



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103275220 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201310167446. 9

(22) 申请日 2008. 03. 31

(30) 优先权数据

60/909, 580 2007. 04. 02 US

60/948, 564 2007. 07. 09 US

(62) 分案原申请数据

200880018310. 9 2008. 03. 31

(73) 专利权人 菲洛根股份公司

地址 意大利锡耶纳

(72) 发明人 达里奥·内里 雅舍·雷巴克

克里斯托夫·勒斯利

亚历山德拉·维拉 乔瓦尼·内里

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
11240

代理人 余刚 张英

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

A61K 47/42(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1612895 A, 2005. 05. 04,

EP 0399271 A3, 1992. 01. 02,

Laura B. 等. Preparation of Phage
Antibodies to the ED-A Domain of
Human Fibronectin. 《Experimental Cell
Research》. 1998, 第 240 卷第 244-251 页.

Stefania S. 等. Expression of ED-A/
EDB isoforms of fibronectin in papillary
carcinoma of the thyroid. 《Journal of
Pathology》. 1999, 第 188 卷 (第 2 期), 第
163-167 页.

审查员 马静

权利要求书1页 说明书35页

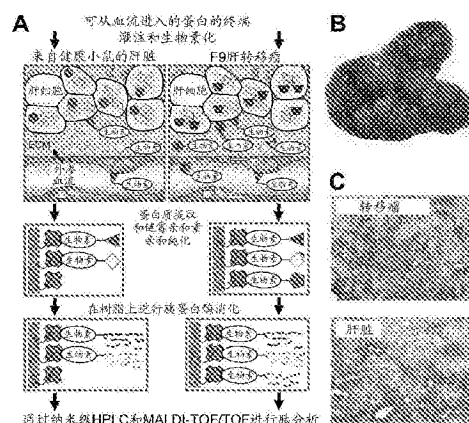
序列表49页 附图6页

(54) 发明名称

与肿瘤转移的新生血管有关的纤连蛋白的
ED-A 抗原

(57) 摘要

本发明提供与肿瘤转移的新生血管有关的纤连蛋白的 ED-A 抗原。本发明涉及一种结合成员，其结合纤连蛋白的额外结构域 -A(ED-A) 同种型，用于治疗肿瘤转移瘤。特别地，本发明涉及一种结合纤连蛋白的额外结构域 -A(ED-A) 同种型和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的结合成员，其中所述抗体包含 :SEQ ID NO :81 中示出的 VH 结构域，除了 VH 结构域的位置 5 处的氨基酸是亮氨酸残基 (L) 而不是缬氨酸残基 (V) ; 和 / 或 SEQ ID NO :82 中示出的 VL 结构域，除了 VL 结构域的位置 18 处的氨基酸是精氨酸残基 (R) 而不是赖氨酸残基 (K)。



1. 一种结合纤连蛋白的额外结构域 -A (ED-A) 的抗体, 其中所述抗体包含 :VH 结构域, 其中所述 VH 结构域的氨基酸序列如在 SEQ ID NO:81 中列出, 除了所述 VH 结构域的位置 5 处的氨基酸是亮氨酸残基 (L) 而不是缬氨酸残基 (V) ;和 VL 结构域, 其中所述 VL 结构域如在 SEQ ID NO:82 的氨基酸 1-108 中列出, 除了所述 VL 结构域的位置 18 处的氨基酸是精氨酸残基 (R) 而不是赖氨酸残基 (K)。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体, 其中, 所述抗体包含单链 Fv, 或者所述抗体是双价抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体, 其中, 所述抗体结合于可检测标记。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体, 其中, 所述抗体结合于具有杀生物活性或细胞毒活性的分子, 或者结合于放射性同位素。

5. 根据权利要求 1 所述的抗体, 其中, 所述抗体结合于细胞因子。

6. 根据权利要求 5 所述的抗体, 其中, 所述抗体经由肽键结合于细胞因子。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的抗体, 其中, 所述抗体为所述细胞因子和所述抗体的融合蛋白形式。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体, 其中, 所述抗体结合于毒素或酶。

9. 根据权利要求 8 所述的抗体, 其中, 所述毒素或酶经由肽键或接头结合于所述抗体。

10. 根据权利要求 4 所述的抗体, 其中, 所述抗体经由肽键结合于具有杀生物活性或细胞毒活性的分子。

11. 根据权利要求 4 所述的抗体, 其中, 所述抗体为所述具有杀生物活性或细胞毒活性的分子和所述抗体的融合蛋白形式。

12. 一种分离的核酸, 编码权利要求 1 至 11 中任一项所述的抗体。

13. 一种宿主细胞, 包含权利要求 12 所述的核酸。

14. 一种生产权利要求 1 至 11 中任一项所述的抗体的方法, 所述方法包括在用于生产的条件下培养权利要求 13 所述的宿主细胞。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 进一步包括分离和 / 或纯化所述抗体。

16. 权利要求 1 或 2 所述的抗体用来制备药剂的应用, 所述药剂用于治疗肿瘤转移, 其中所述抗体结合于具有杀生物活性或细胞毒活性的分子, 或者结合于放射性同位素。

17. 权利要求 1 或 2 所述的抗体用来制备药剂的应用, 所述药剂用于将结合于所述抗体的分子递送至肿瘤转移的新生血管。

18. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体用来制备用于诊断肿瘤转移的诊断产品的应用。

19. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体用来制备药剂的应用, 所述药剂用于检测或诊断人或动物中的肿瘤转移。

与肿瘤转移的新生血管有关的纤连蛋白的 ED-A 抗原

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 3 月 31 日的题为“与肿瘤转移的新生血管有关的纤连蛋白的 ED-A 抗原”的中国专利申请 No. 200880018310.9 的分案申请

技术领域

[0002] 本发明涉及转移瘤的检测和治疗,即在不同于原发性肿瘤的部位产生的继发性肿瘤的检测和治疗。本发明涉及一种结合于纤连蛋白的 ED-A 同种型(isoform)的结合成员的应用,尤其是结合于纤连蛋白的结构域 ED-A 的结合成员。

背景技术

[0003] 大多数与癌症有关的死亡涉及疾病的转移扩散(Hanahan and Weinberg 2000)并且有活力的新生血管是侵袭性肿瘤转移瘤的特征。

[0004] 肿瘤分为良性肿瘤或恶性肿瘤。恶性肿瘤能够从原发性部位(原发性肿瘤)扩散到身体的其它部位,而良性肿瘤则不能扩散。恶性肿瘤可以通过侵袭和转移自它们的原发性部位扩散。由于转移而形成的肿瘤被称作,例如,转移瘤、继发性肿瘤、转移性病变或转移性病灶。

[0005] 血管生成描述了新血管从现有血管的生长。肿瘤可以通过分泌各种生长因子(例如血管内皮生长因子)而诱导血管生成。肿瘤血管生成使得肿瘤可以生长超过几毫米的直径并且还是肿瘤转移的先决条件。由于血管生成而形成的新血管会形成肿瘤或肿瘤转移瘤的新生血管。

[0006] 纤连蛋白(FN)是一种糖蛋白并且在各种正常组织和体液中广泛表达。它是细胞外基质(ECM)的一种成分,并在许多生物学过程中发挥作用,其中上述生物过程包括细胞粘附、细胞迁移、止血、血栓形成、伤口愈合、组织分化以及致癌性转化。

[0007] 不同的 FN 同种型是通过初级转录物 FN 前 mRNA 的三个区域(ED-A、ED-B、IIICS)的可变剪接而产生的,是一种通过细胞因子和细胞外 pH 值来调节的过程(Balza1988; Carnemolla 1989;Borsi 1990;Borsi 1995)。纤连蛋白包含两种可以经受可变剪接的 III 型球状额外结构域:ED-A 和 ED-B(French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar et al. 2006)。小鼠纤连蛋白和人纤连蛋白的 ED-A 的 96.7%是相同的(在两个 90 个氨基酸的序列之间仅 3 个氨基酸不同,参见图 5)。

[0008] 已报道了在 mRNA 水平(参见例如, Jacobs et al. 2002, Matsumoto et al. 1999, Oyama et al. 1989, Tavian et al. 1994)、在分离蛋白的水平(Borsi et al. 1987)以及在免疫组织化学水平(Borsi et al. 1998, Heikmheimo et al. 1991, Koukoulis et al. 1993, Koukoulis et al. 1995, Lohi et al. 1995, Scarpino et al. 1999),纤连蛋白的 ED-A 在肿瘤细胞和实体肿瘤中的表达。Borsi et al., 1998, Exp Cell Res, 240, 244-251 也已报道了 ED-A 存在于原发性肿瘤的新血管中。然而,先前并没有指出 ED-A 与肿瘤转移的新血管有关。

[0009] 我们在本文中表明,纤连蛋白的 ED-A 在肿瘤转移瘤的新生血管中选择性地表

达。因为肿瘤血管容易受到静脉给予的治疗剂的作用 (Neri 和 Bicknell 2005, Rybak et al. 2006, Thorpe 2004, Trachsel 和 Neri 2006), 所以例如结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的抗体分子的结合分子代表新型制剂, 其可以用于制备用来治疗一种和 / 或多种肿瘤转移瘤的药物。肿瘤新血管 (肿瘤血管靶向) 的疗法是一种用于治疗肿瘤转移瘤的有前途的方法。肿瘤血管靶向的目的是破坏肿瘤本身内的血管, 减少血流量以使肿瘤丧失氧和营养物, 从而引起肿瘤细胞死亡。

发明内容

[0010] 本发明提供了抗 ED-A 抗体, 其选择性地识别肿瘤转移瘤的新形成血管。

[0011] 本发明在一个方面涉及结合纤连蛋白的额外结构域 -A (ED-A) 同种型 (A-FN) 的结合成员 (例如抗体分子) 在用于制备用来治疗一种和 / 或多种肿瘤转移瘤的药剂中的应用。在另一个方面, 本发明涉及结合纤连蛋白的 ED-A 的结合成员 (例如抗体分子) 在用于制备用来治疗一种和 / 或多种肿瘤转移瘤的药剂中的应用。

[0012] 在又一个方面, 本发明涉及结合纤连蛋白的 ED-A 同种型的结合成员 (例如抗体分子) 用于将结合 (共轭或轭合) 于该结合成员的分子递送到肿瘤转移瘤的新生血管的应用。在另一个方面, 本发明涉及结合纤连蛋白的 ED-A 的结合成员 (例如抗体分子) 用于将结合 (共轭或轭合) 于该结合成员的分子递送到肿瘤转移瘤的新生血管的应用。在其他的方面, 该结合成员可以用于制备用来递送上述分子的药剂。

[0013] 在另一个方面, 本发明涉及结合纤连蛋白的 ED-A 同种型的结合成员 (例如抗体分子) 用于制备用于诊断肿瘤转移瘤的诊断产品的应用。在另一个方面, 本发明涉及结合纤连蛋白的 ED-A 的结合成员 (例如抗体分子) 用于制备用于诊断肿瘤转移瘤的诊断产品的应用。

[0014] 本发明在一个方面还涉及在人或动物体内检测或诊断肿瘤转移瘤的方法, 包括以下步骤:

[0015] (a) 对人或动物给予结合成员, 例如结合纤连蛋白的 ED-A 同种型的抗体分子, 以及

[0016] (b) 确定在人或动物体内在远离由原发性肿瘤目前或以前占据部位的部位存在或不存在该结合成员;

[0017] 其中, 在人或动物体内结合成员定位于远离目前或以前由原发性肿瘤占据部位的部位表明了肿瘤转移瘤的存在。

[0018] 本发明在另一个方面涉及在人或动物体内检测或诊断肿瘤转移瘤的方法, 包括以下步骤:

[0019] (a) 对人或动物给予结合成员, 例如结合纤连蛋白的 ED-A 的抗体分子, 以及

[0020] (b) 确定在人或动物体内在远离由原发性肿瘤目前或以前占据部位的部位存在或不存在该结合成员;

[0021] 其中, 在人或动物中结合成员定位于远离目前或以前由原发性肿瘤占据部位的部位表明了肿瘤转移瘤的存在。

[0022] 本发明在一个方面还涉及治疗个体体内的肿瘤转移瘤的方法, 包括给予该个体治疗有效量的包含结合纤连蛋白的 ED-A 同种型的结合成员 (例如抗体分子) 的药剂。在另

一个方面,本发明涉及治疗个体体内的肿瘤转移瘤的方法,包括给予该个体治疗有效量的包含结合纤连蛋白的 ED-A 的结合成员(例如抗体分子)的药剂。

[0023] 在另一个方面,本发明涉及在人或动物体内将分子递送到肿瘤转移瘤的新生血管的方法,包括向人或动物给予结合纤连蛋白的 ED-A 同种型的结合成员,例如抗体分子,其中该结合成员结合于上述分子。在又一个方面,本发明涉及在人或动物中将分子递送到肿瘤转移瘤的新生血管的方法,包括向人或动物给予结合纤连蛋白的 ED-A 的结合成员,例如抗体分子,其中该结合成员结合于上述分子。

[0024] 本发明的结合成员可以是结合纤连蛋白的 ED-A 同种型和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的抗体,包含抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9、或它们的变体的一个或多个互补决定区(CDR)。优选地,本发明的结合成员是结合纤连蛋白的 ED-A 同种型和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的抗体,包含抗体 B2、C5、D5、C8、F8、B7 或 G9、或它们的变体的一个或多个互补决定区(CDR)。最优选地,本发明的结合成员是结合纤连蛋白的 ED-A 同种型和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的抗体,包含抗体 F8 或其变体的一个或多个互补决定区(CDR)。

[0025] 本发明的结合成员可以包含抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9 的一组 H 和 / 或 L CDR,或在所披露的 H 和 / 或 L CDR 组中具有 10 个或更少,例如,1、2、3、4、或 5 个氨基酸置换的抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9 的一组 H 和 / 或 L CDR。优选地,本发明的结合成员包含抗体 B2、C5、D5、C8、F8、B7 或 G9 的一组 H 和 / 或 L CDR,其中在所披露的 H 和 / 或 L CDR 组中具有 10 个或更少,例如,1、2、3、4、或 5 个氨基酸置换。优选地,本发明的结合成员包含抗体 F8 的一组 H 和 / 或 L CDR,其中在所披露的 H 和 / 或 L CDR 组中具有 10 个或更少,例如,1、2、3、4、或 5 个氨基酸置换。

[0026] 可以潜在地在 CDR 组内、以及可以在 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 内的任何残基处发生置换。

[0027] 例如,本发明的结合成员可以包含一个或多个 CDR(如本文中描述的),例如,CDR3,以及可选地 CDR1 和 CDR2,以形成一组 CDR。

[0028] 本发明的结合成员还可以包含抗体分子,例如人抗体分子。结合成员通常包含抗体 VH 和 / 或 VL 结构域。作为本发明的一部分,还提供了结合成员的 VH 结构域。在每个 VH 和 VL 结构域内有互补决定区("CDR")、以及骨架区("FR")。VH 结构域包含一组 HCDR,而 VL 结构域包含一组 LCDR。抗体分子可以包含抗体 VH 结构域,抗体 VH 结构域包含 VH CDR1、CDR2 和 CDR3,以及骨架。它可以可替换地或还包括抗体 VL 结构域,抗体 VL 结构域包含 VL CDR1、CDR2 和 CDR3,以及骨架。本文描述了抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 的 VH 和 VL 结构域和 CDR。本文披露的所有 VH 和 VL 序列、CDR 序列、CDR 组、HCDR 组以及 LCDR 组是供本发明之用的结合成员的方面和实施方式。如本文所描述的,"CDR 组"包括 CDR1、CDR2 以及 CDR3。因此,一组 HCDR 是指 HCDR1、HCDR2 以及 HCDR3,而一组 LCDR 是指 LCDR1、LCDR2 以及 LCDR3。除非另有说明,"CDR 组"包括 HCDR 和 LCDR。

[0029] 本发明的结合成员可以包括抗体 VH 结构域,该抗体 VH 结构域包含互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,以及骨架,其中 HCDR1 是 SEQ ID NO :3、23、33、43、53、63、73、83、93、103 或 113,以及其中可选地 HCDR2 是 SEQ ID NO :4 和 / 或 HCDR3 是 SEQ ID NO :5。优选地, HCDR1 是 SEQ ID NO :23、33、43、53、73、83 或 103。最优选地, HCDR1 是 SEQ ID NO :83。

[0030] 通常,VH 结构域与 VL 结构域配对以提供抗体抗原结合位点,虽然如下文进一步描

述的, VH 或 VL 结构域可以单独地用来结合抗原。因此, 本发明的结合成员可以进一步包括抗体 VL 结构域, 该抗体 VL 结构域包含互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 以及骨架, 其中 LCDR1 是 SEQ ID NO :6、26、36、46、56、66、76、86、96、106 或 116, 以及其中可选地 LCDR2 是 SEQ ID NO :7 和 / 或 LCDR3 是 SEQ ID NO :8。优选地, LCDR1 是 SEQ ID NO :26、36、46、56、76、86 或 106。最优选地, LCDR1 是 SEQ ID NO :86。

[0031] 在一个方面, 本发明的结合成员是纤连蛋白的 ED-A 的分离的抗体分子, 其包括 VH 结构域和 VL 结构域, 其中 VH 结构域包括骨架和一组互补决定区 HCDR1、HCDR2 以及 HCDR3, 并且其中 VL 结构域包括互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 以及骨架, 以及其中

[0032] HCDR1 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :3、23、33、43、53、63、73、83、93、103 或 113,

[0033] HCDR2 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :4,

[0034] HCDR3 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :5,

[0035] LCDR1 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :6、26、36、46、56、66、76、86、96、106 或 116 ;

[0036] LCDR2 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :7 ; 以及

[0037] LCDR3 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :8。

[0038] 抗体的一个或多个 CDR 或一组 CDR 可以被移植 (接枝, graft) 到骨架 (例如人骨架) 以提供本发明使用的抗体分子。骨架区可以包含人类种系基因片段序列。因此, 骨架可以被种系化, 从而改变骨架内的一个或多个残基, 以与最类似于人类种系骨架中的等效位置处的残基匹配。本发明的结合成员可以是具有 VH 结构域的分离的抗体分子, 该 VH 结构域包含人类种系骨架中的一组 HCDR, 例如 DP47。通常, 该结合成员还具有 VL 结构域, 该 VL 结构域包含一组 LCDR, 例如, 在人类种系骨架中。VL 结构域的人类种系骨架可以是 DPK22。

[0039] 本发明的 VH 结构域可以具有氨基酸序列 SEQ ID NO :1、21、31、41、51、61、71、81、91、101 或 111。优选地, 本发明的 VH 结构域具有氨基酸序列 SEQ ID NO :21、31、41、51、71、81 或 101。最优选地, 本发明的 VH 结构域具有氨基酸序列 SEQ ID NO :81。本发明的 VL 结构域可以具有氨基酸 SEQ ID NO :2、22、32、42、52、62、72、82、92、102 或 112。优选地, 本发明的 VL 结构域具有氨基酸 SEQ ID NO :22、32、42、52、72、82 或 102。最优选地, 本发明的 VL 结构域具有氨基酸 SEQ ID NO :82。

[0040] 本发明的结合成员可以是单链 Fv (scFv), 其包含借助于连接肽 (peptide linker) 相连的 VH 结构域和 VL 结构域。技术人员可以选择连接肽的适当长度和序列, 例如长度为至少 5 个或 10 个氨基酸, 长度长达约 15、20 或 25 个氨基酸。scFv 可以由氨基酸序列 SEQ ID NO :9 组成或包含氨基酸序列 SEQ ID NO :9。

[0041] 本发明的结合成员可以是双价抗体 (或双特异抗体, diabody) (W094/13804 ; Holliger 1993a), 该双价抗体是一种包含具有经由连接肽相连的 VH 结构域和 VL 结构域的第一多肽和具有经由连接肽相连的 VH 结构域和 VL 结构域的第二多肽的分子, 其中第一多肽的 VH 结构域和 VL 结构域分别与第二多肽的 VL 结构域和 VH 结构域配对。该第一和第二多肽可以是相同的 (从而配对形成二价分子) 或不同的 (从而配对形成双特异性分子)。技术人员可以选择连接肽的适当长度和序列, 例如, 长度为 5 个或更少氨基酸。该连接肽可以具有氨基酸序列 SEQ ID NO :28。

