(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2013 年 7 月 4 日 (04.07.2013)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2013/097616 A1

(51) 国转 利分类号：
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)

(21) 国际申请号：PCT/CN2012/086596

(22) 国际申请日：2012 年 12 月 13 日 (13.12.2012)

(25) 申飾 言：中文

(26) 公布语言：中文

(30) 优先权：
201110459537.0 2011 年 12 月 31 日 (31.12.2011) CN

(71) 申请人：深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 (SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。

(72) 发明人：赵玉梅 (ZHAO, Yumei); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。董丽芳 (DONG, Lifang); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。雷霆 (LEI, Ting); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。

(74) 代理人：广州华进联合专利商标代理有限公司 (ADVANCE CHINA I.P. LAW OFFICE); 中国广东省广州市先烈中路 69 号东山广场 918-920 室, Guangdong 510095 (CN)。

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

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[见续页]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR IDENTIFYING ANTIBODY SENSITIVITY AND CLONED CELL LINE

(54) 发明名称：一种鉴定抗体敏感性和克隆细胞株的方法及试剂盒

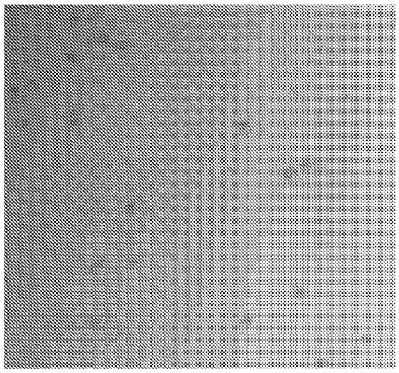


图2 / Fig.2

(57) Abstract: A method and kit for identifying antibody sensitivity and quality of a cloned cell line. The method comprises: obtaining a solid-phase carrier, cells and an antibody; adsorbing the antibody on the solid-phase carrier; incubating the cells and the antibody adsorbed on the solid-phase carrier; reserving cells bonded with the antibody; and dyeing and counting the cells bonded with the antibody, so as to identify the antibody sensitivity or the quality of the cloned cell line based on the cell counting result. The kit comprises components applicable to the method.

(57) 摘要：一种鉴定抗体敏感性和克隆细胞株质量的方法及试剂盒，所述方法包括获取固相载体、细胞和抗体，将抗体吸附于固相载体上，将细胞与吸附在固相载体上的抗体孵育，保留细胞中与抗体结合的细胞，对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数，根据细胞计数结果鉴定抗体的敏感性或克隆细胞株质量。所述试剂盒包括适用于该方法的各组分。

WO 2013/097616 A1

IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) :

本国际公布 :

– 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

说明书

发明名称 :一种鉴定抗体敏感性和克隆细胞株的方法及试剂盒

[1] 技术领域】

[2] 本发明涉及抗体技术领域。更具体地讲 ,本发明涉及一种抗体敏感性的鉴定方法 ,和抗体制备过程中 ,分泌目标抗体的阳性克隆细胞株的鉴定方法。

[3] 背景技术】

[4] 抗体是B细胞增殖分化为浆细胞所分泌的一类具有免疫功能的球蛋白 ,存在于体液中并介导体液免疫。抗体能与相应抗原(如病原体)特异性结合 ,在其他免疫分子和细胞的参与下发挥免疫效应。根据性质不同可将抗体分为单克隆抗体 (以下简称单抗)和多克隆抗体 (以下简称多抗)两种。单抗具有理化性状高度均一、生物活性单一、抗原结合特异性强、易于控制质量等优点 ,现已广泛应用于生物学和医学研究领域。单抗可作为亲合层析的配体、生物治疗的导向物、免疫抑制剂、研究工作中的探针等 ,广泛应用与研究、疾病的治疗和诊断。在临床检测方面主要用于诊断各类病原体 ,检测肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原和检测淋巴细胞表面标志和测定机体微量成分。

[5] 在临床诊断中 ,单抗的质量直接决定了检测结果准确性 ,而单抗对其抗原的敏感性是反映单抗质量的重要指标。目前临床和科研中针对抗体敏感性的鉴定方法主要有ELISA (酶联免疫吸附试验)、Westem-blot (免疫印迹试验)、免疫荧光试验 ,但这些方法均存在一定的不足。

[6] ELISA 和Westem-blot 检测试验中所使用的抗原蛋白为重组蛋白或通过裂解细胞获得的变性蛋白复合物 ,与天然构象蛋白都存在一定差异 ,因此这些实验结果反映出的仅是单抗与重组或变性蛋白结合的敏感性 ,而不能准确反映单抗与天然构象蛋白结合的敏感性。尤其是如果该单抗所结合的抗原决定簇为构象表位 ,由于蛋白变性后空间结构被破坏 ,单抗则不能与此变性蛋白结合 ,采用此变性蛋白抗原检测结果就得到假阴性的错误结果。

[7] 免疫荧光试验包括直接免疫荧光试验和间接免疫荧光试验 ,其中间接免疫荧光试验需要借助于二抗来完成 ,这两个试验虽然能反映单抗与天然构象蛋白结合

的能力，但由于其操作时间较长、操作步骤较为繁琐，同时需要高昂的试验设备，如荧光显微镜、流式细胞仪。

[8] CN1660907A 公开了单抗的三种鉴定方法，包括间接免疫荧光法、斑点免疫印迹法和金标记免疫电镜法，其中间接免疫荧光法和金标记免疫电镜法均需要高昂的设备配合进行结果的判断，斑点免疫印迹法借助硝酸纤维素膜作为固相载体进行抗原-抗体反应，需要通过获得细胞膜蛋白裂解液进行吸附，由于细胞膜蛋白裂解液中的蛋白发生了变性，因此鉴定结果不能反应单抗与天然构象蛋白的敏感性。

