

(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
2022 年 8 月 11 日 (11.08.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/166802 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 5/20 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, 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, 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)。

(21) 国际申请号:

PCT/CN2022/074522

(22) 国际申请日:

2022 年 1 月 28 日 (28.01.2022)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

202110156939.7 2021年2月4日 (04.02.2021) CN

(71) 申请人: 上海交通大学 (SHANGHAI JIAO TONG
UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市闵行区东
川路800号, Shanghai 200240 (CN)。

(72) 发明人: 路慧丽 (LU, Huili); 中国上海市闵行区东
川路800号, Shanghai 200240 (CN)。 杨慧 (YANG,
Hui); 中国上海市闵行区东川路800号, Shanghai
200240 (CN)。 王紫嫣 (WANG, Ziyang); 中国上海
市闵行区东川路800号, Shanghai 200240 (CN)。
朱建伟 (ZHU, Jianwei); 中国上海市闵行区东
川路800号, Shanghai 200240 (CN)。

(74) 代理人: 上海光华专利事务所 (普通
合伙) (J.Z.M.C. PATENT AND TRADEMARK LAW
OFFICE); 中国上海市杨浦区国定路335号5022
室余明伟, Shanghai 200433 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于
生物材料保藏的说明 (细则13之二. 4(d) (i) 和
48. 2(a) (viii))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5. 2(a))。

(54) Title: ANTI-HUMAN CD271 MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 发明名称: 抗人CD271的单克隆抗体及用途

(57) Abstract: Provided are a hybridoma cell line CD271T-2 that secretes anti-human CD271 monoclonal antibody and an anti-human CD271 monoclonal antibody secreted by same, and the hybridoma cell line having an accession number of CGMCC 21494. Also provided is an anti-human CD271 engineered antibody having LCDRs 1-3 and HCDRs 1-3 as shown in SEQ ID NOs. 1-6, respectively. Also provided is a use of the cell line or antibody.

(57) 摘要: 提供了一种分泌抗人CD271单克隆抗体的杂交瘤细胞株CD271T-2以及由该杂交瘤细胞株分泌的抗人CD271单克隆抗体, 该杂交瘤细胞株的保藏号为CGMCC 21494。还提供了具有分别如SEQ ID NOs.1-6所示的LCDR1-3和HCDR1-3的抗人CD271工程抗体。还提供了该细胞株或抗体的用途。



WO 2022/166802 A1

抗人 CD271 的单克隆抗体及用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种抗人 CD271 的单克隆抗体及用途。

背景技术

CD271 是一种低亲和力的神经生长因子受体(LNGFR)，属于肿瘤坏死因子受体超家族成员，相对分子质量为 75 kD，又称为 p75NTR，它包含 3 个区域：富含半胱氨酸的膜外区、跨膜区和 155 个氨基酸残基组成的胞内区。CD271 不仅表达在神经系统，与神经细胞的发育、分化和存活密切相关，也是富集间充质干细胞比较合适的标志分子，与传统分选方法相比，具有特异性高、纯度高、集落形成能力强等优点。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是一类具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞，在再生医学研究中具有广泛的应用前景。间充质干细胞进行的临床试验主要包括组织损伤修复，如骨、软骨、关节损伤的修复，心脏、肝脏、脊髓损伤和神经系统疾病的治疗。但 MSC 用于靶向组织修复一直受到干细胞在受损部位定植、增殖的限制。因此，在组织损伤部位或者神经系统疾病相关的治疗中，清除或富集移植物中特定的细胞成为当前移植领域中最为关键的问题。CD271、CD105、CD133 等作为间充质干细胞的表面标记物，可以有效分离或者富集间充质干细胞，在体内或体外特定的诱导条件下，可分化为软骨、肌肉、肌腱等，达到组织修复的目的。另一方面，CD271 也是多种肿瘤干细胞 (CSC) 的标志物之一。CD271 作为 MSC 和 CSC 的表面标记分子，相对于 CD44、CD105 等分子具有对干细胞更好的特异性，其单克隆抗体不但可用于 MSC 的筛选和鉴定，也能用于抗肿瘤研究，具有重要的研究和应用价值。但目前仍缺乏对间充质干细胞及肿瘤干细胞等具有广泛的识别能力的抗 CD271 单克隆抗体。

发明内容

鉴于以上所述现有技术的缺点，本发明的目的在于提供一种抗人 CD271 的单克隆抗体及用途。

天然 CD271 的胞外结构包括 4 个富含半胱氨酸的 CRD 结构 (CRD1-4) 以及一个连接区域 (stalk 区)。在 CD271 表达后，CRD 区域会被蛋白酶水解从而脱落，因此靶向 CRD 区的抗体与 CD271 阳性细胞的结合会受到影响，甚至在细胞代谢的某个阶段无法

检测到 CD271 的表达。而靠近细胞膜的 stalk 区无糖基化、磷酸化修饰或高级空间结构，结构稳定，识别此区域的抗体理论上具有较好的通用性。因此，为了获得能够稳定识别人 CD271 的单克隆抗体，我们选取 stalk 区作为靶点开发新型的抗 CD271 单克隆抗体，为该领域研究提供新的工具。

为了实现上述目的以及其他相关目的，本发明采用如下技术方案：

本发明第一方面提供一种抗分泌抗人 CD271 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 CD271T-2，所述杂交瘤细胞株的保藏号为 CGMCC 21494。保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。保藏日期为 2021 年 1 月 25 日。分类命名为杂交瘤细胞株 CD271T-2。

本发明第二方面提供一种抗人 CD271 单克隆抗体，抗人 CD271 单克隆抗体由 CD271T-2 杂交瘤细胞株分泌。

所述的抗人 CD271 单克隆抗体与人间充质干细胞有很好的结合亲和力。

可选的，所述抗体是鼠源性单克隆抗体，属于 IgM 亚型。

本发明第三方面提供一种抗人 CD271 的工程抗体，所述抗人 CD271 的工程抗体包括轻链和重链，所述轻链包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；所述重链包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

具体的，轻链互补决定区 LCDR1，长度：10 aa，氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，具体为：QSVDYDGDSY。

轻链互补决定区 LCDR2，长度：3 aa，氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，具体为：AAS。

轻链互补决定区 LCDR3，长度：9 aa，氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，具体为：QQSNEDPFT。

重链互补决定区 HCDR1，长度：10 aa，氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示，具体为：GFSLSTSGMG。

重链互补决定区 HCDR2，长度：7 aa，氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，具体为：IWWDDDK。