[0042] 本发明的结合成员可以包含非抗体分子内的抗原结合位点, 通常由一个或多个 CDR 提供, 例如, 非抗体蛋白质支架中的一组 CDR。在本文其它地方详细描述了结合成员, 包

括非抗体分子和抗体分子。

[0043] 本发明的结合成员可以结合于具有杀生物活性或细胞毒活性的分子。可替换地，本发明的结合成员可以结合于放射性同位素。作为进一步的替换方式，本发明的结合成员可以用可检测标记物加以标记。

[0044] 下文更详细地描述了本发明的这些和其它方面。

附图说明

[0045] 图 1 :A :示出了基于灌注的蛋白质组方法的示意图，其中基于灌注的蛋白质组方法用于比较分析来自健康小鼠肝脏和来自小鼠的 F9 肝转移瘤中的可及蛋白 (accessible protein)。B :示出了由 F9 肝转移瘤发展的较大的转移性病灶。C :示出了 F9 肝转移瘤 (转移灶) 的血管的选择性和有效染色以及血管的强染色和正常肝脏 (肝) 中的一些窦状隙的标记。染色对应于深色的线，并且它是在终端麻醉 (terminal anaesthesia) 下用 PBS (pH 7.4) 中的 15ml 的 1.8mM 磺基琥珀酰亚胺基-6-[生物素-氨基]己酸酯 (1mg/ml) 溶液 (补充有 10% 右旋糖酐-40 作为血浆增容剂) 灌注荷瘤小鼠，接着用链霉亲和素-碱性磷酸酶结合物进行组织化学染色而获得的。

[0046] 图 2 :A :示出了通过对正常小鼠肝脏 (正常) 和来自小鼠的 F9 肝转移瘤 (肿瘤) 的纤连蛋白结构域结构的蛋白质组分析所确定的纤连蛋白肽的位置。B :对通过正常小鼠肝脏样品和来自小鼠的 F9 肝转移瘤的蛋白质组分析所鉴定的肽进行 LC-MS/MS 实验。通过 HPLC 首先分离肽，随后洗脱成 192 个流份。每个流份在 MALDI 目标板上标记为一个分离的点并且获得每个流份的 MALDI TOF MS 谱。针对三个重复的 F9 小鼠肝转移瘤样品 (参见图片标记：“肝转移”) 和正常小鼠肝脏的三个重复样品 (参见图片标记：“正常肝脏”) 示出了两种不同的特定 HPLC 流份 (分别为上部的行和中间行) 的质谱。按照内部标准将离子峰高度归一化 (参见材料和方法)，因而使得可以半定量比较在不同样品中的相应的肽。在上部的行中，用箭头指示的峰 (在示出的第一样品中标记为“FU”) 对应于肽 FLTTTPNSLLVSWQAPR (SEQ ID No :15)，其衍生自纤连蛋白的恒定区 (纤连蛋白-III 型结构域 16)。此肽的离子峰在 F9 小鼠肝转移瘤样品 (肝转移) 中更高，但也存在于正常小鼠肝脏样品 (正常肝脏) 中，这表明纤连蛋白分子原则上存在于 F9 小鼠肝转移瘤和正常小鼠肝脏中，但似乎在 F9 小鼠肝转移瘤样品中更丰富。在中间行中，由右手箭头指示的峰 (标记为“EDA”) 对应于肽 IAWESPQGQVSR (SEQ ID NO :16)，其衍生自纤连蛋白的可变剪接的额外结构域 A。此 ED-A 肽仅在 F9 小鼠肝转移瘤样品 (肝转移) 可检测到而在正常小鼠肝脏样品 (正常肝脏) 则检测不到。由左手箭头指示的参比肽 (标记为“ref”) 用来鉴定其中 ED-A 肽洗脱的 HPLC 流份。这意味着，在正常小鼠肝脏样品 (正常肝脏) 的谱中参比肽的峰的存在表明，示出了其中 ED-A 肽是可检测的流份的质谱 (如果它存在于正常小鼠肝样品中)。最下一行示出了在 ED-A 肽离子峰的位置 (由箭头指示) 处质谱的放大视图，其证明在正常肝脏样品中不存在这种肽。

[0047] 图 3 :A :具有 flag- 标记亲代抗 ED-A 抗体 (抗 ED-A) 的 F9 肝转移瘤和相邻正常小鼠肝脏组织的免疫组织化学染色 (深色的线) 展示出了在转移瘤中强烈染色的血管样式，而在相邻的正常肝脏组织中则检测不到任何特异性染色。在阴性对照 (对照) 中，省略了 flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体。借助于 flag- 标记亲代抗 ED-A 抗体观测到的染色样式类

似于借助于 flag- 标记的抗 ED-B scFv(L19) 抗体 (抗 EDB) 观测到的染色样式, flag- 标记的抗 ED-B scFv(L19) 抗体 (抗 EDB) 识别纤连蛋白额外结构域 B, 是新生血管结构的一种既定标记。B: 示出了 Sv190 小鼠的器官 (脾脏、心脏、肺脏以及具有两个转移瘤的肝部分), 其中上述小鼠被注射 F9DR 肿瘤细胞, 并在三周以后进一步在尾静脉被注射 (200 μ l/ 小鼠, 即 60 μ g 抗体 / 小鼠) Alexa 750- 标记的亲代抗 ED-A 抗体 (终浓度为 0.3mg/ml)。在注射 Alexa 750- 标记的亲代抗 ED-A 抗体后 6 小时, 切除小鼠器官。利用国产的红外线荧光成像仪 (Birchler et al. 1999) 来可视化 Alexa750- 标记的亲代抗 ED-A 抗体染色, 其中该成像仪装备有卤钨灯、专门用于 Alexa 750 的激发和发射滤光片、以及单色 CCD 照相机。

[0048] 图 4: 示出了 ED-A 在人转移瘤中的表达。通过免疫组织化学, 利用 flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体来评估 ED-A 在人转移瘤中的表达。虽然在省略 flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体的阴性对照 (对照) 中没有检测到阳性染色并且对于具有 flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体的人正常肺组织切片 (正常人肺) 仅观测到非常弱的背景染色, 但人肺转移瘤 (RCC [肾细胞癌] 的人肺转移) 被 flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体 (抗 EDA) 强烈阳性染色, 如深色的线和阴影所示。flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体的染色样式主要是血管染色并且类似于用 flag- 标记的抗 ED-B scFv(L19) 抗体 (抗 EDB) 所观测到的染色样式, 该 flag- 标记的抗 ED-B scFv(L19) 抗体 (抗 EDB) 识别纤连蛋白额外结构域 B, 是一种新生血管结构的既定标记。借助于 flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体并通过结肠直肠癌的人类肝脏转移瘤 (CRC 的人类肝转移) 的免疫组织化学分析获得了类似结果。flag- 标记的亲代抗 ED-A 抗体展示了结肠直肠癌的人类肝脏转移瘤的强烈血管和间质染色样式。

[0049] 图 5: 示出了人 ED-A (上方序列) 和小鼠 ED-A (下方序列) 之间的序列比对。星号表示人 ED-A 和小鼠 ED-A 的氨基酸相同的氨基酸位置。

[0050] 图 6: A: 示出了抗 ED-A 抗体 H1 重链 (VH) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:12)。抗 ED-A 抗体 H1 的重链 CDR1 的核苷酸序列 加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的重链 CDR2 的核苷酸序列 以斜体示出并加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的重链 CDR3 的核苷酸序列 以黑体示出并加下划线。B: 示出了抗 ED-A 抗体 H1 接头序列的核苷酸序列 (SEQ ID NO:14)。C: 示出了抗 ED-A 抗体 H1 轻链 (VL) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:13)。抗 ED-A 抗体 H1 的轻链 CDR1 的核苷酸序列 加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的轻链 CDR2 的核苷酸序列 以斜体示出并加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的轻链 CDR3 的核苷酸序列 以黑体示出并加下划线。

[0051] 图 7: A: 示出了抗 ED-A 抗体 H1 重链 (VH) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)。抗 ED-A 抗体 H1 的重链 CDR1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的重链 CDR2 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 以斜体示出并加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的重链 CDR3 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5) 以黑体示出并加下划线。B: 示出了抗 ED-A 抗体 H1 接头序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)。C: 示出了抗 ED-A 抗体 H1 轻链 (VL) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。抗 ED-A 抗体 H1 的轻链 CDR1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6) 加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的轻链 CDR2 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7) 以斜体示出并加下划线。抗 ED-A 抗体 H1 的轻链 CDR3 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8) 以黑体示出并加下划线。

[0052] 图 8 :示出了 F8 双价抗体在 F9 带瘤小鼠中的生物分布。4 只 F9 带瘤小鼠被静脉注射 I^{125} 标记的 F8 双价抗体。在 24 小时以后处死小鼠并切除肿瘤、肝、肺、脾、心脏、肾、肠、尾以及血液。然后对肿瘤、肝、肺、脾、心脏、肾、肠、尾以及血液进行放射性计数。图 8 中示出了每克 (g) 肿瘤、肝、肺、脾、心脏、肾、肠、尾以及血液中检测到的 I^{125} 标记的 F8 双价抗体的注射剂量 (ID) 的百分比 (%)。F9 肿瘤 (肿瘤) 包含比所分析的任何其它小鼠组织多约 4 倍的 ID。

具体实施方式

[0053] 术语

[0054] 纤连蛋白

[0055] 如在本文其它地方所述,纤连蛋白是易遭受可变剪接的抗原,并且纤连蛋白的许多可变同种型是已知的。额外结构域 -A (EDA 或 ED-A) 还被称为 ED、额外 III 型重复 A (EIIIA) 或 EDI。Kornblihtt et al. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868 和 Paolella et al. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545-3557 已经公布了人 ED-A 的序列。人 ED-A 的序列还可以获自 SwissProt 数据库,作为以登录号 P02751 保藏的氨基酸序列的氨基酸 1631-1720 (纤连蛋白 III 型 12 ;额外结构域 2)。小鼠 ED-A 的序列可获自 SwissProt 数据库,作为以登录号 P11276 保藏的氨基酸序列的氨基酸 1721-1810 (纤连蛋白 III 型 13 ;额外结构域 2)。

[0056] 纤连蛋白的 ED-A 同种型 (A-FN) 包含额外结构域 -A (ED-A)。人 A-FN 的序列可以由相应的人纤连蛋白前体序列推断得到,该前体序列可获自 SwissProt 数据库,登录号为 P02751。小鼠 A-FN 的序列可以由相应的小鼠纤连蛋白前体序列推断得到,该前体序列可获自 SwissProt 数据库,登录号为 P11276。A-FN 可以是纤连蛋白的人 ED-A 同种型。ED-A 可以是人纤连蛋白的额外结构域 -A。

[0057] ED-A 是 90 个氨基酸序列,其通过可变剪接而被插入纤连蛋白 (FN) 中并位于 FN 的结构域 11 和 12 之间 (Borsi et al., 1987, *J. Cell Biol.*, 104, 595-600)。ED-A 基本上不存在于血浆形式的 FN 中,但在胚胎发生、组织重构、纤维化、心脏移植以及实体肿瘤生长期间却是丰富的。

[0058] 可变剪接

[0059] 可变剪接是指发生 DNA 的初级 RNA 转录物以产生不同的 mRNA 的剪接存在不同模式。在切除内含子以后,可以确定选择哪些外显子被一起剪接以形成 mRNA。可变剪接导致产生包含不同的外显子和 / 或不同数目的外显子的不同同种型。例如,一种同种型可以包含对应于一个或多个外显子的另外的氨基酸序列,其可以包含一个或多个结构域。

[0060] 结合成员

[0061] 其描述彼此结合的一对分子的一个成员。结合对的成员可以是来自天然的或全部或部分地合成产生的。分子对的一个成员具有在其表面上的区域、或空腔,其结合于并因而互补于上述分子对的另一成员的特定的空间和极性组织。结合对类型的实例是抗原 - 抗体、生物素 - 抗生物素蛋白、激素 - 激素受体、受体 - 配体、酶 - 底物。本发明涉及抗原 - 抗体反应。

[0062] 结合成员通常包括具有抗原结合位点的分子。例如,结合成员可以是抗体分子或

包含抗原结合位点的非抗体蛋白。

[0063] 抗原结合位点可以通过以下方式提供：排列在非抗体蛋白支架如纤连蛋白或细胞色素 B 等上的互补决定区 (CDR) (Haan & Maggos, 2004 ; Koide 1998 ; Hygren 1997), 或随机化或突变在蛋白支架内的环的氨基酸残基以赋予对于预期靶的结合特异性。Nygren 等 (1997) 已详细综述了用于在蛋白质中设计新结合位点的支架。WO/0034784 披露了抗体模拟物的蛋白支架, 其全部内容以引用方式结合于本文, 其中发明人描述了包括具有至少一个随机化环的纤连蛋白 III 型结构域的蛋白质 (抗体模拟物)。其中移植一个或多个 CDR (例如, 一组 HCDR) 的适宜支架可以由免疫球蛋白基因超家族的任何结构域成员来提供。该支架可以是人类蛋白或非人蛋白质。非抗体蛋白支架的一个优点在于, 它可以在支架分子中提供抗原结合位点, 其中该支架分子比至少某些抗体分子更小和 / 或更容易制造。小尺寸的结合成员可以赋予有用的生理学特性, 如进入细胞、深入渗透到组织中或达到其它结构内的靶标的能力, 或在蛋白质内结合靶抗原的空腔的能力。Wess, 2004 综述了抗原结合位点在非抗体蛋白支架中的应用。蛋白质通常具有稳定的骨架以及一个或多个可变环, 其中该一个或多个环的氨基酸序列发生特异性地或随机地突变以产生结合靶抗原的抗原结合位点。这样的蛋白质包括来自金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的蛋白 A、运铁蛋白、四连接素、纤连蛋白 (例如, 第 10 个纤连蛋白 III 型结构域) 以及脂质运载蛋白 (lipocalins) 的 IgG 结合域。其它方式包括合成基于植物环蛋白 (cyclotides) 的“微体 (Microbodies)” (Selecore GmbH), 该植物环蛋白是具有分子内二硫键的小蛋白。

[0064] 除抗体序列和 / 或抗原结合位点以外, 根据本发明的结合成员可以包含其它氨基酸, 例如, 形成肽或多肽, 如折叠结构域, 或赋予分子除结合抗原能力之外的另一种功能特点。本发明的结合成员可以携带可检测标记, 或可以结合于毒素或靶标部分或酶 (例如, 经由肽键 (peptidyl bond) 或接头)。例如, 结合成员可以包含催化部位 (例如, 在酶结构域中) 以及抗原结合位点, 其中抗原结合位点结合于抗原并因而使催化部位靶向于抗原。催化部位可以例如通过切割来抑制抗原的生物学功能。

[0065] 如前所述, 虽然非抗体支架可以携带 CDR, 但用于携带本发明的 CDR 或 CDR 组的结构将通常是抗体重链或轻链序列或其实质部分, 其中 CDR 或 CDR 组位于对应于由重排免疫球蛋白基因编码的天然存在的 VH 和 VL 抗体可变域的 CDR 或 CDR 组的位置。可以通过参考 Kabat 1987 及其更新来确定免疫球蛋白可变域的结构和位置, 现可获自互联网 (在 immuno.bme.nwu.edu 或利用任何搜索引擎查找“Kabat”)。

[0066] CDR 区或 CDR 用来指免疫球蛋白的重链和轻链的高变区, 如由 Kabat 等 (1987) (Kabat 1991a, 以及最新版本) 所定义的。抗体通常包含 3 个重链 CDR 和 3 个轻链 CDR。本文中的术语 CDR (根据情况) 用来指这些区域之一、或这些区域的若干或甚至全部, 这些区域包含负责通过抗体对于它所识别的抗原或表位的亲和力而进行结合的大多数氨基酸残基。

[0067] 在 6 个短 CDR 序列中, 重链的第三 CDR (HCDR3) 具有较大的尺寸可变性 (基本上是由于产生它的基因的排列机制而具有较大的多样性)。它可以短至 2 个氨基酸, 虽然已知的最长尺寸是 26 个氨基酸。功能上, HCDR3 在确定抗体的特异性方面具有部分作用 (Segal 1974 ; Amit 1986 ; Chothia 1987 ; Chothia 1989 ; Caton 1990 ; Sharon 1990a ; Sharon 1990b ; Kabat et al., 1991b)。

[0068] 抗体分子

[0069] 其描述了免疫球蛋白,不管是天然的还是部分或全部合成产生的。该术语还涵盖包含抗体抗原结合位点的任何多肽或蛋白质。这里必须明了,本发明并不涉及天然形式的抗体,即抗体并不处于它们的天然环境中,而是已能够通过从天然来源纯化、通过基因重组、或通过化学合成而分离或获得,因而它们包含如后文将描述的非天然氨基酸。包含抗体抗原结合位点的抗体片段包括但不限于抗体分子如 Fab、Fab'、Fab'-SH、scFv、Fv、dAb、Fd,以及双价抗体。

[0070] 可以采用单克隆抗体和其它抗体并使用重组 DNA 技术来产生结合靶抗原的其它抗体或嵌合分子。这样的技术可以涉及将编码抗体的免疫球蛋白可变区、或 CDR 的 DNA 引入不同免疫球蛋白的恒定区、或恒定区加上骨架区。参见,例如,EP-A-184187、GB2188638A 或 EP-A-239400、以及大量随后的文献。可以使产生抗体的杂交瘤或其它细胞经受基因突变或其它变化,这会使所产生的抗体的结合特异性发生改变或不发生改变。

[0071] 由于可以用许多方式来修饰抗体,所以术语“抗体分子”应被解释为涵盖具有所需要的特异性的抗体抗原结合位点和 / 或结合于抗原的任何结合成员或物质。因此,此术语涵盖抗体片段和衍生物,包括包含抗体抗原结合位点的任何多肽,不管是天然的或是全部或部分合成的。因而包括融合于另一种多肽(例如,来自另一物种或属于另一种抗体类型或子类)的包含抗体抗原结合位点的嵌合分子、或等价物。在 EP-A-0120694 和 EP-A-0125023、以及大量的随后文献中描述了嵌合抗体的克隆和表达。

[0072] 在抗体工程领域可获得的其他技术已经使得分离人类抗体和人源化抗体称为可能。例如,可以根据 Kontermann 和 Dubel (2001) 的描述来制备人杂交瘤。噬菌体展示是另一种用于产生结合成员的已知技术,其已在许多出版物中有详细描述,如 W092/01047(下文进一步论述)和美国专利 US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160、US6521404 以及 Kontermann 和 Dubel (2001)。转基因小鼠可以用于分离人抗体,其中小鼠抗体基因被灭活并且功能上由人抗体基因替换并同时完全保留小鼠免疫系统的其它成分 (Mendez 1997)。

[0073] 可以通过在适宜的表达载体内表达自借助于合成和组装的寡核苷酸产生的基因来产生合成的抗体分子,例如 Knappik 等 (2000) 或 Krebs 等 (2001) 所描述的。

[0074] 已表明,整个抗体的片段能够实现结合抗原的功能。结合片段的实例是 (i) Fab 片段,其含有 VL、VH、CL 以及 CH1 结构域;(ii) Fd 片段,其由 VH 和 CH1 结构域组成;(iii) Fv 片段,其由单一抗体的 VL 和 VH 结构域组成;(iv) dAb 片段 (Ward 1989; McCafferty 1990; Holt 2003),其由 VH 或 VL 结构域组成;(v) 分离的 CDR 区;(vi) F(ab')₂ 片段,其作为一种二价片段,包含两个相连的 Fab 片段;(vii) 单链 Fv 分子 (scFv),其中 VH 结构域和 VL 结构域通过连接肽相连,该连接肽使得两个结构域可以联合以形成抗原结合位点 (Bird 1988; Huston 1988);(viii) 双特异性单链 Fv 二聚体 (PCT/US92/09965) 以及 (ix) “双价抗体”,其是通过基因融合构造的多价或多特异性片段 (W094/13804; Holliger 1993a)。可以通过加入连接 VH 和 VL 结构域的二硫桥来稳定 Fv、scFv 或双价抗体分子 (Peiter 1996)。包含连接于 CH3 结构域的 scFv 的微抗体 (minibody) 也是可以加以制备的 (Hu 1996)。结合片段的其它实例是 Fab', 其与 Fab 片段的不同之处在于在重链 CH1 结构域的羧基末端加入