[9] CN1718588A 公开了一种单抗用于恶性肿瘤检测的方法，它是通过ELISA 技术和免疫印迹技术实现的，ELISA 试验技术是以重组蛋白作为抗原进行检测，免疫印迹试验技术是以变性的蛋白作为抗原进行的检测，两种试验技术均无法真实反映出单抗与天然构象蛋白结合的敏感性。

[10] CN101891806A 公开了一种单抗质量的筛选方法，是使用间接免疫荧光技术来实现的，间接免疫荧光试验的判定需要昂贵的设备如荧光显微镜，一般的小型临床和科研机构的经济承受能力有限，这种方法不利于普及。

[11] 此外，在单抗的制备过程中，人们需要对抗体阳性克隆细胞株进行筛选，获得能分泌高敏感性抗体的克隆细胞株。目前人们大多采用ELISA 方法进行阳性克隆筛选。该方法一般使用重组蛋白作为抗原，筛选出的单抗往往并不适用于天然构象蛋白的结合反应，造成筛选失败，浪费人力物力。

[12] CN1693461A 公开了单抗制备过程中阳性克隆细胞株的筛选方法，是使用间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行的，这种方法一般是使用重组蛋白作为抗原进行筛选，但是由于重组蛋白与天然构象蛋白有一定差异，因此通过ELISA 筛选出的阳性克隆细胞株并不能真实反映单抗与天然构象蛋白的敏感性。

[13] 可见，现有的抗体和抗体阳性克隆细胞株的筛选方法，多数是通过抗体与重组蛋白或变性蛋白的结合水平反映抗体的敏感性。而在医学检验领域，多要利用抗体与天然构象蛋白的特异性结合力，为了准确快捷筛选出与天然构象蛋白结合能力强的单抗，需要一种新的试验技术来判断单抗的与天然构象蛋白的结合能力。

[14] 【发明内容】

[15] 为了解决现有技术中的问题，本发明利用细胞，特别是细胞表面的天然构象蛋白来鉴定抗体敏感性或鉴定阳性克隆细胞株。

[16] 本发明一方面提供了一种鉴定抗体敏感性的方法，包括如下步骤：

[17] 获取固相载体、细胞和抗体；

[18] 抗体吸附于固相载体；

[19] 细胞与吸附在固相载体的抗体孵育，保留细胞中与抗体结合的细胞；

[20] 对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数；

[21] 根据细胞计数结果鉴定抗体的敏感性。

[22] 本发明另一方面提供了一种鉴定克隆细胞株的方法，包括以下步骤：

[23] 获取固相载体、细胞和克隆细胞株的分泌的抗体；

[24] 将分泌的抗体吸附固相载体；

[25] 细胞与吸附在固相载体的抗体孵育，保留细胞中与抗体结合的细胞；

[26] 对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数；

[27] 根据细胞计数结果鉴定克隆细胞株。

[28] 本发明还一方面提供了一种以上方法进行抗体或克隆细胞株鉴定的试剂盒，包括，

[29] 固相载体，用于吸附待测抗体或克隆细胞株分泌的抗体；

[30] 抗体包被液，用于抗体吸附于固相载体；

[31] 细胞洗涤液，用于洗涤除去未与抗体结合的细胞；

[32] 染色液，用于染色与抗体结合的细胞。

[33] 本发明又一方面提供了一种鉴定抗体特异性的方法，包括，

[34] 获取固相载体、细胞和抗体，细胞包括至少已知两种细胞类型；

[35] 抗体吸附于固相载体；

[36] 细胞与吸附在固相载体的抗体孵育，保留细胞中与抗体结合的细胞；

[37] 对与抗体结合的细胞进行染色，并分别进行细胞计数；

[38] 通过比较不同细胞类型的已知细胞计数结果，鉴定抗体的特异性。

[39] 本发明利用活细胞表面表达的天然构象抗原与待测抗体结合，并对细胞进行染

色和计数，来鉴定抗体的敏感性，同时也可以鉴定抗体制备过程中克隆细胞株的质量。该方法可以直观地反映抗体与天然构象抗原的结合水平，结果更加准确，并减少阳性克隆细胞株筛选失败导致的人力和物力的浪费。另一方面，本发明的方法通过区分待测抗体结合的细胞类型，初步判断待测抗体的特异性。本方法简单、快捷、直观。

[40] 【附图说明】

[41] 图1是实施方式中"城墙式"细胞计数法示意图。

[42] 图2是实施例1的鉴定结果图。

[43] 图3是实施例2的鉴定结果图。

[44] 图4是实施例3的鉴定结果图。

[45] 图5是实施例4的鉴定结果图。

[46] 图6是实施例5的鉴定结果图。

[47] 图7是实施例6的鉴定结果图。

[48] 图8是实施例7的鉴定结果图。

[49] 图9是实施例8的鉴定结果图。

[50] 【具体实施方式】

[51] 本发明的其它方面和优点在阅读以下描述和具体实施方案后将变得显而易见。

[52] 定义

[53] 除另有说明外，本文中使用的术语具有以下含义。

[54] 本文中使用的术语"抗体"，在本文中以最广义使用并具体覆盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性杭体(如双特异性抗体)、及抗体片段，只要它们显示所需生物学活性。

[55] 术语"单克隆抗体"在用于本文吋指由基本上同质的抗体群获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极少量存在的可能的天然存在突变以外。另夕卜，与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制品不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性以外，单克隆抗体的优越性体现在可以通过杂交瘤培养合成它们而不受其它免疫球蛋白的污染。修饰语"单克隆"，指抗体由基本上同质的抗体群获得的特征，并不解释为需