重链互补决定区 HCDR3，长度：13 aa，氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示，具体为：ARRDYGNYYAMDY。

进一步的,所述抗人 CD271 的工程抗体的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示;或为对 SEQ ID NO.7 进行一定的取代、添加和/或缺失一个或几个氨基酸获得具有同等功能的氨基酸序列。重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示,或为对 SEQ ID NO.8 进行一定的取代、添加和/或缺失一个或几个氨基酸获得具有同等功能的氨基酸序列。

具体的, SEQ ID NO.7 所示序列,具体为:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASN
LESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPFTFGSGTKLEIK。

SEQ ID NO.8 所示序列,具体为:

QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDD
DKYYNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTAGTATYYCARRDYGNYYAMDYWGQGTS
VTVS。

可选的,所述工程抗体可以为单克隆抗体。

可选的,所述单克隆抗体是鼠源性的。

一种实施方式中,所述单克隆抗体亚类为 IgM。

可选的,所述抗体由 CD271T-2 杂交瘤细胞株经反转录-聚合酶链式合成反应制备产生。

本发明第四方面提供一种多核苷酸,编码前述的抗人 CD271 抗体的重链可变区和/或轻链可变区或全长氨基酸。

编码前述的抗人 CD271 抗体的重链可变区和/或轻链可变区如 SEQ ID NO.9- SEQ ID NO.14 所示。

具体的,轻链互补决定区 LCDR1, DNA, 长度: 30 bp, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示,具体为: CAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTAT。

轻链互补决定区 LCDR2, DNA, 长度: 9bp, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示,具体为: GCTGCATCC。

轻链互补决定区 LCDR3, DNA, 长度: 27 bp, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示,具体为: CAGCAAAGTAATGAGGATCCATTCACG。

重链互补决定区 HCDR1, DNA, 长度: 30 bp, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示,具体为: GGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGT。

重链互补决定区 HCDR2, DNA, 长度: 21bp, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示, 具体为: ATTTGGTGGGATGATGATAAG。

重链互补决定区 HCDR3, DNA, 长度: 39bp, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.14 所示, 具体为: GCTCGAAGGGACTATGGTAACTACTATGCTATGGACTAC。

进一步的, 编码前述抗人 CD271 抗体的轻链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO.15 所示, 编码前述的抗人 CD271 抗体的重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO.16 所示。

具体的, SEQ ID NO.15 所示序列:

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGG
CCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAAC
TGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATC
TAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCT
CAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAAT
GAGGATCCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA。

SEQ ID NO.16 所示序列:

CAAGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGAAGCCCTCACAGACCCTC
AGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTG
GATTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGAT
GATAAGTACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCAGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAG
AAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACTTACTAC
TGTGCTCGAAGGGACTATGGTAACTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT
CAGTCACCGTCTCCTCAG。

本发明第五方面提供一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码前述的抗 CD271 抗体的 Fab 段的轻链可变区和重链可变区的重组序列, 能够获得分子量更小的单链抗体。

本发明第五方面提供一种构建体, 含有前述的多核苷酸。

所述构建体可以由所述分离的多核苷酸插入到表达载体的多克隆位点构建而成。

本发明中的表达载体通常指本领域熟知的各种市售表达载体, 例如可以是细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。具体可采用的表达载体包括但不限于: pET 系列表达载体、pGEX 系列表达载体、pcDNA 系列表达载体等。

本发明的宿主细胞, 所述宿主细胞含有前述的构建体或基因组中整合有外源的前述的

多核苷酸。任何适用于表达载体进行表达的细胞都可以作为宿主细胞，例如，所述宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞等；或是低等真核细胞，如酵母细胞等；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞等。具体的，可以为例如，酵母、昆虫、植物等的细胞。优选的，所述宿主细胞为真核细胞，可采用不会产生抗体的哺乳动物宿主细胞系，具体可采用的细胞系包括但不限于：中国仓鼠的卵巢细胞(CHO)、幼仓鼠的肾脏细胞(BHK, ATCC CCL 10)、幼鼠的塞尔托利细胞(Sertoli cells)、猴的肾脏细胞(COS 细胞)、通过 SV40 (COS-7, ATCC CRL 165 1) 转化的猴的肾脏 CVI 细胞、人的胚肾细胞(HEK-293)、猴肾脏细胞(CVI, ATCC CCL-70)、非洲绿猴的肾脏细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)、人的子宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL-2) 等。

合适的表达所述抗体的条件对于本领域技术人员来说应该是已知的，本领域技术人员可根据经验选择适用的培养基，在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

本发明第六方面提供一种宿主细胞，所述宿主细胞含有前述的构建体或基因组中整合有外源的前述的多核苷酸。

本发明第七方面提供前述的细胞株，或前述的抗人 CD271 单克隆抗体，或前述的抗人 CD271 的工程抗体，或前述的多核苷酸，或前述的构建体，或前述的抗体的宿主细胞的用途，选自以下任一种：

- a) 表达 CD271 的细胞，所述细胞包括但不限于间充质干细胞、肿瘤干细胞、神经系统细胞，其体外的检测、鉴定、分离、富集、靶向；
- b) 介导间充质干细胞靶向修复组织；
- c) 干细胞、肿瘤干细胞、神经系统细胞的检测及示踪；
- d) 制备神经系统靶向药物；
- e) 制备肿瘤治疗药物；
- f) 与其他化学小分子、生物大分子、放射性分子、纳米材料等偶联，用于上述 a)-e)

的各类用途。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

本发明的由杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体具有效价高、特异性好、与天然抗原亲和力强的优势。抗人CD271的工程抗体由CD271T-2杂交瘤经反转录-聚合酶链式合成反应制备产生，该抗体能特异性结合人CD271分子，在体外对于人间充质干细胞有一定的亲和力。CD271在间充质干细胞、肿瘤干细胞和神经系统相关疾病细胞表面均有表达，是介导间充质干细胞或者靶向神经系统相关细胞及肿瘤的潜在靶点。因此抗人CD271单克隆抗体是一种具有巨大潜力的医疗用抗体。

本发明的抗人 CD271 抗体具有高特异性和亲和力，可以将其与磁性纳米材料偶联，制备免疫磁珠来分选间充质干细胞，也可将其与其他靶点联用设计双特异性抗体，或其他化学分子、放射性分子、多肽或蛋白、纳米材料等联合使用，用于某些组织修复疾病及神经系统或者肿瘤相关疾病的治疗。

