

(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
2019 年 8 月 1 日 (01.08.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/144568 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/30 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/093245

(22) 国际申请日: 2018 年 6 月 28 日 (28.06.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201810081205.5	2018 年 1 月 26 日 (26.01.2018)	CN
201810081241.1	2018 年 1 月 26 日 (26.01.2018)	CN
201810081247.9	2018 年 1 月 26 日 (26.01.2018)	CN
201810081244.5	2018 年 1 月 26 日 (26.01.2018)	CN
201810081245.X	2018 年 1 月 26 日 (26.01.2018)	CN
201810081249.8	2018 年 1 月 26 日 (26.01.2018)	CN

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, 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, 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)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(72) 发明人: 及

(71) 申请人: 裴新辉(PEI, Xinhui) [CN/CN]; 中国山东省泰安市岱岳区马庄镇, Shandong 271041 (CN)。

(74) 代理人: 北京华仁联合知识产权代理有限公司(BEIJING HUAREN UNITED INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市海淀区苏州街1号7层051室李冰, Beijing 100080 (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, 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,

(54) Title: HIGHLY EFFECTIVE ANTI-CANCER CELL MONOCLONAL ANTIBODY SCREENING METHOD

(54) 发明名称: 一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法

(57) Abstract: Disclosed in the present application is a highly effective anti-cancer cell monoclonal antibody screening method, comprising the following steps: directly removing antigens common to cancer cells or cancerous tissues and normal cells or normal tissues in vivo using antibodies against corresponding normal cells or normal tissues. The present method does not perform large-scale screening of antigens in vitro. The method of the present invention obtains 11 monoclonal antibodies against the anti-hepatoma cell strain HepG2. Said monoclonal antibodies specifically recognise HepG2, and do not recognise or basically recognise normal human hepatocyte HH cells. Said monoclonal antibodies also have specific recognition of HepG2 compared to cancer cells from other tissue sources.

(57) 摘要: 本申请公开了一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法。包括以下步骤: 用抗相对应的正常细胞或正常组织的抗体在体内直接去掉癌细胞或癌变组织与正常细胞或正常组织共有的抗原。所述方法不在体外对抗原进行大规模筛选。本发明方法获得了11种抗肝癌细胞株HepG2的单克隆抗体。这些单抗对HepG2有特异性的识别, 而不识别或基本不识别正常人肝细胞HH cell。同时, 与其他组织来源的癌细胞相对比, 这些单抗都对HepG2有特异性的识别。

WO 2019/144568 A1

一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法

技术领域

本发明涉及分子生物学抗原抗体筛选技术领域，特别涉及一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法。

背景技术

在目前的肿瘤的生物治疗方案中，免疫治疗是一直是研究和应用的热点。总体上来说，目前主要有两种主要的方式。一种是基于细胞免疫的，即让杀伤性 T 细胞识别并杀伤癌细胞；另外一种是基于体液免疫的，即获得肿瘤的特异性抗体，然后通过抗体激活补体途径或通过偶联在抗体上的药物特异性杀伤癌细胞。但是不管哪种免疫疗法，让免疫系统识别癌细胞是最关键的一步。

但是癌细胞是一种逃逸了机体免疫监视的恶性增生细胞，它尽可能“伪装”成正常细胞，以避免被机体免疫系统识别并清除，因此想要免疫系统识别癌细胞变的非常困难。

对于肿瘤抗体治疗来说，最关键的步骤是获得癌细胞特异性的单克隆抗体。目前主要有两种方式获得肿瘤特异性抗体：

第一种，直接用某种癌细胞或其提取物免疫小鼠或其它动物，并获得抗该癌细胞的单抗，然后通过用对照细胞（如对应的正常细胞）再对这些抗体进行负筛选，最终获得特异性抗体；

第二种，首先通过分子生物学手段获得癌细胞特异性的蛋白，尤其是膜蛋白，然后用这个蛋白去免疫并获得单克隆抗体。

然而这两种方法都有很多问题。如前所述，癌细胞是逃逸了免疫系统监控的细胞，所以虽然从分子尺度上来看，癌细胞的确与正常细胞有很多不同，但是这种不同并不足以激活机体的免疫系统。所以，如果用第一种方法获得抗体，往往需要从几千甚至几万个克隆中才能够筛选到一个癌细胞特异性的抗体。也因为这种缺陷，这种方法已经基本被淘汰。第二种方

法也是目前主流的方法，现有技术中已经通过这种方法获得了一些抗体并获得应用。

但是，并非一种肿瘤的癌细胞一定会表达这种抗原，即使在一个肿瘤组织内也不是所有的癌细胞都会表达某种特定的抗原。所以，这种抗体仅仅可以识别并杀伤表达这种抗原的癌细胞，而不表达这种抗原的癌细胞却因此被筛选出来并恶性增生。癌细胞的这种高变异性也是癌症难以治疗的原因之一。