几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸,以及 Fab' -SH,其是一种 Fab' 片段,其中恒定域的半胱氨酸残基携带一个游离的巯基。

[0075] 可以由本文描述的任何抗体分子起始来获得本发明的抗体片段,例如,包含本文描述的任何抗体的 VH 和 / 或 VL 结构域或 CDR 的抗体分子,通过一些方法如酶(如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)消化、和 / 或借助于化学还原的二硫桥的切割。在另一种方式中,本发明的抗体片段可以通过本领域技术人员同样众所周知的基因重组技术或通过肽合成(借助于例如自动肽合成仪,如由 Applied Biosystems 等公司提供的)、或通过核酸合成和表达来获得。

[0076] 根据本发明的功能抗体片段包括任何功能片段,该功能片段的半衰期通过化学修饰、尤其通过聚乙二醇化、或通过结合到脂质体中而增加。

[0077] dAb(结构域抗体)是抗体的小单体(monomeric)抗原结合片段,即抗体重链或轻链的可变区(Holt 2003)。VH dAb 天然存在于骆驼(例如,骆驼、美洲驼)体内并且可以通过用靶抗原免疫骆驼、分离抗原特异性 B 细胞以及直接克隆来自个体 B 细胞的 dAb 基因来产生。还可以通过细胞培养来产生 dAb。它们的小尺寸、良好的可溶性以及温度稳定性使它们在生理上尤其有用的并且适合用于选择和亲和力成熟。本发明的结合成员可以是 dAb,其包含基本上如在本文中陈述的 VH 或 VL 结构域,或包含基本上如在本文中陈述的一组 CDR 的 VH 或 VL 结构域。

[0078] 如在本文中所使用的,短语“基本上如陈述的”是指与本文描述的结合成员的 VH 或 VL 结构域的有关 CDR 的特性与本文陈述了其序列的特定区域相同或高度类似。如本文所描述的,相对于一个或多个可变结构域的特定区域,短语“高度类似的”是指,在 CDR 和 / 或 VH 或 VL 结构域中可以进行 1 至约 5 个,例如 1 至 4 个,包括 1 至 3 个,或 1 个或 2 个,或 3 个或 4 个氨基酸置换。

[0079] 双特异性或双功能抗体形成第二代单克隆抗体,其中两个不同可变区被结合在相同分子中(Holliger 1999)。根据它们补充新效应子功能或靶向在肿瘤细胞表面上的若干分子的能力,已证明了它们在诊断领域和治疗领域的应用。在使用双特异性抗体的情况下,它们可以是常规的双特异性抗体,其能够用多种方法加以制备(Holliger 1993b),例如,化学制备或由二次杂交瘤(hybrid hybridoma)制备,或可以是任何上述双特异性抗体片段。这些抗体可以通过化学方法(Glennie 1987;Repp 1995)或体细胞方法(Staerz 1986;Suresh 1986)获得,但同样可以通过基因工程技术获得,其会迫使异二聚体形成并因而促进所寻找抗体的纯化过程(Merchand 1998)。双特异性抗体的实例包括 BiTE™技术的那些双特异性抗体,其中可以使用两种具有不同特异性的抗体的结合域并借助于短柔性肽直接连接。这样就将两种抗体结合在一个短的多肽单链上。可以构造双价抗体和 scFv 而没有 Fc 区,其中仅利用可变结构域,从而潜在地降低抗独特型反应的影响。

[0080] 双特异性抗体可以被构造成整个 IgG、双特异性 Fab' 2、Fab' PEG、双价抗体或双特异性 scFv。另外,可以利用本领域已知的常规方法来连接两个双特异性抗体以形成四价抗体。

[0081] 相对于双特异性全长抗体,双特异性双链抗体也可以是特别有用的,因为它们可以容易构建并表达在大肠杆菌(E. coli)中。利用噬菌体展示(W094/13804),可以容易地从文库选择具有适当结合特异性的双价抗体(和许多其它多肽如抗体片段)。如果双价抗体

的一个臂保持恒定,例如,具有指向靶抗原的特异性,那么就可以建造文库,其中另一个臂是变化的并选择具有适当特异性的抗体。可以通过如在 Ridgeway 1996 中所描述的其他设计方法来制备双特异性全长抗体。

[0082] 在本领域可以利用多种方法来获得针对靶抗原的抗体。抗体可以是单克隆抗体,尤其是人、鼠、嵌合或人源化起源的单克隆抗体,其可以按照本领域技术人员熟知的标准方法来获得。

[0083] 通常,为了制备单克隆抗体或它们的功能片段(尤其是鼠来源的),可以参照尤其是在手册“Antibodies”(Harlow 和 Lane 1988)中描述的技术或参照由 Kohler 和 Milstem, 1975 描述的由杂交瘤制备的技术。

[0084] 单克隆抗体可以获自,例如,于 A-FN、或其片段之一加以免疫的动物细胞,其中该片段包含由所述单克隆抗体识别的表位,例如,包含 ED-A 或由 ED-A 组成的片段、或 ED-A 的肽片段。A-FN、或其片段之一尤其可以按照通常的工作方法加以制备,其中通过起始于核酸序列(包含在为 A-FN 或其片段编码的 cDNA 序列中)的基因重组,通过起始于包含在 A-FN 和 / 或其片段的肽序列中的氨基酸序列的肽合成。

[0085] 可以例如用亲和柱来纯化单克隆抗体,在亲和柱上已预先固定 A-FN 或包含由所述单克隆抗体识别的表位的片段之一,例如包含 ED-A 或由 ED-A 组成的片段或 ED-A 的肽片段。单克隆抗体的纯化可以如下进行:在 A 蛋白和 / 或 G 蛋白上的层析,接着进行或不进行离子交换层析,其目的在于除去其自身残留的蛋白质污染物以及 DNA 和 LPS,接着进行或不进行在琼脂糖凝胶上的排阻层析以除去由于存在二聚体或其它多聚体而引起的潜在聚集物。可以同时或接连使用所有这些技术。

[0086] 抗原结合位点

[0087] 其描述分子的结合于并互补于所有或部分的靶抗原的部分。在抗体分子中,它被称为抗体抗原结合位点,并且包含结合于并且互补于所有或部分的靶抗原的那部分抗体。在抗原较大的情况下,抗体可以仅与抗原的特定部分结合,该部分被称作表位。抗体抗原结合位点可以由一个或多个抗体可变结构域提供。抗体抗原结合位点可以包含抗体轻链可变区 (VL) 和抗体重链可变区 (VH)。

[0088] 分离的

[0089] 其是指这样的状态,其中本发明的结合成员或编码上述结合成员的核酸将通常是与本发明一致的。因此,本发明的结合成员、VH 和 / 或 VL 结构域可以分离和 / 或纯化自例如它们的自然环境,并且为基本上纯的或均匀的形式,或者,对于核酸而言,没有或基本上没有不同于编码具有所需功能的多肽的序列的核酸或基因。分离的成员和分离的核酸将不含有或基本上不含有与其天然伴随的物质,如其它多肽或核酸,在它们的自然环境中,或它们被制备的环境中(例如细胞培养)其与这样的物质相伴存在,上述制备是通过体外或体内实施的重组 DNA 技术而进行的。可以用稀释剂或佐剂来配制成员和核酸并仍然用于被分离的实际用途,例如,如果用来涂布供免疫测定之用的微量滴定板,则通常会使得成员与明胶或其它载体混合,或当用于诊断或治疗时则将其与药用载体或稀释剂混合。结合成员可以被糖基化,天然糖基化或通过异源真核细胞(例如 CHO 或 NS0(ECACC 85110503 细胞))的系统被糖基化,或它们可以是(例如如果通过原核细胞中的表达所产生)非糖基化的。

[0090] 包含抗体分子的异质制剂(heterogeneous preparation)也形成本发明的一部

分。例如,上述制剂可以是抗体与全长重链和缺少 C 端赖氨酸的重链的混合物,并具有不同程度的糖基化和 / 或具有衍生氨基酸,如 N 端谷氨酸的环化以形成焦谷氨酸残基。

[0091] 抗原的一种或多种结合成员,例如,纤连蛋白的 A-FM 或 ED-A,可以通过下述方式获得:使根据本发明的结合成员的文库接触抗原或其片段,例如包含 ED-A 或由 ED-A 组成的片段或 ED-A 的肽片段,然后选择能够结合该抗原的文库的一种或多种结合成员。

[0092] 可以利用 Iterative Colony Filter Screening(ICFS) 来筛查抗体文库。在 ICFS 中,包含编码若干结合特异性的 DNA 的细菌生长在液体培养基中,并在已达到指数生长期以后,使数以十亿计的细菌分布在由适合的预处理薄膜滤器组成的生长载体上,对其进行温育直到出现完全汇合的细菌菌落。第二捕获衬底(trap substrate) 包括另一个薄膜滤器,其被预加湿和覆盖有所期望的抗原。

[0093] 然后将捕获薄膜滤器放置在平板上,该平板包含适宜的培养基并覆有生长过滤器,其表面覆盖有朝上的细菌菌落。在室温下温育如此获得的夹层大约 16 小时。因此可以获得编码抗体片段 scFv(具有扩散作用)的基因的表达,以致那些特异性地结合于存在于捕获膜上的抗原和片段被捕获。然后借助于通常用于此目的的比色技术处理捕获膜以显示出结合的抗体片段 scFv。

[0094] 根据捕获过滤器上着色斑点的位置可以追溯到存在于生长膜上并产生捕获的抗体片段的相应细菌菌落。聚集上述菌落并生长,然后将几百万细菌分布在新的培养膜上并重复上述程序。然后进行类似的循环直到在捕获膜上的阳性信号对应于单个阳性菌落,每一个阳性菌落都是指向在选择中所用抗原的单克隆抗体片段的潜在来源。ICFS 描述在例如 WO 0246455 中,其以引用方式结合于本文。文库还可以在颗粒或分子复合物上展示,例如,可复制的基因组(genetic package) 如噬菌体(例如 T7) 颗粒,或其它体外展示系统,每种颗粒或分子复合物包含编码展示在其上的抗体 VH 可变域的核酸,以及可选地还包含展示的 VL 结构域(如果存在的话)。噬菌体展示描述于 W092/01047 和例如美国专利 US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160 以及 US6521404,其全部内容以引用方式结合于本文。

[0095] 在选择能够结合抗原的结合成员并展示在噬菌体或其它文库颗粒或分子复合物上以后,核酸可以获自展示所述选择的结合成员的噬菌体或其它颗粒或分子复合物。这样的核酸可以用于随后的通过从核酸表达来产生结合成员或抗体 VH 或 VL 可变结构域,该核酸具有获自展示所述选择的结合成员的噬菌体或其它颗粒或分子复合物的核酸的序列。

[0096] 具有所述选择的结合成员的抗体 VH 可变结构域的氨基酸序列的抗体 VH 可变域可以分离的形式提供,正如包含上述 VH 结构域的结合成员可以分离的形式提供一样。

[0097] 可以进一步测试结合 A-FN 或纤连蛋白的 ED-A 或其它靶抗原或同种型的能力,例如,与例如抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9 中的任何一种竞争性结合于 A-FN 或 A-FN 的片段,例如纤连蛋白的 ED-A,的能力。

[0098] 本发明的结合成员可以特异性地结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A。本发明的结合成员可以结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A,并且亲和力相同于抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9(例如具有 scFv 格式),或具有更好的亲和力。本发明的结合成员可以结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A,其中 K_D 为 $3 \times 10^{-8} M$ 或具有更好的亲和力。

优选地,本发明的结合成员以 K_D 为 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更好的亲和力结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A。更优选地,本发明的结合成员以 K_D 为 $1.7 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更好的亲和力结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A。还要更优选地,本发明的结合成员以 K_D 为 $1.4 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更好的亲和力结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A。最优选地,本发明的结合成员结合纤连蛋白的 A-FN 和 / 或 ED-A,其中 K_D 为 $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 或具有更好的亲和力。

[0099] 本发明的结合成员可以与抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9 一样结合于 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A 上的相同表位。

[0100] 本发明的结合成员可以不显示任何显著结合于不同于 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的分子。尤其是该结合成员可以不结合纤连蛋白的其它同种型,例如纤连蛋白的 ED-B 同种型和 / 或 IIICS 同种型。

[0101] 可以产生本文披露的抗体分子的变体并用于本发明。在 CDR、抗体 VH 或 VL 结构域以及结合成员的氨基酸序列内进行置换所需要的技术是本技术领域通常可获知的。借助于置换可以构建变体序列,并测试结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的能力和 / 或测试任何其它所期望的性能,其中置换可以或不可以预测是否对活性具有最小或有利影响。

[0102] 如所讨论的,根据本发明,可以采用本文具体披露了其序列的 VH 和 VL 结构域中的任一种的可变结构域氨基酸序列变体。特定的变体可以包括一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的加入、缺失、置换和 / 或插入),可以少于约 20 个改变,少于约 15 个改变,少于约 10 个改变或少于约 5 个改变,可以是 5、4、3、2 或 1 个改变。可以在一个或多个骨架区和 / 或一个或多个 CDR 中进行改变。上述改变通常并不导致功能丧失,所以包含如此改变的氨基酸序列的结合成员可以保留结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的能力。例如,它可以保留与没有进行改变的结合成员相同的定量结合,例如,如在本文描述的测定中所测得的。包含如此改变的氨基酸序列的结合成员可以具有改善的结合 A-FN 和 / 或纤连蛋白的 ED-A 的能力。

[0103] 可以利用一种或多种所选 VH 和 / 或 VL 基因的随机诱变以在整个可变结构域内产生突变,从而产生本发明的新的携带 CDR 衍生序列的 VH 或 VL 区。在某些实施方式中,在 CDR 组的整个可变结构域内进行一个或两个氨基酸置换。可以使用的另一种方法是将诱变定向于 VH 或 VL 基因的 CDR 区。

[0104] 如前所述,基本上如本文陈述的 CDR 氨基酸序列可以作为在人抗体可变结构域中的 CDR 或其实质部分。基本上如本文陈述的 HCDR3 序列代表本发明的实施方式并且例如这些序列中的每一个可以作为人重链可变结构域中的 HCDR3 或其实质部分。

[0105] 本发明采用的可变结构域可以获自或衍生自任何种系或重排的人可变结构域,或可以是基于已知人可变结构域的共有序列或实际序列合成的可变结构域。可变结构域可以衍生自非人抗体。利用重组 DNA 技术,可以将本发明的 CDR 序列(例如 CDR3)引入缺少 CDR(例如 CDR3)的全套的可变结构域。例如,Marks 等(1992)描述了产生全套抗体可变结构域的方法,其中位于或相邻于可变结构域区域的 5' 端的共有引物连同共有引物一起用于人 VH 基因的第三骨架区以提供缺少 CDR3 的 VH 可变结构域的基因谱型(repertoire)。Marks 等进一步描述了上述基因谱型(repertoire)如何结合于特定抗体的 CDR3。利用类似的技术,本发明的 CDR3 衍生序列可以混合于缺少 CDR3 的 VH 或 VL 结构域的基因谱型,以及混合的完全 VH 或 VL 结构域结合于关联 VL 或 VH 域以提供本发明的结合成员。然后可以用

适宜的宿主系统如 W092/01047 的噬菌体展示系统（其全部内容以引用方式结合于本文）、或随后的大量文献的噬菌体展示系统，包括 Kay、Winter&McCafferty (1996)，来展示上述抗体的基因谱型，以便可以选择适合的结合成员。该全套可以由来自任何物种 (anything) 的 10^4 个以上的单独成员组成，例如由至少 10^5 、至少 10^6 、至少 10^7 、至少 10^8 、至少 10^9 或至少 10^{10} 个成员组成。

[0106] 类似地，可以将一个或多个、或所有三个 CDR 移植到全套的 VH 或 VL 结构域，然后对其进行筛选以获得纤连蛋白的 A-FN 和 / 或 ED-A 的一个或多个结合成员。

[0107] 可以采用抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9 的 HCDR1、HCDR2 以及 HCDR3 中的一种或多种，或 HCDR 组，和 / 或可以采用抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 或 G9 的 X LCDR1、LCDR2 以及 LCDR3 中的一种或多种，或抗体 H1、B2、C5、D5、E5、CB、F8、F1、B7、E8 或 G9 的 LCDR 组。

[0108] 类似地，可以采用本文披露的其它 VH 和 VL 结构域、CDR 组以及 HCDR 组和 / 或 LCDR 组。

[0109] 纤连蛋白的 A-FN 和 / 或 ED-A 可以用于筛选例如抗体分子的结合成员，以用来制备用于治疗肿瘤转移瘤的药剂。如在本文其它地方所披露的，该筛选可以是基因谱型 (repertoire) 的筛选。

[0110] 在某些实施方式中，免疫球蛋白可变域的实质部分将包含至少三个 CDR 区、以及它们的间隔骨架区。该部分还可以包括至少约 50% 的第一和第四骨架区的一者或两者，该 50% 是第一骨架区的 C 端 50% 和第四骨架区的 N 端 50%。在可变域的实质部分的 N 端或 C 端的另外的残基可以是那些并不通常伴随天然存在的可变域区的残基。例如，通过重组 DNA 技术制备的本发明的结合成员的结构可以导致引入由引入的接头编码的 N 端或 C 端残基，以便于进行克隆或其它操作步骤。其它操作步骤包括引入接头以将本发明的可变结构域连接于另外的蛋白质序列，该另外的蛋白质序列包括如在本文别处更详细讨论的抗体恒定区、其它可变结构域（例如在双价抗体的生产中）或可检测 / 功能标记。

[0111] 虽然在本发明的某些方面中，结合成员包含一对 VH 和 VL 结构域，但基于 VH 或 VL 结构域序列的单个结合域则形成本发明的进一步的方面。已知，单个免疫球蛋白结构域，尤其是 VH 域，能够以特异性的方式结合靶抗原。例如，参见以上 dAb 的讨论。

[0112] 在任一单个结合域的情况下，这些结构域可以用来筛选能够形成两结构域结合成员的互补结构域，该两结构域结合成员能够结合纤连蛋白的 A-FN 和 / 或 ED-A。这可以通过噬菌体展示筛选方法并利用如在 W092/01047 中所披露的所谓分级双重组合方法（其全部内容以引用方式结合于本文）来实现，其中包含 H 或 L 链克隆的单个菌落用来感染编码其它链 (L 或 H) 的克隆的完全文库并且按照噬菌体展示技术如在该参考文献中所描述的那些技术来选择所得到的双链结合成员。此技术还披露在 Marks 1992 中。

[0113] 本发明的结合成员可以进一步包含抗体恒定区或其部分，例如人抗体恒定区或其部分。例如，VL 结构域可以在其 C 端连接于抗体轻链恒定域，其包括人 C κ 或 C λ 链，例如 C λ 。类似地，基于 VH 结构域的结合成员可以在其 C 端连接于所有或部分（例如 CH1 域）的衍生自抗体同种型的免疫球蛋白重链，例如，IgG、IgA、IgE 和 IgM 以及任何同种型子类，尤其是 IgG1 和 IgG4。具有这些性能并使得可变区稳定化的任何合成的或其它恒定区变体也可用于本发明的实施方式。

[0114] 本发明的结合成员可以标记有可检测的或功能标记。标记可以是产生或可以被诱导产生信号的任何分子,包括但不限于荧光剂、放射性标记、酶、化学发光剂或光敏剂。因此,可以通过检测荧光或发光、放射性、酶活性或光吸收来检测和 / 或测量结合。可以利用本领域已知的常规化学性能来将可检测标记附于本发明的抗体。

[0115] 存在许多方法,借助于这些方法,标记可以产生通过外部方式可检测的信号,例如,通过目视检查、电磁辐射、热、以及化学试剂。该标记还能够与结合本发明的抗体的另一结合成员结合,或与载体结合。

[0116] 标记的结合成员例如标记有可检测标记的 scFv,可以用于体内或体外诊断,和 / 或用于治疗。

[0117] 例如,放射性标记的结合成员(例如结合(共轭或轭合)于放射性同位素的结合成员)可以用于放射诊断和放射治疗。可以结合(共轭或轭合)于本发明的结合成员的放射性同位素包括以下同位素,如 ^{94m}Tc 、 ^{99m}Tc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{47}Sc 、 ^{111}In 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{121}Sn 、 ^{161}Tb 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{105}Rh 以及 ^{177}Lu 。

