

(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
2025 年 1 月 2 日 (02.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/001335 A1

(51) 国际专利分类号:

C12Q 1/6883 (2018.01) *C12N 5/10* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/082680

(22) 国际申请日: 2024 年 3 月 20 日 (20.03.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310790989.X 2023年6月30日 (30.06.2023) CN

(71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310012 (CN)。

(72) 发明人: 胡新央 (HU, Xinyang); 中国浙江省杭州市
西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310012 (CN)。
王建安 (WANG, Jianan); 中国浙江省杭州市西
湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310012 (CN)。 李

国华 (LI, Guohua); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路866号, Zhejiang 310012 (CN)。 倪骋
(NI, Cheng); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘
路866号, Zhejiang 310012 (CN)。

(74) 代理人: 杭州杭诚专利事务所有限公司
(HANGZHOU HANGCHENG PATENT ATTORNEY
OFFICE CO., LTD.); 中国浙江省杭州市上城
区西湖大道35号万新大厦1号楼505,
Zhejiang 310009 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: INTERVENTION TARGET FOR ADVANCED FIBROSIS OF ISCHEMIC HEART DISEASE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点及其应用

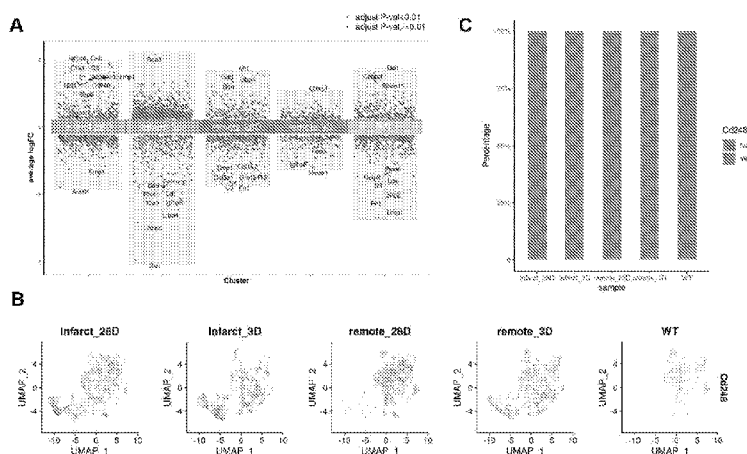


图 1

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biomedicines. Disclosed are an intervention target for advanced fibrosis of an ischemic heart disease and a use thereof. In the present invention, it was found that a CD248 protein is only specifically and highly expressed in cardiac fibroblasts in an ischemic injury area, and is expressed at lower levels in other normal tissue cells, and therefore, the CD248 protein can be used as an intervention target for advanced fibrosis of an ischemic heart disease to effectively inhibit excessive cardiac fibrosis, and the safety is high. According to the present invention, an RNA fragment, a monoclonal antibody and a CAR-T cell targeting CD248 are prepared; the RNA fragment can inhibit CD248 gene expression; the monoclonal antibody has good affinity to the CD248 protein, and can effectively inhibit the activation of fibroblasts; and the CAR-T cell has better infiltration into a heart ischemia injury area, and can kill CD248⁺ fibroblasts.

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(57) 摘要: 本发明涉及生物医药领域, 公开了一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点及其应用。本发明发现CD248蛋白仅特异高表达于缺血损伤区的心脏成纤维细胞中, 在其他正常组织细胞中表达量较低, 因此将其作为缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点可有效地抑制心脏过度纤维化, 安全性高。本发明制备了针对CD248的RNA片段、单克隆抗体和CAR-T细胞; RNA片段可抑制CD248基因表达; 单克隆抗体对CD248蛋白具有较好的亲和力, 且可有效抑制成纤维细胞的激活; CAR-T细胞对心脏缺血损伤区具有较好的浸润性, 可对CD248⁺成纤维细胞造成杀伤。

一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域，尤其涉及一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点及其应用。

背景技术

[0002] 在罹患缺血性心脏病的患者中，心脏纤维化程度是预测不良预后的一个重要指标，其严重程度同患者的住院率、死亡率和不良心脏事件的发生率增加相关。临床最为常见、致命的急性心肌缺血事件为急性心肌梗死；而随着急诊介入手术的开展，部分患者的病变冠脉会在一定时间内被开通，但该类患者心脏同样会遭受缺血/再灌注损伤打击。成纤维细胞是心脏主要的基质细胞类型，其在心脏的结构维持和功能调节中发挥重要作用。越来越多的研究表明，心脏成纤维细胞是一种异质性较高的细胞类型，不同亚群的成纤维细胞在生理及病理情况下的功能有所不同。在心肌梗死早期（2-7 天），成纤维细胞受到缺氧、炎症等损伤刺激后激活转分化为肌成纤维细胞，迁移至损伤部位并合成分泌胶原基质，促发纤维疤痕的产生，从而修复受损的心肌组织、防止心脏破裂。但是在心肌梗死晚（10 天以后），促纤维化信号的持续激活导致胶原基质的过度产生，引发心脏僵硬增加、顺应性下降，并影响心脏电活动，最终带来心力衰竭的恶性后果。因此，在心肌梗死晚期抑制成纤维细胞过度激活具有积极意义。

[0003] 通过本发明团队的前期研究，我们发现不同亚群的成纤维细胞在心梗不同时期的作用有所不同，但是由于缺乏可靠的生物标志物，我们对成纤维细胞在心脏稳态及心梗后不同时相的具体作用尚缺乏了解，因此尚无法筛选出在心肌梗死晚期心脏重塑中起关键作用的成纤维细胞亚群。另一方面，目前基础及临床研究中开发应用的抗纤维化靶点和策略作用较宽泛，无法针对特定的病理成纤维细胞亚群，导致抗纤维化的治疗效果不佳且可能带来一定的心脏毒性。近年来单细胞测序技术的快速发展为我们认识心脏成纤维细胞异质性、找寻可靠的生物标志物及治疗靶点提供了有力工具。借助单细胞测序解析心梗后不同时相/区域心脏成纤维细胞亚群的动态变化，进而找寻特异在心梗晚期心脏病理重塑中起关键作用的成纤维细胞亚群，以期在不影响早期瘢痕性修复的前提下改善晚期不良间质重塑，对解决心脏纤维化的难题至关重要。

[0004] 心肌梗死发生后，成纤维细胞会经历转分化、去分化、凋亡或老化等不同改变，且成纤维细胞的不同命运转归紧密参与心梗后心脏重塑的调节。纤维原性肌成纤维细胞可在心梗远期过度产生细胞外基质，促发心脏间质纤维化；而抑制肌成纤维细胞功能或清除特定的肌

成纤维细胞亚群是潜在的纤维化干预手段。

[0005] 肿瘤领域新近的嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR)-T 细胞技术赋能 T 细胞靶向识别杀伤携带特定抗原的病理细胞，而 CAR 是将细胞内 T 细胞信号和共刺激分子和特定抗原的单链可变区相组合。CAR-T 细胞技术的出现彻底改变了难治性急性淋巴细胞白血病和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的治疗策略。但是，要将 CAR-T 技术应用于心脏纤维化的治疗，找寻特异表达于病理成纤维细胞，在其他细胞、组织中低/无表达的干预靶点是保证其安全有效的关键。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题，本发明提供了一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点及其应用。首先，本发明借助单细胞测序技术发现了一群在缺血性心脏病晚期心脏纤维化中起关键作用的 CD248⁺成纤维细胞；CD248 蛋白仅特异高表达于缺血损伤区的心脏成纤维细胞中，在其他正常组织细胞中表达量较低，因此将 CD248 作为缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点不仅能够有效地抑制心脏过度纤维化，并且安全性高。其次，本发明制备了针对 CD248 的 RNA 片段、单克隆抗体和 CAR-T 细胞；其中，小干扰 RNA 片段可抑制 TGF- β 刺激下的成纤维细胞激活和胶原基质合成；单克隆抗体 IgG78 对 CD248 蛋白具有较好的亲和力，且可有效抑制成纤维细胞的激活；CAR-T 细胞对心脏缺血损伤区具有较好的浸润性，可有效减少缺血区 CD248⁺成纤维细胞数量，因此，本发明单克隆抗体和 CAR-T 细胞可显著减轻心脏间质纤维化并提高心脏收缩功能。

[0007] 本发明的具体技术方案为：

第一方面，本发明提供了一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点，所述干预靶点为 CD248 基因、CD248 蛋白或 CD248⁺成纤维细胞。