正因为癌细胞的多变性和多样性，越来越多的业内专家认为，对于免疫疗法来说，只有几种或更多的抗体联合治疗，即“鸡尾酒疗法”才有可能解决这个问题。但是如前所述，通过目前主流的这两种方法想获得多种特异性的抗体是非常困难的。因此，如何尽可能高效地获得肿瘤特异性的抗体，已经成为肿瘤抗体治疗的瓶颈问题。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于，提供了一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法。本发明方法获得了 11 种抗肝癌细胞株 HepG2 的单克隆抗体。这些单抗对 HepG2 有特异性的识别，而不识别或基本不识别正常人肝细胞 HH cell。同时，与其他组织来源的癌细胞相对比，这些单抗都对 HepG2 有特异性的识别。

为解决上述技术问题，本发明提供了一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，包括以下步骤：用抗相对应的正常细胞或正常组织的抗体在体内直接去掉癌细胞或癌变组织与正常细胞或正常组织共有的抗原。

所述方法不在体外对抗原进行大规模筛选。

所述方法可以进一步包括：

- A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；
- B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；
- C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；
- D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 淋巴细胞，并与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；
- E. 用所述单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体。

所述步骤 A 优选进一步包括：用正常细胞或正常组织的全细胞、全细胞裂解液或者抽提出的膜蛋白作为抗原免疫动物，获得抗正常细胞血清。

所述步骤 B 优选进一步包括：将步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理新的未免疫过的动物。

所述步骤 D 优选进一步包括：分离步骤 C 处理后动物的脾细胞，并与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株。

所述步骤 A 还可以进一步包括：用正常细胞或正常组织的全细胞、全细胞裂解液或者抽提出的膜蛋白作为抗原免疫动物，免疫 1~5 次；最后一次免疫 8~12 天后采血收集血清，获得抗正常细胞血清。

为解决上述技术问题，本发明还提供了一种如前述任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法在制备抗肿瘤药物中的应用。

为解决上述技术问题，本发明又提供了一种如前述任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法在细胞特异性识别中的应用。

为解决上述技术问题，本发明另提供了一种如前述任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法在与人源化技术或药物偶联技术结合中的应用。

为解决上述技术问题，本发明提供了一种获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，包括以下步骤：

- A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；
- B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；
- C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；
- D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 淋巴细胞；
- E. 分离后的 B 淋巴细胞与 SP 2/0 细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；
- F. 用所述单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体。

所述癌细胞优选为 HepG2 细胞。

所述正常细胞优选为 HH cell。

所述步骤 A 可以进一步包括：用 80~120 万细胞免疫小鼠，免疫间隔 10~20 天，免疫 1~5 次；最后一次免疫 8~12 天后采血收集血清。

所述步骤 B 优选进一步包括：将步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理新的未免疫过的动物；处理间隔 10~20 天，处理 1~5 次。

为解决上述技术问题，本发明又提供了一种获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，包括以下步骤：用抗相对应的正常细胞或正常组织的抗体在体内直接去掉癌细胞或癌变组织与正常细胞或正常组织共有的抗原。

所述方法优选不在体外对抗原进行大规模筛选。

为解决上述技术问题，本发明还提供了一种如前述任一项所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法制备的抗体。

为解决上述技术问题，本发明又提供了一种如前述抗体在制备抗肿瘤药物中的应用。

为解决上述技术问题，本发明另提供了一种如前述抗体在寻找细胞特异性抗原中的应用。

为解决上述技术问题，本发明提供了一种简便寻找细胞特异性抗原的方法，包括以下步骤：

- A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；
- B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；
- C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；
- D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 细胞；
- E. 分离后的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；用单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体；
- F. 步骤 E 获得的单克隆抗体亲和纯化癌细胞的细胞裂解液，得到与其结合的抗原蛋白。

所述癌细胞优选为肝癌细胞。

所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，优选进一步包括：

- G. 质谱分析步骤 F 获得的抗原蛋白。

所述步骤 A 可以进一步包括：

- A1. 收集细胞；
- A2. 重选细胞；
- A3. 免疫后获得血清。

所述子步骤 A1 可以进一步包括：

正常细胞培养扩增至密度达到 75~85% 时，吸去培养液；先用 PBS 洗

去残留的培养基，然后再用 PBS/8-12mM EDTA 处理细胞，使细胞脱落并最终吹打收集细胞。

所述子步骤 A2 可以进一步包括：

800~1200 转，3-5 分钟离心后，用 1%多聚甲醛吹散细胞沉淀，并室温固定 0.3~0.7 小时，然后通过离心洗去多聚甲醛，并用 PBS 重选细胞，细胞计数后，最终保存于-20° C。

所述子步骤 A3 可以进一步包括：

取 100 万细胞定容于 200 μ l PBS 并与 200 μ l 完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂涡旋振荡混合；免疫 5-7 周龄小鼠，每只小鼠用 100 万细胞免疫，免疫间隔 2 周，共 2-4 次；最后一次免疫 5-15 天后采血收集血清。

所述步骤 C 优选进一步包括：

C1.收集细胞；

C2.重选细胞；

C3.免疫后获得 B 细胞。

所述子步骤 B1 优选进一步包括：癌细胞培养扩增至密度达到 78-82% 左右时，吸去培养液；先用 PBS 洗去残留的培养基，然后再用 PBS/7-13mM EDTA 处理细胞，使细胞脱落并最终吹打收集细胞。