要通过任何特定方法来生产抗体。

[56] 鉴定抗体敏感性的方法

[57] 本发明一方面提供了一种鉴定抗体敏感性的方法，包括以下步骤：

[58] 获取固相载体、细胞和抗体；

[59] 抗体吸附于固相载体；

[60] 细胞与吸附在固相载体的抗体孵育，保留细胞中与抗体结合的细胞；

[61] 对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数；

[62] 根据细胞计数结果鉴定抗体的敏感性。

[63] 获取固相载体、细胞和抗体。待鉴定的抗体为单克隆抗体或多克隆抗体，通常需要鉴定的抗体为单克隆抗体；固相载体选择应用最广泛的聚苯乙烯凹孔板，也可以选择本领域通用的材料，如纤维素、交联右旋糖酐等，外形上也可以用试管和珠粒等。

[64] 细胞可以是来自血液或组织中提取到的活细胞，例如外周血中提取的单个核细胞、淋巴细胞和白细胞，也可以是细胞培养的传代细胞。通常而言，进行抗体敏感性鉴定时，已知待测抗体是哪一种抗原或小分子的抗体，优选选择那些细胞表面表达较多该抗原或小分子的细胞。例如，已知淋巴细胞表面表达较多CD3或CD4抗原，在鉴定CD3或CD4抗体的敏感性时，优选使用淋巴细胞。白细胞各亚群的细胞表面都有CD45抗原的表达，在鉴定CD45抗体质量时，可以直接选用白细胞，无需进一步提取细胞亚群。

[65] 细胞的提取，可以使用商业细胞提取试剂盒，按照其说明书的操作步骤提取细胞，也可以使用常规的方法提取细胞。例如，使用Percoll细胞分离液提取外周血单个核细胞，使用淋巴细胞分离液提取外周血淋巴细胞，使用红细胞溶血剂裂解红细胞后获得外周血中白细胞；培养的贴壁细胞先通过消化酶消化后再离心得到浓度较高的细胞，培养的悬浮细胞直接通过离心收集得到浓度较高的细胞。

[66] 一般而言，可以用商品化的淋巴细胞分离液提取淋巴细胞的方法如下：

[67] 取新鲜抗凝血lmL，与Hanks液1：1混匀；

[68] 将上述混匀后的液体小心加于2mL的淋巴细胞分离液之液面上，以1500～2000r

pm/min 离心15分钟，此时离心管中由上至下细胞分四层，各层的分布为：第一层为血浆或组织匀浆层，第二层为环状乳白色淋巴细胞，第三层为透明分离液层，第四层为红细胞层；

[69] 收集第二层细胞放入含细胞洗涤液的试剂管中，充分混匀后，以1500～2000rpm/min 离心10～30分钟，沉淀经反复洗2次即得所需细胞。

[70] 抗体吸附于固相载体。使用包被液将抗体制成抗体溶液，与固相载体接触，例如，将抗体溶液加入到聚苯乙烯多孔板，如96孔聚苯乙烯板的板孔中，放置于37℃孵育箱中l～2h或4度放置过夜。抗体与载体的吸附为物理吸附，靠的是蛋白质分子结构上的疏水基团与固相载体表面的疏水基团间的作用力，这种物理吸附是非特异性的，吸附的多少取决于pH值、温度、蛋白浓度、离子强度以及吸附时间。另外，固相载体对不同蛋白质的吸附能力是不同的，大分子蛋白质较小分子蛋白质通常含有更多的疏水基团，故更易吸附到固相载体表面。所使用的包被液有碳酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、Tris-HCl 缓冲液等，优选碳酸盐缓冲液，pH范围为8～10，优选9～10，更优选9.5～10；离子强度为0.01～lmol/L，优选0.01～0.5mol/L，更优选0.05～0.1mol/L; 抗体在96孔聚苯乙烯板中的包被量为2～50μg/板，优选5～20μg/板，更优选5～10μg/板。

[71] 细胞与吸附了固相载体的抗体孵育，保留细胞中与抗体结合的细胞。将细胞制备成细胞悬液，浓度为为5～500cells/pL，优选10～100cells^L，更优选50～80cells^L。将获得的细胞悬液与吸附了抗体的固相载体接触，吸附到载体上的抗体通过与细胞表面抗原或小分子的直接结合使目标细胞被抓住，室温孵育一段时间后，使用Hanks液进行洗涤，此时不含有与单抗相结合的抗原的细胞则被洗脱，含有与单抗相结合的抗原的细胞则被保留下来。抗体与活细胞结合的过程中，如选用96孔聚苯乙烯板作为载体，则每孔中加入的上述浓度的细胞悬液lOOul。抗体与细胞结合的条件一般为轻微振荡室温孵育lh左右，优选20～40分钟，更优选20～30分钟。

[72] 抗体与活细胞反应结束后，使用细胞洗液将未与抗体结合的细胞洗脱，所使用的洗液种类有很多，包括PBS溶液、含有BSA 的PBS溶液、含有小牛血清的PBS溶液，优选含有BSA 的PBS溶液，其中BSA 的浓度为0.1～lg/L。一般情况下如使

用96孔聚苯乙烯板作为载体时，每次洗涤时加入细胞洗液的量为100～300uL，优选200uL。使用细胞洗液洗涤所反应的各个孔，每孔每次加入200uL细胞洗液，轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，洗涤完毕后需要将孔内的洗液吸去进行后续的细胞染色。