[0008] 如本申请背景技术中所述，在缺血性心脏病晚期（10 天以后），促纤维化信号的持续激活会导致心脏过度纤维化，最终带来心力衰竭的恶性后果。因此，需要在缺血性心脏病晚期对上述纤维化过程进行抑制。通过本发明团队的前期研究，我们发现不同亚群的成纤维细胞在缺血性心脏病不同时期的纤维化程度各不相同。为此，本发明创新性地借助单细胞测序技术来解析不同时相/区域心脏成纤维细胞亚群的动态变化，最终发现了一群在缺血性心脏病晚期心脏纤维化中起关键作用的 CD248⁺成纤维细胞；CD248 蛋白仅特异高表达于激活后的心脏成纤维细胞中，尤其在缺血性心脏病晚期的表达量高，是导致心脏过度纤维化的主要因素之一；并且，CD248 蛋白在正常的组织细胞中的表达量较低，因此作为干预靶点具有很高的安全性。

[0009] 第二方面，本发明提供了 CD248 基因、CD248 蛋白或 CD248⁺成纤维细胞作为干预靶点在制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药物中的应用。

[0010] 利用 CD248 作为干预靶点，可有针对性地制备可抑制 CD248 基因表达、可抑制 CD248 蛋白活性、可减少 CD248 蛋白数量或杀伤 CD248⁺成纤维细胞的药物，从而减轻心脏间质纤维化。

[0011] 第三方面，本发明提供了一种可降低 CD248 基因表达的小干扰 RNA 片段，具有如下核苷酸序列：

SEQ ID NO: 1: Sense (5' -3'): GCCCACAAGACCUCUGUUAUU;

SEQ ID NO: 2: Antisense (5' -3'): AAUAACAGAGGUCUUGUGGGC。

[0012] 本发明设计合成了针对 CD248 基因的小干扰 RNA 序列，其可有效抑制 TGF- β 刺激下的成纤维细胞激活和胶原基质合成。

[0013] 第四方面，本发明提供了上述针对 CD248 基因的小干扰 RNA 片段在制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药物中的应用。

[0014] 第五方面，本发明提供了一种针对 CD248 的特异性单克隆抗体，其重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示：

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLQESGGTLVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYAMGWVRQTP
GKGLEWLSAIRKSGTTTYADSVKGRFIISRDNSKNTLYLQMNRLRVGDTATYYCATHPIAG
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*。

[0015] 其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示：

MAWTPLLLLLLHCTGSLSQPVLTQPPSLASPGASASLTCTLRSDINVGSYRISWYQQKPGS
PPQYLLSYKSDSDKQKGSQVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWNSAGV
FGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA
GVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*。

[0016] 本发明制备了针对 CD248 的单克隆抗体 IgG78，其对 CD248 蛋白具有较好的亲和力，且可有效抑制成纤维细胞的激活，因此可减轻心脏过度纤维化。

[0017] 第六方面，本发明提供了上述特异性单克隆抗体在制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药

物中的应用。

[0018] 第七方面，本发明提供了一种针对 CD248 的 CAR-T 细胞，其 scFC 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示：

MASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGEAQPVLTQPPSLASPGASASLTCTLRSDINVGSYRISW
YQQKPGSPQYLLSYKSDSDKQKSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMI
WHNSAGVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGTLVQPGGSLRLSCEASGFT
FSNYAMGWVRQTPGKGLEWLSAIRKSGTTPMRTQSK*。

[0019] 本发明进一步利用单克隆抗体 IgG78 的 Fab 段设计制备了 CD248 CAR-T 细胞。CD248 CAR-T 细胞可对 CD248⁺成纤维细胞造成杀伤；经注射后，CD248 CAR-T 细胞可很好地浸润到心脏缺血损伤区，减少缺血区 CD248⁺成纤维细胞数量，进而减轻心脏间质纤维化并提高心脏收缩功能。

[0020] 第八方面，本发明提供了上述 CAR-T 细胞在制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药物中的应用。

[0021] 第九方面，本发明提供了一种缺血性心脏病晚期抗纤维化药物，含有上述的 RNA 片段或上述的特异性单克隆抗体或如上述的 CAR-T 细胞。

[0022] 作为优选，所述抗纤维化药物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0023] 作为优选，所述抗纤维化药物为注射制剂。

[0024] 进一步优选，所述注射制剂为通过心肌内注射、皮内注射、皮下注射、肌肉注射或静脉注射的注射制剂。

[0025] 与现有技术对比，本发明的有益效果是：

(1) 本发明创新性地借助单细胞测序技术发现了一群在缺血性心脏病晚期心脏纤维化中起关键作用的 CD248⁺成纤维细胞；CD248 蛋白仅特异高表达于缺血损伤区的心脏成纤维细胞中，在其他正常的组织细胞中表达量较低，因此将 CD248 作为缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点不仅能够有效地抑制心脏过度纤维化，并且安全性高。

[0026] (2) 本发明制备了针对 CD248 的小干扰 RNA 片段、单克隆抗体和 CAR-T 细胞；其中，小干扰 RNA 片段可抑制 TGF- β 刺激下的成纤维细胞激活和胶原基质合成；单克隆抗体 IgG78 对 CD248 蛋白具有较好的亲和力，且可有效抑制成纤维细胞的激活；而 CAR-T 细胞对心脏缺血损伤区具有较好的浸润性，可有效减少缺血区 CD248⁺成纤维细胞数量，因此，本发明单克隆抗体和 CAR-T 细胞可显著减轻心脏间质纤维化并提高心脏收缩功能。

附图说明

[0027] 图 1 为单细胞测序分析心肌梗死后不同时相/区域成纤维细胞中的差异基因表达及

CD248 在心肌梗死不同时相/区域的表达分布特点；其中，图(a)为心肌梗死后 3 天、28 天梗死区/远端区的成纤维细胞中的差异基因表达，图(b)为 CD248 在心肌梗死后 3 天、28 天梗死区/远端区的成纤维细胞中的表达、分布情况，图(c)为 CD248⁺成纤维细胞在心肌梗死后 3 天、28 天梗死区/远端区的成纤维细胞中的占比；

图 2 为敲低 CD248 基因抑制 TGF- β 刺激下的成纤维细胞转分化及胶原基质合成；

图 3 为沉默 CD248 基因改善缺血/再灌注诱导的心脏收缩功能障碍；其中，图(a)为 RT-PCR 验证 CD248 基因敲除小鼠的敲除效率，图(b、c)为心脏超声监测野生型（WT 组）及 CD248 敲除小鼠（CD248 KO 组）在缺血/再灌注损伤后 0-28 天的左心室收缩功能改变；

图 4 为沉默 CD248 基因减轻缺血/再灌注诱导的心脏间质纤维化；图(a)为各组小鼠心脏天狼星红染色典型图，图(b)为各组小鼠心脏由天狼星红染色统计得到的纤维化面积；

图 5 为 CD248 单克隆抗体 IgG78 与 CD248 蛋白的亲合力及其抑制成纤维细胞激活的功能；其中，图(a)为 ELISA 检测 CD248 单克隆抗体 IgG78 与 CD248 蛋白的亲合力，图(b)为 CD248 单克隆抗体 IgG78 抑制 TGF- β 刺激下的心脏成纤维细胞激活；

图 6 为 CD248 单克隆抗体 IgG78 改善缺血/再灌注后心脏收缩功能障碍；其中，图(a)为 CD248 单克隆抗体 IgG78 的在体给药剂量及给药过程，图(b)为 CD248 单克隆抗体 IgG78 改善缺血/再灌注后 4 周心脏收缩功能障碍；

图 7 为 CD248 单克隆抗体 IgG78 改善缺血/再灌注后心脏间质纤维化；图(a)为各组小鼠心脏天狼星红染色典型图，图(b)为各组小鼠心脏由天狼星红染色统计得到的纤维化面积；

图 8 为 CD248 CAR-T 细胞体外杀伤 CD248⁺成纤维细胞；

图 9 为尾静脉回输 CD248 CAR-T 24 小时后心脏缺血损伤区 CD248 CAR-T 细胞的浸润情况；

图 10 为尾静脉回输 CD248 CAR-T 细胞改善缺血/再灌注后心脏收缩功能障碍；其中，图(a)为 CD248 CAR-T 细胞的在体给药剂量及给药过程，图(b)为 CD248 CAR-T 细胞回输后的小鼠心脏功能连续监测；

图 11 为尾静脉回输 CD248 CAR-T 细胞改善缺血/再灌注后心脏间质纤维化；图(a)为各组小鼠心脏天狼星红染色典型图，图(b)为各组小鼠心脏由天狼星红染色统计得到的纤维化面积；