本发明菌株保藏信息如下：

细胞株名称：杂交瘤细胞株 CD271T-2；

保藏号为：CGMCC 21494；

保藏日期：2021 年 1 月 25 日；

保藏单位名称：中国普通微生物菌种保藏管理中心；

保藏单位简称：CGMCC；

保藏单位地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

附图说明

图 1 是 ELISA 检测抗人 CD271 免疫后小鼠血清效价检测图：包被抗原为全长 CD271 蛋白抗原，抗原浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ ，上样血清从 1:2000 稀释到 1:256000 稀释，1 号、2 号、3 号、4 号、5 号小鼠血清效价都在 1:128000 以上，5 只小鼠对抗原的反应性都较高；

图 2 是小鼠 CD271T-2 腹水纯化抗体 SDS-PAGE 检测图：在非还原情况下，腹水抗体条带较为单一，还原情况下，在 26 kDa 和 53 kDa 处分别是抗体的轻链和重链；

图 3 是小鼠腹水纯化抗体 ELISA 鉴定：包被抗原为全长 CD271 蛋白抗原，抗原浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，每孔 100 μL ，上样抗体浓度梯度为 0.625 $\mu\text{g/mL}$ 、1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ ，每孔 100 μL ，结果表明 CD271T-2 抗体能够识别结合人 CD271 抗原；

图 4 是 ForteBio 验证纯化后抗体亲和力图谱；

图 5 是本发明所述抗人 CD271 抗体的重轻链可变区基因克隆 PCR 结果：图 5A 为 CD271T-2 杂交瘤的抗体重轻链可变区的基因克隆 PCR 结果，图 5B 为 CD271T-2 杂交瘤的抗体重轻链可变区嵌合 ScFv 基因克隆 PCR 结果；

图 6 是抗人 CD271 单克隆抗体检测间充质干细胞表面 CD271 的表达情况：图 6A 为来源于 Biolegend 的 APC Goat anti human CD271 的阳性对照抗体，免疫来自黑色素瘤细胞，其细胞表面高表达 CD271 分子，此抗体与阴性对照相比有略微迁移；图 6B 为来源于 Abcam 的 Rabbit anti human CD271 阴性对照抗体，免疫来自人 CD271 细胞膜内 350-450 氨基酸区域，与阳性对照相比，无任何偏移；图 6C 为 CD271T-2 腹水纯化抗体，与阳性和阴性对照相比，其偏移程度较高，说明制备的抗人 CD271 单克隆抗体具有非常高的亲和力和特异性，且从阳性细胞比例上优于市售的 APC mouse anti human CD271 对照抗体。

具体实施方式

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。从一般意义上，重链可以理解为抗体中分子量较大的多肽链，轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分为 κ 和 λ 轻链。重链通常可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿

主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987 and 1991)),或 Chothia&Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901-917; Chothia 等人(1989)Nature 342:878-883 的定义。特别地,重链还可以包含 3 个以上 CDR,例如 6、9、或 12 个。例如在本发明的双功能抗体中,重链可以是 IgG 抗体的重链的 C 端连接另一个抗体的 ScFv,这种情况下重链含有 9 个 CDR。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,特别地,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型),IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

为了使本发明的发明目的、技术方案和有益技术效果更加清晰,以下结合实施例对本发明进一步详细说明,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容容易地了解本申请发明的其他优点及功效。

在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或者按照各制造商所建议的条件。

当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。

本发明所用的“CD271-T2”当跟杂交瘤细胞株一起使用时表示细胞株;当单独使用或者跟单克隆抗体、抗体等一起时表示为本发明所述的单克隆抗体或工程抗体。

【实施例 1】抗人 CD271 杂交瘤细胞株及单克隆抗体的制备

1. 小鼠免疫

免疫抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO.17 所示，具体为：

EEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGT
TDN。

1)初免抗原制备：取 1 mL 无菌 EP 管，将免疫原 100 μ g 用 PBS 稀释至 100 μ L 放于 EP 管中；充分摇匀弗氏完全佐剂，使沉淀的双歧杆菌均匀混合；取 100 μ L 弗氏完全佐剂加入 5 mL 的无菌 EP 管，再加入稀释好的免疫原，使抗原的体积与佐剂的体积比为 1: 1，将离心管置于冰盒中；准备好超声破碎仪，将离心管置于冰盒中超声。超声条件是总功率 200 W，总时间 10 min，工作时间 5 秒，间隔时间 6 秒。实时观察溶液乳化的情况；用 1 毫升一次性注射器吸入乳化好的抗原，置于冰盒中备用。

2) 二免、三免抗原制备：取 1 mL 无菌 EP 管，将免疫原 100 μ g 用 PBS 稀释至 100 μ L 放于 EP 管中；充分摇匀弗氏不完全佐剂，使沉淀的双歧杆菌均匀混合；取 100 μ L 弗氏不完全佐剂加入 5 mL 的无菌 EP 管，再加入稀释好的免疫原，使抗原的体积与佐剂的体积比为 1: 1，将离心管置于冰盒中；准备好超声破碎仪，将离心管置于冰盒中超声。超声条件是总功率 200 W，总时间 10 min，工作时间 5 s，间隔时间 6 s。实时观察溶液乳化的情况；用 1 毫升一次性注射器吸入乳化好的抗原，置于冰盒中备用。

3) 加强免疫抗原制备：取 1 mL 无菌 EP 管，将免疫原 200 μ g 用 PBS 稀释至 400 μ L，用 1 毫升一次性注射器吸入，置于冰盒备用。

4) 小鼠免疫方法

用 1 毫升注射器吸入免疫抗原，分 2-3 点，每点 0.1 mL 左右，给小鼠进行背部（或腹部）皮下注射；三免后第三天采血进行抗体滴度 ELISA 检测，具体结果见图 1，滴度达到 1:100000 时即可加强免疫。

2. 饲养细胞的准备

饲养细胞可促进单个或少数分散细胞的生长繁殖。

1) 准备好灭菌的手术器具和玻璃平皿，96 孔板，5 mL 一次性注射器，300 mL 70%的酒精，Balb/c 小鼠若干，无血清 DMEM 培养液，灭菌的 PBS。