[73] 对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数。使用细胞染料，例如核酸染料，对结合在固相载体上的活细胞进行染色。加入的核酸染料通过与细胞内核酸物质的结合，使细胞具有易于肉眼识别的颜色。所使用的核酸染料有甲基氯、瑞氏-吉姆萨、沙黄、苏木素等，优选甲基氯、瑞氏-吉姆萨和苏木素染料中的一种，其中甲基氯染料使用水配制而成，甲基氯水溶液的浓度为0.05%～5%，优选0.05%～1.5%，更优选为0.05-0.5%。瑞氏-吉姆萨和苏木素使用市场上销售的成品即可，细胞染色之前，首先使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50uL，然后使用染色液进行染色，染色过程中孔中的液体无需倒掉，每孔直接再加入50～100uL染色液，室温放置5～15min，为促进染色，可用吹风机从孔底部加热l-2min，之后用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，洗去染色液，最后96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行细胞计数。整个计数过程是通过普通的倒置显微镜来实现的，采用"城墙式"细胞计数方法，通过观察显微镜下细胞的计数结果来判断此抗体敏感性的高低，细胞计数结果越多，待鉴定抗体的敏感性越高。可以通过设置阳性和阴性抗体对照来进一步提高鉴定的准确性。

[74] 鉴定克隆细胞株的方法

[75] 本发明还提供了一种鉴定克隆细胞株的方法。获得待鉴定克隆细胞株培养上清，其中含有分泌的抗体，使用上述鉴定抗体敏感性的方法，得到细胞计数结果，细胞越多说明该细胞株分泌的抗体与天然构象的抗原敏感性越好，从多株克隆中筛选计数结果高的进行扩大培养，有助于提到克隆细胞株筛选的成功率。

[76] 抗体或克隆细胞株鉴定的试剂盒

[77] 本发明还提供了适用于上述方法的鉴定试剂盒，包括固相载体，用于吸附待测抗体或克隆细胞株分泌的抗体；抗体包被液，用于抗体吸附于固相载体；细胞洗涤液，用于洗涤除去未与抗体结合的细胞；染色液，用于染色与抗体结合的

细胞。具体固相载体、抗体包被液、细胞洗涤液、染色液的描述如前。

[78] 鉴定抗体特异性的方法

[79] 本发明还提供了一种鉴定抗体特异性的方法，包括获取固相载体、至少两种已知细胞类型的细胞、待鉴定抗体。将抗体吸附于固相载体，将细胞与吸附了固相载体的抗体孵育，保留与抗体结合的细胞，对与抗体结合的细胞进行染色，并分别进行细胞计数。具体步骤和试剂选择如前面方法中所述。比如，鉴定待测的CD14抗体的特异性吋，可以使用淋巴细胞和单核细胞，用一种能区分这两类细胞的染料如瑞氏-吉姆萨染料对这两类细胞进染色，或者使用对淋巴细胞或单核细胞特异性的染料进行染色，通过比较两种细胞类型的计数结果，可以初步判断CD14抗体与单核细胞结合的特异性。由于单核细胞表面的CD14抗原表达明显多于淋巴细胞的，如果淋巴细胞的计数明显高于正常情况，则该待测抗体对CD14抗原的特异性不够理想。比如，使用质量合格的CD14抗体鉴定，其淋巴细胞的计数结果为20个，而待测的CD14 抗体的淋巴计数有50个，可以认为该待测抗体的特异性不理想。

[80] 实施例

[81] 以下将通过具体实施例对本发明作出进一步的描述。实施例仅对本发明作出示例性说明，并非对本发明作出任何意义上的限定。

[82] 除非另有声明，否则以下实施例中使用的试剂组分为分析纯，使用的溶剂为去离子水，所用的细胞计数设备为尼康ANTI - MOULD 倒置显微镜。所述的细胞计数方法示意图如图1所示。显微镜下细胞放大倍数为100x10。以下实施例中所述的96孔聚苯乙烯板的规格为400uIJ孔。

[83] 实施例一

[84] 将待测的鼠抗人CD3单抗、已鉴定过的质量较好的鼠抗人CD3单抗 (阳性对照) 和阴性对照鼠IgG (基本不与CD3抗原结合) 均按照10μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 9.8的碳酸盐缓冲液作为包被液，37度孵育箱放置lh，取出96孔板，放置于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的淋巴细胞悬液IOOμL/孔，淋巴细胞悬液的浓度为6xl07L ，放置于摇床上室温轻微摇动30分钟，使用细胞洗液洗脱所反应的各个孔，每孔每次加入2

OOμL细胞洗液，轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用0.25% 甲基氯染色，每孔直接再加入50μL甲基氯染色液，室温放置5分钟，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果如图2所示，计数结果为待测抗体孔内细胞计数为248和257，阳性对照为240和245，阴性对照为23和17。淋巴细胞表面有CD3抗原，利用淋巴细胞计数能够进行待测抗体针对CD3抗原敏感性的鉴定。

[85] 实施例二

[86] 将两株待测的鼠抗人CD4抗体细胞株培养上清和阴性对照鼠IgG按照5μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 9.0的碳酸盐缓冲液作为包被液，37度孵育箱放置1.5h，取出96孔板，放置于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的淋巴细胞悬液IOOμL/孔，淋巴细胞悬液的浓度为6x10 8/L, 放置于摇床上室温轻微摇动1小吋，使用细胞洗液洗脱所反应的各个孔，每孔每次加入200μL细胞洗液，使用200μL量程的移液器轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用0.05% 甲基氯染色，每孔直接再加入IOOμL甲基氯染色液，室温放置3min，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果如图3所示，计数结果为第一株CD4抗体为110和117，第二株CD4抗体为24和27，阴性对照为10和17。淋巴细胞表面有CD4抗原，利用淋巴细胞能够进行待测克隆细胞株的筛选，比较两个细胞株的细胞计数结果，可知第一个细胞株分泌的CD4抗体的能力和/或敏感性比较好，可用于进一步的扩大培养。

[87] 实施例三

[88] 将待测的鼠抗人CD45单抗、已鉴定质量较好的Ebioscience公司的鼠抗人CD45抗体和阴性对照鼠IgG按照20μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 9.0的Tris-HCl缓冲液作为包被液，4度冰箱放置过夜，取出96孔板，放置

