFGSGTKLEIKRADAA</u> PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 3	抗体 MM11 VH	<u>DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNFIYWNWIRQ</u> <u>FPGNRLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISISRDTSKNQF</u> <u>FLKLNSVTTEDTATYYCVRADYWGQGTLVTVSA</u>

SEQ ID NO: 4	抗体 MM11 VL	<u>DTVMTOTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLESSDGHAYLN</u> <u>WYLOKPGOSPOLLIRVSNRFSGLVLRFSGSGSGTDFTL</u> <u>KISRVEAEDLGVYFCLQFTHVPFTFGSGTKLEIKRA</u>
SEQ ID NO: 5	抗体 MM11 HCDR1	SNFYWN
SEQ ID NO: 6	抗体 MM11 HCDR2	YISYDGSNNYNPSLKN
SEQ ID NO: 7	抗体 MM11 HCDR3	ADY
SEQ ID NO: 8	抗体 MM11 LCDR1	RSSQSLESSDGHAYLN
SEQ ID NO: 9	抗体 MM11 LCDR2	RVSNRFS
SEQ ID NO: 10	抗体 MM11 LCDR3	LQFTHVPFT
SEQ ID NO: 11	抗体 R012 重链	<u>SKSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYAMSWVRQA</u> <u>PGKGLEIYIGIISGRGTTYASWLKGRFTISKSTTTVDLKIT</u> <u>SPTTEDTATYFCARDAGISDVYTYGFNLWGOGTLVTVSS</u> GQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVT VTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQ PVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGP SVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDDPEVQFT WYINNEQVRTARPLREQFNSTIRVVSTLPIAHQDWL RGKEFKCKVHNAKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTM GPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAED NYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCS VMHEALHNHYTQKSISRSPGK
SEQ ID NO: 12	抗体 R012 轻链	<u>QPVLAQLPSASAALGASAKLTCTLSSAHRTYTIAWYQQQ</u> <u>QGEAPRYLMMLKSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGADRYLI</u> <u>ISSVQAADEADYICGADDSGGYVFGGGTQLTVTGQPAV</u> TPSVILFPPSSEELKDNKATLVCLINDFYPGTVKVNWK ADGTPVTQGVDTTQPSKQSNKYAASSFLSLSANQWK SYQSVTCQVTHEGHTVEKSLAPAEC
SEQ ID NO: 13	抗体 R012 VH	<u>SKSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYAMSWVRQA</u> <u>PGKGLEIYIGIISGRGTTYASWLKGRFTISKSTTTVDLKIT</u> <u>SPTTEDTATYFCARDAGISDVYTYGFNLWGOGTLVTVSS</u>
SEQ ID NO: 14	抗体 R012 VL	<u>QPVLAQLPSASAALGASAKLTCTLSSAHRTYTIAWYQQQ</u> <u>QGEAPRYLMMLKSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGADRYLI</u>

		<u>ISSVQAADEADYYCGADDSGGYVFGGGTQLTVTGQP</u>
SEQ ID NO: 15	抗体 R012 HCDR1	TYAMS
SEQ ID NO: 16	抗体 R012 HCDR2	IISGRGTTYASWLKG
SEQ ID NO: 17	抗体 R012 HCDR3	DAGISDVYTGYNL
SEQ ID NO: 18	抗体 R012 LCDR1	TLSSAHRITYIA
SEQ ID NO: 19	抗体 R012 LCDR2	LKSDGSYTKGT
SEQ ID NO: 20	抗体 R012 LCDR3	GADDSGGYV
SEQ ID NO: 21	抗体 R036 重链	<u>SQSVESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMSWVROA</u> <u>PGKGLEIYIGHGGRTTYAIWAKGRFTISKSTTVDLKIT</u> <u>SPTTEDTATYFCARDAGTTYVGTTYVATGYFNLWGQGL</u> <u>VTVSS</u> QPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYL PEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVS TSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPEL LGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPE VQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAH QDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPK VYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNG KAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDV FTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
SEQ ID NO: 22	抗体 R036 轻链	<u>QPVLTOPPSASAALGASAKLTCTLSSAHKTYTIAWYQQQ</u> <u>QGEAPRYLMILKSDGSYTRGTGVPDRFSGSSSGADRYLII</u> <u>SSVQADDEADYYCGADDSGGYVFGGGTQLTVTGQPAVT</u> PSVILFPPSSEELKDNKATLVCLINDFYPGTVKVNWKA DGTPVTQGVDTTQPSKQSNKYAASSFLSLSANQWKS YQSVTCQVTHEGHTVEKSLAPAACS
SEQ ID NO: 23	抗体 R036 VH	<u>SQSVESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMSWVROA</u> <u>PGKGLEIYIGHGGRTTYAIWAKGRFTISKSTTVDLKIT</u> <u>SPTTEDTATYFCARDAGTTYVGTTYVATGYFNLWGQGL</u> <u>VTVSS</u>
SEQ ID NO: 24	抗体 R036 VL	<u>QPVLTOPPSASAALGASAKLTCTLSSAHKTYTIAWYQQQ</u> <u>QGEAPRYLMILKSDGSYTRGTGVPDRFSGSSSGADRYLII</u> <u>SSVQADDEADYYCGADDSGGYVFGGGTQLTVTGQP</u>
SEQ ID NO:	抗体 R036	SYAMS

25	HCDR1	
SEQ ID NO: 26	抗体 R036 HCDR2	IIGGRGTTYAIWAKG
SEQ ID NO: 27	抗体 R036 HCDR3	DAGTTYVGTTYVATGYFNL
SEQ ID NO: 28	抗体 R036 LCDR1	TLSSAHKTYTIA
SEQ ID NO: 29	抗体 R036 LCDR2	LKSDGSYTRGT
SEQ ID NO: 30	抗体 R036 LCDR3	GADDSGGYV
SEQ ID NO: 31	人 Nectin-4 蛋白 全长序列 (510aa)	MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLLASFTGRCPAGELETS DVVTVVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARVDA GEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLD GSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRRLRVL VPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWD TEVKGTTSSRSFKHSRRAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLT CVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLW HIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVD GDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLD PQEDSGKQVDLVSASVVVVGVAALLFCLLVVVVVL MSRYHRRKAQMTQKYEEELTLTRENIRRLHSHHTD PRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPEGRSY STLTTVREIETQTELLSPGSGRAEEEEEDQDEGIKQAMN HFVQENGLTRAKPTGNGIYINGRGHLV
SEQ ID NO: 32	人 Nectin-4 蛋白胞外结构域 序列, 位于全长 序列的 32-349 位	GELETSDVVTVVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAW ARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPP RNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARL RLRVLPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS VTWDTEVKGTTSSRSFKHSRRAAVTSEFHLVPSRSMN GQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLED QNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSG VRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTV DVLDPQEDSGKQVDLVSAS

权 利 要 求

1. 抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段, 包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

(a) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR1; SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR2; 和 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR3; 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1; SEQ ID NO: 9 所示的 LCDR2; 和 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR3;

(b) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR1; SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR2; 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR3; 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1; SEQ ID NO: 19 所示的 LCDR2; 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR3; 或

(c) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 25 所示的 HCDR1; SEQ ID NO: 26 所示的 HCDR2; 和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR3; 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 28 所示的 LCDR1; SEQ ID NO: 29 所示的 LCDR2; 和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段, 包含重链可变区和轻链可变区, 其中

(a) 重链可变区包含 SEQ ID NO: 3 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列, 且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 4 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列;

(b) 重链可变区包含 SEQ ID NO: 13 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列, 且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 14 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列; 或

(c) 重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列, 且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 的序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列;

例如, 所述抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段包含

(a) 重链可变区包含 SEQ ID NO: 3 的序列, 且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 4 的序列;

(b) 重链可变区包含 SEQ ID NO: 13 的序列, 且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 14 的序列;

或

(c) 重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 的序列, 且轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 的序列;