2) 拉颈处死 Balb/c 小鼠，浸入 70%酒精 10 min。

3) 拿出小鼠沥去多余的酒精，置于灭菌的玻璃平皿上。

4) 剪开并分离小鼠腹部的皮肤（勿剪破肌肉层）。用 5 mL 注射器吸取 5 mL DMEM 无

血清培养液，注入小鼠腹部，轻轻按摩并摇动小鼠身体，使巨噬细胞充分混入培养液。用注射器小心吸回培养液，放入 15 mL 离心管。

5) 按上述方法重复 1-2 次，以尽量多的获得巨噬细胞。

6) 1500 rpm，离心 10 min，弃上清。用培养液悬浮，1 只成年 Balb/c 小鼠可取约 10^6 个腹腔细胞，可铺 3-4 块 96 孔板。

3.PEG 介导大鼠脾脏 B 细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合

- 1) 细胞：Sp2/0-Ag14，培养基：DMEM+10%FBS，融合前 48 小时传代，密度视 48 小时后覆盖瓶底 80%左右为宜。
- 2) 小鼠剪尾拉颈处死 Balb/c 小鼠，浸入 70%酒精 10 min。
- 3) 剪开左侧上腹部直至小鼠左背部，分离出脾脏，除去脾脏上的结缔组织，放入干净平皿中，加少量 DMEM 基础培养基（无血清）。
- 4) 将小鼠脾脏剪成 4-5 小段，用 5 mL 注射器内塞顶部研磨，边磨边加入少量 DMEM，将磨出的脾脏细胞冲入平皿。
- 5) 将平皿中的细胞全部移入 15 mL 离心管，加入适量的 DMEM 基础培养基，混匀离心，200 g，5 min。
- 6) 用 PBS 洗涤二遍，离心，200 g，5 min。
- 7) 收集所有的 Sp2/0-Ag14 细胞，并用 PBS 洗涤一遍待用并计数。
- 8) 将 10^8 个脾脏细胞和 10^7 个骨髓瘤细胞混合在 50 mL 离心管中（骨髓瘤细胞数可视收获细胞再提高），加入 30-40 mL 无血清的 DMEM，充分混匀，1500 rpm 离心 3 min，去上清。
- 9) 轻敲离心管的底部，使沉淀物充分打散。
- 10) 将细胞放入 37 °C 水浴，按下列方法缓慢滴入 PEG。
- 11) 用滴管沿管壁缓慢滴入 1 mL PEG 溶液，持续时间 1 min，边加边轻轻振荡，100 g，离心 2 min；
- 12) 用同样的方法滴入 4.5 mL DMEM 基础培养基（预热、无血清），持续时间 3 min，边加边轻轻振荡；
- 13) 用同样的方法滴入 5 mL DMEM 基础培养基（预热、无血清），持续时间 2 min，加完后轻轻振荡 30 s；
- 14) 慢慢加入 45 mL DMEM 基础培养基（预热、无血清），
- 15) 100 g 离心 5 min，去上清，轻敲底部。

- 16) 加入含 HAT 的 DMEM 完全培养基 (含 20% FBS), 轻轻重悬, 用台盼蓝进行细胞计数, 100 μ L/孔, 种入 5 块 96 孔板。
- 17) 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养, 培养期间不要晃动培养板。
- 18) 融合后 11-13 天进行 ELISA 鉴定, 并根据细胞生长情况进行测定, 在测定之前的 2-3 天内不要换液, 使上清中抗体的量充分蓄积。

4.有限稀释筛选单克隆

- 1) 取出抗体阳性孔细胞, 用 HT 培养液制成细胞悬液。并取样进行台盼兰染色, 计数。
- 2) 取 320 个细胞分散在 6.4 mL 的 HT 培养液中, 充分混匀后用排枪加入 96 孔板的第 1-4 列, 每孔 100 μ L, 使每孔 5 个细胞; 剩下的细胞液再加入 3.2 mL 的 HT 培养液, 充分混匀后, 100 μ L 每孔加入 5-8 列, 使每孔 2.5 个细胞; 取剩下的细胞液 1 mL, 再加入 2 mL 培养液, 充分混匀后, 100 μ L 每孔加入 9-12 列, 使每孔 0.625 个细胞。
- 3) 将 96 孔板放入 CO₂ 培养箱, 37 $^{\circ}$ C 培养。
- 4) 第五天, 显微镜下观察细胞的生长情况, 记录细胞生长的孔。
- 5) 克隆大量繁殖后, 布满孔底的 1/3~1/2 时, 测培养液抗体。
- 6) 在每孔 0.625 细胞的孔中选取 Elisa 阳性最高、生长状态良好的孔中的细胞, 做下一轮有限稀释; 同时选取相同情况的另一孔转移到含有饲养细胞的 24 孔板中的一孔扩增后冻存。
- 7) 三轮有限稀释后将经过筛选并符合建株条件的细胞扩增培养冻存。

5.杂交瘤细胞产生小鼠腹水的制备方法

- 1) 细胞注射 7-10 天之前, 每只裸鼠腹腔注射 0.5 mL 高压灭菌的降植烷 (石蜡油)。
- 2) 复苏建株细胞株培养传代, 上清测 ELISA, 确定为阳性时, 离心收集细胞, 台盼蓝染色技术; 按每只 Balb/c 5×10^5 个细胞, 重悬在 0.2 mL PBS 中。
- 3) 腹腔注射 8 周雌性 Balb/c 小鼠。
- 4) 1-2 星期左右, 腹水开始出现。当动物的体型像怀孕的雌鼠时, 可开始抽取腹水。用 5 mL 注射器从腹腔的外周抽取腹水, 每只约 2-3 mL 左右。
- 5) 将腹水 3000 rpm (1500 g) 离心 10 分钟, 上清分装后-70 $^{\circ}$ C 保存。
- 6) 保持裸鼠健康的情况下, 可根据腹水产生的情况, 间隔 1-3 天反复抽取。

【实施例 2】小鼠腹水纯化鉴定及 ForteBio 验证纯化抗体亲和力

1. 小鼠腹水 Mab Select Sure™ 纯化

- 1) 小鼠腹水在采集后立刻离心，上清冻存于-80℃。纯化前室温或 4 度解冻，离心取上清，加入 1/10 体积 1 M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0 调 pH 值，0.22 μm 过滤即为待上柱样品，取样 S；
- 2) 柱子用 10 CV 的 1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0 平衡；
- 3) 上样，收集所有流穿，取样 FL；
- 4) Mab Select Sure™ 用 10 CV 的 100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0 洗涤；
- 5) Mab Select Sure™ 用 10 CV 的 10 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl, pH 8.0 洗涤；
- 6) 收集管中预先加入 0.1 CV 的 1 M Tris-HCl pH 9.0，洗脱时每次加入 0.5 CV 的 100 mM NaCl/HCl pH3.0，并立即混合；洗脱 Elute 1, 2, 3...管，分半取样制备样品。

2. 纯化抗体 SDS-PAGE 及 ELISA 鉴定

1) SDS-PAGE 鉴定

对纯化得到的腹水抗体 CD271T-2 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析，具体结果见图 2。