[0118] 例如,标记有可检测标记的本发明的结合成员可以用来检测、诊断或监测人或动物体内的一种和 / 或多种肿瘤转移瘤。可以将结合成员给予人或动物,通常是人类患者,然后可以确定人或动物体内在远离由原发性肿瘤目前或以前占据部位的部位是否存在抗体;抗体分子定位于人或动物体内在远离由原发性肿瘤目前或以前占据部位的部位则表明存在一种和 / 或多种肿瘤转移瘤。

[0119] 本发明的结合成员可以用于制造供诊断肿瘤转移瘤之用的诊断产品。

[0120] 本发明还提供了在人或动物体内检测或诊断肿瘤转移瘤的方法,包括以下步骤:

[0121] (a) 给予人或动物本发明的结合成员,例如标记有可检测标记的结合成员,其结合纤连蛋白的 ED-A 同种型和 / 或纤连蛋白的 ED-A,以及

[0122] (b) 确定在人或动物体内在远离由原发性肿瘤目前或以前占据部位的部位是否存在结合成员;

[0123] 其中结合成员定位于人或动物体内在远离由原发性肿瘤目前或以前占据部位的部位则表明存在肿瘤转移瘤。在结合成员标记有可检测标记的情况下,可以通过检测标记来确定可检测标记的存在或不存在。

[0124] 如本文所描述的结合成员还可以用于在竞争性测定中测量抗原水平,即在竞争性测定中通过采用如由本发明提供的结合成员来测量样品中抗原水平的方法。这样就不需要将结合与未结合抗原进行物理分离。将报道分子连接于结合成员以致结合时会发生物理或光学变化是一种可能性。报道分子可以直接或间接地产生可检测信号,该信号可以是可量化的。报道分子的连接可以是直接或间接的,共价的,例如借助于肽键,或非共价的。借助于肽键的连接可以是由于编码抗体和报道分子的基因融合的重组表达。

[0125] 竞争性测定还可以用于表位作图。在一个实例中,表位作图可以用来鉴定由结合成员结合的表位。这样的表位可以是线性的或构象的。构象表位可以包含纤连蛋白的 A-FN 或 ED-A 的至少两个不同的片段,其中当纤连蛋白的 A-FN 或 ED-A 被折叠成其三级或四级结构时,所述片段彼此接近地定位以形成被纤连蛋白结合成员的 A-FN 或 ED-A 所识别的构象表位。在测试竞争性时,可以采用抗原的肽片段,尤其是包括感兴趣的表位的肽或基本上由感兴趣的表位的肽组成的肽片段。可以使用在任一末端具有表位序列加上一个或多个氨基

酸的肽。根据本发明的结合成员这样就可以使它们与抗原的结合受到具有或包括给定序列的肽的抑制。

[0126] 本发明的另外的方面采用结合物（或轭合物）或本发明的结合成员与对病变处的靶细胞施加杀生物性或细胞毒性作用的分子以及存在于上述病变处的针对细胞外基质成分的抗体之间的融合。例如，杀生物分子或细胞毒性分子可以是白细胞介素-2 (IL-2)、多柔比星、白细胞介素-12 (IL-12)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 或组织因子（优选截短的）。这样的结合物（轭合物）可以治疗上用于例如治疗如本文提及的肿瘤转移瘤和/或肿瘤。例如在 W001/62298 中描述了结合成员与杀生物分子或细胞毒性分子的融合或结合物（轭合物）的生产和应用，其以引用方式结合于本文。

[0127] 在一个方面，本发明提供了治疗一种和/或肿瘤转移瘤的方法，该方法包括给予个体治疗有效量的包含本发明的结合成员的药物。结合成员可以是 (i) 通过细胞间相互作用对靶细胞施加杀生物性或细胞毒性作用的分子的结合物（轭合物）和 (ii) 纤连蛋白的 ED-A 同种型和/或纤连蛋白的 ED-A 的结合成员的结合物（轭合物）。

[0128] 在另一个方面，本发明提供了本发明的结合成员用于制备药物的应用，该药物用于治疗一种和/或多种肿瘤转移瘤。结合成员可以结合于或融合于如本文所描述的施加杀生物性或细胞毒性作用的分子。结合成员可以是 (i) 通过细胞间相互作用对靶细胞施加杀生物性或细胞毒性作用的分子的结合物和 (ii) 根据本发明的人纤连蛋白的结合成员的结合物。

[0129] 在又一个方面，本发明提供了将 (i) 通过细胞间相互作用对靶细胞施加杀生物性或细胞毒性作用的分子的结合物和 (ii) 根据本发明的人纤连蛋白的结合成员的结合物用于治疗人或动物体的方法。这样的治疗可以是一种和/或多种肿瘤转移瘤的治疗。

[0130] 本发明的又一方面提供了 (i) 通过细胞间相互作用对靶细胞施加杀生物性或细胞毒性作用的分子的结合物和 (ii) 根据本发明的人纤连蛋白的结合成员的结合物。这样的结合物优选包含融合蛋白（包含杀生物分子或细胞毒性分子）和所述结合成员，或者，其中结合成员是双链或多链的，融合蛋白包含杀生物分子或细胞毒性分子以及所述结合成员的多肽链成分。优选地，该结合成员是单链多肽，例如，单链抗体分子，如 scFv。因此，本发明的进一步的方面提供了融合蛋白，其包含杀生物分子或细胞毒性分子以及本发明的单链 Fv 抗体分子。

[0131] 通过细胞间相互作用对靶细胞施加其作用的杀生物分子或细胞毒性分子可以与靶细胞直接发生相互作用，可以与靶细胞上的膜结合受体相结合，或扰动细胞膜的电化学势。与膜结合受体相结合的分子包括趋化因子、细胞因子以及激素。扰动细胞膜的电化学势的化合物包括溶血素、离子载体、作用于离子通道的药物。在示例性的优选实施方式中，上述分子是白细胞介素-2、组织因子（优选截短的）或阿霉素。其它实施方式可以采用白细胞介素-12、干扰素- γ 、IP-10 以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。

[0132] 正如下文将进一步讨论的，特异性结合成员优选为一种抗体或包含抗体抗原结合位点。便利地，特异性结合成员可以是单链多肽，如单链抗体。这使得可以方便地生产包含单链抗体和杀生物分子或细胞毒性分子（例如，白细胞介素-2 或组织因子）的融合蛋白。在其它实施方式中，可以通过在分离的多肽中，例如在完整抗体中或在如 Fab 或双价抗体的抗体片段中结合抗体 VH 结构域和抗体 VL 结构域，来提供抗体抗原结合位点。在特异性

结合成员是双链或多链分子（例如分别为 Fab 或整个抗体）的情况下，杀生物分子或细胞毒性分子可以被结合为具有特异性结合成员中的一个或多个多肽链的融合多肽。

[0133] 结合成员可以借助于肽键而结合于杀生物分子或细胞毒性分子，即在融合多肽内包含所述分子和特异性结合成员或其多肽链成分。关于可用于制备包含 IL-2 的融合多肽的 IL-2 序列信息，参见 Taniguchi et al. (1983) Nature 302, 305-310 ; MaED-A et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 115 :1040-1047 ; Devos et al. (1983) Nucl. Acids Res. 11:4307-4323。Scarpatti et al. (1987) Biochemistry 26 :5234-5238、以及 Ruf et al. (1991) J. Biol. Chem. 226 :15719-15725 提供了关于截短的组织因子的序列信息。用于结合的其它方式包括化学结合，尤其是利用双功能试剂的交联（例如采用 DOUBLE-PEAGENTS™交联剂选择指南 (DOUBLE-PEAGENTS™Cross-linking Reagents Selection Guide), Pierce）。

[0134] 在期望缓释的情况下，例如，在杀生物分子或细胞毒性分子是阿霉素或扰动细胞膜的电化学势的其它分子的情况下，化学结合可以是借助于在特异性结合成员（多肽，如抗体或抗体片段）的伯氨基基团和杀生物分子或细胞毒性分子（如阿霉素）的氧化糖部分（六碳氨糖）之间形成席夫碱（亚胺）。

[0135] 本发明进一步提供了一种编码本发明的结合成员的分离的核酸。核酸可以包括 DNA 和 / 或 RNA。在一个方面，本发明提供了核酸，其编码如上述所定义的本发明的 CDR 或 CDR 组或 VH 结构域或 VL 结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子，例如 scFv 或 IgG，例如 IgG1。优选的核苷酸序列是编码本文披露的 VH 和 / 或 VL 结构域的核苷酸序列。

[0136] 本发明还提供了质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体，其包含至少一种如上所述的多核苷酸。

[0137] 本发明还提供了重组宿主细胞，其包含如上所述的一种或多种构建体。编码任何 CDR 或 CDR 组或 VH 结构域或 VL 结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子，例如所提供的 scFv 或 IgG1 或 IgG4，其本身形成本发明的一个方面，正如产生编码产物的方法形成本发明的一个方面一样，该方法包括来自编码核酸的表达。通过在适当条件下培养包含核酸的重组宿主细胞可以方便地实现表达。在通过表达进行生产以后，可以利用任何适宜的技术来分离和 / 或纯化 VH 或 VL 结构域、或结合成员，然后在适当情况下使用。

[0138] 根据本发明的核酸可以包含 DNA 或 RNA 并且可以是全部或部分合成的。除非上下文另有要求，如本文所述的核苷酸序列包括具有特定序列的 DNA 分子，并包括具有其中用 U 替换 T 的特定序列的 RNA 分子。

[0139] 又一个方面提供了生产抗体 VH 可变结构域的方法，该方法包括引起来自编码核酸的表达。这样的方法可以包括在用于生产所述抗体 VH 可变结构域的条件下培养宿主细胞。

[0140] 作为本发明的进一步的方面，提供了生产 VL 可变结构域和包含 VH 和 / 或 VL 结构域的结合成员类似方法。

[0141] 生产方法可以包括产物的分离和 / 或纯化步骤。生产方法可以包括将产物配制成组合物，该组合物包括至少一种另外的成分，如药用赋形剂。

[0142] 用于在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是众所周知的。适宜的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、丝状真菌、酵母菌和杆状病毒系统以及转基因植物

和动物。在本领域已很好确立了抗体和抗体片段在原核细胞中的表达。关于综述,参见例如 Plückthun 1991。一种常用细菌宿主是大肠杆菌 (*E. coli*)。

[0143] 本领域技术人员还可以使用在培养物中的真核细胞中的表达,作为一种选择来生产结合成员,例如 Chadd & Chamow(2001)、Andersen & Krummen(2002)、Larrick & Thomas(2001)。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、海拉细胞 (HeLa cells)、幼仓鼠肾细胞、NS0 小鼠黑素瘤细胞、YB2/0 大鼠骨髓瘤细胞、人胚肾细胞、人胚胎视网膜细胞以及许多其他细胞。

[0144] 可以选择或构建适宜的载体,其包含适当的调节序列,包括启动子序列、终止序列、多腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因以及在适当的情况下包括其他序列。在适当情况下载体可以是质粒例如噬菌粒,或病毒例如噬菌体。关于进一步的详情,参见例如, Sambrook & Russell(2001)。例如在制备核酸构建物、诱变、测序、DNA 引入细胞和基因表达、以及蛋白质分析中,用于操作核酸的许多已知技术和实验方案详细描述在 Ausubel 1999 中。

[0145] 本发明的进一步的方面提供了一种宿主细胞,其包含如本文所披露的核酸。这样的宿主细胞可以是体外的并且可以是在培养物中的。这样的宿主细胞可以是体内的。宿主细胞的体内存在可以便于本发明的结合成员细胞内表达为“胞内抗体 (intrabody)”或细胞内抗体。胞内抗体可以用于基因治疗。

[0146] 又一个方面提供了一种方法,该方法包括将本发明的核酸引入宿主细胞中。上述引入可以采用任何可获得的技术。对于真核细胞,适宜的技术可以包括磷酸钙转染、二乙氨基乙基葡聚糖 (DEAE-Dextran)、电穿孔、脂质体介导的转染和转导,其中利用逆转录病毒或其他病毒,例如牛痘,或对于昆虫细胞为杆状病毒。在宿主细胞,尤其是在真核细胞中引入核酸可以使用基于病毒或质粒的系统。质粒系统可以被附加地保持或可以被掺入到宿主细胞或人工染色体中。掺入可以通过在单个或多个基因座处随机或定向整合一个或多个拷贝来实现。对于细菌细胞,适宜的技术可以包括氯化钙转化、电穿孔以及利用噬菌体的转染。

[0147] 引入以后,可以接着引起或使得核酸表达,例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞。可以借助于本领域技术人员已知的方法来纯化表达的产物。

[0148] 根据本发明,本发明的核酸可以被整合到宿主细胞的基因组(例如染色体)中。可以按照标准技术通过包括促进与基因组重组的序列来促进整合。

[0149] 本发明还提供了一种方法,该方法包括在表达系统中使用如上所述的构建物以表达如上所述的结合成员或多肽。

[0150] 本发明的结合成员被设计用于在人或动物受试者(例如人)中进行诊断或治疗的方法。结合成员可以用于一种和/或多种肿瘤转移瘤的诊断或治疗。

[0151] 因此,本发明的进一步的方面提供了治疗方法,该方法包括给予如所提供的结合成员、包含这样的结合成员的药物组合物、以及这样的结合成员用于制备所给予的药物的应用,例如在包括将结合成员与药用赋形剂配制在一起的制备药剂或药物组合物的方法中。药用载体是众所周知的并由本领域技术人员根据所选择的活性化合物的特性和给予方式来采用。

[0152] 通常以药物组合物的形式给予本发明的结合成员,该药物组合物可以包含除结合成员以外的至少一种成分。因此根据本发明并按照本发明使用的药物组合物除活性组分之

外还可以包含药用赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其他物质。这样的物质应该是无毒的并且不应干扰活性组分的效力。载体或其他物质的准确特性将取决于给予途径,其中给予途径可以是口服、吸入或通过注射,例如静脉内注射。

[0153] 本发明还设想了用于口服的药物组合物,例如纳米抗体 (nanobody) 等。这样的口服制剂可以是片剂、胶囊剂、散剂、液体或半固体形式。片剂可以包含如明胶或佐剂之类的固体载体。液体药物组合物通常包含液体载体如水、石油 (或石蜡油)、动物油或植物油、矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液、葡萄糖或其他糖溶液或二醇类,如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0154] 对于静脉内注射、或在痛苦部位的注射,活性组分将具有胃肠道外用水溶液的形式,其是无热原的并且具有适宜的 pH、等渗性以及稳定性。本领域技术人员能够很好地制备适宜的溶液,其中利用例如,等渗载体如氯化钠注射液 (Sodium Chloride Injection)、林格氏注射液 (Ringer' s Injection)、乳酸化林格氏注射液 (Lactated Ringer' s Injection)。根据需要,可以采用防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和 / 或其他添加剂。用于制备药物制剂的许多方法是本领域技术人员已知的。参见例如,Robinson,1978。

[0155] 可以单独给予或联合其他治疗、同时或相继或作为与另一种治疗剂或多种治疗剂的联合制剂,来给予组合物,这取决于要治疗的病症。

[0156] 纤连蛋白的 A-FN 和 / 或 ED-A 的结合成员可以连同一种另外的药用成分用作联合治疗的一部分。联合治疗可以用来提供显著的协同效应,尤其是结合纤连蛋白的 A-FN 和 / 或 ED-A 的结合成员与一种或多种其他药物的联合。可以同时给予或相继给予或作为与另一种治疗剂或多种治疗剂的联合制剂来给予纤连蛋白的 A-FN 和 / 或 ED-A 的结合成员,以用于治疗本文所列的一种或多种病症。

[0157] 例如,本发明的结合成员可以和现有治疗剂一起用于治疗一种和 / 或多种肿瘤转移瘤。用于治疗一种和 / 或多种肿瘤转移瘤的现有治疗剂包括:多柔比星、紫杉醇、吉西他滨、索拉非尼、美法伦、以及阿瓦斯丁。

[0158] 本发明的结合成员和一种或多种上述另外的药物成分可以用于制备药剂。该药剂可以用于单独给予或组合给予个体,因而可以包含结合成员和作为联合制剂或作为单独制剂的其他成分。单独的制剂可以用来便于分开给予和顺序给予或同时给予,并使得可以通过不同途径来给予上述成分,例如通过口服和肠胃外给予。

[0159] 根据本发明,可以将所提供的组合物给予哺乳动物。可以“治疗有效量”给药,这足以显示出对患者的益处。这样的益处可以至少是至少一种症状的改善。给予的实际量、以及给予的速率和时间过程 (time-course) 将取决于待治疗病症的性质和严重性、待治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床症状、病因、组合物的递送部位、结合成员的类型、给予的方法、给药的时间安排以及医生已知的其他因素。治疗处方,例如剂量的确定等,是全科医生和其他医生的责任,并且可以根据待治疗疾病的症状的严重性和 / 或进展来确定处方。

[0160] 在本领域中,抗体的适当剂量是众所周知的 (Ledermann 1991 以及 Bagshawe 1991)。在适当情况下,可以使用在本文、或在《医师桌上手册》(Physician' s Desk Reference (2003)) 中针对要给予的药剂类型所指定的具体剂量。可以通过在动物模型中比较其体外活性和体内活性来确定本发明的结合成员的治疗有效量或合适剂量。将在小鼠和其他试验动物中的有效剂量类推到人类的方法是已知的。精确剂量将取决于若干因素,

包括抗体是否是用于诊断、预防或用于治疗、要治疗区域的大小和位置、抗体（例如整个抗体、片段或双价抗体）的精确特性、以及任何可检测标记或连接于抗体的其他分子的特性。对于系统应用，典型的抗体剂量范围是 100 μ g 至 1g，而对于局部应用是 1 μ g 至 1mg。可以给予最初较高的负荷剂量，接着给予一次或多次较低剂量。抗体可以是整个抗体，例如 IgG1 或 IgG4 同种型。这是用于成人患者的单一治疗的剂量，对于儿童和婴儿可以按比例地调节，并且对于其它抗体形式 (antibody format) 还与分子量成比例地加以调节。根据医生的决定，可以以每日、每周两次、每周或每月间隔进行重复治疗。对于皮下给予，治疗可以是每两周至每四周一次，而对于静脉内给予，则治疗可以是每四周至八周一次。在本发明的某些实施方式中，治疗是周期性的，并且给予之间的期间为约两周或更长时间，例如约三周或更长时间，约四周或更长时间，或约每月一次。在本发明的其它实施方式中，可以在外科手术以前和 / 或以后给予治疗，并且可以直接给予或施用于手术治疗的解剖部位。

[0161] 鉴于包括以下实验性实施例的本发明披露的内容，对于本领域技术人员来说，本发明的另外的方面和实施方式将是显而易见的。

[0162] 实验

[0163] 材料与方法

[0164] 动物模型

[0165] 动物实验由瑞士联邦兽医局 (Swiss Federal Veterinary Office) 许可并按照瑞士动物保护条例 (Swiss Animal Protection Ordinance) 进行。定期监测小鼠。当显示疼痛或痛苦的任何征兆时、或在体重损失 > 15% 的情况下，对动物实施安乐死。雄性 Sv129 小鼠 (RCC, Füllingsdorf, 瑞士) 接受静脉内注射约 10⁶ 突变 F9 鼠畸胎瘤细胞 (Terrana et al. 1987)，其由 Dario Rusciano (SIFI, Catania, 意大利) 友情提供。小鼠在肿瘤细胞注射以后 3 周用于体内生物素化、靶向试验或用于免疫组织化学的器官切除。

[0166] 体内生物素化

[0167] 如先前描述的 (Roesli et al. 2006, Rybak et al. 2005)，进行体内生物素化实验。简言之，通过正中胸骨切开术对麻醉小鼠实施开胸。用灌注针对左心室实施穿刺并在右心房形成小切口以使灌注溶液可以流出。其后立即进行体循环的灌注，其中压力为 100mm Hg，流速为 1.5ml/分钟。在第一步骤中，用 15ml 生物素化溶液（预热至 38℃）实施灌注，其中该生物素化溶液包含在 PBS 中的 1mg/ml 磺基 -NHS-LC- 生物素 (Pierce, Rockford, IL, USA)，pH 7.4，并补充有 10% (w/v) 右旋糖酐 -40 (Amersham Biosciences, Uppsala, 瑞典) 作为血浆增容剂。从而，可与生物素化反应竞争的血液成分在灌注的最初几分钟内被从循环中除去并且可进入不同组织的含伯胺蛋白（以及某些糖脂和磷脂）可以被生物素共价修饰。为了中和未反应的生物素化试剂，体内生物素化以后用 50mM Tris、10% (w/v) 右旋糖酐 -40（在 PBS 中，pH 7.4，预热至 38℃）进行洗涤步骤 10 分钟。在用生物素化试剂灌注期间（以及在接着用淬灭溶液 (quenching solution) 灌注的最初 3 分钟内），用 50mM Tris（在 PBS 中），pH 7.4 (38℃) 洗涤心脏周围的区域，以淬灭流出的未反应的生物素化试剂并避免在器官表面分子的不希望的标记。在灌注以后，切除器官和肿瘤，样品被新鲜速冻以用于制备器官匀浆或被包埋在低温包埋化合物 (Microm, Walldorf, 德国) 中并在液氮中冷冻于异戊烷中以用于制备用于组织化学分析的冰冻切片。未灌注小鼠用作蛋白质组分析的阴性对照。