于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的白细胞悬液IOOμL/孔，白细胞悬液的浓度为7.2xl0 8/L，放置于摇床上室温轻微摇动1小时，使用细胞洗液洗脱未与单抗结合的细胞，每孔每次加入200μL细胞洗液，使用200μL量程的移液器轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定ELISA 板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用0.2% 甲基氯染色，每孔直接再加入IOOμL甲基氯染色液，室温放置3min，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果如图4所示，计数结果为待测CD45 抗体为653和662，ebioscience 公司的CD45 抗体为630和625，阴性对照为12和15。已知各白细胞亚群的细胞表面都有CD45 抗原的表达，因此利用白细胞计数结果能够进行待测抗体针对CD45 抗原敏感性的鉴定。

[89] 实施例四

[90] 将待测的鼠抗人CD45 单抗、已鉴定质量较好的Ebioscience 公司的鼠抗人CD45 抗体和阴性对照鼠IgG 分别按照10μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 9.6的碳酸盐缓冲液作为包被液，4度冰箱放置过夜，取出96孔板，放置于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的白细胞悬液100μL/孔，白细胞悬液的浓度为5 X 107/L, 放置于摇床上室温轻微摇动20分钟，使用细胞洗液洗脱未与单抗结合的细胞，每孔每次加入200μL细胞洗液，使用200μL量程的移液器轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用瑞氏-吉姆萨染色，每孔直接再加入IOOμL瑞氏-吉姆萨染色液，室温放置15分钟，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果如图5所示，计数结果为待测CD45 抗体为420和430，Ebioscience 公司的CD45 抗体为410和425，阴性对照为10和14。不同的核酸染料，只要能够对目标细胞进行合适的染色，都可以用于本发明的方法。

[91] 实施例五

[92] 将待测的鼠抗人CD45单抗、已鉴定质量较好的Ebioscience公司的鼠抗人CD45抗体和阴性对照鼠IgG分别按照10μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 9.6的碳酸盐缓冲液作为包被液，4度冰箱放置过夜，取出96孔板，放置于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的白细胞悬液100μL/孔，白细胞悬液的浓度为6xl07L，放置于摇床上室温轻微摇动20分钟，使用细胞洗液洗脱未与单抗结合的细胞，每孔每次加入200μL细胞洗液，使用200μL量程的移液器轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用苏木素染色，每孔直接再加入IOOμL苏木素染色液，室温放置15分钟，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果如图6所示，计数结果为待测CD45抗体为550和561，ebioscience公司的CD45抗体为541和555，阴性对照为15和17。不同的核酸染料，只要能够对目标细胞进行合适的染色，都可以用于本发明的方法。

[93] 实施例六

[94] 将待测的鼠抗人CD45单抗、已鉴定质量较好的Ebioscience公司的鼠抗人CD45抗体和阴性对照鼠IgG分别按照10μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 9.6的碳酸盐缓冲液作为包被液，4度冰箱放置过夜，取出96孔板，放置于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的白细胞悬液100μL/孔，白细胞悬液的浓度为6 X 107/L，放置于摇床上室温轻微摇动20分钟，使用细胞洗液洗脱未与单抗结合的细胞，每孔每次加入200μL细胞洗液，使用200uL量程的移液器轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用沙黄染色，每孔直接再加入IOOμL沙黄染色液，室温放置15分钟，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果如图7所示，计数结果为待测CD45抗体为525和531，ebioscience公司的CD45抗体为536和531，阴性对照为14和17。不同的核酸染料，只要能

够对目标细胞进行合适的染色，都可以用于本发明的方法。

[95] 实施例七

[96] 将待测的鼠抗人CD19单抗、参比公司的鼠抗人CD19单抗和阴性对照鼠IgG分别按照20μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 10.0的碳酸盐缓冲液作为包被液，37度孵育箱放置2h，取出96孔板，放置于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的淋巴细胞悬液IOOμL/孔，淋巴细胞悬液的浓度为6xl07L，放置于摇床上室温轻微摇动20分钟，使用细胞洗液洗脱未与单抗结合的细胞，每孔每次加入200μL细胞洗液，使用200μL量程的移液器轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用0.2%甲基氯染色，每孔直接再加入IOOμL加甲基氯染色液，室温放置5min，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果

[97] 如图8所示，计数结果为待测CD19单抗为25和21，参比公司的CD19单抗为125和130，阴性对照为16和14。可见，本方法既可以检测敏感性高的抗体，也可以检测出敏感性低的抗体，具有良好的通用性。

[98] 实施例八

[99] 将待测的鼠抗人CD3单抗、参比公司的鼠抗人CD3单抗和阴性对照鼠IgG分别按照10μg/板包被96孔聚苯乙烯板，每个测试设置两个复孔，以pH 9.0的碳酸盐缓冲液作为包被液，37度孵育箱放置1.5h，取出96孔板，放置于干净毛巾上倒扣96孔板将孔内液体拍干后，加入已制备好的淋巴细胞悬液IOOμL/孔，淋巴细胞悬液的浓度为5X 107/L，放置于摇床上室温轻微摇动30分钟，使用细胞洗液洗脱未与单抗结合的细胞，每孔每次加入200μL细胞洗液，使用200μL量程的移液器轻微吹打孔内液体，然后吸走孔内液体，重复洗涤3次，使用4%中性甲醛固定液固定96孔聚苯乙烯板中结合的细胞，每孔加入固定液50μL然后使用苏木素染色，每孔直接再加入IOOμL苏木素染色液，室温放置15分钟，之后使用塑料吸管吸去孔内的染色液，再使用塑料吸管加入纯水，重复"吸液---加纯水"2次，最后将96