图 12 为 CD248 CAR-T 细胞对缺血/再灌注后小鼠的毒副作用评价；其中，图(a)为血清中炎症因子检测，图(b)为 HE 染色评估肝脏、脾脏、肺脏的形态和炎症细胞浸润情况。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0029] 总实施例

一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点,所述干预靶点为 CD248 基因、CD248 蛋白或 CD248⁺ 成纤维细胞。CD248 基因、CD248 蛋白或 CD248⁺ 成纤维细胞作为干预靶点可用于制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药物。

[0030] 一种可降低 CD248 基因表达的小干扰 RNA 片段,具有如下所示的核苷酸序列:

SEQ ID NO: 1: Sense (5' -3'): GCCCACAAGACCUCUGUUAUU;

SEQ ID NO: 2: Antisense (5' -3'): AAUAAACAGAGGUCUUGUGGGC。

[0031] 一种针对 CD248 的特异性单克隆抗体,

重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLQESGGTLVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYAMGWVRQTP
GKGLEWLSAIRKSGTTTYYADSVKGRFIISRDNSKNTLYLQMNRLRVGDTATYYCATHPIAG
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*。

[0032] 其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示:

MAWTPLLLLLLSHCTGSLSQPVLTPPPSLASPGASASLTCTLRSDINVGSYRISWYQQKPGS
PPQYLLSYKSDSDKQKGSQVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHNSAGV
FGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA
GVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*。上述单
克隆抗体在制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药物中的应用。

[0033] 一种针对 CD248 的 CAR-T 细胞,具有如 SEQ ID NO: 5 所示的 scFC 区的氨基酸序列:

MASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGEAQPVLTPPPSLASPGASASLTCTLRSDINVGSYRISW
YQQKPGSPQYLLSYKSDSDKQKGSQVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMI
WHNSAGVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGTLVQPGGSLRLSCEASGFT
FSNYAMGWVRQTPGKGLEWLSAIRKSGTTPTMRTQSK*。上述 CAR-T 细胞在制备缺血性
心脏病晚期抗纤维化药物中的应用。

[0034] 一种缺血性心脏病晚期抗纤维化药物,含有对 CD248 基因的表达具有抑制作用的物质或上述的单克隆抗体或如上述的 CAR-T 细胞。作为优选,还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。作为优选,所述抗纤维化药物为注射制剂。进一步优选,所述注射制剂为通过心肌内注射、皮内注射、皮下注射、肌肉注射或静脉注射的注射制剂。

[0035] 实施例 1：单细胞测序分析参与心梗晚期心脏纤维化的主要成纤维细胞亚群

首先，为明确成纤维细胞在正常及心肌梗死后心脏组织微环境中的表型、构成和其在疾病中潜在的功能特征，我们利用酶消化法将正常及心肌梗死后 3 天、28 天梗死区、远端区的心脏组织制成单细胞悬液，而后流式分选了 PDGFRA⁺DDR2⁺成纤维细胞进行单细胞测序。利用 10× Genomics 单细胞测序平台进行心脏成纤维细胞单细胞测序及后续数据处理。测序数据经基本处理后，用 STAR 软件，将 RNA reads 比对到参考基因组，并统计比对到基因组各个区段的比例，得到特定的独特分子标识符（UMI）数据。根据比对结果，我们得到每个细胞每个基因的表达量。

[0036] 为找寻在心梗晚期心脏重塑中起关键作用的成纤维细胞亚群，我们基于心梗不同时相对每组的差异表达基因进行了分析（图 1 A）。分析发现，相较其他时相/区域的成纤维细胞，心梗后 28 天梗死区的成纤维细胞高表达 *Igfbp6*、*C4b*、*Cls1*、*C3*、*Tirf*、*Aebp1*、*Efemp1*、*Nbl1*、*Cd248* 和 *Sfrp2*。最终，基于“①靶分子高表达于病理成纤维细胞中，而在正常组织及其他类型细胞中低/无表达；②为便于后续的 CAR-T 细胞干预，靶分子是一种胞膜蛋白”的标准，我们选取 CD248 作为靶分子进行后续研究。进一步针对阳性细胞比例进行分析发现，正常（6.55%）、心梗后 3 天梗死区（1.54%）和远端区（5.33%）及心梗后 28 天的远端区（3.06%）CD248⁺细胞的比例均较低，而心梗后 28 天梗死区（22.22%）的 CD248⁺细胞比例显著升高（图 1 B、C）。

[0037] 实施例 2：敲低 CD248 基因抑制 TGF-β 刺激下的成纤维细胞转分化及胶原基质合成为探究敲低 CD248 基因对成纤维细胞激活的影响，我们设计合成了针对小鼠 CD248 的特异性 siRNA（SEQ ID NO：1；SEQ ID NO：2），并在离体培养的乳小鼠心脏成纤维细胞中验证了其 TGF-β 刺激下成纤维细胞激活的影响。研究发现 TGF-β（10 ng/ml，48h）处理可诱导乳小鼠心脏成纤维细胞转分化，表现为 α-SMA 和 Periostin 高表达，且间质成分 Fibronectin 及 Vimentin 表达上调（图 2）。而采用 siRNA 抑制 CD248 的基因表达，可抑制 TGF-β 刺激下的成纤维细胞转分化和胶原基质合成，表现为 α-SMA、Periostin 和 Fibronectin、Vimentin 的表达下调（图 2）。

[0038] 实施例 3：沉默 CD248 基因改善缺血/再灌注诱导的心脏收缩功能障碍

为明确 CD248 在缺血损伤后心脏功能调节中的关键作用，我们利用 CRISPR-cas9 技术构建了 CD248 基因敲除小鼠，并借助该基因型小鼠观察了沉默 CD248 基因对缺血/再灌注（ischemia/reperfusion, I/R）后心功能障碍的影响。首先，RT-PCR 检测证实了 CD248 KO 小鼠中 CD248 分子的缺失（图 3 A）。随后，心脏超声结果提示，野生型（WT）和 CD248 基因

敲除 (CD248KO) 小鼠的假手术组心脏功能稳定维持在基线水平, 敲除 CD248 并未对小鼠的心脏功能产生影响 (图 3 B、C)。而 I/R 造模后, WT 小鼠的心脏收缩功能出现明显下降, 表现为左室缩短分数 (Fractional shortening %, FS%) 和射血分数 (Ejection fraction %, EF%) 显著降低, 且左心室舒张末期容积 (Left ventricular end of diastolic volume, LVEDV) 和左心室收缩末期容积 (Left ventricular end of systolic volume, LVESV) 显著增加 (图 3 B、C)。非常有意思的是, CD248 KO 小鼠的左心室收缩功能得到明显改善, 表现为 I/R 28 天时 EF、FS 的显著上调和 LVESV 的显著下调, 而 LVEDV 改变无统计学意义 (图 3 B、C)。

[0039] 实施例 4: 沉默 CD248 基因减轻缺血/再灌注诱导的心脏间质纤维化

为进一步明确 CD248 在缺血损伤后心脏间质重塑中的作用, 我们借助 CD248 基因敲除小鼠观察了沉默 CD248 基因对 I/R 后心脏间质重塑的影响。我们取各组小鼠心脏组织, 经石蜡包埋、切片后行天狼星红染色, 对各组小鼠心脏组织进行形态学评价。结果提示, 相较野生型小鼠 (WT) 组, CD248 基因缺失 (CD248 KO 组) 并未显著影响心脏的结构及间质胶原沉积; I/R 损伤后 4 周 WT 小鼠心脏间质的胶原沉积增加, 而 CD248 缺失 (CD248 KO+I/R 组) 可显著减轻 I/R 后小鼠心脏间质的胶原沉积 (图 4)。

[0040] 实施例 5: CD248 单克隆抗体 IgG78 与 CD248 蛋白的亲和力及其抑制成纤维细胞激活的功能

为进一步推动 CD248 分子的潜在临床转化, 我们设计合成了针对小鼠 CD248 的单克隆抗体 IgG78 (重链 SEQ ID NO: 3 和轻链 SEQ ID NO: 4)。首先, 我们利用 Elisa 观察分析发现, 单抗 IgG78 同小鼠 CD248 蛋白具有较强的亲和力 (图 5 A)。随后, Western-blot 分析发现, 单抗 IgG78 处理抑制了 TGF- β (10 ng/ml, 48h) 刺激下的成纤维细胞激活, 表现为 α -SMA 和 Periostin 的表达水平降低 (图 5 B)。