2) ELISA 鉴定

收集所有收集管的蛋白，超滤离心后测定蛋白浓度，对 CD271T-1, CD271T-2 进行 ELISA 鉴定，底物为 CD271 全长蛋白，一抗为小鼠腹水纯化抗体，二抗为 Goat Anti Mouse IgG(H+L)-HRP，具体结果见图 3。

3. ForteBio 验证纯化后抗体亲和力

用 proA 传感器固化全长抗原 CD271，检测 30, 50, 70, 90, 110, 130 nM CD271T-1, CD271T-2 抗体亲和力。固化 5 分钟（固化高度 1nm 左右）结合 5 分钟，解离 5 分钟（解离拟合最前面 1 分钟）。再生 5 s，中和 15 s，循环三次。所有抗原抗体的稀释液为 PBS，再生缓冲液为 pH1.5 10mM 甘氨酸缓冲液，平衡洗脱液为 0.02% Tween PBS，中和为 0.05% Tween PBS。固化物（即抗原）的浓度为 10 μg/ mL。固化高度在 1nm 左右。具体参数见表 1，曲线图见图 4。

表 1

	KD(M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	Full X ²	Full R ²
CD271T-2	3.37×10 ⁻⁹	6.69×10 ⁴	2.25×10 ⁻⁴	4.4542	0.98420

【实施例 3】抗人 CD271 的重轻链可变区基因克隆及嵌合抗体 2 的构建

1.RNA 提取：采用 Trizol 一步法，取杂交瘤细胞 CD271T-2 约 10^6 个，加入 Trizol，按照康为世纪 Ultrapure RNA Kit CW0581S 试剂盒提取 RNA，核酸电泳鉴定 RNA 完整性；杂交瘤细胞 CD271T-2 的保藏号为 CGMCC 21494。保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。保藏日期为 2021 年 1 月 25 日。分类命名为杂交瘤细胞株 CD271T-2；

2.逆转录为 cDNA (20 μ L)：取 Oligo dT Primer(50 μ M) 1 μ L，dNTP Mixture (10 nM) 1 μ L，模板 RNA 5 μ g，加水至 10 μ L，65℃保温 5 min，冰上迅速冷却；加入上述变性后反应液 10 μ L，5x primerscript II Buffer 4 μ L，RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L，PrimeScript II RTase (200 U/ μ L) 1 μ L，加水至 20 μ L，42℃反应 60 min，70℃，15 min 失活；

3.PCR 扩增抗 CD271 抗体的重轻链可变区基因：轻、重链可变区基因 PCR 扩增于苏州泓迅生物技术公司操作，PCR 结果见图 5A&5B；

4.测序载体的构建：PMD19-T 载体购自 takara，将重轻链可变区基因 pcr 产物回收，与 T 载体连接后，进行 DH5 α 转化，以 100 μ g/ mL 氨苄浓度筛选阳性克隆，送测序，与蛋白数据库所具有的若干保守的框架氨基酸比对。所得单克隆抗体包括轻链和重链，轻链包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；所述重链包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。编码轻链互补决定区 LCDR1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示；编码轻链互补决定区 LCDR2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示；编码轻链互补决定区 LCDR3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示；编码重链互补决定区 HCDR1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示；编码重链互补决定区 HCDR2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示；编码重链互补决定区 HCDR3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.14 所示。轻链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO.15 所示，重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO.16 所示。

【实施例 4】抗人 CD271 腹水抗体与 Hu-MS-C 流式亲和表达鉴定

取适当生长良好的 Hu-MS-C 细胞胰酶消化离心收集，用 FACS (PBS+2%FBS) 重悬洗涤，1000 rpm，3 min 离心，弃上清；按表 3 加入一抗，室温避光孵育 30 min，用 FACS

(PBS+2%FBS)重悬洗涤,离心 1000 rpm, 3 min, 重复 3 次, 弃上清, 按表 1 加入二抗, 室温避光 30 min, 用 FACS (PBS+2%FBS)重悬洗涤, 离心 1000 rpm, 3 min, 重复 3 次, 加入 300 μ L FACS 重悬细胞, 流式细胞仪检测, 具体结果见图 6。图中表明, 来源于 Biolegend 的 APC mouse anti human CD271 的阳性抗体, 免疫原来自黑色素瘤细胞, 其细胞表面高表达 CD271 分子, 此抗体与阴性对照相比有略微迁移 (图 6A); 来源于 Abcam 的 Rabbit anti human CD271 阳性对照抗体, 免疫原来自人 CD271 细胞膜内 350-450 氨基酸区域, 与阴性对照相比, 也无任何偏移 (图 6B); CD271T-2 的腹水纯化抗体与阳性和阴性对照相比, 其偏移程度较高, 说明制备的抗人 CD271 单克隆抗体具有非常高的亲和力和特异性 (图 6C)。

表 2

	一抗 (各自 10 μ g)	二抗
Abcam-FITC	Rabbit anti human CD271	Goat anti rabbit FITC
Blank-FITC	无	无
Blank-APC	无	无
Positive-APC	APC Goat anti human CD271	
CD271T-2	CD271T-2	Goat anti mouse FITC

以上所述, 仅为本发明的较佳实施例, 并非对本发明任何形式上和实质上的限制, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员, 在不脱离本发明方法的前提下, 还将可以做出若干改进和补充, 这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员, 在不脱离本发明的精神和范围的情况下, 当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化, 均为本发明的等效实施例; 同时, 凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变, 均仍属于本发明的技术方案的范围。