例如, 所述抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段包含

(a) SEQ ID NO: 1 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链序列, 以及 SEQ ID NO: 2 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链序列; 例如, SEQ ID NO: 1 所示的重链序列, 以及 SEQ ID NO: 2 所示的轻链序列;

(b) SEQ ID NO: 11 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链序列, 以及 SEQ ID NO: 12 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链序列; 例如, SEQ ID NO: 11 所示的重链序列, 以及 SEQ ID NO: 12 所示的轻链序列; 或

(c) SEQ ID NO: 21 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链序列, 以及 SEQ ID NO: 22 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链序列; 例如, SEQ ID NO: 21 所示的重链序列, 以及 SEQ ID NO: 22 所示的轻链序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链 Fv、单链 Fab 或双体抗体(diabody)。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段, 具有以下一个或多个特性:

(a) 在 ELISA 测定法中测量, 具有仅与 Nectin-4 特异性结合的能力, 与 Nectin 家族成员 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Nectin-like-1、Nectin-like-2、Nectin-like-3、Nectin-like-4、Nectin-like-5 均无特异性结合;

(b) 在流式细胞术测定法中测量, 具有结合细胞上表达的 Nectin-4 分子的能力;

(c) 在 Western 印迹法中测量, 能够特异性检测 Nectin-4 蛋白; 并且在添加过量的 Nectin-4 蛋白时, 与膜上 Nectin-4 蛋白的结合被抑制; 和/或

(d) 在免疫组织化学染色中, 特异性染色表达 Nectin-4 分子的组织, 例如, 所述组织选自扁桃腺、唾液腺、大脑、小脑、胎盘、膀胱、肺、乳腺、食道、喉、胸腺、心脏、胃、小肠、结肠、直肠、输尿管、卵巢、输卵管、子宫颈、子宫内膜、皮肤、肾脏、前列腺、胰腺、甲状腺、脾脏和肝脏。

5. 分离的核酸, 其编码权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段。

6. 包含权利要求 5 所述的核酸的载体, 优选地所述载体是表达载体。

7. 包含权利要求 6 所述的核酸或权利要求 7 所述的载体的宿主细胞, 优选地, 所述宿主细胞是原核的或真核的, 更优选的选自大肠杆菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞, 最优选地, 所述宿主细胞是 293 细胞或 CHO 细胞。

8. 制备权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括在适于表达编码权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养权利要求 7 的宿主细胞, 以及从培养基回收表达的所述抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段。

9. 试剂盒, 其包含权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段。

10. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段的用途, 用

于制备检测样品中 Nectin-4 的试剂盒。

11. 一种用于检测来自受试者的生物样品中的 Nectin-4 的方法，所述方法包括：

- 1) 将所述生物样品与捕获剂接触，其中，所述捕获剂为权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段；
- 2) 检测所述捕获剂与所述生物样品的结合；和任选地
- 3) 测定来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平，任选地，将来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平与 Nectin-4 的参考存在或表达水平进行比较；
任选地，其中 Nectin-4 的存在或表达水平使用免疫组织化学(IHC)方法、Western 印迹测定、荧光激活的细胞分选(FACS)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)检测。

12. 用于确定受试者使用抗 Nectin-4 抗体或者抗 Nectin-4 抗体偶联药物治疗的资格的方法，所述方法包括：

- 1) 将来自所述受试者的生物样品与捕获剂接触，其中，所述捕获剂为权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段；
- 2) 检测所述捕获剂与来自所述受试者的生物样品的结合；和任选地
- 3) 测定来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平，任选地，将来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平与 Nectin-4 的参考存在或表达水平进行比较；
任选地，其中 Nectin-4 的存在或表达水平使用免疫组织化学(IHC)方法、Western 印迹测定、荧光激活的细胞分选(FACS)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)检测。

13. 用于预后患有癌症的受试者的方法，所述方法包括：

- 1) 将来自使用抗肿瘤剂（例如，抗 Nectin-4 抗体或者抗 Nectin-4 抗体偶联药物）治疗后的受试者的生物样品与捕获剂接触，其中，所述捕获剂为权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段；
- 2) 检测所述捕获剂与来自所述受试者的生物样品的结合；和任选地
- 3) 测定来自所述受试者的生物样品中 Nectin-4 的存在或表达水平，
检测到 Nectin-4 和/或检测到所述样品中 Nectin-4 的表达水平高于参考水平指示不良预后；或者，样品中不存在 Nectin-4 或检测到 Nectin-4 水平低于参考存在或表达水平表明预后良好，
任选地，其中 Nectin-4 的存在或表达水平使用免疫组织化学(IHC)方法、Western 印迹测定、荧光激活的细胞分选(FACS)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光(IF)测定和/或免疫共沉淀(Co-IP)检测。

14. 根据权利要求 11 - 13 中任一项所述的方法，其中所述生物样品是受试者的组织样品、细胞样品或体液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织样品、血液、血清、尿液、唾液、组织液样品，例如，肿瘤或健康组织的组织切片（如，石蜡切片或冰冻切片）样品。