孔聚苯乙烯板倒扣去净孔内液体后进行显微镜下细胞计数。显微镜下细胞染色效果如图9所示，计数结果为待测CD3单抗为51和42，参比公司的CD19单抗为251和254，阴性对照为19和13。可见，本方法既可以检测敏感性高的抗体，也可以检测出敏感性低的抗体，具有良好的通用性。

[100] 本发明利用活细胞表面表达的天然构象的抗原与待测抗体结合，并对细胞进行染色和计数，来鉴定抗体的敏感性，同时也可以鉴定抗体制备过程中克隆细胞株的质量。该方法可以直观地反映抗体与天然构象抗原的结合水平，结果更加准确，并减少阳性克隆细胞株筛选失败导致的人力和物力的浪费。另一方面，本发明的方法通过区分待测抗体结合的细胞类型，初步判断待测抗体的特异性。本方法简单、快捷、直观。以上实施例证明，本发明的方法具有良好的通用性。

[101] 本文中的所有数据、图像、仪器、试剂和步骤应理解为说明性而非限制性的。虽然已结合上述具体实施方案描述了本发明，许多修改和其它变化对于本领域技术人员是显而易见的。所有这种修改和其它变化也落入本发明的精神和范围内。

权利要求书

[权利要求 1] 一种鉴定抗体敏感性的方法，包括以下步骤：

获取固相载体、细胞和抗体；

所述抗体吸附于所述固相载体；

所述细胞与吸附在所述固相载体的抗体进行孵育，保留所述细胞中与抗体结合的细胞；

对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数；

根据细胞计数结果鉴定所述抗体的敏感性。

[权利要求 2] 一种鉴定克隆细胞株的方法，包括以下步骤：

获取固相载体、细胞和克隆细胞株的分泌的抗体；

将所述分泌的抗体吸附所述固相载体；

所述细胞与吸附在所述固相载体的抗体孵育，保留所述细胞中与抗体结合的细胞；

对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数；

根据细胞计数结果鉴定克隆细胞株。

[权利要求 3] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：根据细胞计数结果鉴定所述抗体的敏感性，细胞数量多的抗体敏感性高；根据细胞计数结果鉴定克隆细胞株，细胞数量多的克隆细胞株质量好。

[权利要求 4] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述细胞来自人体或动物体液中的细胞，或者人工培养的原代细胞，或者人工培养的传代细胞。

[权利要求 5] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述人体或动物体液中的细胞选自红细胞、白细胞、血小板，优选白细胞中的淋巴细胞亚群。

[权利要求 6] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述抗体选自单克隆抗体，优选抗细胞表面抗原的单克隆抗体，更优选抗淋巴细胞表面抗原的单克隆抗体。

[权利要求 7] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述固相载体选自

纤维素载体、交联右旋糖酐载体、聚苯乙烯载体。

[权利要求 8] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述细胞制备成细胞悬浮液，所述细胞悬液的浓度为5-500cells^L ，优选 10-lOOcells/μL，更优选50-80cells~L 。

[权利要求 9] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述细胞与所述抗体在20°C-25 °C孵育1小吋，优选20-40 分钟，更优选20-30 分钟。

[权利要求 10] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：吸附吋使用包被液与所述抗体混合，所述包被液的pH值为6-8 ，优选9-10 ，更优选9.5-10 。

[权利要求 11] 根据权利要求10所述方法，其特征在于：所述包被液的离子浓度为0.01-lmol/L ，优选0.01-5 m01/1，更优选0.05-0. 1 mol/L 。

[权利要求 12] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：使用染色液对与抗体结合的活细胞进行染色，所述染色液中的染料选 自甲基氯、瑞氏-吉姆萨、沙黄、苏木素中的其中一种。

[权利要求 13] 根据权利要求12所述的方法，其特征在于：所述甲基氯配制为甲基氯水溶液，浓度为0.05%-5% ，优选0.05%-1.5% ，更优选0.05%-0•5%。

[权利要求 14] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述染色前，先将所述与抗体结合的活细胞固定。

[权利要求 15] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：还包括设置阳性和/或阴性对照，

获取已知敏感性的抗体作为阳性和/或阴性抗体；

所述阳性和/或阴性抗体吸附于固相载体；

所述细胞与吸附在所述固相载体的所述阳性和/或阴性抗体孵育，保留所述细胞中与抗体结合的细胞；

对与抗体结合的细胞进行染色和细胞计数。

[权利要求 16] 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：所述细胞计数为显微镜下进行的细胞计数。