所述子步骤 B2 优选进一步包括：

900~1100 转，3-5 分钟离心后，用 0.5-1.5%多聚甲醛吹散细胞沉淀，并室温固定 0.3~0.7 小时，然后通过离心洗去多聚甲醛，并用 PBS 重选细胞，细胞计数后，最终保存于-20° C。

本发明有益效果包括：

1) 本发明筛选出的 11 种抗体是用 HepG2 细胞直接筛选出来的，也就是说没经过 HH cell 或其他细胞的负筛选。利用本发明新方法，不用或者基本不用后续的负筛选过程。这无疑大大地提高了筛选的效率。

2) 本发明方法无需用已知抗原进行免疫，特别适合获得未知特异性抗原癌细胞的特异性抗体。

3) 本发明方法提供了一种简单的寻找细胞特异性抗原的方法，可以用这 11 种单克隆抗体去亲和纯化 HepG2 的细胞裂解液，这样本发明就得到了可以与它们结合的蛋白。然后用质谱或其他方法去分析这些蛋白，就

可以知道这些蛋白是什么，方便了进一步的深入研究。

附图说明

图1为本发明实施例所述体内去除癌细胞与相应正常细胞共同抗原并获得抗癌细胞单抗的原理图；

图2为本发明实施例所述抗HH cell的血清对HH cell和HepG2的识别能力对比图；

图3为本发明实施例所述11种单克隆抗体特异性识别能力柱形图；

图4为本发明实施例所述其它类型的细胞与本发明单抗对HepG2特异性识别对比图；

图5为本发明实施例所述体外去除癌细胞与相应正常细胞共同抗原并最终获得抗癌细胞单抗的原理图；

图6为本发明实施例所述体外法获得的单克隆抗体特异性识别HepG2能力柱形图。

具体实施方式

下面结合实施例详述本发明。为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚、明确，以下参照附图并举实施例对本发明进一步详细说明，但本发明并不局限于这些实施例。如无特别说明，本发明的实施例中的原料和催化剂均通过商业途径购买。

在众多肿瘤的免疫疗法过程中，获得特异性抗癌细胞的单克隆抗体一直是其中的一个关键因素。但是遗憾的是到目前为止，还没有一种可以高效筛选该抗体的方法。本发明提供了一种高效获得抗癌细胞单克隆抗体的方法。本发明方法的核心设计思想是，用抗相对应的正常细胞抗体在体内直接去掉癌细胞与正常细胞共有的抗原，而不是在体外进行大规模的筛选，本发明将这种方法称为“抗体滤镜”。通过这种方法，本发明以肝癌细胞HepG2为模型实施例，获得了11个抗HepG2的单克隆细胞株。在本发明的实验中，本发明发现这些抗体对HepG2有特异性识别，而对正常的肝细胞（HH cell）和其他组织来源的细胞基本不识别。通过本发明的试验，证明了这是一种可以高效筛选抗癌细胞单克隆抗体的方法，而未来这种方

法与人源化技术或药物偶联技术相结合将有可能应用于癌症的治疗。

如图 1 所示,为本发明实施例所述体内去除癌细胞与相应正常细胞共同抗原并获得抗癌细胞单抗的原理图。

其中步骤为: 1, 用正常细胞免疫小鼠; 2, 采集抗正常细胞血清; 3: 将抗血清注射入另外的小鼠; 4, 同时, 用相应的癌细胞免疫该小鼠; 5, 收集该小鼠的脾细胞; 6, 细胞融合; 7, 筛选抗该癌细胞的单克隆抗体细胞株。

本发明的新方法获得了 11 种抗 HepG2 的单克隆抗体。这些单抗对 HepG2 有特异性的识别, 而不识别或基本不识别 HH cell。同时, 与其他组织来源的癌细胞相对比, 这些单抗都对 HepG2 有特异性的识别。

首先, 本发明用正常细胞 (比如说 HH cell) 的全细胞、或者全细胞裂解液或者抽提出的膜蛋白作为抗原免疫小鼠, 这样本发明就获得了抗 HH cell 的血清。随后本发明将这种抗血清或纯化出来的多克隆抗体注射新的未免疫过的小鼠, 同时用相应的癌细胞 (比如说 HepG2) 去免疫该小鼠。因为此时该小鼠体内已经有了抗 HH cell 的抗体, 所以 HepG2 细胞中与 HH cell 共有的抗原会被抗 HH cell 抗体识别, 并最终被巨噬细胞或其他吞噬细胞吞噬。这样剩下的 HepG2 抗原就是该细胞的特异性抗原。这些抗原会激活该小鼠的体液免疫系统, 并引起相应 B 淋巴细胞的增生和分化。最后, 本发明分离该小鼠的脾细胞 (B 淋巴细胞占很大比例) 并与 SP 2/0 细胞融合, 最终获得单克隆抗体细胞株。如前所述, 因为注射的抗 HH cell 血清已经清除了 HepG2 与 HH cell 共有的抗原, 因此这部分抗原并不能引起机体的免疫反应也就没有相应 B 淋巴细胞的增值分化, 因此本发明最后获得的单克隆抗体细胞株, 仅仅是抗 HepG2 特异性抗原的。本发明管这种通过抗正常细胞的血清或抗体在体内清除相应正常细胞与癌细胞共有抗原, 并最终获得癌细胞特异性抗体的方法, 叫做“抗体滤镜”。