[0168] 用于蛋白质组分析的蛋白提取物的制备

[0169] 将样品再悬浮于 40 μ l/克组织的裂解缓冲液 (2% SDS、50mM Tris、10mM EDTA、完全 E 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Diagnostics, Mannheim, 德国), 在 PBS 中, pH7.4) 中, 然后利用 Ultra-Turrax T8 分散器 (IKA-Werke, Staufen, 德国) 加以匀化。利用 Vibra-cell (Somes, New Town, CT, USA) 对匀浆进行超声处理, 接着在 99°C 温育 15 分钟并在 15000xg 下离心 20 分钟。上清液用作总蛋白提取物。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce)) 来确定蛋白质浓度。

[0170] 生物素化蛋白的纯化

[0171] 对于每个样品, 用缓冲液 A (NP40 1%、SDS 0.1%, 在 PBS 中) 洗涤 960 μ l 链霉亲和素-琼脂糖凝胶 (Amersham Biosciences, Uppsala, 瑞典) 淤浆三次, 制成颗粒并与 15 毫克总蛋白提取物混合。在 RT 下在旋转混合器中进行生物素化蛋白的捕获持续两小时。除去上清液并用缓冲液 A 洗涤树脂三次, 用缓冲液 B (NP40 0.1%, NaCl 1M, 在 PBS 中) 洗涤两次, 并用 50mM 碳酸氢铵洗涤一次。最后, 将树脂再悬浮于 400 μ l 的 50mM 碳酸氢铵溶液并添加 20 μ l 测序级改性猪胰蛋白酶 (在 50mM 碳酸氢铵中 40ng/ μ l 的贮存液) (Promega, Madison, WI, USA)。在 37°C 和不断搅拌下进行蛋白酶消化过夜。用 C18 微柱 (ZipTip C18, Millipore, Billerica, MA, USA) 对肽进行脱盐、纯化和浓缩。在冻干以后, 将肽储存在 -20°C。

[0172] 纳米毛细管-HPLC, 其中自动化在线流份定位于 MALDI 目标板

[0173] 通过反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 来分离胰蛋白酶肽, 其中利用 UltiMate 纳米尺度 LC 系统和 FAMOS 微型自动采样器 (LC Packings, 阿姆斯特丹, 荷兰), 其通过 Chromeleon 软件 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 加以控制。流动相 A 由水中的 2% 乙腈和 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 组成, 流动相 B 则由水中的 80% 乙腈和 0.1% TFA 组成。流速是 300nl/分钟。将来自生物素化蛋白 (亲和纯化自 1.5mg 总蛋白) 的消化的冻干肽溶解于 5 μ l 缓冲液 A 并装填在柱 (内径: 75 μ m, 长度 15cm, 填充有 C18 PepMap 100, 3 μ m, 100Å 微珠; LC Packings) 上。用梯度为 0-30% 的 B 洗脱肽 7 分钟, 用 30-80% 的 B 洗脱 67 分钟, 用 80-100% 的 B 洗脱 3 分钟, 然后用 100% 的 B 洗脱 5 分钟; 在分析下一个样品前, 用 100% A 对柱进行平衡 20 分钟。将洗脱流份与 3mg/ml α -氰基-4-羟基肉桂酸、277pmol/ml 神经降压肽 (内部标准)、0.1% TFA、以及 70% 的乙腈水溶液混合, 然后放置在利用在线 Probot 系统 (Dionex) 的 192 孔 MALDI 目标板上。MALDI 基质溶液的流量设置为 1.083 μ l/分钟。因此, 在 20 秒期间内收集的每个流份包含 361nl MALDI 基质溶液和 100nl 样品。神经降压肽的最终浓度是 100fmol/孔。

[0174] MALDI-TOF/TOF 质谱法

[0175] 用 4700 蛋白质组分析仪 (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) 进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析。对于前体离子选择, 在进行 MS/MS 以前, 以 MS 方式测量所有部分。选择最多 15 个前体/样品斑点用于随后的破碎, 其中通过碰撞诱导离解。由 Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems) 对谱进行处理和分析, 其使用内部 MASCOT (Matrix Science, London, UK) 软件, 用于将 MS 和 MS/MS 数据匹配于硅消化蛋白的数据库。相对于下载自 NCBI 主页 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 小鼠数据库筛查所获得的数据。借助于 MASCOT 软件进行的蛋白质鉴定被认为是对于最好的肽离子在 95% 置信

区间内的正确调用。

[0176] 利用 4700 蛋白质组分析仪 (Applied Biosystems) 进行 MALDI-TOF 和 MALDI-TOF/TOF 质谱分析。在 750 至 4000m/z 的范围内获得肽质量, 其中焦点质量 (focus mass) 为 2000m/z。MS 谱总结自 2000 个激光散粒, 其来自在 355nm 和 200Hz 下操作的 Nd:YAG 激光器。在 6 个校准孔中利用 5 个肽标准 (质量 900-2400m/z ;Applied Biosystems) 进行自动的板校准。此板校准用来更新仪器默认的用于所有 MS 和 MS/MS 谱的质量校准。另外, 利用加入 MALDI 基质的内部标准肽进行每个 MS 谱的内部校准。自动选择信噪比 > 100 的最多 15 个前体 / 样品孔用于随后的破碎, 其中通过碰撞诱导离解。MS/MS 谱总结自 2500 至 5000 个激光散粒。由 Global Protein Server Workstation(Applied Biosystems) 对谱进行处理和分析, 其使用内部 MASCOT(Matrix Science) 软件, 用于将 MS 和 MS/MS 数据匹配于硅消化蛋白数据库。MASCOT 搜索参数是 : (i) 2006 年 9 月 9 日下载自欧洲生物信息学协会 (European Bioinformatics Institute(EBI)) 主页 (ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/SPproteomes/fasta/proteomes/59.M_musculus.fasta.gz) 的小鼠数据库 ; (ii) 酶 : 胰蛋白酶和半胰蛋白酶 (semi-trypsin) ; (iii) 允许的若干错误切割 : 1 ; (iv) 可变翻译后修饰 : 蛋氨酸氧化 ; (v) 肽容差 : ± 30 ppm ; (vi) MS/MS 容差 : ± 0.2 Da ; (vii) 肽电荷 : +1 ; (viii) 用于肽的最低离子评分 C. I. % : 95 以及 (ix) 排名最高肽 : 1。另外, 使用了用以下参数过滤的 MS/MS 峰 : (i) 质量范围 : 低于前体质量 60Da 至 20Da ; (ii) 最小信噪比 : 6 ; (iii) 峰值密度过滤器 : 最多 30 个峰值 / 200Da 以及 (iv) 最大数量的峰 / 谱 : 65。

[0177] 抗体

[0178] 先前已描述了抗 ED-B 抗体片段 scFv(L19) 的分离 (Pini et al. 1998)。利用发布的程序 (Giovannom, Nucleic Acid Research, 2001, 29(5) : E27), 从 ETH-2 文库分离亲代抗 ED-A 抗体。在以下部分描述了亲代抗 ED-A 抗体的亲和力成熟, 产生高亲和力抗 ED-A 抗体。

[0179] 亲代抗 ED-A 抗体的亲和力成熟

[0180] 亲代抗 ED-A 抗体 (ETH-2 衍生抗体) 用作构建亲和力成熟文库的模板。在 VH CDR1 的位置 31、32 和 33 以及在 VL CDR1 的位置 31、31a 和 32 产生随机突变的过程中, 通过 PCR 在文库的 VHCDR1 (DP47 种系) 和 VL CDR1 (DPK22 种系) 中引入序列变异性, 其中对于 VH 使用部分简并引物 5' -CTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATMNNMNNMNGCTAAAGGTGAATCCAGA-3' (SEQ ID NO : 17) 而对于 VL 使用 5' -CCAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAAMNNMNNMNGCTAACACTCTGACTGGCCTGC-3' (SEQ ID NO : 18) (所有寡核苷酸购买自德国科隆的 Operon Biotechnologies)。通过 PCR 装配以 scFv 格式对 VHVL 组合进行组装, 其中利用引物 LMB3long (5' -CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (SEQ ID NO : 19) 和 fdseqlong (5' -GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3') (SEQ ID NO : 20), 并利用凝胶纯化的 VH 和 VL 片段作为模板。用 NcoI/NotI 双重消化组装的 VH-VL 片段并克隆到 NcoI/NotI 消化的 pHEN1 噬菌粒载体 (Hoogenboom et al., 1991)。按照 (Viti et al., 2000) 将获得的连接产物电穿孔到电感受态大肠杆菌 TG-1 细胞, 产生包含 1.5×10^7 个个体抗体克隆的文库, 其对具有改善的亲和力结合 ED-A 的抗体进行筛选。

[0181] 抗 ED-A 抗体的选择

[0182] 筛选上述抗体文库, 以获得比亲代抗 ED-A 抗体具有更大亲和力结合 ED-A 的抗体,

其中利用 BIAcore 分析。在 BIAcore 分析中所使用的抗原 (11A12) 包含人纤连蛋白的 ED-A 结构域并具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:120) :

[0183] MRSYRTEIDKPSQMVTVDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQTEMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPSEGSQLVQTAVTNIDRPKGLAFTDVIDVDSIKIAWESPQQVSRVRYTSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQSTAIPAPTDLKFQVTPSTLSAQWTPPNVQLTGYRVVTPKEKTGPMKEINLAPDSSSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPAQGVVTTLENVRSHHHHHH

[0184] 抗原 (11A12) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:121) 如下:

[0185] atgagatcctaccgaacagaaattgacaaacatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggacaacagcattagtggtcaagtgctgccttcaagttcccctgttactgggttacagagtaaccaccactcccaaaaatggaccaggaccaacaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaatgactattgaaggcttgagccacagtgaggatgttggttagtgctatgctcagaatccaagcggagagagtcagcctcttccatcaaaattgcttgggaaagcccacaggggaagtttccaggtacaggggtgacctactcgagccctgaggatggaatccatgagctattccctgcacctgatggtgaagaagacactgcagagctgcaaggcctcagaccgggttctgagtacacagtcagtggttgcttgcacgatgatggagagccagccctgattggaacccagtcacagctattcctgcaccaactgacctgaagttcactcaggtcacccacaagcctgagcgcccagtggaaccacccaatgttcagctcactggatatcgagtgcgggtgacccccaaagagaagaccggaccaatgaaagaaatcaaccttgctcctgacagctcatccgtggttgatatcaggacttatggtggccaccaaataatgaagtgagtgctctatgctcttaagqacactttgacaagcagaccagctcaggagattgtcaccactctggagaatgtcagatctcatcaccatcaccatcactaa

[0186] 通过 PCR 并利用引物来扩增抗原的核苷酸序列,其中引物在 5' 和 3' 分别包含 BamHI 和 BglIII 限制酶切位点。用 BamHI 和 BglIII 限制性内切核酸酶消化获得的 PCR 产物和载体 pQE12 (QIAGEN),随后在包含 3:1 的插入片段与载体的反应中加以连接。对所获得的载体进行测序以检查序列的正确性。

[0187] 抗原的制备如下:

[0188] 在有 1 μ l 的 11A12 的 DNA 微量制剂存在的条件下,在 10ml 2TY、Amp、1% 葡萄糖中 TG1 电感受态预培养物被电穿孔。然后预培养物被稀释 1:100 (8ml 在 800ml 的 2TY、Amp、0.1% 葡萄糖中) 并生长至 0.4-0.6 的 OD₆₀₀,然后被 IPTG 诱导过夜。第二天旋转沉淀细胞并过滤上清液 (Millipore 0.22 μ m)。在离心并澄清液体培养基以后,利用在 FPLC 上的 Hitrap 柱纯化 11A12。Ni/ 柱的再生如下:用 5 个柱容积 (CV) 的 H₂O,接着用 3CV 的 0.5M EDTA/0.2M Tris pH 8 对柱进行冲洗以从柱洗出用过的镍。接着用 5CV 的 H₂O 冲洗柱。然后用 2CV 的 100mM NiSO₄重新装填柱,接着用若干 CV 的 H₂O 冲洗柱。然后用 5CV 裂解缓冲液 (20mM 咪唑 /250mM NaCl/PBS pH 7.4) 对柱进行平衡。过滤细胞裂解液 (Millipore 0.45 μ m) 并装填到柱上 (手动)。然后将柱放回到 FPLC 上并使 (约 3CV) 裂解缓冲液流动,直到 UV 信号变得稳定 (恒定)。然后开始洗脱程序:在 5CV 中,梯度从 0% 至 100% 的洗脱缓冲液 (400mM 咪唑 /250mM NaCl/PBS pH 7.4)。汇聚包含洗脱抗原的流份,然后在 PBS 中透析过夜。

[0189] 抗 ED-A 抗体的表达和纯化

[0190] 抗 ED-A 抗体的表达和纯化如下:在有 1 μ l 的抗 ED-A 抗体之一的 DNA 微量制剂存在的条件下,在 10ml 2TY、Amp、1% 葡萄糖中,将 TG1 电感受态预培养物电穿孔。然后预培养物被稀释 1:100 (8ml 在 800ml 的 2TY、Amp、0.1% 葡萄糖中) 并生长至 0.4-0.6 的 OD₆₀₀,

然后被 IPTG 诱导过夜。第二天旋转沉淀细胞并过滤上清液 (Millipore 0.22 μm)。用蛋白-琼脂糖凝胶柱纯化 scFv 并且三乙胺用来从柱洗脱 scFv。在 4°C 下在 PBS 中透析包含洗脱 scFv 的流份过夜。然后将 scFv 流份放置在 Superdex 75 柱上,其中 PBS 以 0.5ml/分钟流过并收集 0.25ml 流份。单体流份用于 BIAcore 分析。

[0191] BIAcore 分析 1

[0192] 用 HBS-EP 缓冲液 BIAcore、0.01M N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 (Hepes) pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% 表面活性剂 P20 (用于测定的相同缓冲液) 以 5 μl /分钟的流速冲洗 BIAcore 芯片过夜。抗原 (11A12) 在醋酸盐缓冲液 (pH 4.0) 中被稀释至 50 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度并且通过注射 50 μl 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和乙基-N-(二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 的混合物来激活芯片上的 COOH 基团。将 40 μl 的 11A12 抗原注射到芯片上并用 30 μl 乙醇胺封闭剩余的游离 COOH 基团。在 0.22 μm 过滤以后,将 20 μl 每一个体细菌上清液注射到芯片上并实时监测与抗原的相互作用。

[0193] BIAcore 分析 2

[0194] 利用表面等离子体共振评价了亲代抗 ED-A 抗体和抗 ED-A 抗体 B2、C5、D5、C8、F8、B7 以及 G9 的 k_{on} 、 k_{off} 以及 K_D 。用在测定期间使用的相同的缓冲液平衡芯片过夜,其中缓冲液流速为 5 μl /分钟。以上述流速进行整个涂布程序。用醋酸盐缓冲液 pH4.00 (由 BIAcore 提供) 稀释 (1 : 25) 抗原 11A12 至 20 $\mu\text{g/ml}$ 的终浓度。然后混合 NHS 和 EDC 并注射 50 μl 以激活 CM5 芯片上的 COOH 基团。接着是注射 40 μl 的抗原 (持续约 40")。然后注射 30 μl 的乙醇胺以阻断最终游离的 COOH 的反应性。

[0195] 以 20 μl /分钟的流速测定每个样品。注射 20 μl 未稀释的单体蛋白 (它来自凝胶过滤)。离解时间为约 200"。然后注射 10 μl 的 HCl 10mM 以再生芯片。以不同稀释度,即 1 : 2 稀释度 (在 PBS 中) 重复注射单体蛋白,接着用 HCl 再生。接着以 1 : 4 的稀释度第三次注射蛋白,接着再次用 HCl 再生。利用 BIA 评价软件评价了每种抗 ED-A 抗体的 k_{on} 、 k_{off} 以及 K_D 值。

[0196] 组织化学

[0197] 为了证实成功的体内生物素化,如在 (Rybak et al. 2005) 中所描述的,之后进行生物素化结构的染色。从新鲜冷冻样品切割切片 (10 μm),用丙酮固定,依次用链霉亲和素:生物素化碱性磷酸酶复合物 (Biospa, Milano, 意大利) 和用 Fast-Red TP (Sigma) 温育 [在有 1mM 左旋咪唑存在的条件下来抑制内源性碱性磷酸酶],然后用苏木素溶液 (Sigma) 复染。

[0198] 如先前描述的 (参见例如, (Brack et al. 200c)),用 scFv-抗体 (其携带 FLAG 标记) 进行免疫组织化学染色。简言之,同时用 scFv 片段 (终浓度为 2-10 $\mu\text{g/mL}$) 和用单克隆抗 Flag 抗体 M2 来温育切片。用兔抗鼠免疫球蛋白抗体 (Dakocytomation, Glostrup, 丹麦),接着用小鼠单克隆碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶复合物 (Dakocytomation) 来检测结合的抗体。Fast Red (Sigma) 用作磷酸酶底物,并且用苏木素 (Sigma) 对切片实施复染。

[0199] 用 Glycergel (Dakocytomation, Glostrup, 丹麦) 封固所有切片并借助于 Axiovert S100TV 显微镜 (Carl Zeiss, Feldbach, 瑞士) 并利用 Axiovision 软件 (Carl Zeiss) 进行分析。

[0200] 借助于抗 ED-A 抗体进行体内定位

[0201] 用商用红外荧光团衍生物 Alexa Fluor 750 羧酸琥珀酰亚胺酯 (Invitrogen) 并按照供应商的实验方案来标记该亲代抗 ED-A 抗体 scFv。通过凝胶过滤并利用 PD-10 柱 (GE Healthcare) 将标记的抗体与未反应的染料分离。按照 Invitrogen 标记实验方案估计的标记程度为 5 个染料分子 / 抗体分子。在注射 F9DR 肿瘤细胞三周后, 在 Sv190 小鼠的尾静脉注射 Alexa 750 标记的亲代抗 ED-A scFv 抗体 (终浓度为 0.3mg/ml) (200 μ l / 小鼠, 即 60 μ g 抗体 / 小鼠)。在注射标记的抗体 6 小时以后, 切除小鼠器官并用国产 (home-built) 的红外线荧光成像仪 (Birchler et al. 1999) 成像, 其中上述成像仪装备有卤钨灯、专门针对 Alexa 750 的激发和发射滤光片、以及单色 CCD 照相机。

[0202] F8 双价抗体的生物分布

[0203] F8 双价抗体包含与抗 ED-A 抗体 F8 相同的 VH 和 VL 结构域, 例如, 采用 scFv 格式。F8 双价抗体和抗 ED-A scFv F8 在 VH 和 VL 结构域之间具有不同的接头序列。F8 双价抗体接头的氨基酸序列是 GSSGG (SEQ ID NO:28) (核苷酸序列: ggggtccagtggcggt [SEQ ID NO:29])。因此, F8 双价抗体接头序列的长度为 5 个氨基酸, 而在抗 ED-A scFv F8 中接头长度为 20 个氨基酸 (参见 SEQ ID NO:11)。在 VL 和 VH 结构域之间接头长度的减小意味着有利于 VL 和 VH 结构域的分子间而不是分子内配对。因此, 对于一个 F8 多肽的 VL 结构域而言, 和它配对的相同 F8 多肽的 VH 结构域相比, 更可能与另一个 F8 多肽的 VH 结构域配对。