1. 一种分泌抗人 CD271 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 CD271T-2, 所述杂交瘤细胞株的保藏号为 CGMCC 21494。
2. 一种抗人 CD271 单克隆抗体, 其特征在于, 所述抗人 CD271 的单克隆抗体由权利要求 1 所述的 CD271T-2 杂交瘤细胞株分泌。
3. 一种抗人 CD271 的工程抗体, 其特征在于, 所述抗人 CD271 的工程抗体包括轻链和重链, 所述轻链互补决定区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示, 所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示, 所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示; 所述重链互补决定区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示, 所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示, 所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。
4. 如权利要求 3 所述的抗人 CD271 的工程抗体, 其特征在于, 包括以下特征中的任一项或多项: (1) 所述抗人 CD271 的工程抗体的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示; 或为对 SEQ ID NO.7 进行一定的取代、添加和/或缺失一个或几个氨基酸获得具有同等功能的氨基酸序列; (2) 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示, 或为对 SEQ ID NO.8 进行一定的取代、添加和/或缺失一个或几个氨基酸获得具有同等功能的氨基酸序列。
5. 如权利要求 3-4 任一所述的抗人 CD271 的工程抗体, 其特征在于, 所述抗体由 CD271T-2 杂交瘤细胞株经反转录-聚合酶链式合成反应制备产生。
6. 一种多核苷酸, 编码如权利要求 3-5 任一所述的抗人 CD271 抗体的重链可变区和/或轻链可变区或全长氨基酸。
7. 如权利要求 6 所述的多核苷酸, 其特征在于, 还包括以下特征中的任一项或多项: (1) 编码轻链互补决定区 LCDR1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示; 编码轻链互补决定区 LCDR2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示; 编码轻链互补决定区 LCDR3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示; (2) 编码重链互补决定区 HCDR1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示; 编码重链互补决定区 HCDR2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示; 编码重链互补决定区 HCDR3 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.14 所示。
8. 一种多核苷酸, 其特征在于, 所述多核苷酸编码如权利要求 3-5 任一所述的抗 CD271 抗体的 Fab 段的轻链可变区和重链可变区的重组序列, 能够获得分子量更小的单链抗体。
9. 一种构建体, 含有如权利要求 6-8 任一所述的多核苷酸。

10. 一种宿主细胞,所述宿主细胞含有如权利要求 9 所述的构建体或基因组中整合有外源的如权利要求 6-8 任一所述的多核苷酸。
11. 如权利要求 1 所述的细胞株,或权利要求 2 所述的抗人 CD271 单克隆抗体,或权利要求 3-5 中任一项所述的抗人 CD271 的工程抗体,或权利要求 6-8 中任一项所述的多核苷酸,或权利要求 9 所述的构建体,或权利要求 10 所述的抗体的宿主细胞的用途,选自以下任一种:
 - a) 表达 CD271 的细胞,所述细胞包括但不限于间充质干细胞、肿瘤干细胞、神经系统细胞,其体外的检测、鉴定、分离、富集、靶向;
 - b) 介导间充质干细胞靶向修复组织;
 - c) 干细胞、肿瘤干细胞、神经系统细胞的检测及示踪;
 - d) 制备神经系统靶向药物;
 - e) 制备肿瘤治疗药物;
 - f) 与其他化学小分子、生物大分子、放射性分子、纳米材料等偶联,用于上述 a)-e) 的各类用途。