如图 2 所示, 为本发明实施例所述抗 HH cell 的血清对 HH cell 和 HepG2 的识别能力对比图。该图结果显示, 抗 HH cell 血清对 HH cell 和 HepG2 有相同的识别能力。

本发明用多聚甲醛固定的 HH cell 免疫 BALB/c 小鼠并最终获得了抗 HH cell 的抗血清, 然后用 PBS/1% BSA 1000 倍稀释该血清, 并用 PBS/1%

BSA 倍数梯度稀释该血清，最高稀释倍数为 2,048,000 倍。随后本发明分别用 HH cell 和 HepG2 细胞铺 96 孔细胞培养板，并检测该抗血清对它们的识别能力有没有差别。结果显示，即使稀释倍数达到 200 万倍，该血清对这两种细胞的识别能力并没有差别。

如图 3 所示，为本发明实施例所述 11 种单克隆抗体特异性识别能力柱形图。该图结果显示，用本发明方法获得的 11 种单克隆抗体特异性识别 HepG2 而基本不识别 HH cell。

接下来，本发明将抗 HH cell 血清注射（尾静脉注射或腹腔注射）入 5 只新的 BALB/c 小鼠，并用多聚甲醛固定的 HepG2 细胞免疫该小鼠。在免疫过程中，本发明方法通过定期注射抗 HH cell 血清以维持其体内抗 HH cell 抗体的浓度。经过三轮免疫，本发明方法取该小鼠的脾脏并与 SP2/0 细胞融合。最后用 HepG2 细胞筛选获得的单克隆细胞株，并最终获得了 11 种抗 HepG2 单克隆抗体。经过检测，这 11 种单克隆抗体不识别或基本不识别 HH cell，但是对 HepG2 有强识别，说明了这些单克隆抗体的特异性。

本发明获得的 11 种单克隆抗体，其中只有 HP1、HP2 和 HP3 是 IgG1 亚型，其余 8 种全部是 IgM 亚型。有趣的是，三种 IgG1 亚型的单克隆抗体比其余的单克隆抗体对 HepG2 普遍有更好的识别能力。

如图 4 所示，为本发明实施例所述其它类型的细胞与本发明单抗对 HepG2 特异性识别对比图。图 4 表明，与其他类型的细胞相比这些单抗对 HepG2 有更特异性的识别。其中：1, HepG2; 2, 786-O; 3, A375; 4, DLD-1; 5, ScaBER; 6, A549; 7, H441; 8, WI-38。其纵坐标为相对识别能力，而横坐标为上述各种细胞。

除了人肝细胞外，本发明还分别检测了其他组织来源癌细胞和永生化的细胞，包括：786-O、A375、DLD-1、ScaBER、A549、H441 和 WI-38。本发明发现与这些细胞相比，这 11 种抗体对 HepG2 具有更好的识别能力。

本发明的实验结果显示，抗正常肝细胞（HH cell）血清在识别 HH cell 和肝癌细胞（HepG2）的能力上没有差别。这个结果一是可以间接解释为什么癌细胞可以逃逸免疫系统监控，因为癌细胞在尽可能模拟正常细胞；另外也可以说明，为什么传统的直接用癌细胞免疫而获得单抗的方法缺乏

效率，因为这意味着人们需要淘汰大量与正常细胞交叉反应的单克隆抗体细胞株。

在本发明获得的 11 种单克隆抗体中，8 个为 IgM 亚型。一般认为，IgM 亚型主要出现在初次免疫或弱免疫过程中。这个结果一方面表明了 HH cell 的细胞表面抗原与 HepG2 的细胞表面抗原高度一致，这样注射入的抗 HH cell 抗体清除了这两种细胞共有的抗原，而余下的 HepG2 抗原量太低，难以有效地激活体液免疫系统。另外一方面，即使在这种情况下，8 种 IgM 亚型单克隆抗体对 HepG2 有更特异性的识别，这进一步证明了该方法设计的合理性。除此之外，本发明还发现三种 IgG1 亚型单克隆抗体（HP1、HP2、HP3）对 HepG2 的识别能力强于大部分 IgM 亚型的抗体。这个结果表明，这三种抗体对应的 HepG2 的细胞表面抗原量是足够的，所以它们诱导足够的免疫应答。然后经过 B 淋巴细胞的克隆选择，机体产生了对抗原识别能力更强的 IgG1 亚型抗体。

这也提示本发明，如果这个方法进行进一步的改进，比如说进一步优化调整抗 HH cell 抗体的注射量和免疫的 HepG2 量的比例，即在抗 HH cell 抗体足以清除两种细胞共有的抗原的前提下尽可能提高 HepG2 特异性抗原的量，这样是有可能获得更多的具有更高亲和力的 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 等亚型的抗体。