[权利要求 17] 一种使用权利要求1或2的方法进行抗体或克隆细胞株鉴定的试剂盒，包括，

固相载体，用于吸附待测抗体或克隆细胞株分泌的抗体；

抗体包被液，用于抗体吸附于所述固相载体；

细胞洗涤液，用于洗涤除去未与抗体结合的细胞；

染色液，用于染色与抗体结合的细胞。

[权利要求 18] 根据权利要求17所述的试剂盒，其特征在于：还包括细胞固定液，用于固定与抗体结合的细胞。

[权利要求 19] 一种鉴定抗体特异性的方法，包括，

获取固相载体、细胞和抗体，所述细胞包括至少已知两种细胞类型；

所述抗体吸附于所述固相载体；

所述细胞与吸附在固相载体的抗体孵育，保留所述细胞中与抗体结合的细胞；

对与抗体结合的细胞进行染色，并分别进行细胞计数；

通过比较不同已知细胞类型的细胞计数结果，鉴定抗体的特异性。

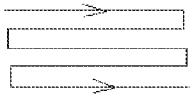


图1

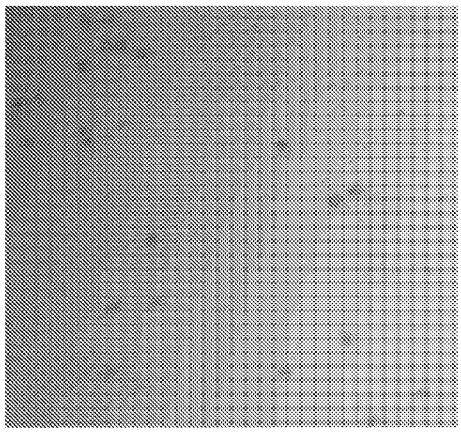


图2

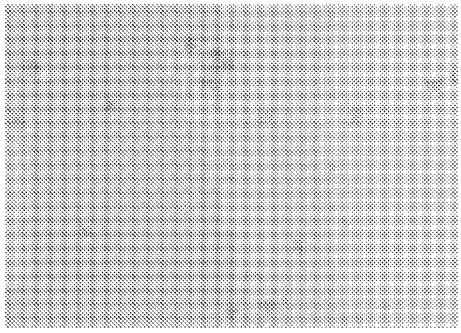


图3

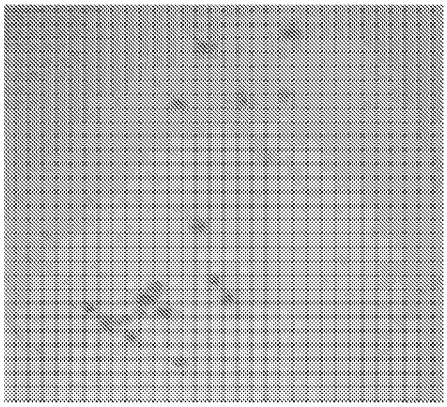


图4

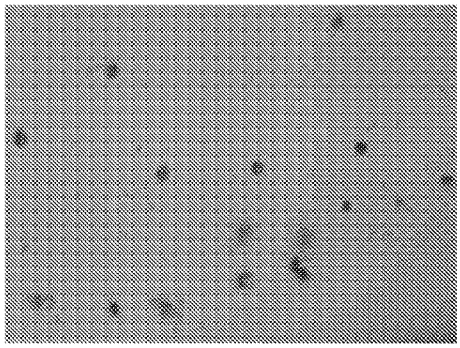


图5

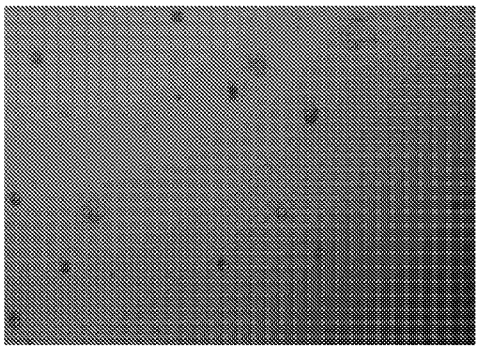


图6

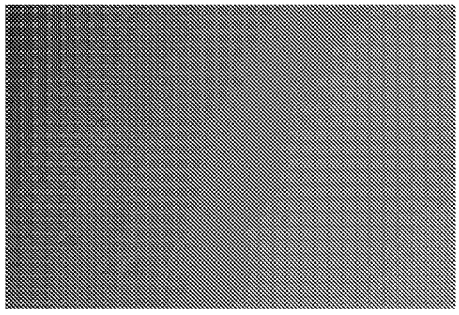


图7

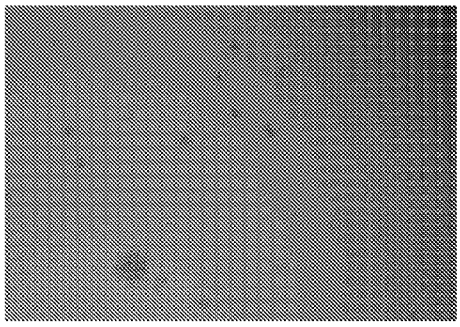


图8

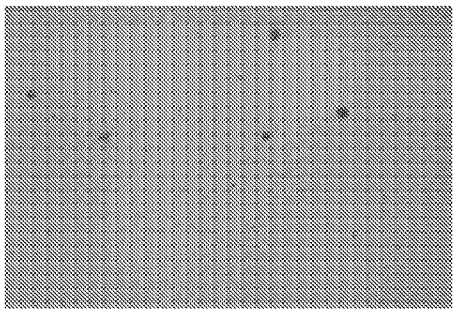


图9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/086596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:G01N 33

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

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

CPRSABS, VEN: surface antigen, CD, antibod+, sensitive,cell strain, count+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1188115 A (AKZO NOBEL NV) 22 July 1998 (22.07.1998) see claims 1-10, description, page 9, the last paragraph, page 12	1-19
A	CN 101665781 A (UNIV NANJING AGRIC) 10 March 2010 (10.03.2010) see the whole document	1-19
A	CN 101246173 A (HOU M, et al.) 20 August 2008 (20.08.2008) see the whole document	1-19
A	US 6461825 B1 (Sanfi (Societe Anonyme)) 8 October 2002 (08.10.2002) see the whole document	1-19
A	CN 101044404 A (NAGAOKA & CO LTD, BURSTEIN TECHNOLOGIES INC,	1-19

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 March 2013 (05.03.2013)	14 March 2013 (14.03.2013)

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

Authorized officer
WANG, Xiaoyuan
Telephone No. (86-10) 62085241

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/086596

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	KOUYAMAY) 26 September 2007 (26.09.2007) see the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/086596