各 Nectin-4 抗体与 Nectin 家族蛋白的结合

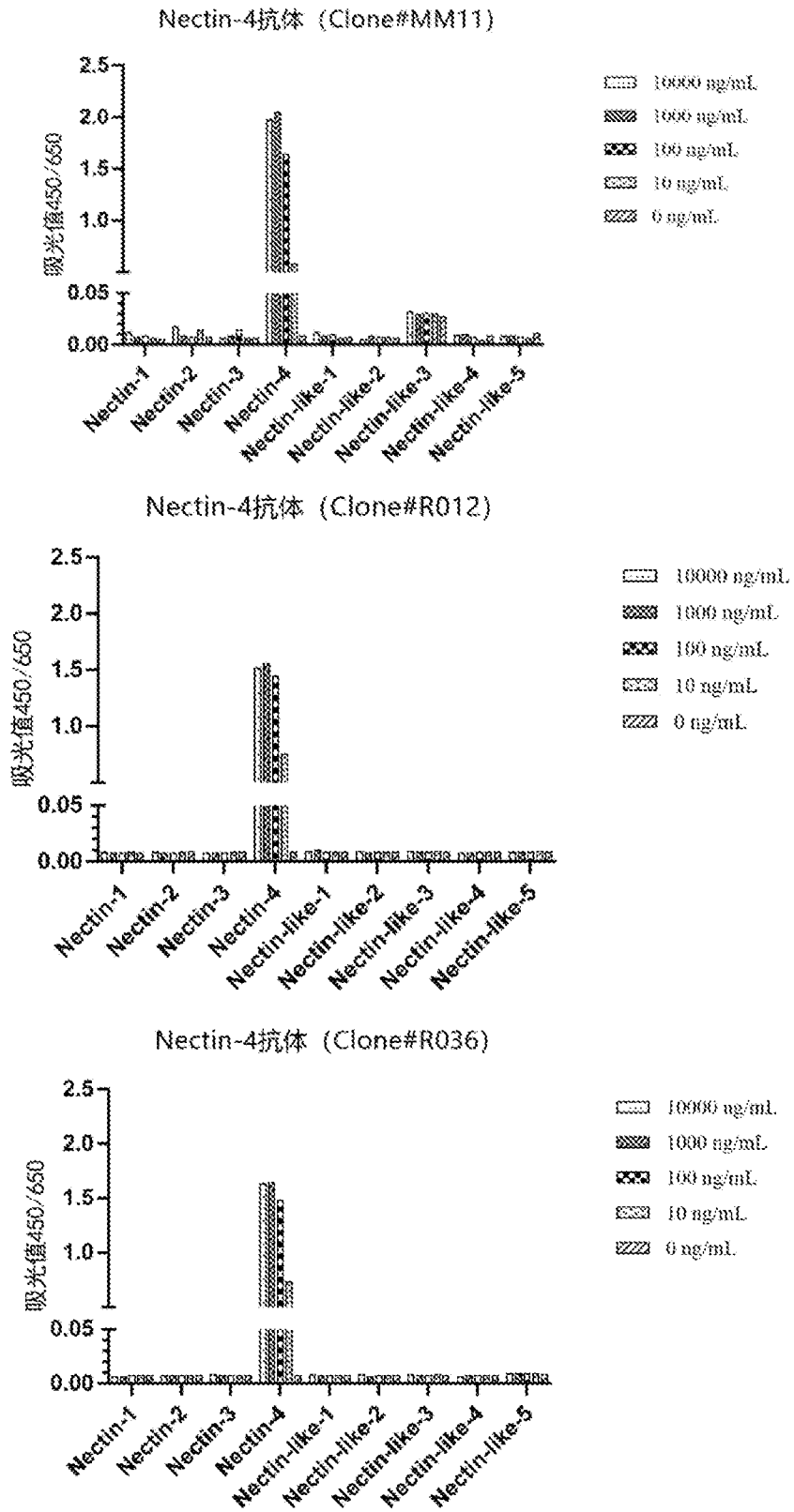


图 1

流式细胞术检测Nectin-4抗体与不表达或表达Nectin-4的细胞的结合

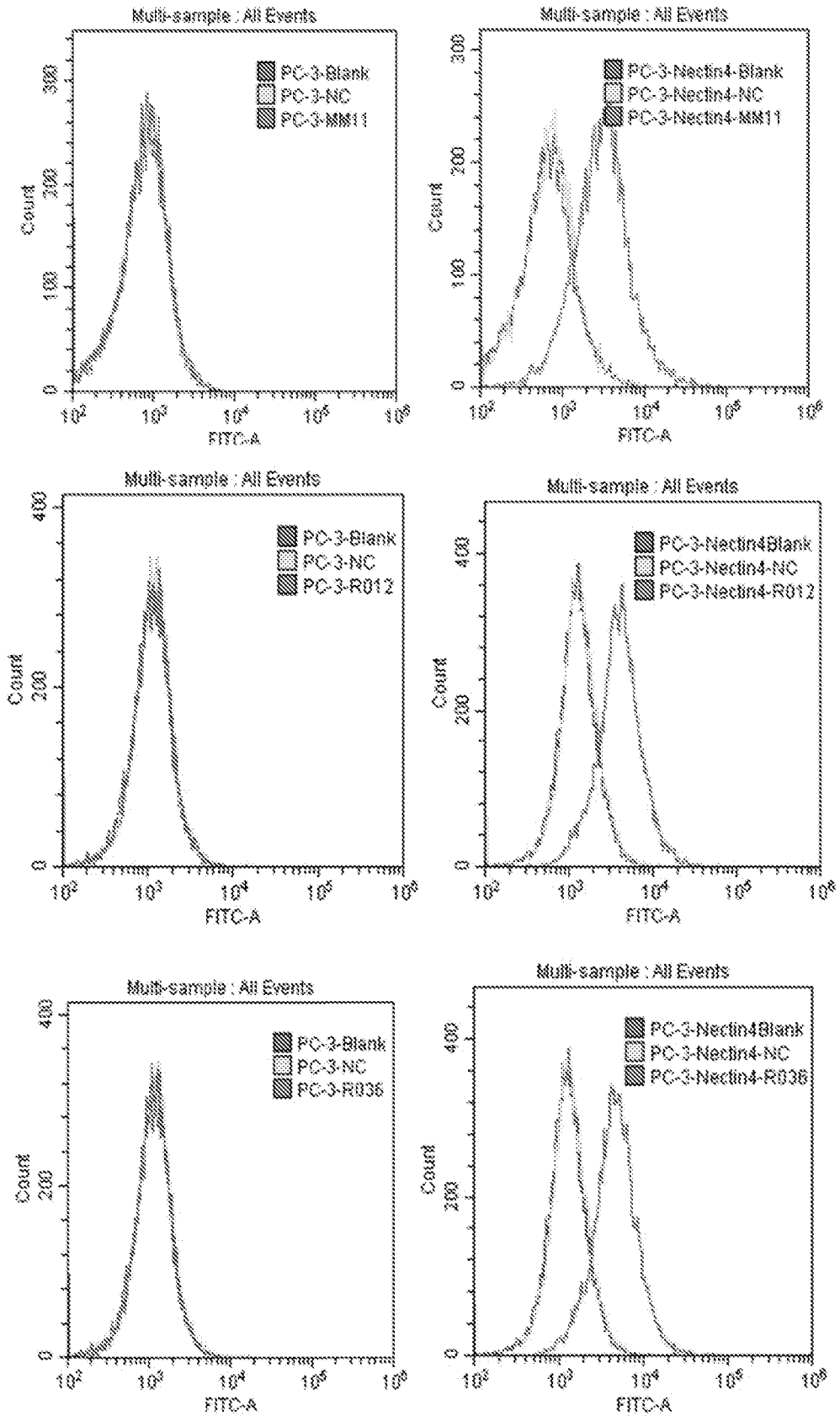


图2

Nectin-4 抗体的 Western 印迹法测试结果

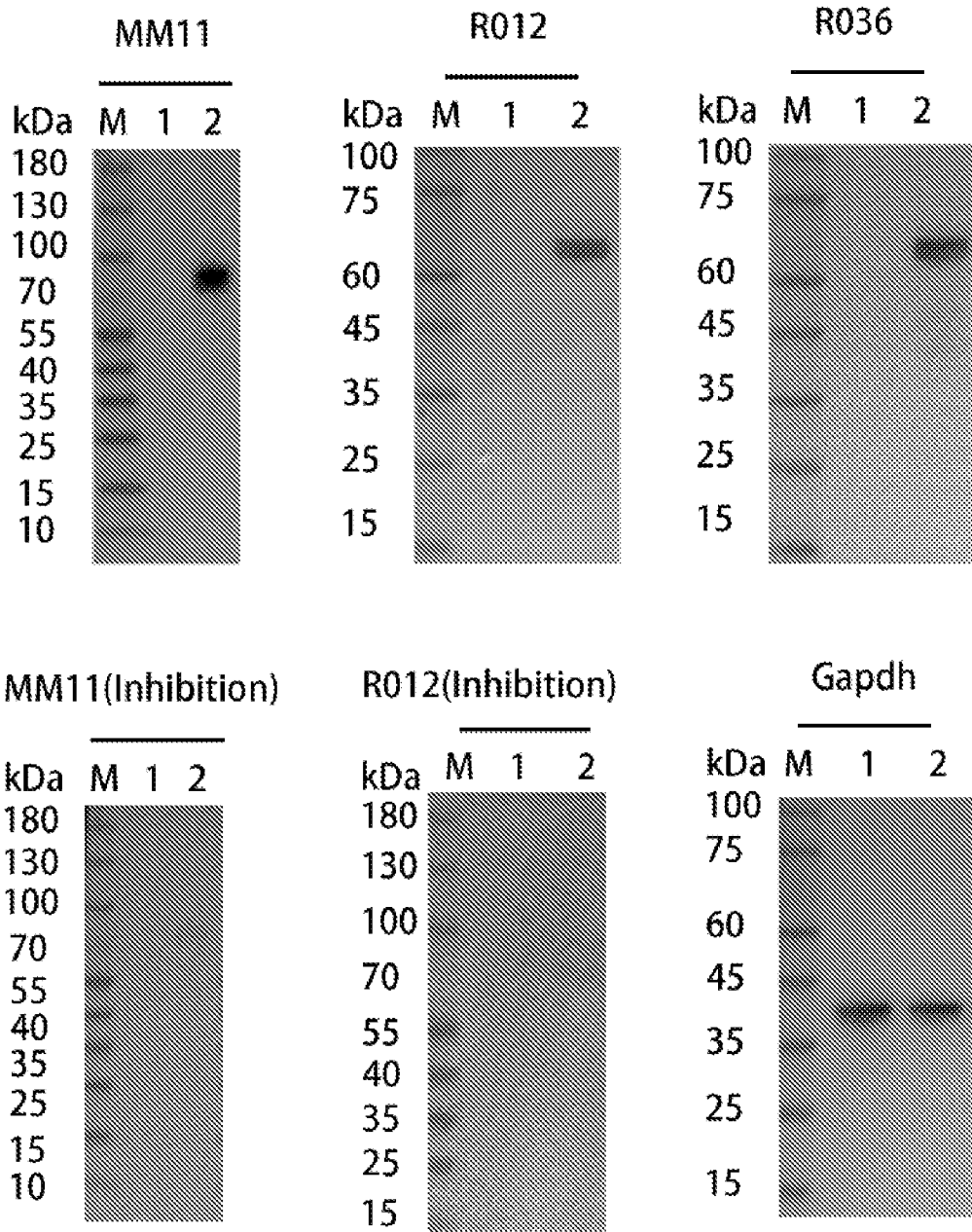


图 3

Nectin-4 兔单抗在具有代表性的正常人组织上免疫组织化学染色结果

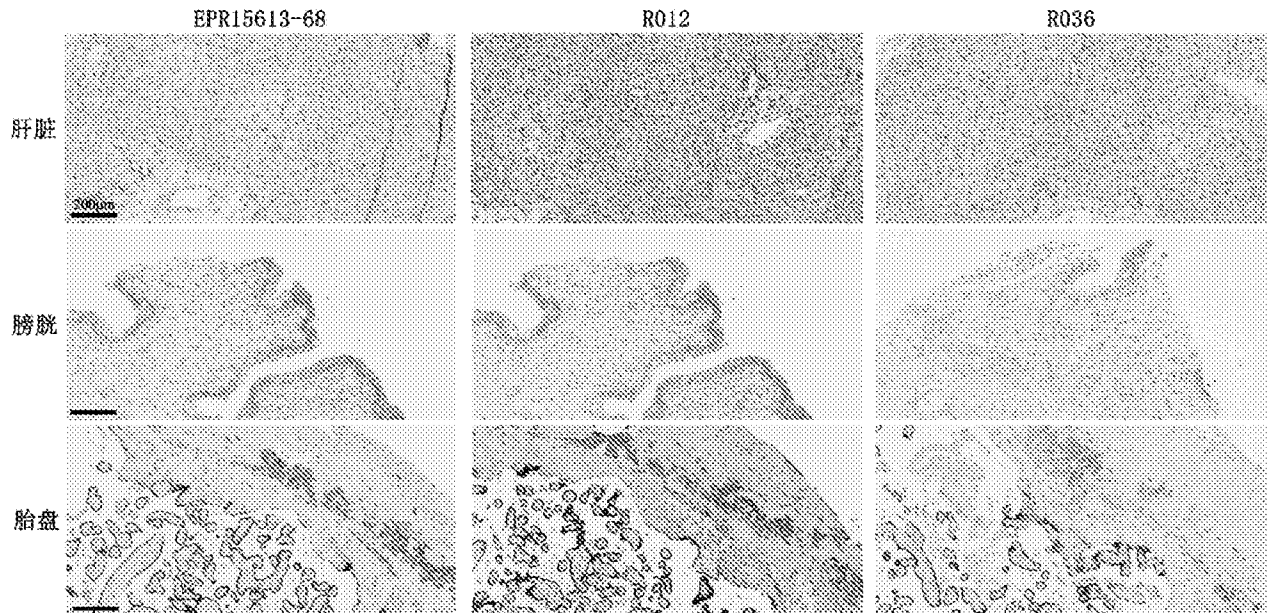


图 4

Nectin-4 兔单抗在人体膀胱癌组织上免疫组织化学染色结果

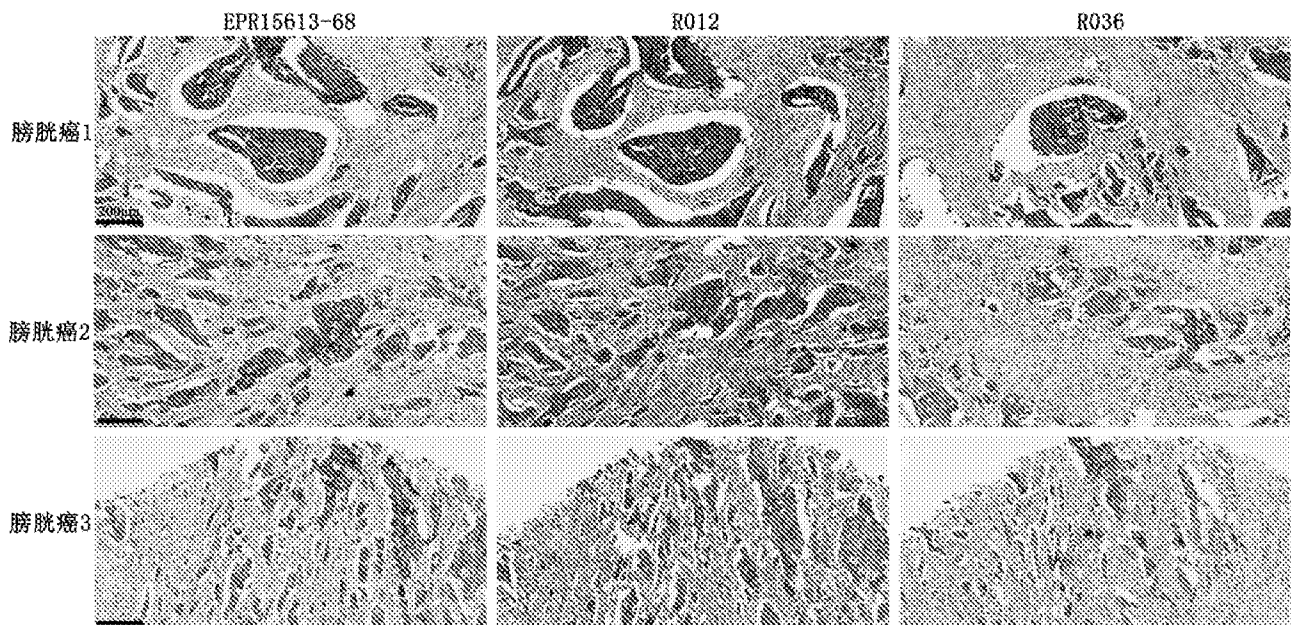


图 5

Nectin-4 兔单抗在人体肺癌组织上免疫组织化学染色结果

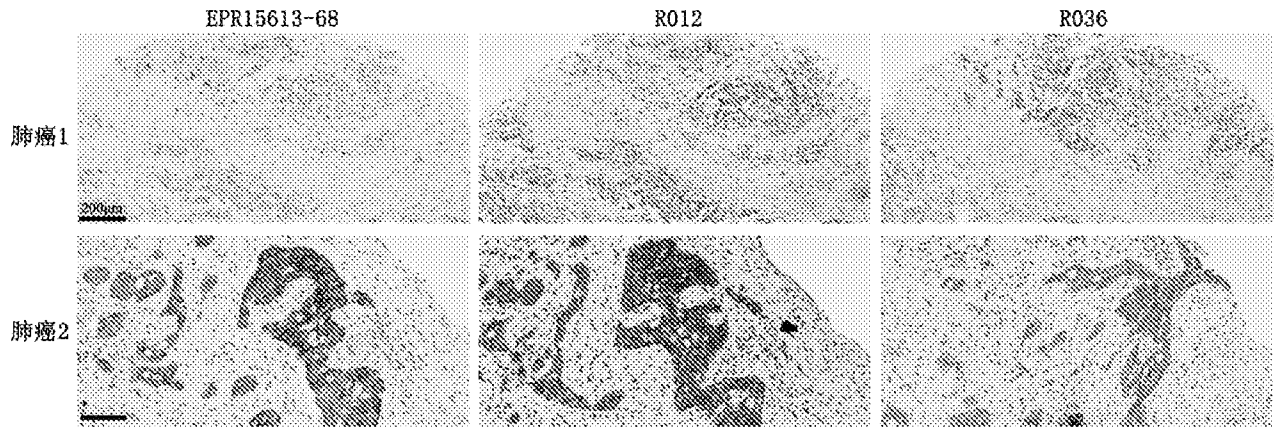


图 6

Nectin-4 兔单抗在人体乳腺癌组织上免疫组织化学染色结果

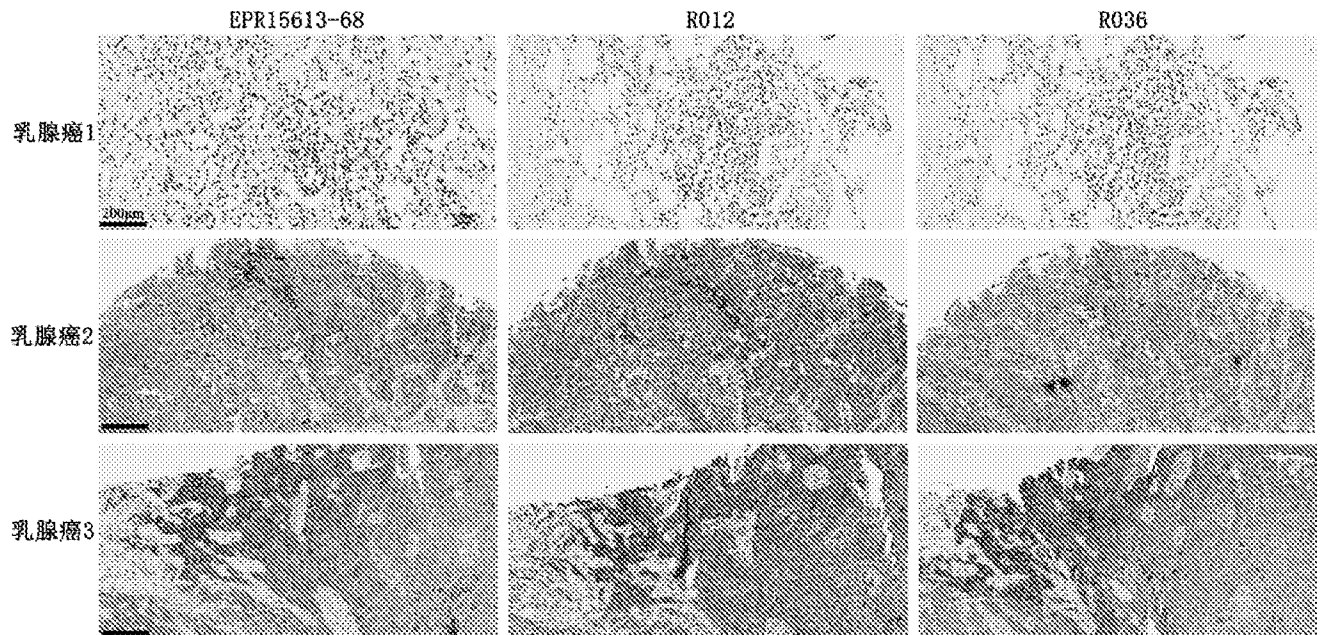


图 7

Nectin-4 鼠单抗在具有代表性的正常人组织上免疫组织化学染色结果

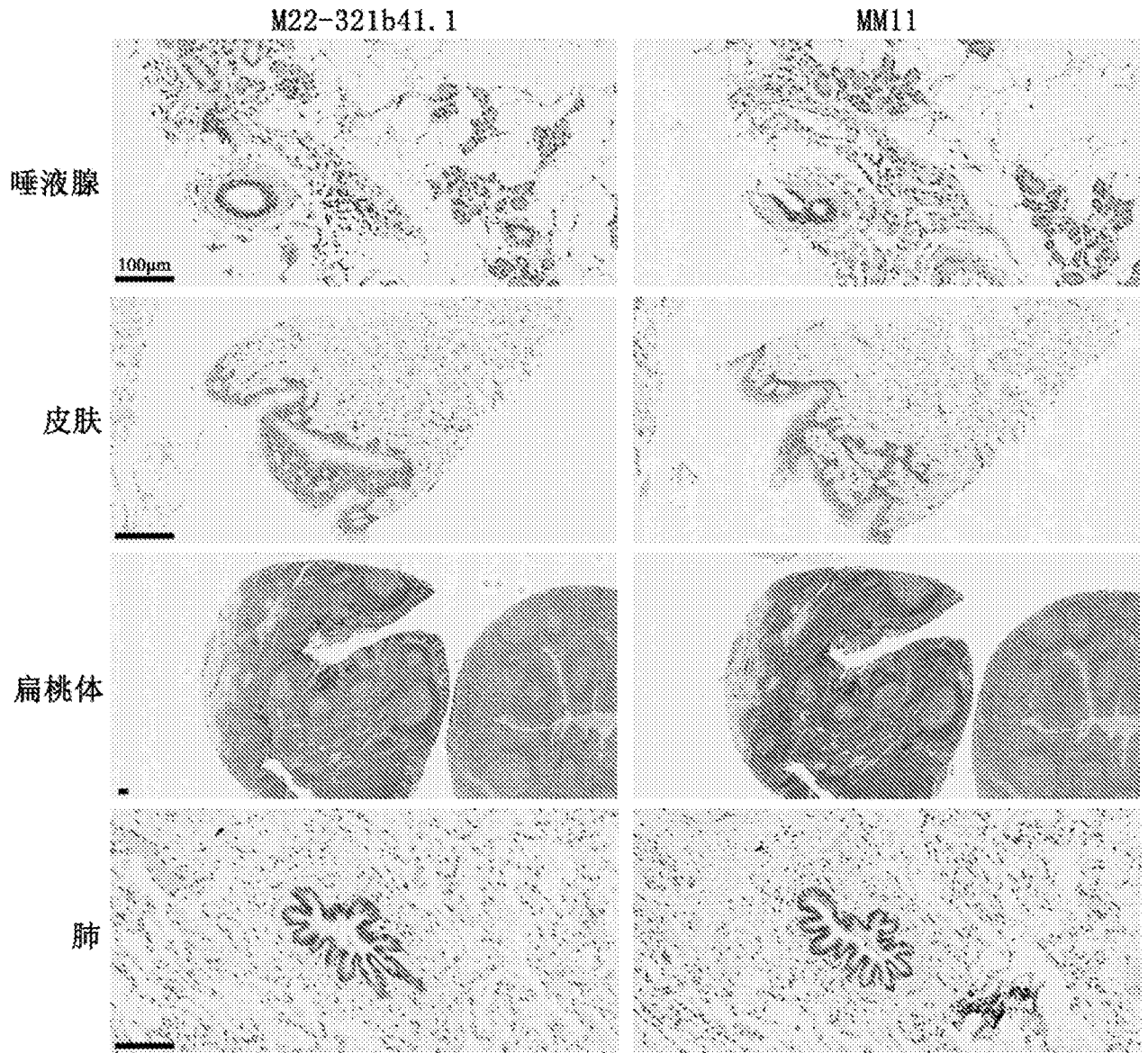


图 8

Nectin-4 鼠单抗在人体前列腺癌组织上免疫组织化学染色结果

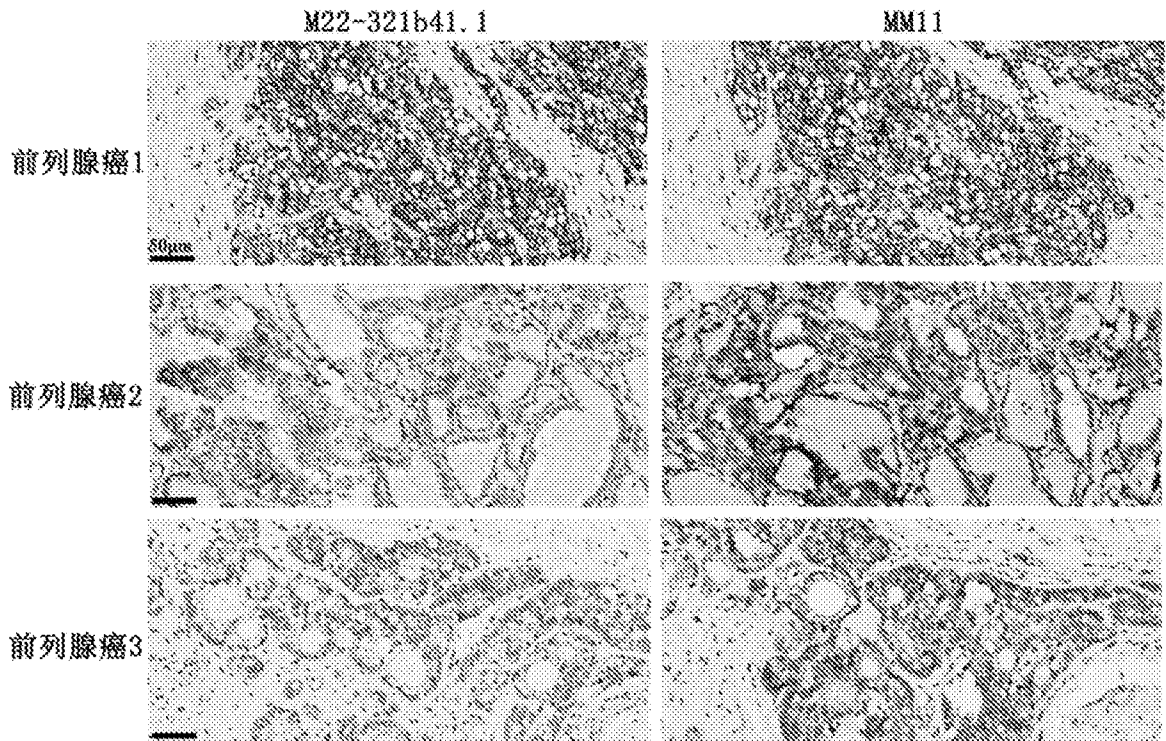


图 9

Nectin-4 鼠单抗在人体肺癌组织上免疫组织化学染色结果

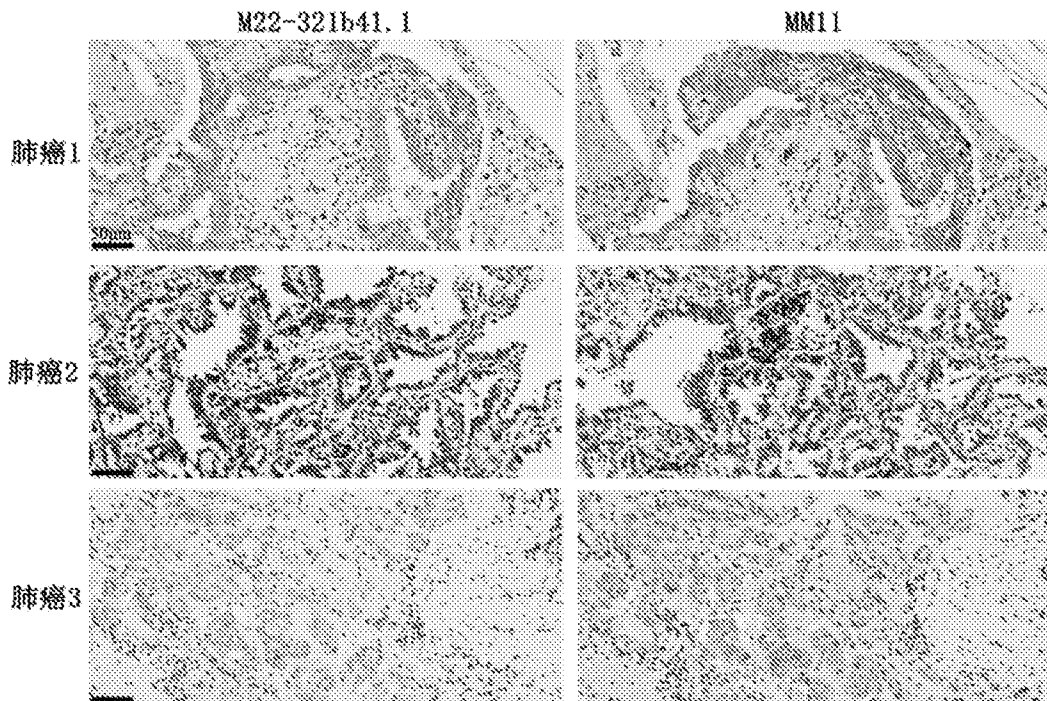


图 10

Nectin-4 鼠单抗在人体三阴性乳腺癌组织上免疫组织化学染色结果

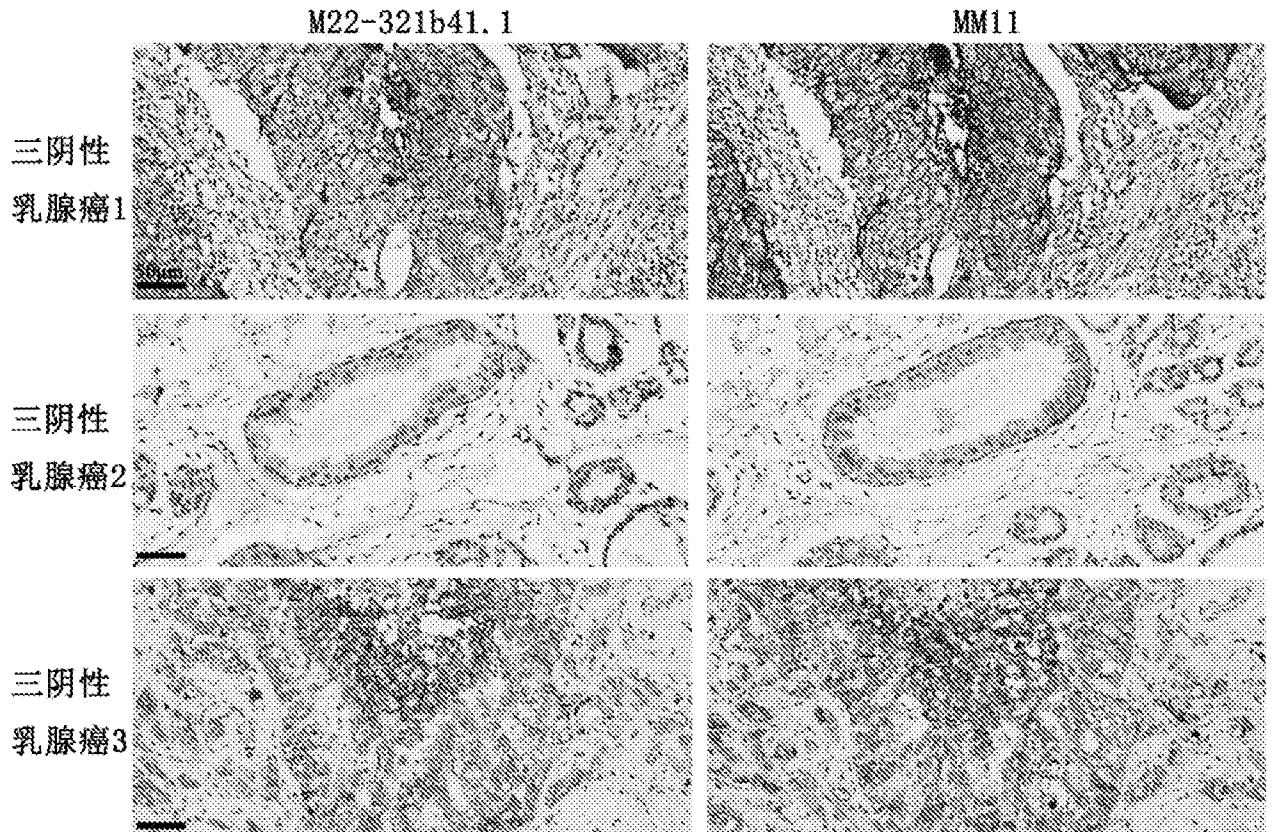


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/098089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K16/28(2006.01)i; C07K16/30(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; G01N33/53(2006.01)i; G01N33/574(2006.01)i; G01N33/577(2006.01)i; A61K39/00(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) IPC: C07K C12N 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, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, WANFANG, PUBMED, WEB OF SCIENCE, BING, GENBANK, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: nectin-4, PVRL4, 脊髓灰质炎病毒受体样分子-4, 柄蛋白-4, 粘连蛋白-4, 结合素-4, 抗体, 抗原结合片段, 单抗, antibody, 检测, 诊断, detection, diagnosis, 预后, prognosis, SEQ ID NO.1-32		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111051345 A (AGENSYS INC.) 21 April 2020 (2020-04-21) claims 1-96, and table 1	1-14
A	US 2011301056 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 08 December 2011 (2011-12-08) claims 1-45	1-14
A	WO 2022207822 A1 (EMERGENCE THERAPEUTICS AG et al.) 06 October 2022 (2022-10-06) claims 1-32	1-14
A	CN 112088167 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. et al.) 15 December 2020 (2020-12-15) claims 1-37	1-14
A	CN 114514246 A (EX-MATCH UNIVERSITY et al.) 17 May 2022 (2022-05-17) claims 1-16	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 03 September 2024		Date of mailing of the international search report 11 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022228406 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 03 November 2022 (2022-11-03) claims 1-25	1-14
A	WO 2021213434 A1 (MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) 28 October 2021 (2021-10-28) claims 1-18	1-14
A	BOULEFTOUR, W. et al. "The Anti-Nectin 4: A Promising Tumor Cells Target. A Systematic Review" <i>Molecular Cancer Therapeutics</i> , Vol. 21, No. 4, 07 February 2022 (2022-02-07), pages 493-501	1-14