此外，本发明用的是全细胞免疫，这就意味着有很多胞内蛋白也参与了免疫，这也许进一步解释为什么本发明获得的抗体较少而且大部分是 IgM 亚型。因此下一步，本发明后续研究会只提取膜蛋白进行免疫，这在理论上可以进一步提高特异性抗体的数量和质量。

为了进一步检测这些单克隆抗体的特异性，本发明用这 11 种单抗检测了透明细胞肾细胞癌细胞（786-O）、黑色素瘤细胞（A375）、结肠癌细胞（DLD-1）、膀胱癌细胞（ScaBER）、肺癌细胞（A549、H441）和人正常成纤维细胞（WI-38）。结果表明，与肝癌细胞（HepG2）相比，11 种抗体对它们基本不识别或者识别能力较弱。这个结果一方面进一步说明了这 11 种单抗的特异性，另一方面也阐释了不同来源的细胞在细胞表面抗原上有很大的差异。同时本发明注意到，HP-5 同样也可以识别一些其他来源的细胞，这也许暗示 HP-5 识别的抗原在其他一些类型的细胞表面同样有

表达。

本发明获得了 11 种单克隆抗体。虽然其中有 8 个是 IgM 亚型的，但是与 HH cell 和其他细胞相比这 11 种抗体对 HepG2 有很强的特异性结合。在这里需要特别指出的是，这 11 种抗体是用 HepG2 细胞直接筛选出来的，也就是说没经过 HH cell 或其他细胞的负筛选。

换句话说，利用本发明的新方法，不用或者基本不用后续的负筛选过程。这无疑大大地提高了筛选的效率。同时因为这种方法无需用已知抗原进行免疫，那么它就特别适合获得未知特异性抗原癌细胞的特异性抗体。

而且本发明方法提供了一种简单的寻找细胞特异性抗原的方法。比如说，本发明可以用这 11 种单克隆抗体去亲和纯化 HepG2 的细胞裂解液，这样本发明就得到了可以与它们结合的蛋白。然后用质谱或其他方法去分析这些蛋白，就可以知道这些蛋白是什么，这无疑方便了进一步的深入研究。

在本发明一实施例中，提供了一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，包括以下步骤：用抗相对应的正常细胞或正常组织的抗体在体内直接去掉癌细胞或癌变组织与正常细胞或正常组织共有的抗原。

所述方法优选不在体外对抗原进行大规模筛选。

所述方法可以进一步包括：

- A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；
- B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；
- C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；
- D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 淋巴细胞，并与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；
- E. 用所述单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体。

所述步骤 A 优选进一步包括：用正常细胞或正常组织的全细胞、全细胞裂解液或者抽提出的膜蛋白作为抗原免疫动物，获得抗正常细胞血清。

所述步骤 B 优选进一步包括：将步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理新的未免疫过的动物。

所述步骤 D 优选进一步包括：分离步骤 C 处理后动物的脾细胞，并与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株。

所述步骤 A 优选进一步包括：用正常细胞或正常组织的全细胞、全细胞裂解液或者抽提出的膜蛋白作为抗原免疫动物，免疫 1~5 次；最后一次免疫 8~12 天后采血收集血清，获得抗正常细胞血清。

在本发明又一实施例中，提供了一种如前述任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法在制备抗肿瘤药物中的应用。

在本发明再一实施例中，提供了一种如前述任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法在细胞特异性识别中的应用。

在本发明另一实施例中，提供了一种如前述任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，在与人源化技术或药物偶联技术结合中的应用。

为解决上述技术问题，本发明提供了一种获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，包括以下步骤：

- A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；
- B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；
- C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；
- D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 淋巴细胞；
- E. 分离后的 B 淋巴细胞与 SP 2/0 细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；
- F. 用所述单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体。

所述癌细胞优选为 HepG2 细胞。

所述正常细胞优选为 HH cell。

所述步骤 A 可以进一步包括：用 80~120 万细胞免疫小鼠，免疫间隔 10~20 天，免疫 1~5 次；最后一次免疫 8~12 天后采血收集血清。

所述步骤 B 优选进一步包括：将步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理新的未免疫过的动物；处理间隔 10~20 天，处理 1~5 次。

为解决上述技术问题，本发明又提供了一种获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，包括以下步骤：用抗相对应的正常细胞或正常组织的抗体在体内直接去掉癌细胞或癌变组织与正常细胞或正常组织共有的抗原。

所述方法优选不在体外对抗原进行大规模筛选。

为解决上述技术问题，本发明还提供了一种如前述任一项所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法制备的抗体。

为解决上述技术问题，本发明又提供了一种如前述抗体在制备抗肿瘤药物中的应用。

为解决上述技术问题，本发明另提供了一种如前述抗体在寻找细胞特异性抗原中的应用。

为解决上述技术问题，本发明提供了一种简便寻找细胞特异性抗原的方法，包括以下步骤：

- A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；
- B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；
- C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；
- D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 细胞；
- E. 分离后的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；用单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体；
- F. 步骤 E 获得的单克隆抗体亲和纯化癌细胞的细胞裂解液，得到与其结合的抗原蛋白。