[0041] 实施例 6: CD248 单克隆抗体 IgG78 改善缺血/再灌注后心脏收缩功能障碍

更进一步, 我们在小鼠缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 模型上明确了 CD248 单抗 IgG78 对 I/R 后心脏功能障碍的影响。小鼠心脏 I/R 损伤后, Sham+IgG78 及 I/R+IgG78 组按照 30mg/kg 的方式每周腹腔注射 IgG78 两次, 而 Sham+IgG 及 I/R+IgG 组给予相同剂量的 IgG 处理 (图 6 A)。研究结果提示, 长期的单抗 IgG78 处理改善 I/R 诱导的小鼠心脏收缩功能障碍和左心室重塑, 表现为左心室射血分数 (Ejection fraction %, EF%)、缩短分数 (Fractional shortening %, FS%) 的显著上调和左心室收缩末期容积 (Left ventricular end of systolic volume, LVESV) 的显著下调, 而左心室舒张末期容积 (Left ventricular end of diastolic volume, LVEDV) 改变无统计学意义 (图 6 B)。

[0042] 实施例 7: CD248 单克隆抗体 IgG78 改善缺血/再灌注后心脏间质纤维化

为观察各组小鼠心脏间质的胶原沉积情况,我们对 CD248 单克隆抗体 IgG78 治疗后小鼠的心脏组织进行了天狼星红染色,发现 I/R 损伤后 4 周 I/R+IgG 组小鼠的心脏间质胶原沉积增加,而单抗 IgG78 干预(I/R+IgG78 组)可显著减轻 I/R 后小鼠心脏间质的胶原沉积(图 7 A、B)。

[0043] 实施例 8: CD248 CAR-T 细胞体外杀伤 CD248⁺成纤维细胞

我们利用单克隆抗体 IgG78 的 Fab 段设计了 CAR 的胞外识别区,并在此基础上制备合成了过表达 CD248 CAR 的逆转录病毒。随后,我们利用 Pan T 磁珠从 6-8 周龄的 C57BL/6J 小鼠脾脏分选了 Pan T 细胞,给予 CD3/CD28 磁珠激活后转染 CD248 CAR 逆转录病毒制备了小鼠 CD248 CAR-T 细胞(scFC 区 SEQ ID NO: 5)。

[0044] 首先,我们采用 CD248 过表达慢病毒转染(MOI=40, 72h)的方法诱导 CD248⁺成纤维细胞,随后将其与 CD248 CAR-T 细胞共培养,进而流式分析 CD248⁺成纤维细胞比例改变。结果如图 8 A、5B 所示,相较 Pan T 细胞,CD248 CAR-T 细胞处理可大大降低 CD248⁺成纤维细胞的比例($4.73 \pm 1.31\%$ in CD248 Overexpression+CAR-T (1:8) versus $32.37 \pm 1.71\%$ in CD248 Overexpression),提示 CD248 CAR-T 细胞对 CD248⁺成纤维细胞具有不错的杀伤能力。

[0045] 实施例 9: 尾静脉回输 CD248 CAR-T 24 小时后心脏缺血损伤区 CD248 CAR-T 细胞的浸润情况

CAR 的重要功能是引导 T 细胞到达靶抗原的位置。为检测 CD248 CAR-T 细胞的趋向性,我们在 I/R 造模后 2 周回输 CFSE 标记的 2×10^6 Pan-T 或 CD248 CAR-T 细胞,24h 后利用小动物成像仪观察心脏中 T 细胞的聚集情况。结果如图 9 所示,相较 I/R+Pan T 组,I/R+CAR-T 组的荧光信号明显增强,提示相较 Pan T 细胞,CD248 CAR-T 细胞的心脏趋向性更强,更多的 T 细胞会被募集到心脏区域。

[0046] 实施例 10: 尾静脉回输 CD248 CAR-T 细胞改善缺血/再灌注后心脏收缩功能障碍

更进一步,我们在小鼠 I/R 模型上观察了 CD248 CAR-T 细胞对 I/R 后心脏间质纤维化及心脏功能障碍的潜在治疗作用。I/R 造模成功后,我们采用尾静脉注射的方式于 I/R 后 7 天、14 天分别回输 1×10^7 CAR-T 细胞,并超声动态检测各组小鼠心脏功能的变化(图 10 A)。研究结果提示,CD248 CAR-T 细胞处理改善 I/R 诱导的小鼠心脏收缩功能障碍和左心室重塑,表现为 EF、FS 的显著上调和 LVESV、LVEDV 的显著下调(图 10 B)。

[0047] 实施例 11: 尾静脉回输 CD248 CAR-T 细胞改善缺血/再灌注后心脏间质纤维化

为进一步分析 CD248 CAR-T 细胞对 I/R 后心脏间质纤维化的影响,我们取各组小鼠心脏组织,经石蜡包埋、切片后行天狼星红染色,对各组小鼠心脏组织进行形态学评价。结果如图 11 所

示, 相较 I/R 组, CD248 CAR-T 细胞回输显著减轻 I/R 后小鼠心脏间质的胶原沉积。

[0048] 实施例 12: CD248 CAR-T 细胞对缺血/再灌注后小鼠的毒副作用评价

为进一步评价 CD248 CAR-T 细胞治疗的安全性, 我们采用 CBA 法检测了各组小鼠血清中的炎症因子水平, 并采用 HE 染色的方法评估了全身各重要脏器的形态和免疫细胞浸润情况。CBA 多细胞因子检测发现, CD248 CAR-T 细胞回输并未显著影响 I/R 小鼠血清中 IL-6、IL-10、MCP-1、IFN- γ 和 TNF- α 的水平, 且导致 IL-12p70 的水平显著下降 (图 12 A)。HE 染色发现, 相较 I/R 组, CD248 CAR-T 细胞干预并未显著影响 I/R 小鼠肝脏、肾脏和肺脏的组织结构, 且上述组织中未见明显免疫细胞浸润 (图 12 B)。

[0049] 本发明中所用原料、设备, 若无特别说明, 均为本领域的常用原料、设备; 本发明中所用方法, 若无特别说明, 均为本领域的常规方法。

[0050] 以上所述, 仅是本发明的较佳实施例, 并非对本发明作任何限制, 凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换, 均仍属于本发明技术方案的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种缺血性心脏病晚期纤维化干预靶点,其特征在于:所述干预靶点为 CD248 基因、CD248 蛋白或 CD248⁺成纤维细胞。
2. CD248 基因、CD248 蛋白或 CD248⁺成纤维细胞作为干预靶点在制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药物中的应用。
3. 一种降低 CD248 基因表达的 RNA 片段,其特征在于: Sense (5' -3')的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, Antisense (5' -3') 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。
4. 一种针对 CD248 的特异性单克隆抗体,其特征在于: 其重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。
5. 一种针对 CD248 的 CAR-T 细胞, 其特征在于: 其 scFC 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。
6. 如权利要求 3 所述 RNA 片段或权利要求 4 所述特异性单克隆抗体或权利要求 5 所述 CAR-T 细胞在制备缺血性心脏病晚期抗纤维化药物中的应用。
7. 一种缺血性心脏病晚期抗纤维化药物, 其特征在于: 含有如权利要求 3 所述的 RNA 片段或如权利要求 4 所述的特异性单克隆抗体或如权利要求 5 所述的 CAR-T 细胞。
8. 如权利要求 7 所述的抗纤维化药物, 其特征在于: 所述抗纤维化药物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。
9. 如权利要求 7 或 8 所述的抗纤维化药物, 其特征在于: 所述抗纤维化药物为注射制剂。
10. 如权利要求 9 所述的抗纤维化药物, 其特征在于: 所述注射制剂为通过心肌内注射、皮内注射、皮下注射、肌肉注射或静脉注射的注射制剂。