A	万洋洋等 (WAN, Yangyang et al.). "Nectin 4 在乳腺癌中的表达及其临床意义 (The Expression of Nectin 4 in Breast Cancer and Its Potential Role in Breast Cancer)" <i>交通医学 (Medical Journal of Communications)</i> , Vol. 35, No. 1, 31 December 2021 (2021-12-31), pages 13-16	1-14
A	郭明海等 (GUO, Minghai et al.). "结合素4与恶性肿瘤关系的研究进展 (Research on the Relationship between Nectin-4 and Cancer)" <i>中国医药导报 (China Medical Herald)</i> , Vol. 9, No. 9, 31 March 2012 (2012-03-31), pages 9-10 and 21	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/098089

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.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/098089

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
CN	111051345	A	21 April 2020	CA	3065514	A1	13 December 2018				
				MX	2019014318	A	13 August 2020				
				WO	2018226578	A1	13 December 2018				
				WO	2018226578	A8	31 May 2019				
				RU	2019144030	A	09 July 2021				
				RU	2019144030	A3	28 December 2021				
				KR	20200024788	A	09 March 2020				
				TW	201902922	A	16 January 2019				
				EP	3635013	A1	15 April 2020				
				EP	3635013	A4	24 February 2021				
				US	2020231670	A1	23 July 2020				
				US	11292837	B2	05 April 2022				
				JP	2020522261	A	30 July 2020				
				JP	7168590	B2	09 November 2022				
				BR	112019025513	A2	23 June 2020				

				US	2011301056	A1	08 December 2011	WO	2010067487	A1	17 June 2010
EP	2373794	A1	12 October 2011								
EP	2373794	A4	05 September 2012								