所述癌细胞优选为肝癌细胞。

所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，优选进一步包括：

- G. 质谱分析步骤 F 获得的抗原蛋白。

所述步骤 A 可以进一步包括：

- A1. 收集细胞；
- A2. 重选细胞；
- A3. 免疫后获得血清。

所述子步骤 A1 可以进一步包括：

正常细胞培养扩增至密度达到 75~85% 时，吸去培养液；先用 PBS 洗去残留的培养基，然后再用 PBS/8-12mM EDTA 处理细胞，使细胞脱落并最终吹打收集细胞。

所述子步骤 A2 可以进一步包括：

800~1200 转，3-5 分钟离心后，用 1% 多聚甲醛吹散细胞沉淀，并室温固定 0.3~0.7 小时，然后通过离心洗去多聚甲醛，并用 PBS 重选细胞，细胞计数后，最终保存于 -20° C。

所述子步骤 A3 可以进一步包括：

取 100 万细胞定容于 200 μ l PBS 并与 200 μ l 完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂涡旋振荡混合；免疫 5-7 周龄小鼠，每只小鼠用 100 万细胞免疫，免疫间隔 2 周，共 2-4 次；最后一次免疫 5-15 天后采血收集血清。

所述步骤 C 优选进一步包括：

C1.收集细胞；

C2.重选细胞；

C3.免疫后获得 B 细胞。

所述子步骤 B1 优选进一步包括：癌细胞培养扩增至密度达到 78-82% 左右时，吸去培养液；先用 PBS 洗去残留的培养基，然后再用 PBS/7-13mM EDTA 处理细胞，使细胞脱落并最终吹打收集细胞。

所述子步骤 B2 优选进一步包括：

900~1100 转，3-5 分钟离心后，用 0.5-1.5%多聚甲醛吹散细胞沉淀，并室温固定 0.3~0.7 小时，然后通过离心洗去多聚甲醛，并用 PBS 重选细胞，细胞计数后，最终保存于-20° C。

如前所述，在肿瘤的抗体治疗中，单一抗体治疗越来越显现出局限性。这是因为肿瘤本身具有高变异性，单一抗体的治疗有很大的可能会把那些不表达特定抗原的癌细胞筛选出来，而这些癌细胞有可能是恶性程度更高的。所以，越来越多的科学家认为，几种或更多种抗体同时施用，也就是所谓的“鸡尾酒疗法”，可以尽可能减少逃逸杀伤癌细胞的比例。但是如何高效地获得肿瘤特异性的抗体恰恰是问题关键所在。

在本发明的实验中，本发明已经可以筛选到了 11 种特异性单克隆抗体。这表明，本发明方法可以比较简单容易地获得更多的肿瘤特异性抗体，尤其是获得针对不同抗原的特异性抗体，并在将来用于肿瘤的抗体联合治疗，这样就可以尽可能减少肿瘤细胞逃逸抗体治疗的概率。

材料和方法

材料、细胞和细胞培养

HepG2 购自美国菌种保藏中心(ATCC)。正常人肝细胞购自 ScienCell。DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素、胰酶/EDTA 等购自 Thermo。小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒、二甲基亚砷 (DMSO)、多聚甲醛、HAT 添加剂、HT 添加剂还有其他的化学试剂购自 Sigma。

HepG2 用 DMEM 培养基（含有 10%胎牛血清，加 50 IU/ml 青霉素，50 μ g/ml）培养。正常人肝细胞（Cat. No. 5200, ScienCell Research Laboratories, Inc.）用肝细胞培养液（Cat. No. 5201, ScienCell Research Laboratories, Inc.）培养。细胞的培养环境为，37° C、5% CO₂、湿度大于 95%。

人肝细胞免疫

肝细胞培养扩增至密度达到 80%左右时，轻轻吸去培养液，先用 PBS 洗去残留的培养基，然后再用 PBS/10mM EDTA 处理细胞，使细胞脱落并最终吹打收集细胞。收集获得的细胞，1000 转，4 分钟离心后，细胞用 1% 多聚甲醛（溶于 PBS 中）吹散细胞沉淀，并室温固定 0.5 小时，然后通过离心洗去多聚甲醛，并用 PBS 重选细胞，细胞计数后，最终保存于-20° C。取 100 万细胞定容于 200 μ l PBS 并与 200 μ l 完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂（第一次免疫用完全弗氏佐剂，后两次用不完全弗氏佐剂）充分涡旋振荡混合，并通过皮下注射分别免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠，每只小鼠用 100 万细胞免疫，并一共免疫 50 只，免疫间隔 2 周，共三次。最后一次免疫 10 天后采血收集血清。

肝癌细胞免疫

1，肝癌细胞的扩增及预处理

HepG2 细胞扩增至密度达到 80%左右时，轻轻吸去培养液，先用 PBS 洗去残留的培养基，然后再用 PBS/10mM EDTA 处理细胞，使细胞脱落并最终吹打收集细胞。收集获得的细胞，1000 转，4 分钟离心后，细胞用 1% 多聚甲醛（溶于 PBS 中）吹散细胞沉淀，并室温固定 0.5 小时，然后通过离心洗去多聚甲醛，并用 PBS 重选细胞，细胞计数后，最终保存于-20° C。