[0204] 在大肠杆菌 TG1 细胞中表达 F8 双价抗体, 具体如下: 利用电穿孔, 将编码 F8 双价抗体的 DNA 引入电感受态大肠杆菌 TG1 细胞中。在 10ml 2YT 培养基、Amp、1% 葡萄糖中预培养该电穿孔的大肠杆菌细胞。将预培养物稀释 1 : 100 成 800ml 2YT 培养基、Amp、0.1% 葡萄糖并且培养物生长至 0.6 的密度 (OD_{600nm})。然后利用 1mM 的 IPTG 诱导 F8 双价抗体的表达。

[0205] 用 ¹²⁵I 标记表达的 F8 双价抗体, 具体如下: 将 10 μ l 无菌 PBS 加入非水溶性碘化试剂 (iodogen) 管 (涂布有 50 μ l 溶氯仿中的 0.1mg/ml 非水溶性碘化试剂), 接着添加 2 μ l ¹²⁵I 碘化钠 (约 200 μ Ci) 并在室温 (RT) 下温育 5 分钟。

[0206] 然后将在 OD_{0.2} 处 (约 60 μ g) 的 400 μ l 的 F8 双价抗体加入碘原管并在 RT 下温育 25 分钟。收集 1/100 的上述混合物以测量在混合物中包含的放射性 (称作 'INPUT')。然后将标记的 F8 双价抗体装填在尺寸排阻层析柱 (PD10 :Sephadex G-25M, GE Healthcare) 上以将碘化的 F8 双价抗体与游离碘分离。测量所收集的碘化 F8 双价抗体的放射性并且计算得到的掺入 F8 双价抗体中的碘的百分比 (碘化 F8 双价抗体的 CPM [每分钟计数] / CPM INPUT) 为 30-40%。

[0207] 将四只 F9 荷瘤小鼠放置在 Lugo1 上两天 (600 μ l 变成 300ml) 以封闭甲状腺并且对每只小鼠静脉注射 200 μ l 碘化 F8 双价抗体 (约 5-8 μ g 碘化 F8 双价抗体 [18 μ Ci] / 小鼠)。在 24 小时以后, 处死小鼠并切除肿瘤、肝脏、肺脏、脾脏、心脏、肾脏、肠、尾以及血液 (本文中统称为小鼠 '组织') 并用于放射性计数。利用 Perkin γ - 计数器测量每个组织样品中的放射性水平。通过注射剂量 (以 CPM 为单位) 的百分比除以组织的重量 (以克为单位) 来计算 '输出' (% ID/g)。

[0208] 结果

[0209] 差异表达蛋白和剪接变体的鉴定

[0210] 在图 1A 中描述了基于灌注的化学蛋白质组方法, 其用于在肝脏和在 F9 肝转移瘤

中可及蛋白的比较分析 (Terrana et al., 1987)。这些肿瘤在小鼠肝表面和内部发展成较大的转移性病灶 (图 1B)。在终端麻醉下, 对荷瘤小鼠灌注 15ml 的 1.8mM 磺基琥珀酰亚胺基-6-[生物素酰氨基]己酸酯 (1mg/ml) 在 PBS 中的溶液, pH 7.4, 其补充有 10% 右旋糖酐-40 作为血浆增容剂。该程序 (其通常持续 10 分钟) 使得可以从大循环的所有器官除去血液并选择性地使可及蛋白生物素化 (在血管的腔和近腔方面)。借助于这种程序, 高效率 and 选择性地标记了 F9 肝转移瘤和几乎所有血管, 如通过用链霉亲和素-碱性磷酸酶结合物进行的组织化学染色所证实的 (图 1C)。在正常肝脏中, 血管被强染色, 但还检测到某些窦状隙的标记, 其与肝脏的生理过滤功能并不冲突 (图 1C)。通过灌注包含伯胺的溶液来淬灭体内生物素化。其后, 从肝脏切除肝转移瘤样品, 匀化并在有强洗涤剂 SDS 存在的条件下通过用链霉亲和素树脂的亲和层析来回收生物素化蛋白 (图 1A)。为了将转移瘤蛋白在宿主肝脏中的扩散风险降低到最小程度, 来自体内生物素化的健康小鼠的肝脏用于研究正常肝血管。来自 F9 荷瘤小鼠的宿主肝脏的应用也是有问题的, 这是由于几乎没有残余的健康组织并且难以以肉眼排除没有微小转移。总计利用来自 7 只体内生物素化的健康小鼠和 9 只体内生物素化的 F9 荷瘤小鼠的样品用于蛋白质组分析。另外, 来自 2 只健康小鼠和 3 只荷转移瘤非生物素化小鼠的样品用作阴性对照。来自 F9 转移瘤和正常肝 (并行处理) 的链霉亲和素捕获蛋白的严格洗涤程序和树脂上胰蛋白酶消化产生了肽的集合, 其可以被分离、鉴定和比较, 其中利用纳米 HPLC 和 MALDI-TOF/TOF 质谱程序 (Roesli et al., 2006)。

[0211] 总共鉴定了 1291 种不同的肽 (> 95% Mascot 置信水平), 通过 Mascot 软件将其分为 480 个不同肽组。在来自非生物素化小鼠的阴性对照样品中也发现了几个这样的肽组 (如羧化酶, 其携带内源性生物素作为辅因子, 角蛋白作为污染物, 或非常丰富的蛋白质如血清白蛋白)。其余的 435 个鉴定的肽组中的 331 个可以通过 Mascot 软件明白地注解为单种蛋白, 而 104 个肽组被注解为多种 (总计为 358 种) 蛋白。在大多数情况下, 注解为相同肽组的多种蛋白属于相关蛋白家族 (例如, 免疫球蛋白) 或甚至可以是具有不同数据库条目 (database entry) 的相同蛋白。在 435 个不同肽组中, 117 个只存在于转移瘤样品中, 193 个仅存在于健康肝脏样品中以及 125 个存在于两种类型的组织中。例如, 匹配于纤连蛋白的肽 (美国国家生物技术信息中心 [NCBI] 登录号为 P11276) 存在于 4 个健康肝脏样品中以及 8 个转移瘤样品中。

[0212] 存在于健康肝脏和转移瘤样品中的蛋白 (例如纤连蛋白) 可以以显著不同的水平存在于两种样品中。如果是这样的话, 这应由在其中检测到蛋白的样品数目来反映, 和 / 或由在肝脏和转移样品中观测到的肽数目来反映 (以及归一化的肽信号强度; (Scheurer et al. 2005, Scheurer et al. 2005))。例如, 来自纤连蛋白 (NCBI 登录号为 P11276) 的 38 种胰蛋白酶肽仅存在于转移瘤样品中, 而一种肽仅存在于健康肝脏样品中。11 种肽存在于两种典型的样品中。

[0213] 尽管肝脏是纤连蛋白生物合成的部位, 但在肝脏转移瘤中检测到的纤连蛋白衍生肽的显著丰度促使我们研究了纤连蛋白衍生肽的相对丰度的差异以及可变剪接域的过度表达。表 1 列出了在蛋白质组分析中鉴定的所有纤连蛋白肽。小鼠纤连蛋白包含两个可以经受可变剪接的 III 型球状额外结构域: ED-A 和 ED-B (French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar et al. 2006)。此外, IIICS 节段在小鼠和人类中经受不同的剪接模式。有趣的是, 仅在肿瘤样品中观测到所有三种 ED-A 衍生肽以及 IIICS 衍生肽。

[0214] 在此分析中看不到 ED-B 衍生肽,这是由于 ED-B 不包含赖氨酸残基而两个精氨酸产生的肽的尺寸太大以致检测不到。图 2A 示出了在肿瘤样品(肿瘤)和健康肝脏样品(正常)中鉴定的肽在纤连蛋白域结构上的位置。图 2B 示出了两种纤连蛋白衍生肽的归一化 MS 信号的相对强度:位于 ED-A 结构域内的 IAWESPQGQVSR(SEQ ID NO:16),以及位于结构域 14 中的 FLTTTPNSLLVSWQAPR(SEQ ID NO:15)。后一种肽在转移瘤样品中更加丰富,但在正常肝对应物中也明确可检测到。相比之下,ED-A 衍生肽在转移瘤样品中产生强信号,但在正常肝脏中则完全检测不到(即,低 >100 倍的信号)。

[0215] 免疫组织化学

[0216] 在肝脏结构和转移性新生血管之间观测到纤连蛋白的 ED-A 和 ED-B 结构域的最显著区别。在两种情况下,均观测到转移性血管的强和特异性染色,而在此免疫组织化学分析中正常肝脏和几乎所有正常器官(除在增生期的子宫内膜和卵巢的有些血管之外)均为负分(图 3A)。重要的是,还发现在人肺转移瘤和肝脏转移瘤的新血管中,ED-A 被强烈表达(图 4)。

[0217] 体内定位

[0218] 为了测试 ED-A 作为用于转移瘤的基于配体的血管靶向的靶标的有效性,利用近红外荧光成像进行体内靶向试验。用 Alexa Fluor 750 标记亲代抗 ED-A scFv 抗体并静脉注射到 F9 荷转移瘤小鼠。切除器官的近红外荧光成像揭示了在转移性病变中靶向剂的显著累积(图 3B)。

[0219] 抗 ED-A 抗体的选择

[0220] BIAcore 分析 1

[0221] BIAcore 分析产生每种抗 ED-A 抗体的图像,对其加以分析以推断抗体对抗原的亲合力,具体如下:每幅图像的 X 轴对应于时间而 y 轴对应于共振单位(Resonance Unit)(一种度量,其指示所测试抗体对于涂布在 BIAcore 芯片上的抗原的结合亲和力)。每幅图示出了 3 个峰和 1 个对应于缓冲液的变化斜坡(dig),因而与结果的解释无关。

[0222] 每幅图的上升部分表示结合期。在图像的此部分曲线越陡峭,则抗体与抗原的结合得越快。每幅图的下降部分表示抗体与抗原的离解期。在此图像部分曲线越平坦,则抗体与抗原的离解越慢。

[0223] 由亲代抗 ED-A 抗体衍生的抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 均显示出比亲代抗 ED-A 抗体更平坦的离解曲线,这表明它们以比亲代抗 ED-A 抗体更大的亲和力结合 ED-A,因而还结合 A-FN。抗体 E5、F1、F8 以及 H1 的图像显示出所测试的所有抗 ED-A 抗体的最平坦的离解曲线。抗体 H1、C5、D5、E5、C8、F8 以及 F1 的结合曲线比针对亲代抗 ED-A 抗体所观测到的结合曲线更平坦,而抗体 B2、B7、E8 以及 G9 所观测到的结合曲线与亲代抗 ED-A 抗体所观测到的结合曲线一样陡峭。然而,当 IPTG 诱导的大肠杆菌 TG-1 细胞的细菌上清液用于抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 的 BIAcore 分析时,所测试的抗体样品的浓度是未知的,但最有可能低于用于比较的亲代抗 ED-A 抗体样品的浓度。因此,抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 的结合曲线可以被人为地降低,这是由于在用于 BIAcore 分析的样品中的抗体浓度较低。然而,由于在 BIAcore 分析中浓度并不显著影响抗体与其靶抗原的离解,所以针对抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 所观测到的平坦的离解曲线表明这些抗体结合 ED-A,并且和亲代抗 ED-A 抗

体相比具有至少相等、以及可能更高的亲和力。因此,当利用亲代抗 ED-A 抗体进行相同体内和免疫组织化学研究时(如在本文其它地方所描述的),抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 极有可能产生相同或更好的结果。因此,利用亲代抗 ED-A 抗体获得的体内和免疫组织化学数据提供了抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 可以用于治疗肿瘤转移瘤的证据。

[0224] BIAcore 分析 2

[0225] 利用 BIA 评价软件评价了每种抗 ED-A 抗体的 k_{on} 、 k_{off} 以及 KD 值。亲代抗 ED-A 抗体和抗 ED-A 抗体 B2、C5、D5、C8、F8、B7 以及 G9 对于抗原 11A12 的 k_{on} 、 k_{off} 以及 KD 值详细列在表 3 中。由亲代抗 ED-A 抗体衍生的抗 ED-A 抗体 B2、C5、D5、C8、F8、B7 以及 G9 对于抗原 11A12 均比亲代抗 ED-A 抗体具有更好的 K_D 值,这表明它们以比亲代抗 ED-A 抗体更大的亲和力结合 ED-A,因而还结合 A-FN。因此,当利用亲代抗 ED-A 抗体进行相同体内和免疫组织化学研究时(如在本文其它地方所描述的),抗 ED-A 抗体 B2、C5、D5、C8、F8、B7 以及 G9 极有可能产生相同或更好的结果。因此,利用亲代抗 ED-A 抗体获得的体内和免疫组织化学数据提供了抗 ED-A B2、C5、D5、C8、F8、B7 以及 G9 可以用于治疗肿瘤转移瘤的证据。

[0226] F8 双价抗体的生物分布

[0227] 每克(g)小鼠组织中检测到的 I^{125} 标记(碘化)F8 双价抗体的注射剂量(ID)的百分比(%)非常类似于肝脏、肺脏、脾脏、心脏、肾脏、肠、尾以及血液,并且除肾脏之外均显示小于 2% ID/g(图 8)。相反,F9 肿瘤比所分析的任何其它小鼠组织平均包含多约四倍的 ID(图 8)。这表明,F8 双价抗体被选择性地靶向于 F9 小鼠肿瘤。在其他组织中检测到的 ID 的百分比最有可能表示小鼠体内存在的 F8 双价抗体或其他小鼠组织的非特异性标记的背景负载(background load)。如在本文其他地方所描述的,利用四只小鼠进行生物分布实验,并且虽然每只小鼠组织中检测到的 ID 的百分比是不同的(参见图 8 中的误差条线),但在 F9 肿瘤中检测到的 F8 双价抗体的百分比一致地高于所测试的任何其他小鼠组织。

[0228] 对 F9 原发性肿瘤进行了生物分布研究,结果表明,根据本发明的抗 ED-A 抗体被选择性地靶向于体内肿瘤组织。结果进一步表明,当利用亲代抗 ED-A 抗体进行相同的体内和免疫组织化学研究时(如在本文其它地方描述的),本发明的抗 ED-A 抗体可以用来获得相同或更好的结果。

[0229] 测序

[0230] 抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 均是 scFv 抗体,并利用常规方法加以测序。抗 ED-A 抗体 H1 的核苷酸序列示于图 6 中。抗 ED-A 抗体 H1 的氨基酸序列示于图 7 中。

[0231] 编码抗 ED-A 抗体 B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 的 VH 和 / 或 VL 的优选的核苷酸序列与编码抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 和 / 或 VL 的核苷酸序列相同,只是编码轻(VL)和重(VH)链的 H1CDR1 的核苷酸序列被编码相应抗体轻链(VL)和重链(VH)CDR1(列在表 2 中)的核苷酸序列取代。

[0232] 编码抗 ED-A F8 双价抗体的 VH 和 / 或 VL 结构域的某些优选的核苷酸序列与编码抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 和 / 或 VL 结构域的核苷酸序列相同,只是编码轻链(VL)和重链(VH)的 H1CDR1 的核苷酸序列被编码抗 ED-A 抗体 F8 的轻链(VL)和重链(VH)CDR1(列在表 2 中)的核苷酸序列取代。编码接头(其连接抗 ED-A F8 双价抗体的 VH 和 VL 结构域)的一个优

选核苷酸序列是 ggggtccagtggcggt (SEQ ID NO :29)。

[0233] 抗 ED-A 抗体 B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8 以及 G9 具有与抗 ED-A 抗体 H1 相同的氨基酸序列,只是轻链 (VL) 和重链 (VH) 的 H1CDR1 的氨基酸序列被相应抗体的轻链 (VL) 和重链 (VH)CDR1 (列在表 2 中) 的氨基酸序列取代。抗 ED-A F8 双价抗体的 VH 和 VL 结构域的氨基酸序列与抗 ED-A 抗体 H1 的氨基酸序列相同,只是轻 (VL) 和重 (VH) 链的 H1CDR1 的氨基酸序列被抗 ED-A 抗体 F8 的轻链 (VL) 和重链 (VH)CDR1 (列在表 2 中) 的氨基酸序列取代,以及在 H1 中的接头的氨基酸序列被接头氨基酸序列 GSSGG (SEQ ID NO :28) 取代。

[0234] 抗 ED-A 抗体 B2VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :21) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :23 代替 H1 的 VH CDR1。

[0235] 抗 ED-A 抗体 C5VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :41) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :43 代替 H1 的 VH CDR1。

[0236] 抗 ED-A 抗体 D5VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :51) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :53 代替 H1 的 VH CDR1。

[0237] 抗 ED-A 抗体 E5VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :61) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :63 代替 H1 的 VH CDR1。

[0238] 抗 ED-A 抗体 C8VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :71) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是 SEQ ID NO :73 代替 H1 的 VH CDR1。

[0239] 抗 ED-A 抗体 F8VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :81) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是 SEQ ID NO :83 代替 H1 的 VH CDR1。抗 ED-A F8 双价抗体的 VH 结构域具有与抗 ED-A scFv 抗体 F8 的 VH 结构域相同的氨基酸序列 (即 SEQ ID NO :81)。

[0240] 抗 ED-A 抗体 F1VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :91) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :93 代替 H1 的 VH CDR1。

[0241] 抗 ED-A 抗体 B7VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :101) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是 SEQ ID NO :103 代替 H1 的 VH CDR1。

[0242] 抗 ED-A 抗体 E8VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :111) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :113 代替 H1 的 VH CDR1。

[0243] 抗 ED-A 抗体 G9VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :31) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VH 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :33 代替 H1 的 VH CDR1。

[0244] 抗 ED-A 抗体 B2VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :22) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :26 代替 H1 的 VL CDR1。

[0245] 抗 ED-A 抗体 C5VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :42) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :46 代替 H1 的 VL CDR1。

[0246] 抗 ED-A 抗体 D5VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :52) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :56 代替 H1 的 VL CDR1。

[0247] 抗 ED-A 抗体 E5VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :62) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :66 代替 H1 的 VL CDR1。

[0248] 抗 ED-A 抗体 C8VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :72) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :76 代替 H1 的 VL CDR1。

[0249] 抗 ED-A 抗体 F8VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :82) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :86 代替 H1 的 VL CDR1。抗 ED-A F8 双价抗体的 VL 结构域具有与抗 ED-A 抗体 F8 的 VL 结构域相同的氨基酸序列 (即 SEQ ID NO :82)。

[0250] 抗 ED-A 抗体 F1VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :92) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :96 代替 H1 的 VL CDR1。

[0251] 抗 ED-A 抗体 B7VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :102) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :106 代替 H1 的 VL CDR1。

[0252] 抗 ED-A 抗体 E8VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :112) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :116 代替 H1 的 VL CDR1。

[0253] 抗 ED-A 抗体 G9VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :32) 与抗 ED-A 抗体 H1 的 VL 结构域的氨基酸序列相同,只是由 SEQ ID NO :36 代替 H1 的 VL CDR1。

[0254] 可选地,如图 7A 所示,在抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8、G9 的 VH 结构域的位置 5 处的氨基酸可以是亮氨酸残基 (L) 而不是缬氨酸残基 (V)。此外或可替换地,如图 7C 所示,在抗 ED-A 抗体 H1、B2、C5、D5、E5、C8、F8、F1、B7、E8、G9 的 VL 结构域的位置 18 处的氨基酸可以是精氨酸残基 (R) 而不是赖氨酸残基 (K)。

[0255] 参考文献

[0256] 在本说明书中任何地方引用的所有参考文献,包括那些在上述任何地方引用的文献,其全部内容以引用方式结合于本文并用于所有目的。

[0257] Amit et al. (1986), Science, 233 :747-753.

[0258] Andersen et al. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13 :117.

[0259] Ausubel et al. (1999) 4th eds., Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons.

[0260] Bagshawe K. D, et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4 :915-922

[0261] Balza et al. (1988), FEBS Lett., 228 :42-44.

[0262] Birchler et al. (1999), J. Immunol. Methods, 231, 239-248.

[0263] Bird et al. (1988) Science, 242, 423-426

[0264] Borsi et al. (1987), J. Cell. Biol., 104, 595-600.

[0265] Borsi et al. (1990), FEBS Lett., 261 :175-178.

[0266] Borsi et al. (1995), J. Biol. Chem., 270 :6243-6245.

[0267] Borsi et al. (1998), Exp. Cell Res., 240, 244-251.

[0268] Brack et al. (2006), Clin. Cancer Res., 12, 3200-3208.