JP	2012511305	A	24 May 2012								

WO	2022207822	A1	06 October 2022	JP	2024520188	A	22 May 2024				
				EP	4314057	A1	07 February 2024				
				ECSP	23073625	A	29 February 2024				
				CR	20230469	A	30 November 2023				
				AU	2022248735	A1	03 August 2023				
				ECSP	23073436	A	29 February 2024				
				CO	2023012821	A2	26 February 2024				
				US	2024181075	A1	06 June 2024				
				BR	112023017728	A2	21 November 2023				
				DOP	2023000214	A	30 April 2024				
				PE	20240725	A1	15 April 2024				
				KR	20240035378	A	15 March 2024				
				PE	20240724	A1	15 April 2024				
				EP	4262988	A1	25 October 2023				
				CR	20230470	A	30 November 2023				
				BR	112023019749	A2	23 January 2024				
				JP	2024515536	A	10 April 2024				
				US	2024173424	A1	30 May 2024				
				IL	305954	A	01 November 2023				
				DOP	2023000213	A	30 April 2024				
				CL	2023002909	A1	10 May 2024				
				WO	2022207825	A1	06 October 2022				
				CL	2023002907	A1	10 May 2024				
				MX	2023011563	A	08 February 2024				
				IL	305951	A	01 November 2023				
				KR	20240028330	A	05 March 2024				
				CO	2023012828	A2	15 February 2024				
				MX	2023011561	A	08 February 2024				
				US	2024034791	A1	01 February 2024				
				US	12049500	B2	30 July 2024				
CA	3212651	A1	06 October 2022								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/098089

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				AU 2022250867 A1	03 August 2023