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1188115 A	22.07.1998	ZA 9710391 A	26.08.1998
		NZ 329314 A	25.02.1999
		AU 733165 B2	10.05.2001
		RU 2196178 C2	10.01.2003
		NO 327047 B1	14.04.2009
		BR 9706236 A	04.05.1999
		KR 98063909 A	07.10.1998
		IL 122233 A	30.04.2001
		ES 2262170 T3	16.11.2006
		CA 2221682 A	06.06.1998
		MX 9709446 A	01.07.1998
		CA 2221682 C	18.10.2011
		EP 0856520 B1	05.04.2006
		DE 69735621 D1	18.05.2006
		DE 69735621 T2	24.08.2006
		CN 100430418 C	05.11.2008
		NO 975714 A	08.06.1998
		EP 0856520 A1	05.08.1998
		MX 205222 B1	14.11.2011
		IN 9702723 I4	04.03.2005
		AU 4690897 A	11.06.1998
		US 6020170 A	01.02.2000
		HU 9702359 A2	28.09.1998
		US 6392020 B1	21.05.2002
		US 2002143150 A1	03.10.2002
		KR 100543053 B1	13.06.2006
		JP 10179160 A	07.07.1998
CN 101665781 A	10.03.2010	CN 101665781 B	23.05.2012
CN 101246173 A	20.08.2008	None	
US 6461825 B1	08.10.2002	ES 2053785 T3	01.08.1994
		FI 95752 B	30.11.1995
		CA 1340973 C	25.04.2000
		EP 0311492 A2	12.04.1989
		NO 884327 A	24.04.1989
		JP 1121755 A	15.05.1989
		AU 2294888 A	06.04.1989
		NO 177444 B	06.06.1995
		DK 174032 B1	29.04.2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/086596

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		FR 2621128 A1	31.03.1989
		IL 87882 A	14.01.1993
		FI 884472 A	31.03.1989
		PT 88615 A	31.07.1989
		DK 550288 A	31.03.1989
		DE 3888779 D1	05.05.1994
		EP 0311492 B1	30.03.1994
		IE 63426 B1	19.04.1995
		KR 0126236 B1	24.12.1997
CN 101044404 A	26.09.2007	AU 2004243690 A1	09.12.2004
		JP 2007501407 A1	25.01.2007
		WO 2004 106925 A3	16.06.2005
		WO 2004106925 A2	09.12.2004
		EP 1599730 A2	30.11 .2005
		US 2005032126 A1	10.02.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/086596

The classification of the subject matter:

GOIN 33/543 (2006.01) i

G01N 33/577 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/086596

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:G01N33

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词 (如使用))

CPRSABS, VEN: 抗体,敏感,克隆细胞株,细胞计数,表面抗原 ,surface antigen, CD, antibod+,cell strain, count+

C. 相关文件

类 型*	引用文件,必要时,指明相关段落	相关的权利要求
X	CN1 1881 15A (阿克佐诺贝尔公司)22.7 月 1998(22.07. 1998) 权利要求 1-10,说明书第 9 页最后一段,说明书第 12 页	1-19
A	CN101665781A (南京农业大学)10.3 月 2010(10.03.2010) 全文	1-19
A	CN101246173A (侯明冀学斌,彭军)20.8 月 2008(20.08.2008) 全文	1-19
A	US6461825Bl(Sanfi (Societe Anonyme)) 8.10 月 2002(08. 10.2002) 全文	1-19
A	CN101044404A (长冈实业株式会社 伯斯坦技术公司,小山佳久) 26.9 月 2007(26.09.2007) 全文	1-19

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 因 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的¾ ¾ ¾后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
5.3 月 2013(05.03.2013)	14.3 月 2013 (14.03.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088	王晓媛
传真号: (86-10)62019451	电话号码: (86-10) 62085241

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/086596

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1 1881 15A	22.07. 1998	ZA9710391A	26.08. 1998
		NZ3293 14A	25.02. 1999
		AU733 165B2	10.05.2001
		RU2196178C2	10.01.2003
		NO327047B1	14.04.2009
		BR9706236A	04.05. 1999
		KR98063909A	07. 10. 1998
		IL122233A	30.04.2001
		ES2262170T3	16. 11.2006
		CA2221682A	06.06. 1998
		MX9709446A	01.07. 1998
		CA2221682C	18. 10.201 1
		EP0856520B1	05.04.2006
		DE69735621D1	18.05.2006
		DE69735621T2	24.08.2006
		CN100430418C	05. 11.2008
		N0975714A	08.06. 1998
		EP0856520A1	05.08. 1998
		MX205222B1	14. 11.201 1
		IN9702723I4	04.03.2005
		AU4690897A	11.06. 1998
		US6020170A	01.02.2000
		HU9702359A2	28.09. 1998
		US6392020B1	21.05.2002
		US2002143 150A1	03. 10.2002
		KR100543053B1	13.06.2006
		JP10179160A	07.07. 1998
CN101665781A	10.03.2010	CN101665781B	23.05.2012
CN101246173A	20.08.2008	无	
US6461825B1	08. 10.2002	ES2053785T3	01.08. 1994
		FI95752B	30. 11. 1995
		CA1340973C	25.04.2000
		EP03 11492A2	12.04. 1989
		N0884327A	24.04. 1989
		JP1 121755A	15.05. 1989
		AU2294888A	06.04. 1989
		N0177444B	06.06. 1995
		DK174032B1	29.04.2002

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2007/086596

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		FR2621128A1	31.03.1989
		IL87882A	04.01.1993
		FI884472A	31.03.1989
		PT88615A	31.07.1989
		DK550288A	31.03.1989
		US5388779	14.02.1995
		EP0311492B1	30.03.1994
		DE3851426B1	05.05.1994
		KR0126236B1	30.06.1997
CN101044404A	26.09.2007	AU2004243690A1	09.12.2004
		EP1750701A1	14.02.2007
		WO2004106925A3	16.06.2005
		WO2004106925A2	09.12.2004
		EP1599731	30.11.2005
		US20050261796A1	24.11.2005

主题的分类：

G01N33/543 (2006.01)i

G01N33/577 (2006.01)i