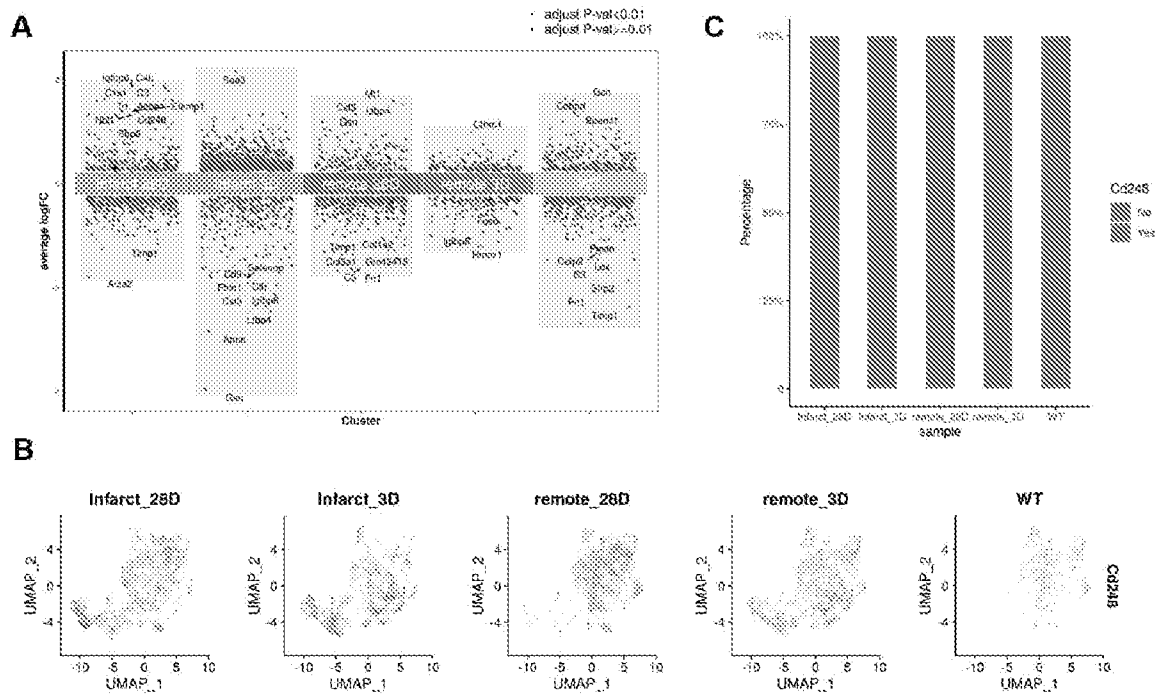


图 1

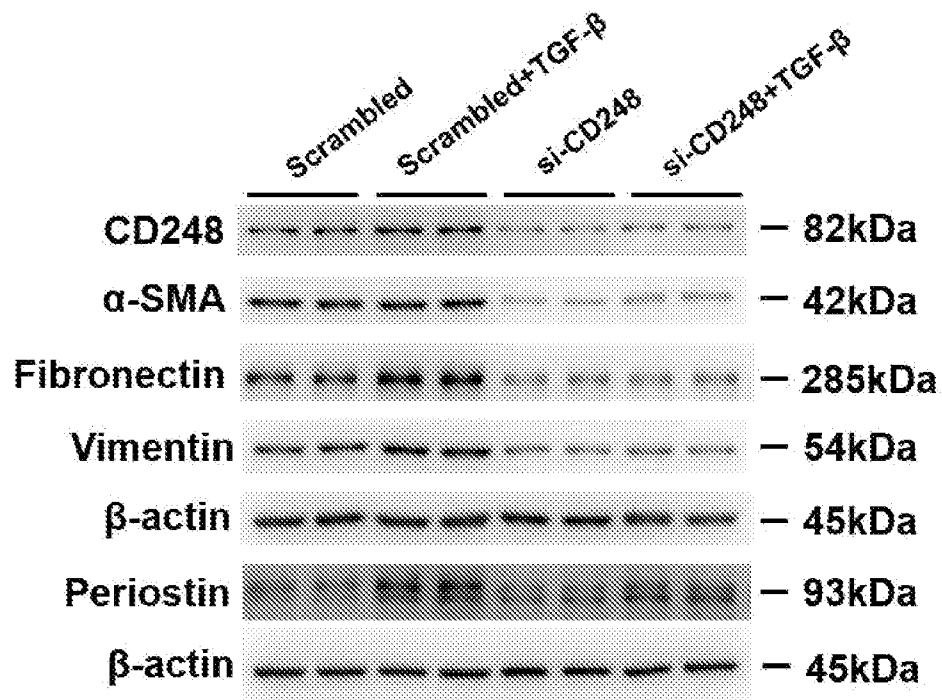


图 2

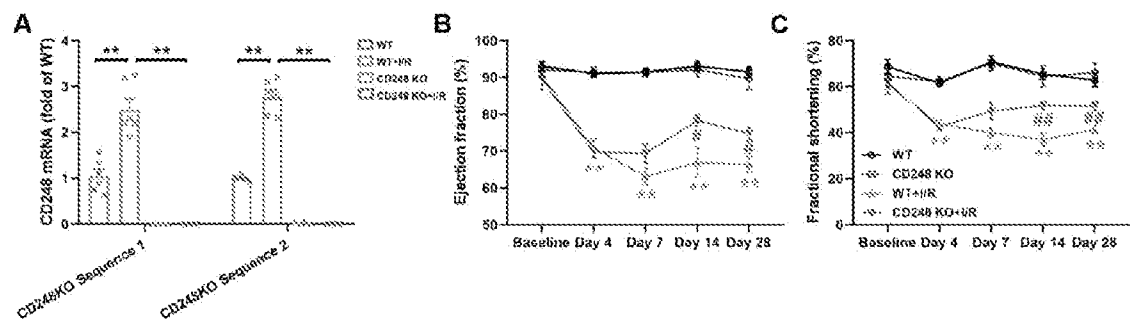


图 3

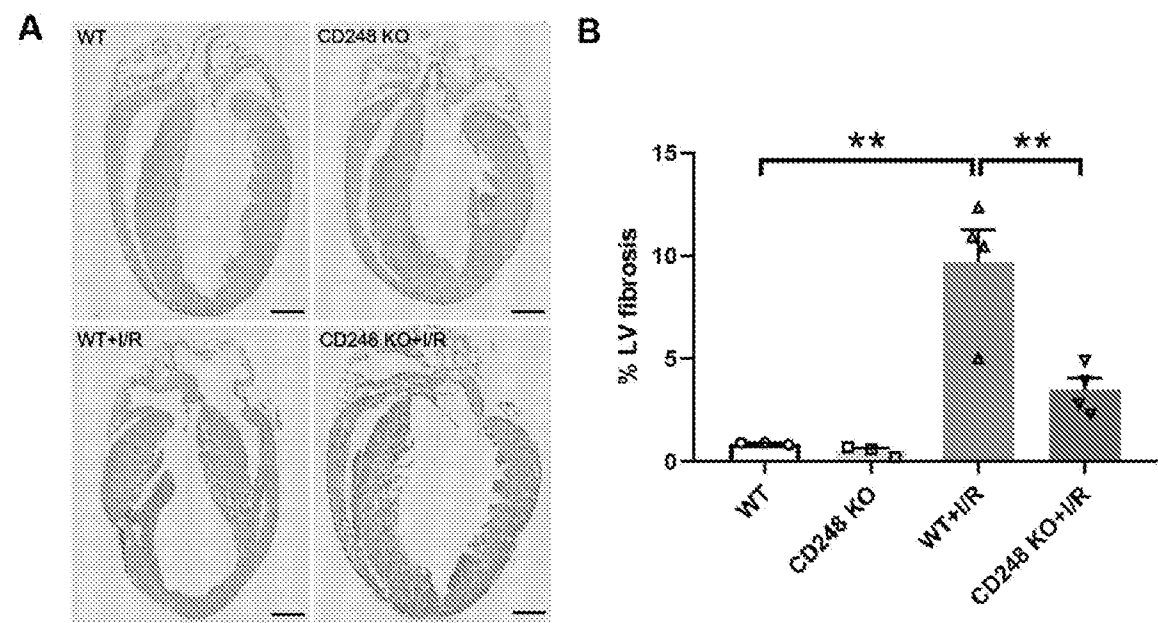