				WO 2022207828 A1	06 October 2022
				CA 3212655 A1	06 October 2022
CN	112088167	A	15 December 2020	JP 2024088696 A	02 July 2024
				JP 2021522801 A	02 September 2021
				US 2021130459 A1	06 May 2021
				WO 2019215728 A1	14 November 2019
				CA 3097679 A1	14 November 2019
				KR 20210009308 A	26 January 2021
				AU 2019264965 A1	19 November 2020
				IL 277858 A	30 November 2020
				EP 3790900 A1	17 March 2021
CN	114514246	A	17 May 2022	US 2023183337 A1	15 June 2023
				JP 2022551537 A	09 December 2022
				AU 2020364959 A1	07 April 2022
				IL 291966 A	01 June 2022
				KR 20220079614 A	13 June 2022
				WO 2021069508 A1	15 April 2021
				CA 3156451 A1	15 April 2021
				EP 4041765 A1	17 August 2022
WO	2022228406	A1	03 November 2022	EP 4332117 A1	06 March 2024
				BR 112023022098 A2	19 December 2023
				JP 2024515342 A	09 April 2024
				TW 202302649 A	16 January 2023
				KR 20240000532 A	02 January 2024
				AU 2022266934 A1	26 October 2023
				CA 3218512 A1	03 November 2022
				US 2024269307 A1	15 August 2024
				MX 2023012456 A	31 October 2023
WO	2021213434	A1	28 October 2021	BR 112022021322 A2	06 December 2022
				CA 3176385 A1	28 October 2021
				EP 4141029 A1	01 March 2023
				EP 4141029 A4	07 August 2024
				US 2023265183 A1	24 August 2023
				MX 2022013163 A	30 November 2022
				AU 2021260639 A1	08 December 2022
				KR 20230007406 A	12 January 2023
				JP 2023522229 A	29 May 2023