[0269] Carbemolla et al. (1989), J. Cell. Biol., 108 :1139-1148.

[0270] Caton et al. (1990), J. Immunol., 144 :1965-1968.

[0271] Chadd et al. (2001), Current Opinion in Biotechnology 12 :188-194

[0272] Chothia et al. (1987), J. Mol. Biol., 196 :901-917.

[0273] Chothia et al. (1989), nature, 342 :877-883.

[0274] Devos et al. (1983), Nucl. Acids Res. 11 :4307-4323.

- [0275] ffrench-Constant(1995), Exp. Cell Res. , 221, 261-271.
- [0276] Giovannoni, Nucleic. Acid Research, 2001, 29 (5) :E27.
- [0277] Glennie M J et al. , 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375
- [0278] Haan et al. (2004), BioCentury, 12 (5) :A1-A6.
- [0279] Hanahan et al. (2000), Cell 200, 57-70.
- [0280] Harlow and Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
- [0281] Kornblihtt et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868.
- [0282] Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y. , pp. 726, 1988
- [0283] Heikmheimo et al. (1991), Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. , 61, 101-109.
- [0284] Holliger and Bohlen 1999 Cancer and metastasis rev. 18 :411-419.
- [0285] Holliger et al. (1993a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448.
- [0286] Holliger et al. (1993b), Current Opinion Biotechnol 4, 446-449.
- [0287] Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490.
- [0288] Hoogenboom et al. (1991), Nucleic Acids Res. , 19 (15) 4133-7.
- [0289] Hu et al. (1996), Cancer Res. , 56, 3055-3061.
- [0290] Huston et al. (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883.
- [0291] Hynes, R. O. (1990). Fibronectins (New York :Springer-Verlag).
- [0292] Jacobs et al. (2002), Hum. Pathol. , 33, 29-38.
- [0293] Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services.
- [0294] Kabat et al. (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington, (a)
- [0295] Kabat et al. (1991b), J. Immunol. , 147 :1709-1719.
- [0296] Kaspar et al. (2006), Int. J. Cancer, 118, 1331-1339.
- [0297] Knappik et al. , (2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86.
- [0298] Kohler and Milstein, Nature, 256 :495-497, 1975
- [0299] Koide et al. (1998), Journal of Molecular Biology, 284 :1141-1151.
- [0300] Kontermann et al. (2001), S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC ; ISBN :3540413545.
- [0301] Koukoulis et al. (1993), J. Submicrosc. Cytol. Pathol. , 25, 285-295.
- [0302] Koukoulis et al. (1995), Ultrastruct. Pathol. , 19, 37-43.
- [0303] Rrebs et al. (2001), Journal of Immunological Methods, 254 67-84.
- [0304] Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12 : 411-418.
- [0305] Ledermann J. A. et al, (1991) Int. J. Cancer 47 :659-664
- [0306] Lohi et al. (1995), Int. J. Cancer, 63, 442-449.
- [0307] MaED-A et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 115 :1040-1047 ;

- [0308] Matsumoto et al. (1999), Jpn. J. Cancer Res. , 90, 320-325.
- [0309] McCafferty et al. , (1990) Nature, 348, 552-554.
- [0310] Mendez, M. et al. , (1997) Nature Genet, 15(2) :146-156.
- [0311] Merchand et al. , 1998 Nature Biotech. 16 :677-681
- [0312] Neri, D. , and Bicknell, R. (2005), Nat Rev Cancer 5, 436-446.
- [0313] Nygren et al. (1997), Current Opinion in Structural Biology, 7 :463-469.
- [0314] Oyama et al. (1989), J. Biol. Chem. , 264, 10331-10334.
- [0315] Paoletta et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557.
- [0316] Pini et al. (1998), J. Biol. Chem. , 273, 21769-21776.
- [0317] Pluckthun (1991), Bio/Technology 9 :545-551.
- [0318] Reiter et al. (1996), Nature Biotech, 14, 1239-1245.
- [0319] Repp et al. , 1995 J. Hemat. 377-382.
- [0320] Ridgeway et al. (1996), Protein Eng. , 9, 616-621.
- [0321] Robinson ed. , Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc. , New York, 1978
- [0322] Roesli et al. (2006), Nature Protocols, 1, 192-199.
- [0323] Rufet al. (1991) J. Biol. Chem. 266 :15719-15725.
- [0324] Rybak et al. (2005), Nat. Methods, 2, 291-298.
- [0325] Rybak et al. (2006), ChemMedChem. , 2, 22-40.
- [0326] Sambrook and Russell, Molecular Cloning :a Laboratory Manual :3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [0327] Scarpatti et al. (1987) Biochemistry 26 :5234-5238.
- [0328] Scarpino et al. (1999) J. Pathol. 188, 163-167.
- [0329] Scheurer et al. (2005), Proteomics 5, 3035-3039.
- [0330] Segal et al. (1974), PNAS, 71 :4298-4302.
- [0331] Sharon et al. (1990a), PNAS, 87 :4814-4817.
- [0332] Sharon et al. (1990b), J. Immunol. , 144 :4863-4869.
- [0333] Silacci et al. (2003), Proteomics, 5, 2340-2350.
- [0334] Staerz U. D. and Bevan M. J. 1986 PNAS 83
- [0335] Suresh et al. , 1986 Method Enzymol. 121 :210-228
- [0336] Taniguchi et al. (1983) Nature 302, 305-310 ;
- [0337] Tavian et al. (1994), Int. J. Cancer, 56, 820-825.
- [0338] Terrana et al. (1987), Cancer Res. 47, 3791-3797.
- [0339] Thorpe (2004), Clin. Cancer Res. , 10, 415-427.
- [0340] Trachsel et al. (2006), Adv. Drug Deliv. Rev. , 58, 735-754.
- [0341] Viti et al. (2000), Methods Enzymol. , 326, 480-505.
- [0342] Ward et al. (1989), Nature 341, 544-546.
- [0343] Wess In :BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42) , A1-A7, 2004

[0344] 表1

[0345] 在正常肝脏和 / 或转移瘤中鉴定的纤连蛋白肽

[0346]

肽序列	序列位置		¹ 肝脏 (总计=6)	转移瘤 (总计=8)
	起始	结束		
HYQINQQWER	59	68		6
VGDTYERPK	109	117		4
HALQSASAGSGSFTDVR	274	290		7
IGDQWDK	480	486		1
TFYQIGDSWEK	568	578	1	
WKEATIPGHLNSYTIK	654	669		2
EATIPGHLNSYTIK	656	669		1
GLTPGVIYEGQLISIQQYGHR	670	690		7
WSRPQAPITGYR	830	841	2	3
SDNVPPPTDLQFVELTDVK	903	921		3
VTIMWTTPDSVVSQYR	922	937		8
VEVLPVSLPGEHGQR	938	952		8
NTFAEITGLSPGVTYLTK	958	975		7
VFAVHQGR	976	983		7
TVLVTWTFPR	1011	1020	2	8
QYNVGFLASK	1040	1049		4
NLQPGSEYTVTLVAVK	1054	1069		6
ATGVFTTLQPLR	1077	1088	1	8
LGVRPSQGGAPR	1116	1128		7
VVTPLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWEK	1169	1196		3
STTPDITGYR	1197	1206		7
VTWAPPPSIELTNLLVR	1375	1391	2	7
TGLDSPTGFDSSDITANSFTVHWVAPR	1446	1472		4
APITGYIIR	1473	1481	1	8
HHAESVGRPR	1482	1492		1
EESPLIGQQATVSDIPR	1525	1542		8
ITYGETGGNSPVQEFVPGSK	1570	1590	2	8
SPVQEFVPGSK	1579	1590		6
STATINNIKPGADYTITLYAVTGR	1591	1614		5
GDSPASSKPVSYNYK	1615	1629		4
TEIDKPSQMQVTDVQDNSISVR	1630	1651		8
WLPSTSPVTGYR	1652	1663		7
TASPDQTEMTIEGLQFTVEYVVSVAQNR	1679	1707		7
² NGESQPLVQTAVTTIPAPTNLK	1708	1819		3
³ NGESQPLVQTAVTNIDRPK	1708	1726		1
³ IAWESPQGQVSR	1740	1751		8
³ VTYSSPEDGIR	1754	1764		1
FSQVTPTSFTAQWIAPSVQLTGYR	1820	1843	1	5
YEVSVYALK	1878	1886		2
TKTETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1926	1949	1	2
TETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1928	1949		3
SYTITGLQPGTDYK	1957	1970		7
IHLYTLNDNAR	1971	1981		7

[0347]

续表 1

SSPVIIDASTAIDAPSNLR	1982	2000	3	8
FLTTTPNSLLVSWQAPR	2001	2017	4	5
ITGYIIK	2020	2026		5
YEKPGSPPR	2027	2035		6
⁴ PYLPNVDEEVQIGHVPR	2165	2181		7
GVTYNIIVEALQNQR	2255	2269	4	7
RPGAAEPSPDGTTGHTYNQYTQR	2425	2447		2

[0348] ¹数目表示,在 6 只健康 体内生物素化小鼠或 8 只荷转移瘤体内生物素化小鼠中的多少只小鼠体内,在相应组织样品中鉴定到该肽。这里列出所有肽,其已由 Mascot 软件注解为纤连蛋白数据库条目 P11276、Q3UHL6 或 Q3TCF1。

[0349] ²此肽包括 ED-A 结构域前后的纤连蛋白序列部分,表明 (EDA-)- 纤连蛋白同种型的存在。

[0350] ³这些肽匹配于 ED-A 结构域的序列 (序列位置 1721-1810)。

[0351] ⁴此肽匹配于 IIICS 延伸的序列 (序列位置 2082-2201)。

[0352] 表 2

[0353] 抗 ED-A 亲和力成熟抗体的重链 (VH) 和轻链 (VL) CDR1 的核苷酸和氨基酸序列

[0354]

抗体	CDR1 (VH)	CDR1 (VL)
H1	CCG CGG AGG P R R (SEQ ID NO: 3)	TCT GCG TGG S A W (SEQ ID NO: 6)
B2	GCG GCT AAG A A K (SEQ ID NO: 23)	GTG GCT TTT V A F (SEQ ID NO: 26)
C5	CCG ATT ACT P I T (SEQ ID NO: 43)	TTG CAT TTT L H F (SEQ ID NO: 46)
D5	GTG ATG AAG V M K (SEQ ID NO: 53)	AAT GCT TTT N A F (SEQ ID NO: 56)
E5	ACT GGT TCT T G S (SEQ ID NO: 63)	CTT GCG CAT L A H (SEQ ID NO: 66)
C8	CTT CAG ACT L Q T (SEQ ID NO: 73)	CTT CCT TTT L P F (SEQ ID NO: 76)
F8	CTG TTT ACG L F T (SEQ ID NO: 83)	ATG CCG TTT M P F (SEQ ID NO: 86)
F1	TAG GCG CGT Q (Amber) A R (SEQ ID NO: 93)	GCG CCT TTT A P F (SEQ ID NO: 96)
B7	CAT TTT GAT H F D (SEQ ID NO: 103)	CTG GCT TTT L A F (SEQ ID NO: 106)
E8	GAT ATG CAT D M H (SEQ ID NO: 113)	TCG TCT TTT S S F (SEQ ID NO: 116)
G9	CAT ATG CAG H M Q (SEQ ID NO: 33)	ACT GCT TTT T A F (SEQ ID NO: 36)

[0355] 表 3

[0356] BIAcore 评价数据

[0357]

抗体	$K_{on}(1/MS)$	$K_{off}(1/s)$	$K_D(M)$
亲代抗 ED-A 抗体	2.5×10^5	0.02	$\sim 1 \times 10^{-7}$
B2	3.8×10^5	7.54×10^{-3}	$\sim 2 \times 10^{-8}$
C5	3.04×10^5	9.23×10^{-3}	$\sim 3 \times 10^{-8}$
D5	4.53×10^5	7.6×10^{-3}	$\sim 1.7 \times 10^{-8}$
C8	3.8×10^5	5.3×10^{-3}	$\sim 1.4 \times 10^{-8}$
F8	4.65×10^5	1.4×10^{-3}	$\sim 3.1 \times 10^{-8}$
B7	2.67×10^5	4.5×10^{-3}	$\sim 1.68 \times 10^{-8}$
G9	3.6×10^5	7.54×10^{-3}	$\sim 2.09 \times 10^{-8}$

[0001]

P72645_序列表

序列表

<110> 菲洛根股份公司 (PHILGEN S.P.A.)
 <120> 与肿瘤转移的新生血管有关的纤连蛋白的ED-A抗原
 <130> P72645MELP
 <150> US 60/909,580
 <151> 2007-04-02
 <150> US 60/948,564
 <151> 2007-07-09
 <160> 193
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1重链 (VH) 的氨基酸序列
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Arg
 20 25 30
 Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1轻链 (VL) 的氨基酸序列
 <400> 2
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala

[0002]

P72645 序列表

20	25	30
Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
Pro Gln Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro		
85	90	95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu		
100	105	110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala		
115	120	125

<210> 3
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1的重链CDR1的氨基酸序列

<400> 3

Pro Arg Arg
 1

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1的重链CDR2的氨基酸序列

<400> 4

Ser Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1的重链CDR3的氨基酸序列

<400> 5

Ser Thr His Leu Tyr Leu
 1 5

<210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

[0003]

P72645_序列表

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体H1的轻链CDR1的氨基酸序列

<400> 6

Ser Ala Trp
1

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体H1的轻链CDR2的氨基酸序列

<400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体H1的轻链CDR3的氨基酸序列

<400> 8

Met Arg Gly Arg Pro Pro
1 5

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体H1连接子序列的氨基酸序列

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15Gly Gly Gly Ser
20

<210> 12

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体H1重链 (VH) 的核苷酸序列

<400> 12

gaggtagcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagaetc 60

[0004]

P72645 序列表

```

tctctgtgcag cctctgggatt cacctttagc ccgctggagga tgagctgggt ccgccagget      120
ccaggggaagg ggctgggagtg ggctctcagct attagtggtg gtggtggttag cacatactac      180
gcagactccg tgaaggggcgg gttaaccatc tccagagaca attccaagaa caccgcttat      240
ctgcaaatga acagcctgag agcggaggac acggcgcgtat attactgtgc gaaaagtact      300
catttgtaic tttttagcta ctggggccag ggaacctctg tcaccgtctc gagt              354

```

<210> 13
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1轻链（VL）的核苷酸序列

```

<400> 13
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aaaagccacc      60
ctctctctgca gggccagtcg gagtgttagc tctgctggtt tagctctgta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcactctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtggt gctctgggaca gacttcactc tcacctcag cagactggag      240
ccgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagatgcgtg gtcggcgccc gacgttcggc      300
caagggacca aggtggaaat caaagcgccc gcagaacaaa aactcacttc agaagaggat      360
ctgaatgggg ccgcattagac tgtgaaa              387

```

<210> 14
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1连接子序列的核苷酸序列

```

<400> 14
ggcgggtggag gtctctggcg cggtggcagt ggcgggtggag gtcccggggg tggaggatct      60

```

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

```

Phe Leu Thr Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
1           5           10           15

```

Arg

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

```

Ile Ala Trp Gln Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
1           5           10

```

<210> 17
 <211> 52

[0005]

		P72645_序列表	
35	40	45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	22		
<211>	125		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体B2 VL结构域的氨基酸序列		
<400>	22		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala			
	20	25	30
Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
	35	40	45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro			
	85	90	95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu			
	100	105	110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala			
	115	120	125
<210>	23		
<211>	3		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体B2重链CDR1的氨基酸序列		
<400>	23		

[0007]

P72645_序列表

Ala Ala Lys
1

<210> 24

<400> 24
000

<210> 25

<400> 25
000

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体B2轻链CDRL的氨基酸序列

<400> 26

Val Ala Phe
1

<210> 27

<400> 27
000

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：F8双特异抗体的连接子序列

<400> 28

Gly Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 29

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：F8双特异抗体的连接子序列

<400> 29

gggtccagtg ggggt

15

<210> 30

<400> 30
000

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体G9 VH结构域的氨基酸序列

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0008]

P72645_序列表															
1	5	10	15												
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	His	Met
	20							25					30		
Gln	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35						40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55						60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												
<210>	32														
<211>	125														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体G9 VL结构域的氨基酸序列														
<400>	32														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Gln
65					70					75				80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Met	Arg	Gly	Arg	Pro
				85					90				95		
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu
			100					105					110		
Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala			
		115					120					125			
<210>	33														
<211>	3														

[0009]

P72645_序列表

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体G9的重链CDR1的氨基酸序列

<400> 33

His Met Gln
1

<210> 34

<400> 34
000

<210> 35

<400> 35
000

<210> 36
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体G9的轻链CDR1的氨基酸序列

<400> 36

Thr Ala Phe
1

<210> 37

<400> 37
000

<210> 38

<400> 38
000

<210> 39

<400> 39
000

<210> 40

<400> 40
000

<210> 41
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体C5 VH结构域的氨基酸序列

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0010]

		P72645_序列表	
35	40	45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210>	42		
<211>	125		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体C5 VL结构域的氨基酸序列		
<400>	43		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His			
20	25	30	
Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro			
	85	90	95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu			
100	105	110	
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala			
115	120	125	
<210>	43		
<211>	3		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体C5的重链CDR1的氨基酸序列		
<400>	43		

[0011]

P72645_序列表

Pro Ile Thr
1

<210> 44

<400> 44
000

<210> 45

<400> 45
000

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体C5的轻链CDR1的氨基酸序列

<400> 46

Leu His Phe
1

<210> 47

<400> 47
000

<210> 48

<400> 48
000

<210> 49

<400> 49
000

<210> 50

<400> 50
000

<210> 51
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体D5 VH结构域的氨基酸序列

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0012]

P72645_序列表															
65						70								75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												
<210>	52														
<211>	125														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体D5 VL结构域的氨基酸序列														
<400>	52														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Ala
			20					25					30		
Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
			35				40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Met	Arg	Gly	Arg	Pro
			85						90					95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu
			100					105					110		
Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Gln	Gln	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala			
			115				120					125			
<210>	53														
<211>	3														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体D5的重链CDR1的氨基酸序列														
<400>	53														
Val	Met	Lys													
1															
<210>	54														
<400>	54														
000															

[0013]

P72645_序列表

<210> 55
 <400> 55
 009
 <210> 56
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体D5的轻链CDR1的氨基酸序列
 <400> 56
 Asn Ala Phe
 1
 <210> 57
 <400> 57
 009
 <210> 58
 <400> 58
 009
 <210> 59
 <400> 59
 009
 <210> 60
 <400> 60
 009
 <210> 61
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体E5 VII结构域的氨基酸序列
 <400> 61
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Gly
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[0014]

	100	105	P72645 序列表 110
	Leu Val Thr Val Ser Ser 115		
<210>	62		
<211>	125		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体E5 VL结构域的氨基酸序列		
<400>	62		
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15		
	Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala 20 25 30		
	His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45		
	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80		
	Pro Gln Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro 85 90 95		
	Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Ala Ala Ala Glu 100 105 110		
	Gln Lys Leu Ile Ser Glu Gln Asp Leu Asn Gly Ala Ala 115 120 125		
<210>	63		
<211>	3		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列：抗-ED-A抗体E5的重链CDR1的氨基酸序列		
<400>	63		
	Thr Gly Ser 1		
<210>	64		
<400>	64 000		
<210>	65		
<400>	65 000		
<210>	66		
<211>	3		

[0015]

P72645_序列表

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体E5的轻链CDR1的氨基酸序列

 <400> 66
 Leu Ala His
 1

 <210> 67

 <400> 67
 000

 <210> 68

 <400> 68
 000

 <210> 69

 <400> 69
 000

 <210> 70

 <400> 70
 000

 <210> 71
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体C8 VH结构域的氨基酸序列

 <400> 71
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Gln
 20 25 30

 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 72

[0016]

P72645_序列表

<211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体C8 VL结构域的氨基酸序列

 <400> 72
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Pro
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

 <210> 73
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体C8的重链CDR1的氨基酸序列

 <400> 73
 Leu Gln Thr
 1

 <210> 74
 <400> 74
 000

 <210> 75
 <400> 75
 000

 <210> 76
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体C8的轻链CDR1的氨基酸序列

 <400> 76

[0017]

P72645_序列表

Leu Pro Phe
1

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80

<400> 80
000

<210> 81

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体P8 VH结构域的氨基酸序列

<400> 81

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体P8 VL结构域的氨基酸序列

<400> 82

[0018]