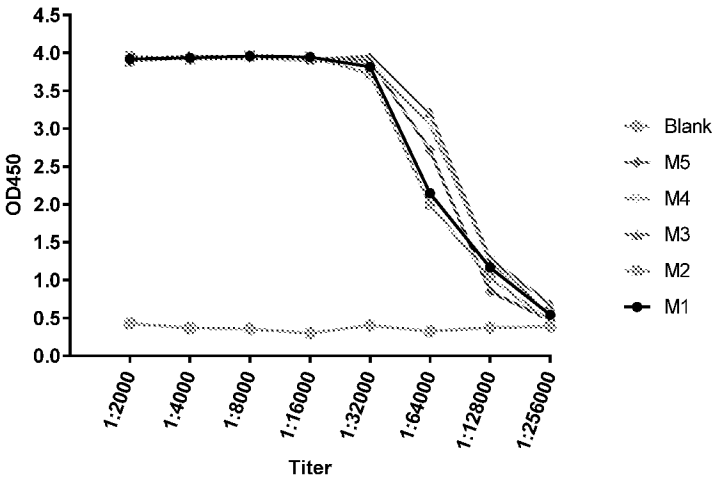


图 1

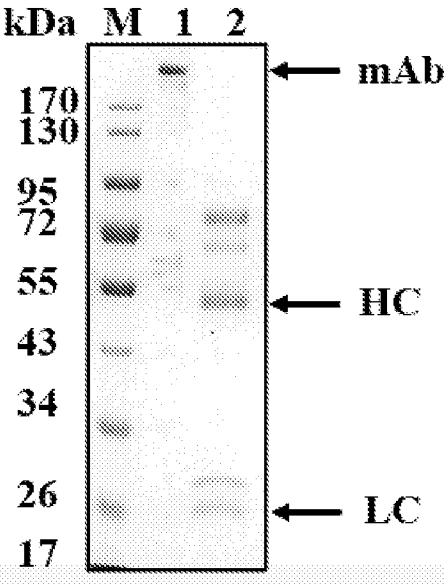


图 2

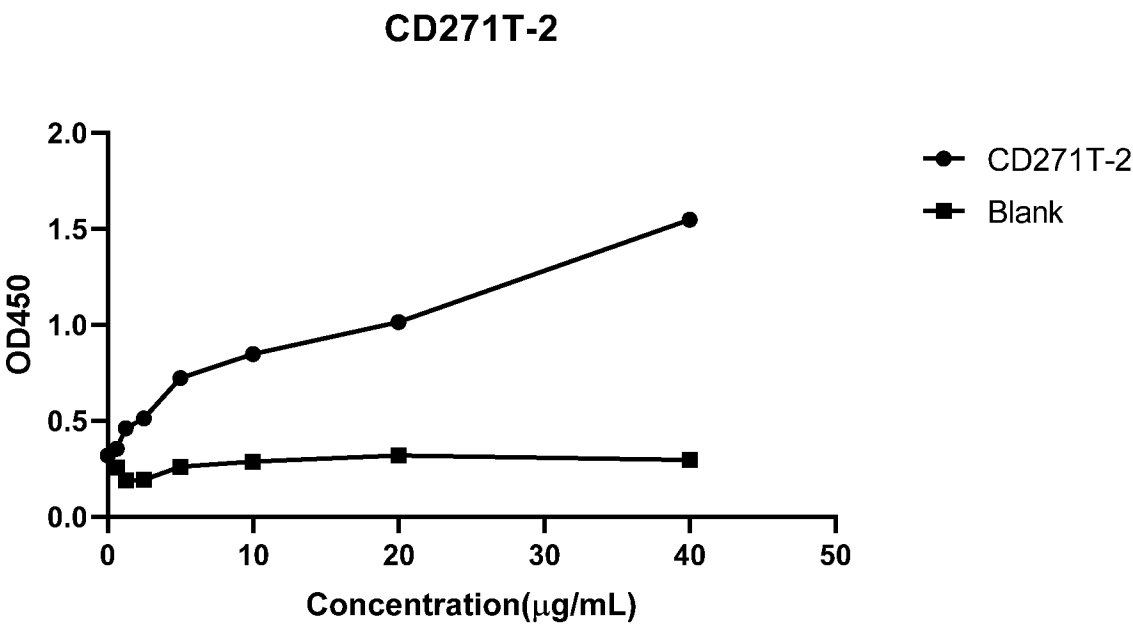


图 3

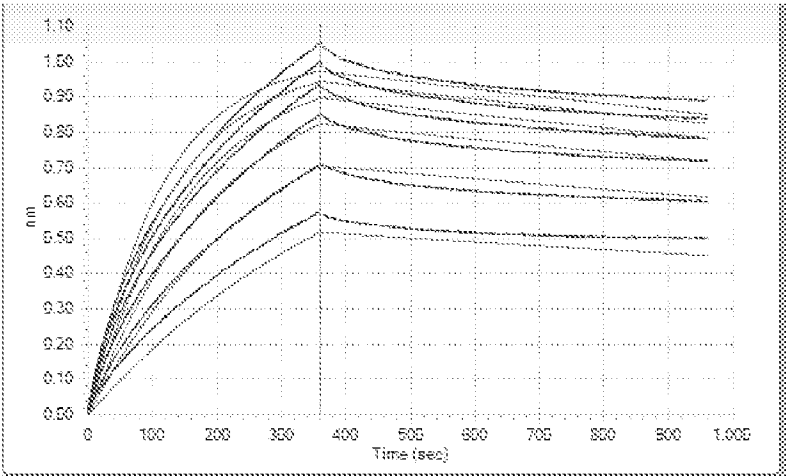


图 4

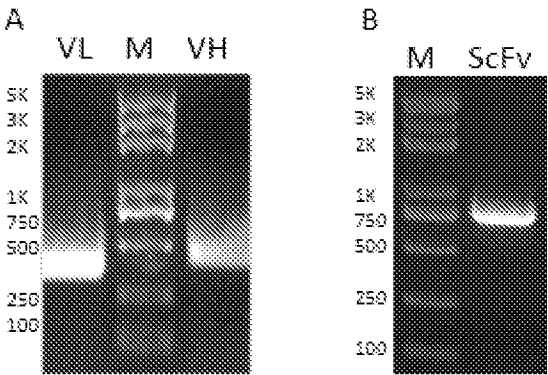


图 5

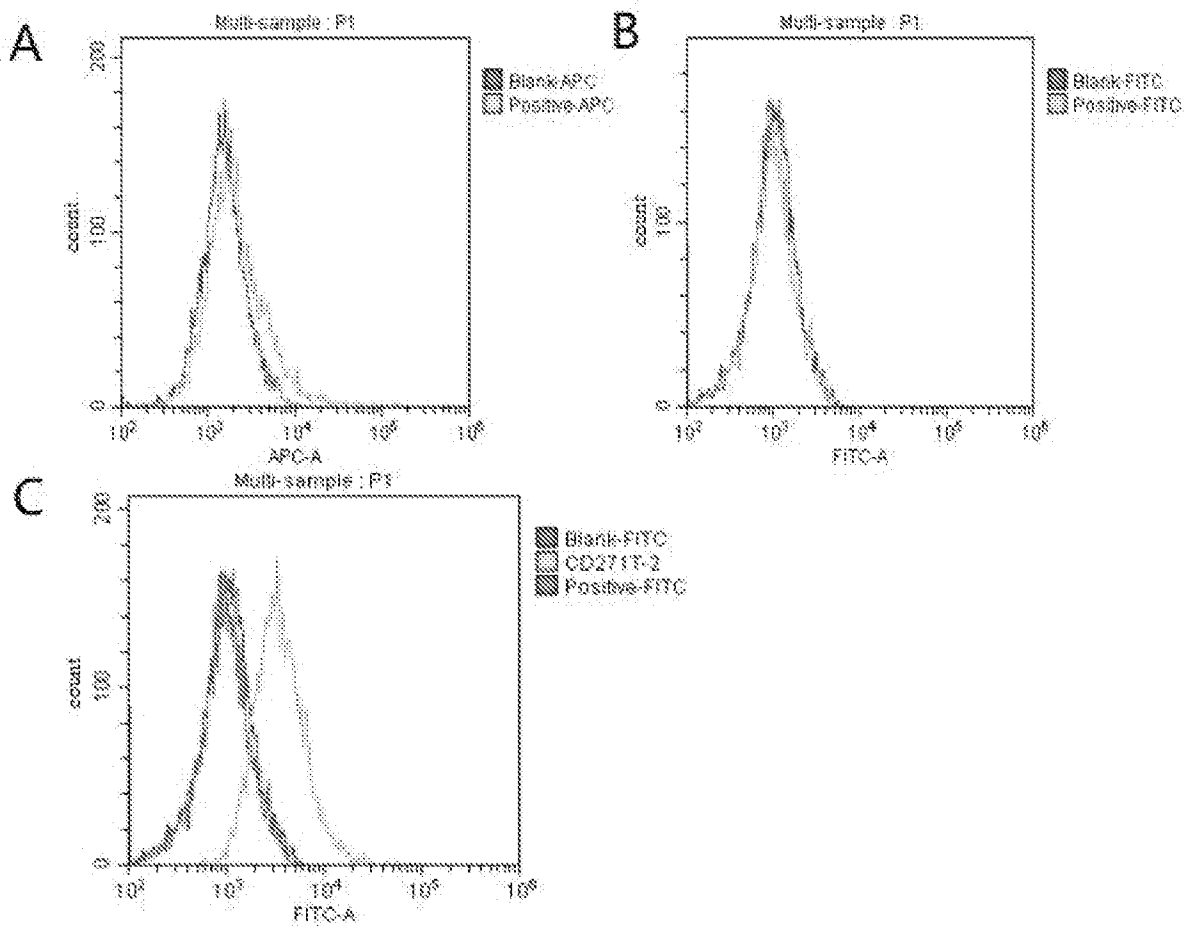


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/074522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/20(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; G01N 33/569(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)

C12N, C07K, A61K, A61P, G01N

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, DWPL, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, WEB OF SCIENCE, PUBMED; 神经生长因子受体, 单克隆抗体, 单抗, 间充质干细胞, LNGFR, CD271, p75NTR, monoclonal antibody +, mAb, MSC, CGMCC 21494; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 对SEQ ID NOS:1-17的序列检索, search for SEQ ID NOS: 1-17