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K16/28(2006.01)i; C07K16/30(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; G01N33/53(2006.01)i; G01N33/574(2006.01)i; G01N33/577(2006.01)i; A61K39/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C07K C12N G01N A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS,CNXTX,ENTXT,ENTXTC,WOTXT,EPTXT,USTXT,CNKI,万方,PUBMED,WEB OF SCIENCE,BING, GENBANK,EMBL,STN,中国专利生物序列检索系统,nectin-4, PVRL4, 脊髓灰质炎病毒受体样分子-4, 柄蛋白-4, 粘连蛋白-4, 结合素-4, 抗体, 抗原结合片段, 单抗, antibody, 检测, 诊断, detection, diagnosis, 预后, prognosis, SEQ ID NO.1-32</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 111051345 A (艾斯司股份有限公司) 2020年4月21日 (2020 - 04 - 21) 权利要求1-96, 表1</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011301056 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2011年12月8日 (2011 - 12 - 08) 权利要求1-45</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2022207822 A1 (EMERGENCE THERAPEUTICS AG 等) 2022年10月6日 (2022 - 10 - 06) 权利要求1-32</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112088167 A (耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展有限公司 等) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 权利要求1-37</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 114514246 A (埃克斯-马赛大学 等) 2022年5月17日 (2022 - 05 - 17) 权利要求1-16</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 111051345 A (艾斯司股份有限公司) 2020年4月21日 (2020 - 04 - 21) 权利要求1-96, 表1	1-14	A	US 2011301056 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2011年12月8日 (2011 - 12 - 08) 权利要求1-45	1-14	A	WO 2022207822 A1 (EMERGENCE THERAPEUTICS AG 等) 2022年10月6日 (2022 - 10 - 06) 权利要求1-32	1-14	A	CN 112088167 A (耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展有限公司 等) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 权利要求1-37	1-14	A	CN 114514246 A (埃克斯-马赛大学 等) 2022年5月17日 (2022 - 05 - 17) 权利要求1-16	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 111051345 A (艾斯司股份有限公司) 2020年4月21日 (2020 - 04 - 21) 权利要求1-96, 表1	1-14																		
A	US 2011301056 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2011年12月8日 (2011 - 12 - 08) 权利要求1-45	1-14																		
A	WO 2022207822 A1 (EMERGENCE THERAPEUTICS AG 等) 2022年10月6日 (2022 - 10 - 06) 权利要求1-32	1-14																		
A	CN 112088167 A (耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展有限公司 等) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 权利要求1-37	1-14																		
A	CN 114514246 A (埃克斯-马赛大学 等) 2022年5月17日 (2022 - 05 - 17) 权利要求1-16	1-14																		
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2024年9月3日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2024年9月11日</p>																			
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>	<p>授权官员</p> <p>蔡玉品</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961968</p>																			

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	WO 2022228406 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司 等) 2022年11月3日 (2022 - 11 - 03) 权利要求1-25	1-14
A	WO 2021213434 A1 (迈威 (上海) 生物科技股份有限公司) 2021年10月28日 (2021 - 10 - 28) 权利要求1-18	1-14
A	BOULEFTOUR, W. 等. "The Anti-Nectin 4: A Promising Tumor Cells Target. A Systematic Review" Mol Cancer Ther, 第21卷, 第4期, 2022年2月7日 (2022 - 02 - 07), 第493-501页	1-14
A	万洋洋 等. "Nectin 4 在乳腺癌中的表达及其临床意义" 交通医学, 第35卷, 第1期, 2021年12月31日 (2021 - 12 - 31), 第13-16页	1-14
A	郭明海 等. "结合素4 与恶性肿瘤关系的研究进展" 中国医药导报, 第9卷, 第9期, 2012年3月31日 (2012 - 03 - 31), 第9-10,21页	1-14

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列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
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/CN2024/098089

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)
CN 111051345 A	2020年4月21日	CA 3065514 A1	2018年12月13日
		MX 2019014318 A	2020年8月13日
		WO 2018226578 A1	2018年12月13日
		WO 2018226578 A8	2019年5月31日
		RU 2019144030 A	2021年7月9日
		RU 2019144030 A3	2021年12月28日
		KR 20200024788 A	2020年3月9日
		TW 201902922 A	2019年1月16日
		EP 3635013 A1	2020年4月15日
		EP 3635013 A4	2021年2月24日
		US 2020231670 A1	2020年7月23日
		US 11292837 B2	2022年4月5日
		JP 2020522261 A	2020年7月30日
		JP 7168590 B2	2022年11月9日
		BR 112019025513 A2	2020年6月23日
US 2011301056 A1	2011年12月8日	WO 2010067487 A1	2010年6月17日
		EP 2373794 A1	2011年10月12日
		EP 2373794 A4	2012年9月5日
		JP 2012511305 A	2012年5月24日
WO 2022207822 A1	2022年10月6日	JP 2024520188 A	2024年5月22日
		EP 4314057 A1	2024年2月7日
		ECSP 23073625 A	2024年2月29日
		CR 20230469 A	2023年11月30日
		AU 2022248735 A1	2023年8月3日
		ECSP 23073436 A	2024年2月29日
		CO 2023012821 A2	2024年2月26日
		US 2024181075 A1	2024年6月6日
		BR 112023017728 A2	2023年11月21日
		DOP 2023000214 A	2024年4月30日
		PE 20240725 A1	2024年4月15日
		KR 20240035378 A	2024年3月15日
		PE 20240724 A1	2024年4月15日
		EP 4262988 A1	2023年10月25日
		CR 20230470 A	2023年11月30日
		BR 112023019749 A2	2024年1月23日
		JP 2024515536 A	2024年4月10日
		US 2024173424 A1	2024年5月30日
		IL 305954 A	2023年11月1日
		DOP 2023000213 A	2024年4月30日
		CL 2023002909 A1	2024年5月10日
		WO 2022207825 A1	2022年10月6日
		CL 2023002907 A1	2024年5月10日
		MX 2023011563 A	2024年2月8日
		IL 305951 A	2023年11月1日
		KR 20240028330 A	2024年3月5日
		CO 2023012828 A2	2024年2月15日
		MX 2023011561 A	2024年2月8日
		US 2024034791 A1	2024年2月1日
		US 12049500 B2	2024年7月30日
		CA 3212651 A1	2022年10月6日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/098089

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)
				AU	2022250867	A1	2023年8月3日
				WO	2022207828	A1	2022年10月6日
				CA	3212655	A1	2022年10月6日
CN	112088167	A	2020年12月15日	JP	2024088696	A	2024年7月2日
				JP	2021522801	A	2021年9月2日
				US	2021130459	A1	2021年5月6日
				WO	2019215728	A1	2019年11月14日
				CA	3097679	A1	2019年11月14日
				KR	20210009308	A	2021年1月26日
				AU	2019264965	A1	2020年11月19日
				IL	277858	A	2020年11月30日
				EP	3790900	A1	2021年3月17日
CN	114514246	A	2022年5月17日	US	2023183337	A1	2023年6月15日
				JP	2022551537	A	2022年12月9日
				AU	2020364959	A1	2022年4月7日
				IL	291966	A	2022年6月1日
				KR	20220079614	A	2022年6月13日
				WO	2021069508	A1	2021年4月15日
				CA	3156451	A1	2021年4月15日
				EP	4041765	A1	2022年8月17日
WO	2022228406	A1	2022年11月3日	EP	4332117	A1	2024年3月6日
				BR	112023022098	A2	2023年12月19日
				JP	2024515342	A	2024年4月9日
				TW	202302649	A	2023年1月16日
				KR	20240000532	A	2024年1月2日
				AU	2022266934	A1	2023年10月26日
				CA	3218512	A1	2022年11月3日
				US	2024269307	A1	2024年8月15日
				MX	2023012456	A	2023年10月31日
WO	2021213434	A1	2021年10月28日	BR	112022021322	A2	2022年12月6日
				CA	3176385	A1	2021年10月28日
				EP	4141029	A1	2023年3月1日
				EP	4141029	A4	2024年8月7日
				US	2023265183	A1	2023年8月24日
				MX	2022013163	A	2022年11月30日
				AU	2021260639	A1	2022年12月8日
				KR	20230007406	A	2023年1月12日
				JP	2023522229	A	2023年5月29日