P72645_序列表

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 83
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体F8的重链CDR1的氨基酸序列
 <400> 83

Leu Phe Thr
 1

<210> 84

<400> 84
 000

<210> 85

<400> 85
 000

<210> 86
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体F8的轻链CDR1的氨基酸序列
 <400> 86

Met Pro Phe
 1

<210> 87

<400> 87
 000

[0019]

P72645_序列表

<210> 88
 <400> 88
 000
 <210> 89
 <400> 89
 000
 <210> 90
 <400> 90
 000
 <210> 91
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体F1 VH结构域的氨基酸序列
 <400> 91
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Ala
 20 25 30
 Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 92
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体F1 VL结构域的氨基酸序列
 <400> 92
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
 20 25 30

[0020]

P72645_序列表

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 93

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体F1的重链CDR1的氨基酸序列

<400> 93

Gln Ala Arg
1

<210> 94

<400> 94
000

<210> 95

<400> 95
000

<210> 96

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体F1的轻链CDR1的氨基酸序列

<400> 96

Ala Pro Phe
1

<210> 97

<400> 97
000

<210> 98

<400> 98
000

<210> 99

[0021]

P72645_序列表

<400> 99
 000
 <210> 100
 <400> 100
 000
 <210> 101
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体B7 VH结构域的氨基酸序列
 <400> 101
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Phe
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 102
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：抗-ED-A抗体B7 VL结构域的氨基酸序列
 <400> 102
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

[0022]

P72645_序列表

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 103

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体B7的重链CDR1的氨基酸序列

<400> 103

His Phe Asp
1

<210> 104

<400> 104
000

<210> 105

<400> 105
000

<210> 106

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体B7的轻链CDR1的氨基酸序列

<400> 106

Leu Ala Phe
1

<210> 107

<400> 107
000

<210> 108

<400> 108
000

<210> 109

<400> 109
000

<210> 110

<400> 110
000

[0023]

P72645_序列表

<210> 111
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 抗-ED-A抗体E8 VH结构域的氨基酸序列

<400> 111

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Met
 20 25 30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 112
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 抗-ED-A抗体E8 VL结构域的氨基酸序列

<400> 112

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

[0024]

P72645_序列表

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 113
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体E8的重链CDR1的氨基酸序列

<400> 113

Asp Met His
1

<210> 114

<400> 114
000

<210> 115

<400> 115
000

<210> 116
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体E8的轻链CDR1的氨基酸序列

<400> 116

Ser Ser Phe
1

<210> 117
<211> 350
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 117

Asn Gly Leu Gly Pro Ser Lys Thr Lys Thr Ala Ser Pro Asp Gln Thr
1 5 10 15

Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser
20 25 30

Val Tyr Ala Gln Asn Arg Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr
35 40 45

Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val
50 55 60

Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val
65 70 75 80

Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu

[0025]

P72645_序列表

85	90	95
Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly		
100	105	110
Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp		
115	120	125
Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ile Pro		
130	135	140
Ala Pro Thr Asn Leu Lys Leu Ser Gln Val Thr Pro Thr Ser Phe Thr		
145	150	155
Ala Gln Trp Ile Ala Pro Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg		
165	170	175
Val Asn Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ser		
180	185	190
Pro Asp Ser Ser Ser Val Ile Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
195	200	205
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro		
210	215	220
Ala Gln Gly Val Ile Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
225	230	235
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg		
245	250	255
Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala		
260	265	270
Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg Ser Ile Ser Pro Asp Val Arg Ser		
275	280	285
Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile His Leu		
290	295	300
Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala		
305	310	315
Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Thr Thr Thr		
325	330	335
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro Arg Ala Arg		
340	345	350
<210> 118		
<211> 90		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 118		
Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp		

[0026]

P72645_序列表

1	5	10	15
Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr	20	25	30
Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro	35	40	45
Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro	50	55	60
Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu	65	70	75
Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr	85	90	

<210> 119
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 119

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp	1	5	10	15
Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr	20	25	30	
Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro	35	40	45	
Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro	50	55	60	
Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu	65	70	75	80
Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr	85	90		

<210> 120
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：含有人纤连蛋白ED-A结构域的抗原(11A12)

<400> 120

Met Arg Ser Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val	1	5	10	15
Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser	20	25	30	
Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro	35	40	45	

[0027]

P72645_序列表

Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr
 50 55 60
 Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala
 65 70 75 80
 Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr
 85 90 95
 Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
 100 105 110
 Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
 115 120 125
 Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro
 130 135 140
 Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
 145 150 155 160
 Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
 165 170 175
 Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr
 180 185 190
 Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 195 200 205
 Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro
 210 215 220
 Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser
 225 230 235 240
 Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
 245 250 255
 Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
 260 265 270
 Val Val Thr Thr Leu Gln Asn Val Arg Ser His His His His His His
 275 280 285

<210> 121

<211> 867

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗原(11A12)的核苷酸序列

<400> 121

atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccateccaga tgcaagtga cgaigtgcag 60
 gacaacagea ttagtgtcaa gtggtgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta 120
 accaccactt ccaaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa 180

[0028]

P72645_序列表

```

acagaaatga ctattgaagg ctgtcagccc acagtggagt atgtgggttag tgtctatgct 240
cagaatccaa ggggagagag icagcctctg gttcagactg cagtaaccaa caatgatcgc 300
cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtgcattcca tcaaaattgc ttgggaaagc 360
ccacaggggc aagtittcac gtacagggtg acctactcga gccctgagga tggaaatcat 420
gagctattcc ctgcacctga tggtnaagaa gacctgcag agctgcaagg cctcagaccg 480
ggttcagagt acacagtcag ttgtgttgcc ttgcaagatg atatggagag ccagccccctg 540
attggaacce agtcacacgc tattcctgca ccaactgacc tgaagttcac tcaggtcaca 600
cccacaagcc tgagcgccca gtggacacca cccaatgttc agctcacttg atategagtg 660
cgggtgaacc ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaaa tcaaccttgc tectgacagc 720
tcattcgtgg ttgtatcagg acctatgttg gccaccaaat atgaagttag tgtctatgct 780
cittaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaaccctct ggagaatgct 840
agatctcact accatcacca tcactaa 867

```

<210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 122

```

His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln Trp Glu Arg
1           5           10

```

<210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 123

```

Val Gly Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Lys
1           5

```

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 124

```

His Ala Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Ser Gly Ser Phe Thr Asp Val
1           5           10           15

```

Arg

<210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 125

```

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys
1           5

```

<210> 126

[0029]

P72645_序列表

<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 126

Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp Glu Lys
1 5 10

<210> 127
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 127

Trp Lys Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys
1 5 10 15

<210> 128
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 128

Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys
1 5 10

<210> 129
<211> 21
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 129

Gly Leu Thr Pro Gly Val Ile Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Ile Gln
1 5 10 15

Gln Tyr Gly His Arg
20

<210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 130

Trp Ser Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg
1 5 10

<210> 131
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 131

Ser Asp Asn Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Gln Phe Val Glu Leu Thr
1 5 10 15

Asp Val Lys

<210> 132
<211> 16

[0030]

P72645_序列表

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 132
Val Thr Ile Met Trp Thr Pro Pro Asp Ser Val Val Ser Gly Tyr Arg
1 5 10 15

<210> 133
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 133
Val Glu Val Leu Pro Val Ser Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg
1 5 10 15

<210> 134
<211> 18
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 134
Asn Thr Phe Ala Glu Ile Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Phe Lys

<210> 135
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 135
Val Phe Ala Val His Gln Gly Arg
1 5

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 136
Thr Val Leu Val Thr Trp Thr Pro Pro Arg
1 5 10

<210> 137
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 137
Gln Tyr Asn Val Gly Pro Leu Ala Ser Lys
1 5 10

<210> 138
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 138

[0031]

P72645 序列表

Asn Leu Gln Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Thr Leu Val Ala Val Lys
 1 5 10 15

<210> 139
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 139

Ala Thr Gly Val Phe Thr Thr Leu Gln Pro Leu Arg
 1 5 10

<210> 140
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 140

Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg
 1 5 10

<210> 141
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 141

Val Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn
 1 5 10 15

Pro Asp Thr Gly Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg
 20 25

<210> 142
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 142

Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg
 1 5 10

<210> 143
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 143

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Glu Leu Thr Asn Leu Leu Val
 1 5 10 15

Arg

<210> 144
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 144

Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Phe Asp Ser Ser Asp Ile Thr Ala

[0032]

P72645_ 序列表

1 5 10 15
Asn Ser Phe Thr Val His Trp Val Ala Pro Arg
20 25
<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 145
Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Arg
1 5
<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 146
His His Ala Glu His Ser Val Gly Arg Pro Arg
1 5 10
<210> 147
<211> 18
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 147
Glu Glu Ser Pro Pro Leu Ile Gly Gln Gln Ala Thr Val Ser Asp Ile
1 5 10 15
Pro Arg
<210> 148
<211> 21
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 148
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr
1 5 10 15
Val Pro Gly Ser Lys
20
<210> 149
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 149
Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys
1 5 10
<210> 150
<211> 24
<212> PRT
<213> Mus musculus

[0033]

P72645_序列表

<400> 150

Ser Thr Ala Thr Ile Asn Asn Ile Lys Pro Gly Ala Asp Tyr Thr Ile
 1 5 10 15

Thr Leu Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 20

<210> 151

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 151

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Val Ser Ile Asn Tyr Lys
 1 5 10 15

<210> 152

<211> 22

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 152

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp
 1 5 10 15

Asn Ser Ile Ser Val Arg
 20

<210> 153

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 153

Trp Leu Pro Ser Thr Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg
 1 5 10

<210> 154

<211> 29

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 154

Thr Ala Ser Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Arg
 20 25

<210> 155

<211> 22

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 155

Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Thr Ile Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Asn Leu Lys
 20

[0034]

P72645_序列表

<210> 156
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 156

Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Asn Ile Asp
 1 5 10 15

Arg Pro Lys

<210> 157
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 157

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
 1 5 10

<210> 158
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 158

Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg
 1 5 10

<210> 159
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 159

Phe Ser Gln Val Thr Pro Thr Ser Phe Thr Ala Gln Trp Ile Ala Pro
 1 5 10 15

Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg
 20

<210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 160

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys
 1 5

<210> 161
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 161

Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala
 1 5 10 15

[0035]

P72645_序列表

Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg
20

<210> 162
<211> 22
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 162

Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala Asn Gly
1 5 10 15

Gln Thr Pro Val Gln Arg
20

<210> 163
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 163

Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
1 5 10

<210> 164
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 164

Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg
1 5 10

<210> 165
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 165

Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
1 5 10 15

Asn Leu Arg

<210> 166
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 166

Phe Leu Thr Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
1 5 10 15

Arg

<210> 167
<211> 7
<212> PRT

[0036]

P72645_序列表

<213> Mus musculus

<400> 167

Ile	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys
1				5		

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 168

Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg
1				5				

<210> 169

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 169

Pro	Tyr	Leu	Pro	Asn	Val	Asp	Glu	Glu	Val	Gln	Ile	Gly	His	Val	Pro
1				5					10					15	

Arg

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 170

Gly	Val	Thr	Tyr	Asn	Ile	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Gln	Asn	Gln	Arg
1				5					10					15

<210> 171

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 171

Arg	Pro	Gly	Ala	Ala	Glu	Pro	Ser	Pro	Asp	Gly	Thr	Thr	Gly	His	Thr
1				5					10					15	

Tyr	Asn	Gln	Tyr	Thr	Gln	Arg
						20

<210> 172

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体H1的VH结构域

<400> 172

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Arg
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0037]

P72645_序列表

20	25	30
Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 173		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体B2的VH结构域		
<400> 173		
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala		
20	25	30
Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 174		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

[0038]

P72645_序列表

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体C5的VH结构域

<400> 174

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 175

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体D5的VH结构域

<400> 175

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

[0039]

P72645_序列表

115

<210> 176
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 抗-ED-A抗体E5的VH结构域

<400> 176

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Gly
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 177
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 抗-ED-A抗体C8的VH结构域

<400> 177

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Gln
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0040]

P72645_序列表

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 178
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体F8的VH结构域

<400> 178

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 179
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体F1的VH结构域

<400> 179

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Ala
20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0041]

P72645_序列表

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 180

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体B7的VH结构域

<400> 180

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Phe
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 181

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体E8的VH结构域

<400> 181

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0042]

P72645_序列表

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Met
20 25 30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 182

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列: 抗 ED A抗体G9的VH结构域

<400> 182

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Met
20 25 30

Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 183

<211> 125

<212> PRT

[0043]

P72645_序列表

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体H1的VL结构域

<400> 183

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 184

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗 ED A抗体B2的VL结构域

<400> 184

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

[0044]

P72645_序列表

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 185
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体C5的VL结构域

<400> 185

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 186
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列：抗-ED-A抗体D5的VL结构域

<400> 186

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

[0045]

P72645 序列表

65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Met	Arg	Gly	Arg	Pro
				85					90					95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu
			100					105					110		
Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala			
		115					120					125			
<210>	187														
<211>	125														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成序列: 抗-ED-A抗体E5的VL结构域														
<400>	187														
Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Leu	Ala
			20					25					30		
His	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Met	Arg	Gly	Arg	Pro
				85					90					95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu
			100					105					110		
Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala			
		115					120					125			
<210>	188														
<211>	125														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成序列: 抗-ED-A抗体C8的VL结构域														
<400>	188														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Leu	Pro
			20					25					30		

[0046]

P72645 序列表

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 189

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体P8的VL结构域

<400> 189

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 190

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列：抗-ED-A抗体F1的VL结构域

<400> 190

[0047]

P72645_序列表

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
          20           25           30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
          85           90           95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100          105          110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115          120          125

<210> 191
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: 抗-ED-A抗体B7的VL结构域

<400> 191

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
          20           25           30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
          85           90           95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100          105          110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115          120          125

```

[0048]

P72645_序列表

<210> 192
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 抗-ED-A抗体E8的VL结构域

<400> 192

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 193
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 抗-ED-A抗体G9的VL结构域

<400> 193

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

[0049]

P72645_序列表

Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu
			100					105					110		

Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala
		115					120					125

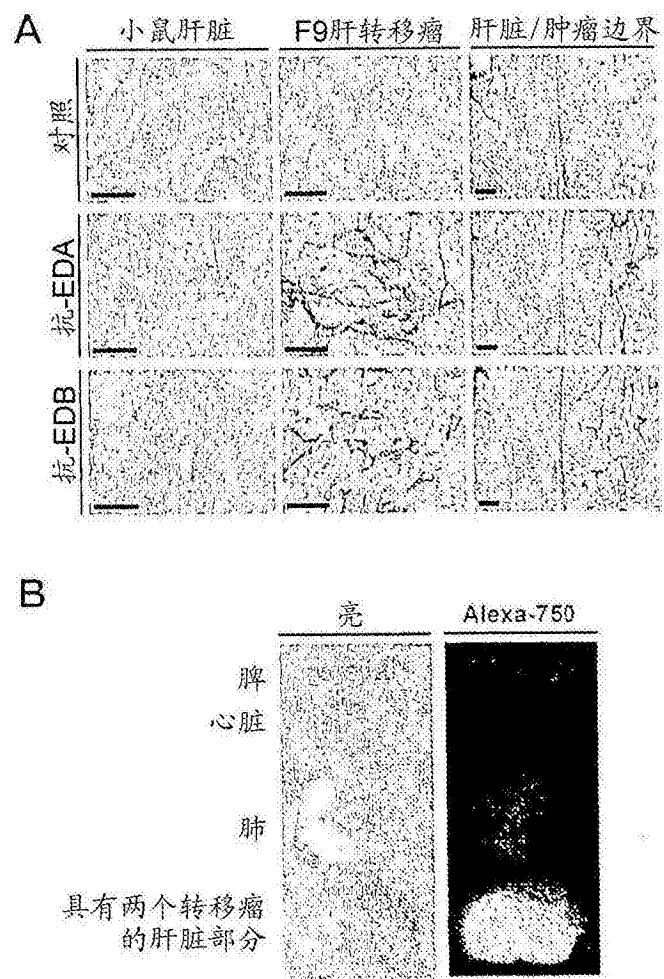


图 3

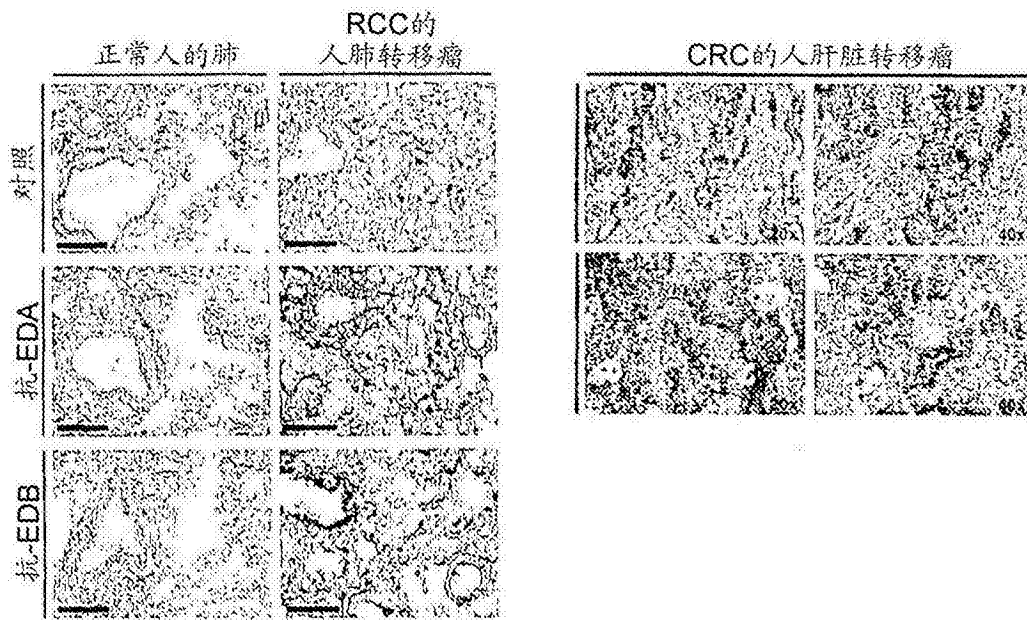


图 4

```

人 1 NIDRPGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVITYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELO
*****
小鼠 1 NIDRPGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVITYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELO

人 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
*****
小鼠 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQST

```

图 5

A

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTT
TAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTC
ATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCGAGT

B

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT
CCGGGGGTGGAGGATCT

图 6

C

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC
CAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
GCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG
TATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTGGGCCGCCGACGTTCCGGCC
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACAAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

图 6 续

A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQ
 APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT
 LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVS
 S

B

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

C

EIVLTQSPGTL^{SL}SPGEKATLSCRASQSVSSAWLAWYQQ
 KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMRGRFPTFGQGTKVEIKAAAEQKLIS
 EEDLNGAA

图 7

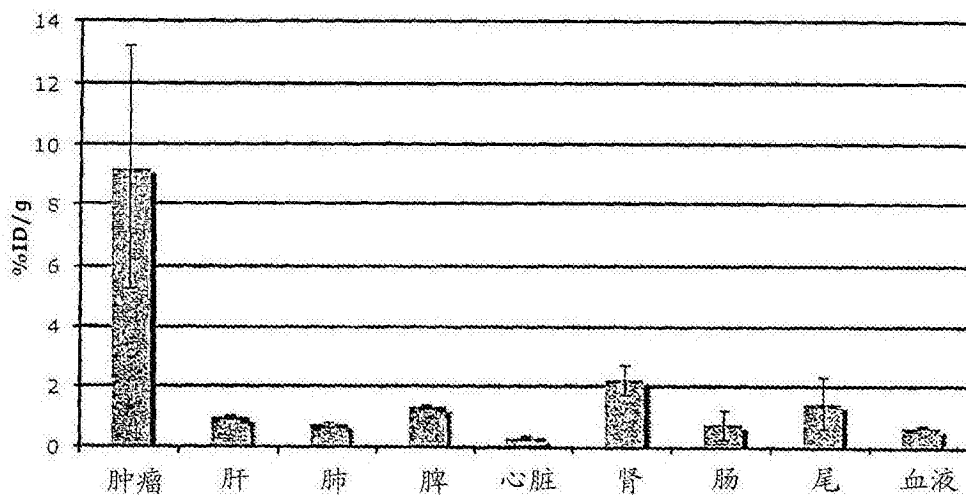


图 8