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113151186 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 23 July 2021 (2021-07-23) see claims 1-11	1-11
A	CN 111050797 A (PHANES THERAPEUTICS, INC.) 21 April 2020 (2020-04-21) see sequences 23 and 24	1-11
A	CN 1878793 A (CRITICAL THERAPEUTICS, INC.) 13 December 2006 (2006-12-13) see sequences 8 and 9	1-11
A	US 2019263909 A1 (XENCOR, INC.) 29 August 2019 (2019-08-29) see entire document	1-11
A	徐艳红 (XU, Yanhong). "抗人CD271单克隆抗体的研制 (non-official translation: Development of Anti-Human CD271 Monoclonal Antibody)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生辑 (Chinese Master's Theses Full-Text Database, Medicine & Health Sciences), No. 7, 15 July 2009 (2009-07-15), ISSN: 1674-0246, E059-45, see abstract	1-11



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

19 April 2022

Date of mailing of the international search report

28 April 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/074522

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI. "GENBANK Accession number: AAG3571.8" <i>GENBANK</i> , 14 July 2016 (2016-07-14), see entire document	1-11
A	MORITA, S. et al. "Humanized anti-CD271 monoclonal antibody exerts an anti-tumor effect by depleting cancer stem cells" <i>CANCER LETTERS</i> , Vol. 461, 31 December 2019 (2019-12-31), ISSN: 0304-3835, pp. 144-152, see entire document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/074522

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **11** (部分)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 11 (in part) comprises a method for treating a living human body or animal body, which falls within a case in PCT Rule 39.1(iv) for which no search is required. The present report relates to performing a search on the following reasonably expected amended subject matter: defining b) in claim 11 as a use in the preparation of a drug for mediating mesenchymal stem cells targeting tissue repair, and defining c) in claim 11 as a use in the preparation of a drug for detecting stem cells, cancer stem cells, and nervous system cells, and tracing.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/074522

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113151186	A	23 July 2021	None			
CN	111050797	A	21 April 2020	JP	2021500916	A	14 January 2021
				WO	2019023410	A1	31 January 2019
				EA	202090401	A1	18 May 2020
				EP	3658185	A1	03 June 2020
				CA	3070295	A1	31 January 2019
				US	2021032330	A1	04 February 2021
				KR	20200032156	A	25 March 2020
				AU	2018306321	A1	13 February 2020
CN	1878793	A	13 December 2006	US	2008113385	A1	15 May 2008
				JP	2011241219	A	01 December 2011
				CA	2882022	A1	24 March 2005
				CA	2538763	A1	24 March 2005
				WO	2005026209	A2	24 March 2005
				US	2011217292	A1	08 September 2011
				US	2009148453	A1	11 June 2009
				IN	1254DELNP2006	A	03 August 2007
				JP	2007527406	A	27 September 2007
				EP	1668035	A2	14 June 2006
				US	2005152903	A1	14 July 2005
				AU	2004272607	A1	24 March 2005
US	2019263909	A1	29 August 2019	KR	20200085828	A	15 July 2020
				EP	3706793	A1	16 September 2020
				WO	2019094637	A1	16 May 2019
				CA	3082383	A1	16 May 2019
				JP	2021502100	A	28 January 2021
				CN	112272563	A	26 January 2021
				AU	2018366199	A1	28 May 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/074522

A. 主题的分类

C12N 5/20(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i;
A61K 47/68(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; G01N
33/569(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)

C12N, C07K, A61K, A61P, G01N

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, DWPI, SIPOABS, CNXTX, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED; 神经生长
因子受体, 单克隆抗体, 单抗, 间充质干细胞, LNGFR, CD271, p75NTR, monoclonal antibody, mAb, MSC, CGMCC
21494; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs:1-17的序列检索

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 113151186 A (上海交通大学) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 参见权利要求1-11	1-11
A	CN 111050797 A (凡恩世制药公司) 2020年4月21日 (2020 - 04 - 21) 参见序列23和24	1-11
A	CN 1878793 A (鉴定医疗有限公司) 2006年12月13日 (2006 - 12 - 13) 参见序列8和9	1-11
A	US 2019263909 A1 (XENC XENCOR INC) 2019年8月29日 (2019 - 08 - 29) 参见全文	1-11
A	徐艳红. “抗人CD271单克隆抗体的研制” 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 第7期, 2009年7月15日 (2009 - 07 - 15), ISSN: 1674-0246, E059-45, 参见摘要	1-11

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年4月19日

国际检索报告邮寄日期

2022年4月28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

李振鹏

电话号码 86-(010)-62411085

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	NCBI. "GENBANK登录号: AAG3571.8" GENBANK, 2016年7月14日 (2016 - 07 - 14), 参见全文	1-11
A	Morita, S等. "Humanized anti-CD271 monoclonal antibody exerts an anti-tumor effect by depleting cancer stem cells" CANCER LETTERS, 第461卷, 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31), ISSN: 0304-3835, 第144-152页, 参见全文	1-11

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:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 11（部分）
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求11（部分）包括了对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则第39条(iv)规定的无须检索的情况。本报告将对以下合理预期修改的主题进行检索：将权利要求11中的b)限定为在制备用于介导间充质干细胞靶向修复组织的药物中的用途，将权利要求11中的c)限定为在制备用于干细胞、肿瘤干细胞、神经系统细胞的检测及示踪的药物中的用途。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/074522

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	113151186	A	2021年7月23日	无			
CN	111050797	A	2020年4月21日	JP	2021500916	A	2021年1月14日
				WO	2019023410	A1	2019年1月31日
				EA	202090401	A1	2020年5月18日
				EP	3658185	A1	2020年6月3日
				CA	3070295	A1	2019年1月31日
				US	2021032330	A1	2021年2月4日
				KR	20200032156	A	2020年3月25日
				AU	2018306321	A1	2020年2月13日
CN	1878793	A	2006年12月13日	US	2008113385	A1	2008年5月15日
				JP	2011241219	A	2011年12月1日
				CA	2882022	A1	2005年3月24日
				CA	2538763	A1	2005年3月24日
				WO	2005026209	A2	2005年3月24日
				US	2011217292	A1	2011年9月8日
				US	2009148453	A1	2009年6月11日
				IN	1254DELNP2006	A	2007年8月3日
				JP	2007527406	A	2007年9月27日
				EP	1668035	A2	2006年6月14日
				US	2005152903	A1	2005年7月14日
				AU	2004272607	A1	2005年3月24日
US	2019263909	A1	2019年8月29日	KR	20200085828	A	2020年7月15日
				EP	3706793	A1	2020年9月16日
				WO	2019094637	A1	2019年5月16日
				CA	3082383	A1	2019年5月16日
				JP	2021502100	A	2021年1月28日
				CN	112272563	A	2021年1月26日
				AU	2018366199	A1	2020年5月28日