图 4

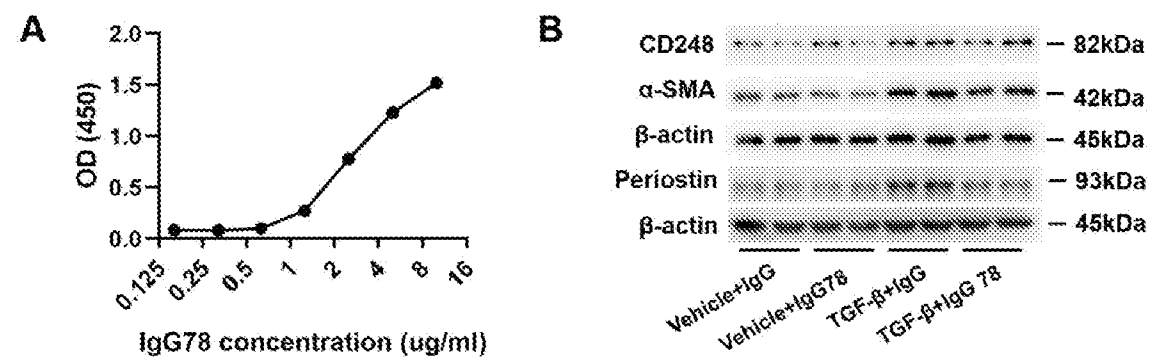


图 5

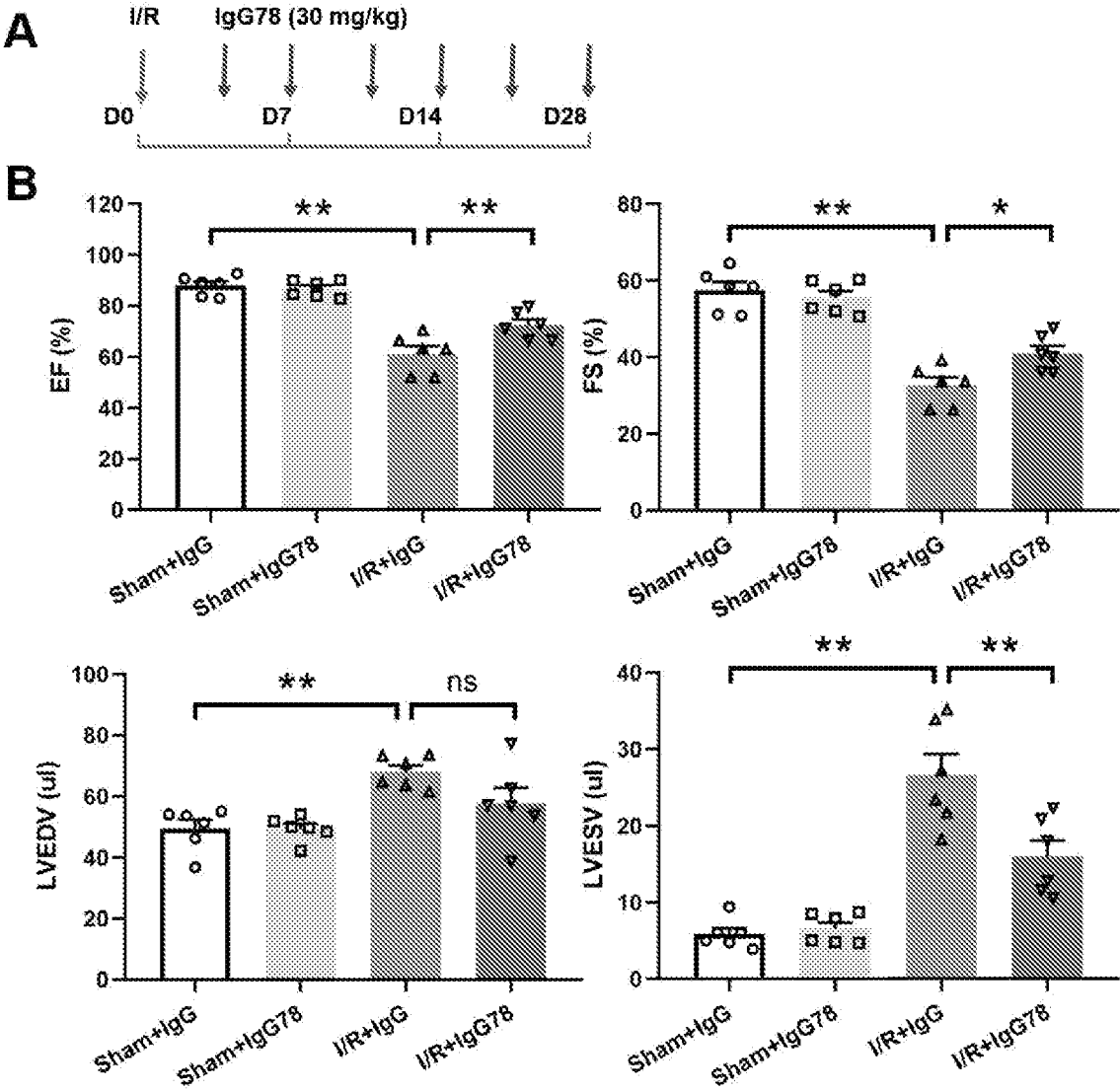
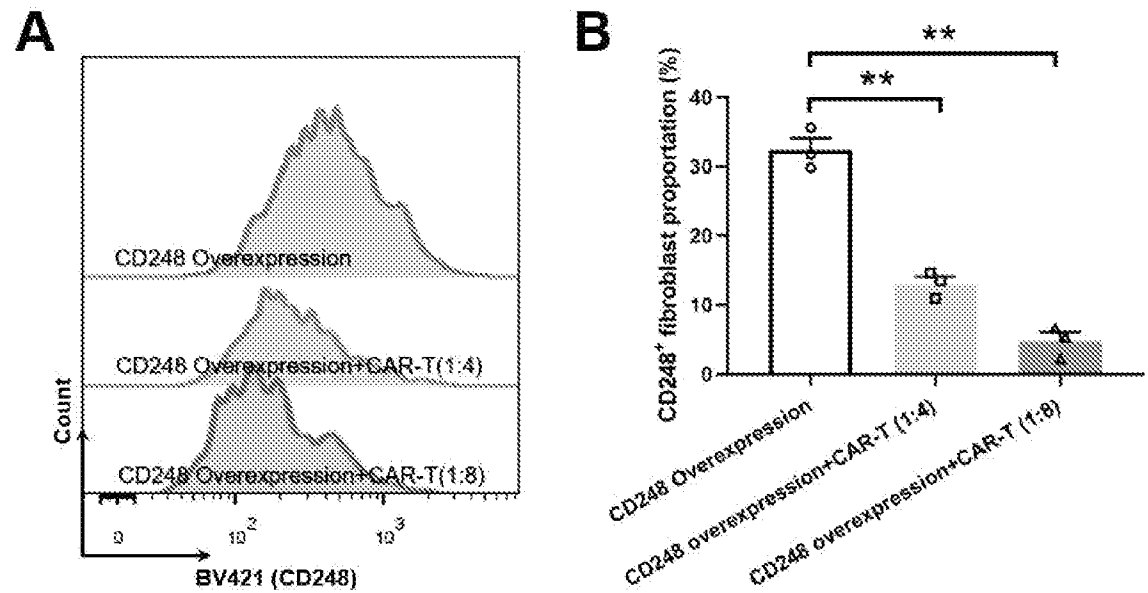
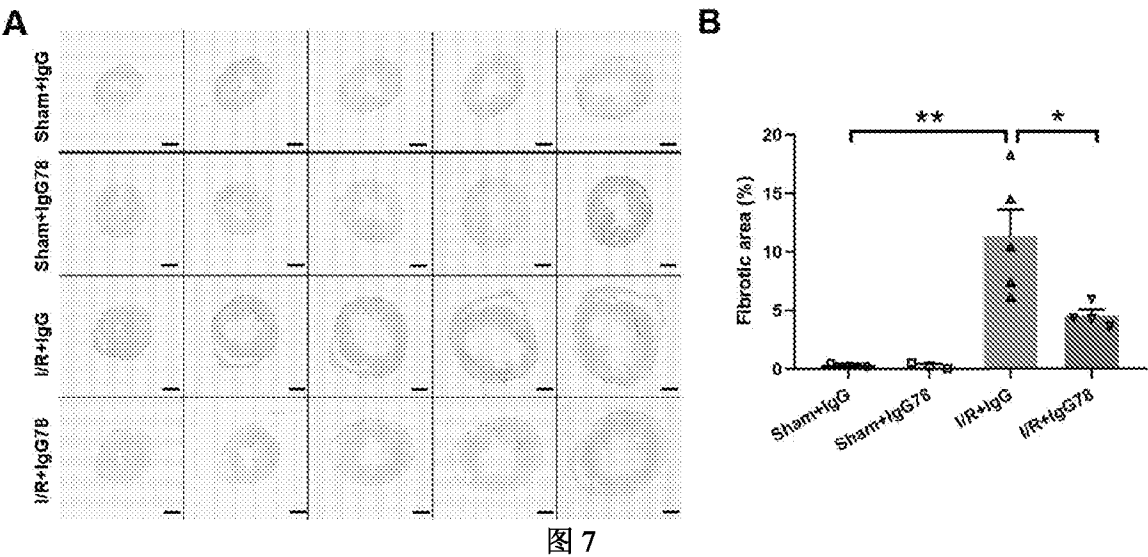