2，免疫小鼠的处理

取 5 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠，首先分别注射（尾静脉注射或腹腔注射）抗 HH cell 纯血清或相应血清纯化出来的多克隆抗体（注射足以清除掉 HH cell 与 HepG2 共同抗原的抗血清或多克隆抗体，本实施例只用了 0.3ml 血清）。在实施步骤 3 期间，每周都要用同样剂量血清处理，以维持小鼠体内足够的抗 HH cell 抗体的浓度。

3，HepG2 细胞的免疫

上述小鼠第一次注射抗 HH cell 血清后, 立即以 100 万 HepG2 细胞每只小鼠的用量, 按照上述的免疫方法 (与人肝细胞免疫的方法相同), 皮下免疫这些处理用抗 HH cell 血清处理过的小鼠。需要特别指出的是, 如 2 所述, 在整个 HepG2 细胞免疫期间 (即免疫间隔为 2 周, 一共免疫三次, 第一次用完全弗氏佐剂, 后两次用不完全弗氏佐剂, 一共 6 周), 抗 HH cell 血清需每周注射一次, 每次 0.3ml。第三次免疫后 2 周后, 用 100 万 HepG2 静脉注射加强免疫, 并同时注射 0.3ml 抗 HH cell 血清, 三天后取小鼠脾脏并分离脾细胞, 最后计数。

单克隆抗体细胞株的获得

然后以 5: 1 的细胞比例与 SP 2/0 融合, 融合剂为 PEG-1500。融合好的细胞平均铺入 8 块 96 孔细胞培养板, 用 HAT 培养基 (含: 100 μ M 次黄嘌呤、0.4 μ M 氨基蝶呤、16 μ M 胸腺嘧啶核苷) 进行选择杀伤培养, 约 10 天后, 此时活下来的细胞即为杂交瘤细胞。

单克隆抗体细胞株的筛选

HepG2 细胞培养于 96 孔细胞培养板, 待细胞密度达到 90-100%时, 温和除去培养基并用 PBS 洗涤一遍, 然后用 PBS/1%多聚甲醛室温固定 30 分钟, 最后用 PBS 温和洗 3 遍。然后加入单克隆细胞株细胞培养上清 100 μ l, 37° C, 孵育 1 小时。温和洗去一抗后, 加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗, PBS/1%BSA 稀释, 37° C, 孵育 1 小时。最后再次温和洗去二抗, 并最终用 TMB 显色液显色。此时以 TMB 显色反应的结果对照杂交瘤细胞培养板的生长情况, 并确定要继续挑选的单克隆抗体细胞株。然后这些细胞株再进行亚克隆, 亚克隆所需的培养基为 HT 培养基 (含: 100 μ M 次黄嘌呤、16 μ M 胸腺嘧啶核苷), 筛选阳性克隆的方法如上所述。亚克隆筛选一共进行三轮, 并最终获得稳定的单克隆抗体细胞株。

单抗亚型鉴定

按照 Sigma 公司的小鼠单克隆抗体亚型试剂盒的方法进行鉴定。

酶联免疫反应 (ELISA)

首先细胞 (HH cell、HepG2 等) 培养于 96 孔细胞培养板, 待细胞密度达到 90-100%时, 温和除去培养基并用 PBS 洗涤一遍, 然后用 PBS/1%多聚甲醛室温固定 30 分钟, 最后用 PBS 温和洗 3 遍。然后加入单克隆细

胞株细胞培养上清或其对照，或用 PBS/1%BSA 稀释的血清等样品，体积都为 100 μ l/孔，37° C，孵育 1 小时。温柔洗去一抗后，加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗，PBS/1%BSA 稀释，37° C，孵育 1 小时。最后再次温柔洗去二抗，并最终用 TMB 显色液显色。整个反应体系都为 100 μ l。阴性对照为 SP2/0 细胞培养上清或 PBS/1%BSA。

在检测不同细胞的结合能力时，即检测抗体的相对识别能力，根据以下计算公式获得：

相对识别能力 = 单抗细胞培养上清的吸光值 / SP2/0 细胞培养上清的吸光值。

在本发明的另一实施例中，提供了一种通过体外去除癌细胞与相应正常细胞共同抗原并获得抗癌细胞单抗的方法。

如图 5 所示，为本发明实施例所述体外去除癌细胞与相应正常细胞共同抗原并最终获得抗癌细胞单抗的原理图。

本实施例方法首先同样用正常细胞（如 HH cell）免疫小鼠获得抗 HH cell 血清，并纯化得到抗 HH cell 的多克隆抗体，并将该多克隆抗体偶联到琼脂糖凝胶微球上。同时，本发明裂解了对应癌细胞（如 HepG2）获得其裂解液。最后用偶联了抗 HH cell 多克隆抗体的亲和柱去掉 HepG2 细胞中与 HH cell 相同的部分。最后不结合的部分作为抗原免疫小鼠，经过三次免疫后，取脾细胞并与 SP2/0 细胞融合，经过筛选，最终获得抗 HepG2 的单克隆抗体。