图 6



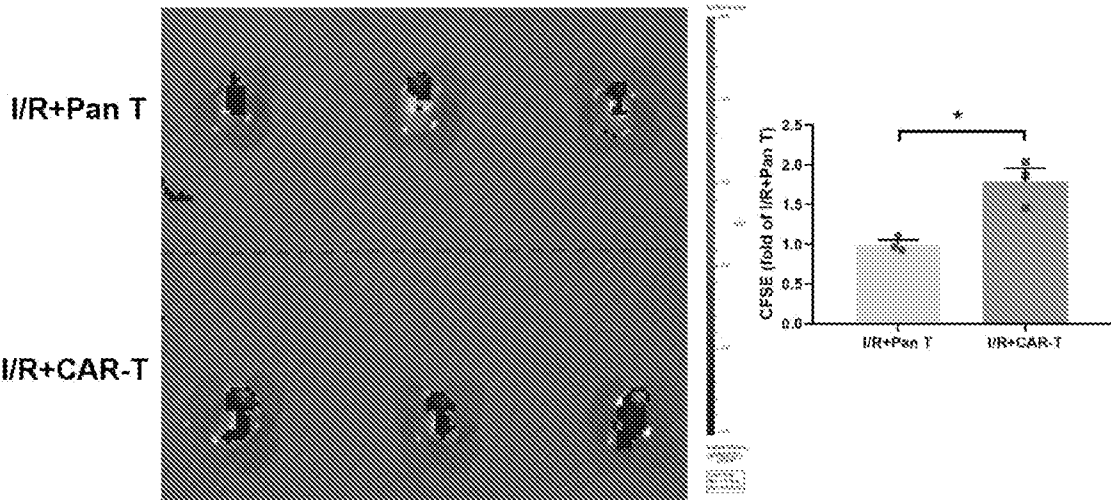


图 9

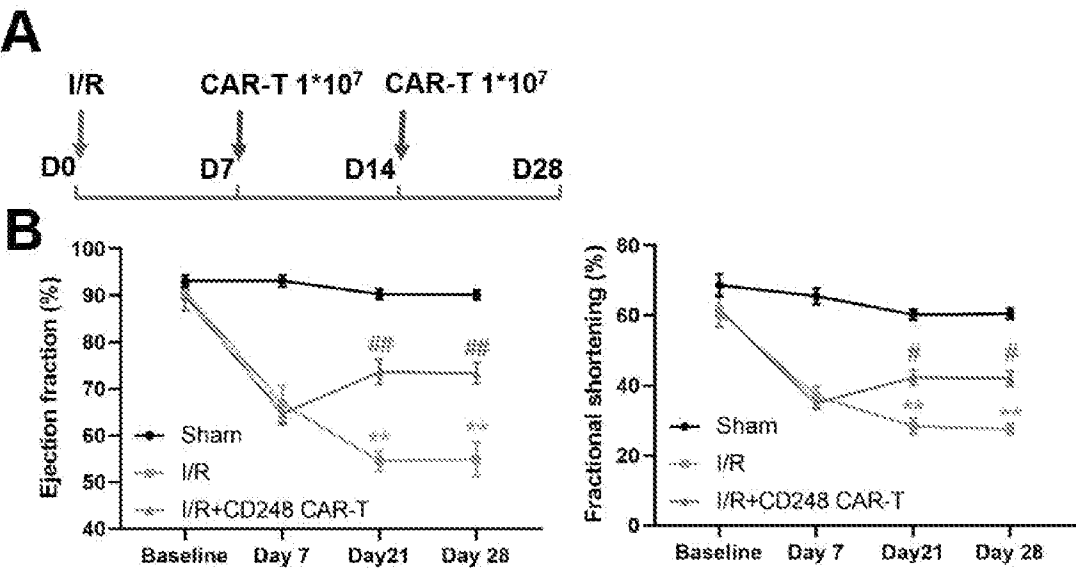


图 10

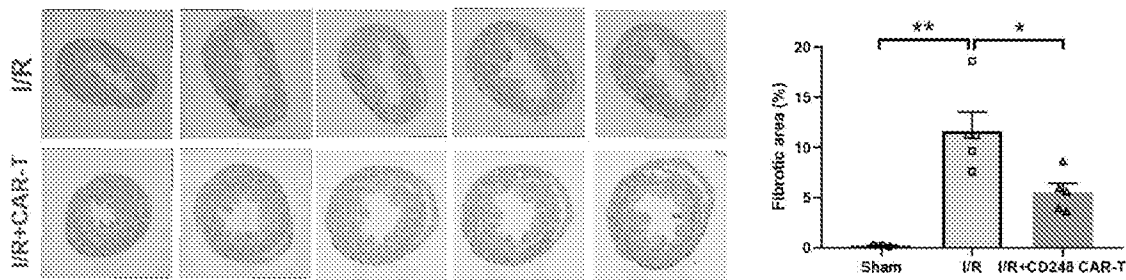


图 11

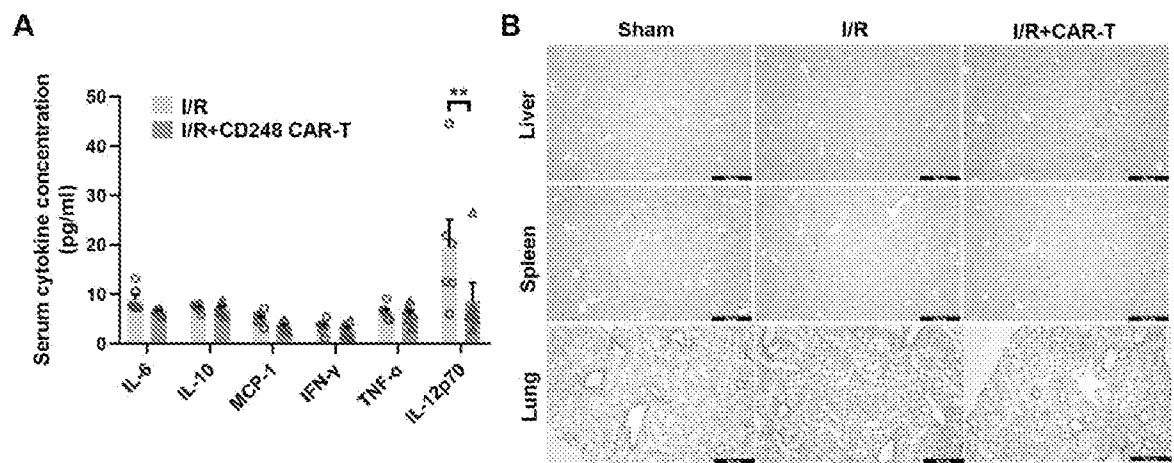


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/082680

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12Q G01N C12N C07K A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; WPABS; WPABSC; DWPI; VEN; ENTXT; ENTXTC; CNKI; CJFD; ISI Web of Science; GenBank; STNext; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 针对序列1-5检索, search conducted on sequences 1-5, CD248, 内皮唾液酸蛋白, 缺血, 心脏, 纤维化, 靶点, 抗体, tem-1, tem1, ischemic, heart, fibrosis, fibrotic, endosialin, target, antibody		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116790744 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 22 September 2023 (2023-09-22) claims 1-10	1-10
X	杨发 (YANG, Fa). "Endosialin在肿瘤微环境中的功能及以其为靶点的抗体的研究 (Non-official translation: Study on Endosialin's Function in Tumor Microenvironment and Antibody Targeting Endosialin)" 万方学位论文 (Wanfang Dissertations), 07 January 2022 (2022-01-07), abstract, page 56, paragraph 1-page 65, paragraph 5, and page 76, paragraph 1-page 82, paragraph 5	1, 3-5, 7-10
A	杨发 (YANG, Fa). "Endosialin在肿瘤微环境中的功能及以其为靶点的抗体的研究 (Non-official translation: Study on Endosialin's Function in Tumor Microenvironment and Antibody Targeting Endosialin)" 万方学位论文 (Wanfang Dissertations), 07 January 2022 (2022-01-07), abstract, and page 56, paragraph 1-page 65, paragraph 5, and page 76, paragraph 1-page 82, paragraph 5	2, 6
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 May 2024		Date of mailing of the international search report 01 June 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/082680

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	张玲玲 等 (ZHANG, Lingling et al.). "抗人肿瘤内皮标志物 1(TEM1) 抗体的表达及活性鉴定 (Non-official translation: Expression and Activity Identification of Anti-human Tumor Endothelial Marker 1(TEM1) Antibody)" <i>细胞与分子免疫学杂志 (Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology)</i> , Vol. 36, No. 12, 31 December 2020 (2020-12-31), abstract, and page 1129, left-hand column, paragraph 1-page 1132, right-hand column, paragraph 1	1, 3-5, 7-10
X	ZHAO, Aizhi et al. "Rapid isolation of high affinity human antibodies against the tumor vascular marker Endosialin/TEM1, using a paired yeast display/secretory scFv library platform" <i>Journal of Immunological Methods</i> , Vol. 363, No. 2, 05 January 2011 (2011-01-05), abstract, and page 3, paragraph 2-page 11, paragraph 1	1, 3-5, 7-10
A	CN 101918446 A (MORPHOTEK INC.) 15 December 2010 (2010-12-15) description, paragraphs [0015]-[0022]	1-10
A	CN 115894682 A (WUXI MAIDI KESI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 04 April 2023 (2023-04-04) description, paragraphs [0006]-[0017]	1-10
A	CN 115948344 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 11 April 2023 (2023-04-11) description, paragraphs [0009]-[0036]	1-10
A	KR 20160135885 A (CATHOLIC KWANDONG UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION et al.) 29 November 2016 (2016-11-29) claims 1-11	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/082680

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/082680

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116790744	A	22 September 2023	None			
CN	101918446	A	15 December 2010	RS	53362	B	31 October 2014
				BRPI	0809665	A2	04 December 2018
				BRPI	0809665	B1	23 March 2021
				BRPI	0809665	B8	25 May 2021
				EP	2620451	A1	31 July 2013
				EP	2620451	B1	14 September 2016
				CA	2682726	A1	16 October 2008
				CA	2682726	C	09 May 2017
				US	2011033455	A1	10 February 2011
				US	8895000	B2	25 November 2014
				HRP	20140266	T1	25 April 2014
				PL	2620451	T3	30 June 2017
				DK	2620451	T3	02 January 2017
				HUE	031269	T2	28 June 2017
				PL	2137217	T3	29 August 2014
				DK	2137217	T3	17 March 2014
				US	2015079104	A1	19 March 2015
				US	9505842	B2	29 November 2016
				PT	2137217	E	20 March 2014
				WO	2008124570	A1	16 October 2008
				WO	2008124570	A8	27 November 2008
				JP	2010523592	A	15 July 2010
				JP	5825784	B2	02 December 2015
				PT	2620451	T	20 December 2016
				US	2008248034	A1	09 October 2008
				US	7807382	B2	05 October 2010
				CY	1115370	T1	04 January 2017
				US	2017029509	A1	02 February 2017
				US	10053509	B2	21 August 2018
				AU	2008237296	A1	16 October 2008
				AU	2008237296	B2	04 July 2013
				LT	2620451	T	10 January 2017
				SI	2137217	T1	31 July 2014
				ES	2452929	T3	03 April 2014
				EP	2137217	A1	30 December 2009
				EP	2137217	B1	05 March 2014
				RS	55447	B1	28 April 2017
				SI	2620451	T1	31 January 2017
				JP	2013150618	A	08 August 2013
				CY	1118592	T1	12 July 2017
				ES	2606906	T3	28 March 2017
				HRP	20161715	T1	10 February 2017
				KR	20100016221	A	12 February 2010
				KR	101529334	B1	16 June 2015
				MX	2009010701	A	20 January 2010
CN	115894682	A	04 April 2023	None			
CN	115948344	A	11 April 2023	None			
KR	20160135885	A	29 November 2016	KR	101818560	B1	16 January 2018

A. 主题的分类

C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12Q G01N C12N C07K A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNTXT;WPABS;WPABSC;DWPI;VEN;ENTXT;ENTXTC;CNKI;CJFD;ISI Web of Science;GenBank;STNext;中国专利生物序列检索系统: 针对序列1-5检索, CD248, 内皮唾液酸蛋白, 缺血, 心脏, 纤维化, 靶点, 抗体, tem-1, tem1, ischemic, heart, fibrosis, fibrotic, endosialin, target, antibody

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
PX	CN 116790744 A (浙江大学) 2023年9月22日 (2023 - 09 - 22) 权利要求1-10	1-10
X	杨发. "Endosialin 在肿瘤微环境中的功能及以其为靶点的抗体的研究" 万方学位论文, 2022年1月7日 (2022 - 01 - 07), 摘要, 第56页第1段-第65页第5段, 第76页第1段-第82页第5段	1、3-5、7-10
A	杨发. "Endosialin 在肿瘤微环境中的功能及以其为靶点的抗体的研究" 万方学位论文, 2022年1月7日 (2022 - 01 - 07), 摘要, 第56页第1段-第65页第5段, 第76页第1段-第82页第5段	2、6
X	张玲玲 等. "抗人肿瘤内皮标志物 1(TEM1) 抗体的表达及活性鉴定" 细胞与分子免疫学杂志, 第36卷, 第12期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 摘要, 第1129页左栏第1段-第1132页右栏第1段	1、3-5、7-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年5月23日

国际检索报告邮寄日期

2024年6月1日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

单珊

电话号码 (+86) 0512-88996446

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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	Aizhi Zhao 等. "Rapid isolation of high affinity human antibodies against the tumor vascular marker Endosialin/TEM1, using a paired yeast display/secretory scFv library platform" J Immunol Methods, 第363卷, 第2期, 2011年1月5日 (2011 - 01 - 05), 摘要, 第3页第2段-第11页第1段	1、3-5、7-10
A	CN 101918446 A (诺福泰克公司) 2010年12月15日 (2010 - 12 - 15) 说明书第[0015]-[0022]段	1-10
A	CN 115894682 A (无锡麦迪科思生物科技有限公司) 2023年4月4日 (2023 - 04 - 04) 说明书第[0006]-[0017]段	1-10
A	CN 115948344 A (上海交通大学) 2023年4月11日 (2023 - 04 - 11) 说明书第[0009]-[0036]段	1-10
A	KR 20160135885 A (CATHOLIC KWANDONG UNIV IND FOUND 等) 2016年11月29 日 (2016 - 11 - 29) 权利要求1-11	1-10

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/082680

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	116790744	A	2023年9月22日	无			
CN	101918446	A	2010年12月15日	RS	53362	B	2014年10月31日
				BR-	0809665	A2	2018年12月4日
				PI			
				BR-	0809665	B1	2021年3月23日
				PI			
				BR-	0809665	B8	2021年5月25日
				PI			
				EP	2620451	A1	2013年7月31日
				EP	2620451	B1	2016年9月14日
				CA	2682726	A1	2008年10月16日
				CA	2682726	C	2017年5月9日
				US	2011033455	A1	2011年2月10日
				US	8895000	B2	2014年11月25日
				HRP	20140266	T1	2014年4月25日
				PL	2620451	T3	2017年6月30日
				DK	2620451	T3	2017年1月2日
				HUE	031269	T2	2017年6月28日
				PL	2137217	T3	2014年8月29日
				DK	2137217	T3	2014年3月17日
				US	2015079104	A1	2015年3月19日
				US	9505842	B2	2016年11月29日
				PT	2137217	E	2014年3月20日
				WO	2008124570	A1	2008年10月16日
				WO	2008124570	A8	2008年11月27日
				JP	2010523592	A	2010年7月15日
				JP	5825784	B2	2015年12月2日
				PT	2620451	T	2016年12月20日
				US	2008248034	A1	2008年10月9日
				US	7807382	B2	2010年10月5日
				CY	1115370	T1	2017年1月4日
				US	2017029509	A1	2017年2月2日
				US	10053509	B2	2018年8月21日
				AU	2008237296	A1	2008年10月16日
				AU	2008237296	B2	2013年7月4日
				LT	2620451	T	2017年1月10日
				SI	2137217	T1	2014年7月31日
				ES	2452929	T3	2014年4月3日
				EP	2137217	A1	2009年12月30日
				EP	2137217	B1	2014年3月5日
				RS	55447	B1	2017年4月28日
				SI	2620451	T1	2017年1月31日
				JP	2013150618	A	2013年8月8日
				CY	1118592	T1	2017年7月12日
				ES	2606906	T3	2017年3月28日
				HRP	20161715	T1	2017年2月10日
				KR	20100016221	A	2010年2月12日
				KR	101529334	B1	2015年6月16日
				MX	2009010701	A	2010年1月20日
CN	115894682	A	2023年4月4日	无			

国际申请号
PCT/CN2024/082680

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	115948344	A	2023年4月11日	无	
KR	20160135885	A	2016年11月29日	KR	101818560 B1
					2018年1月16日