具体方法

抗 HH cell 多克隆抗体的获得和偶联

抗 HH cell 血清的获得方法如前所述，获得的抗血清与 protein A/G(GE) 琼脂糖凝胶微球充分孵育，然后用冰 PBS 充分洗涤直到杂蛋白完全洗净，然后用 50mM 醋酸钠/醋酸缓冲液 (PH3.0) 将血清中的抗体纯化出来，由此获得抗 HH cell 多克隆抗体，并最终透析到 PBS 缓冲液中。最后，根据 Bio-Rad 公司提供的说明书方法将抗体偶联到 Affi gel (Bio-Rad) 柱子上。

HepG2 抗原的获得

HepG2 用 PBS/1% Triton X-100 加“鸡尾酒”蛋白酶抑制剂（含：100nM Aprotinin，50 μ M Leupeptin，10 μ M PepstatinA，0.2mM PMSF，2mM

Benzamidine)冰上裂解 1 小时, 15000 转离心 10 分钟并获得裂解液上清。随后将该裂解液加入到抗 HH cell 多克隆抗体亲和柱中, 并充分孵育, 由此 HepG2 细胞中与 HH cell 共有的抗原就会被该亲和柱吸附, 而 HepG2 特异性的抗原则不会结合该亲和柱。那些不与该亲和柱结合的剩余 HepG2 裂解液, 最终透析到 PBS 缓冲液中, 由此获得 HepG2 特异性抗原, 蛋白浓度测定后, 放-20° C 保存。

单克隆抗体制备

用获得的 HepG2 特异性抗原免疫雌性 6 周龄 BALB/c 小鼠, 每次免疫的剂量为 50 μ g, 共免疫 5 只, 免疫间隔 2 周, 共三次。最后一次免疫后, 取脾细胞与 SP2/0 细胞融合获得单克隆细胞株。

单克隆抗体的筛选与鉴定

与前一实施例中的方法相同。

如图 6 所示, 为本发明实施例所述体外法获得的单克隆抗体特异性识别 HepG2 能力柱形图。图中结果显示, 应用此方法, 本发明共获得 5 个单克隆抗体细胞株, 经过亚型测定, 有 2 个为 IgG1 (PY1 和 PY2), 3 个为 IGM (PY3、PY4 和 PY5), 在跟 HH cell 的对比试验中, 发现该 5 种抗体对 HepG2 有更好的识别能力。

本发明方法可以快速地获得肿瘤特异性的抗体, 为其快速应用于肿瘤治疗提供了可能。例如, 本发明可以首先获得一个患者的肿瘤细胞和对应的正常细胞, 并用这种方法快速获得该患者专用的抗肿瘤抗体, 并应用其个体化的治疗。

最后, 本发明技术不仅仅可以应用于获得肿瘤特异性的抗体, 也可以区分其它科研项目感兴趣研究的细胞, 比如说终端分化细胞和干细胞。除了区分膜蛋白外, 也可以应用于胞内蛋白的区分。

以上所述, 仅是本发明的几个实施例, 并非对本发明做任何形式的限制, 虽然本发明以较佳实施例揭示如上, 然而并非用以限制本发明, 任何熟悉本专业的技术人员, 在不脱离本发明技术方案的范围内, 利用上述揭示的技术内容做出些许的变动或修饰均等同于等效实施案例, 均属于本发明技术方案保护范围内。

权 利 要 求 书

1、一种高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，其特征在于，包括以下步骤：用抗相对应的正常细胞或正常组织的抗体在体内直接去掉癌细胞或癌变组织与正常细胞或正常组织共有的抗原。

2、根据权利要求 1 所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，其特征在于，所述方法不在体外对抗原进行大规模筛选。

3、根据权利要求 1 所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，其特征在于，所述方法进一步包括：

A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；

B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；

C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；

D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 淋巴细胞，并与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；

E. 用所述单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体。

4、一种如权利要求 1~3 中任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，在制备抗肿瘤药物中的应用。

5、一种如权利要求 1~3 中任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，在细胞特异性识别中的应用。

6、一种如权利要求 1~3 中任一项所述高效抗癌细胞单克隆抗体的筛选方法，在与人源化技术或药物偶联技术结合中的应用。

7、一种获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，其特征在于，包括以下步骤：

A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；

B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；

C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；

D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 淋巴细胞；

E. 分离后的 B 淋巴细胞与 SP 2/0 细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；

F. 用所述单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体。

8、一种获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，其特征在于，包括以下步骤：用抗相对应的正常细胞或正常组织的抗体在体内直接去掉

癌细胞或癌变组织与正常细胞或正常组织共有的抗原。

9、根据权利要求 8 所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，其特征在于，所述方法不在体外对抗原进行大规模筛选。

10、一种如权利要求 1~9 中任一项所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法制备的抗体。

11、一种如权利要求 8 所述抗体在制备抗肿瘤药物中的应用 和/或 如权利要求 8 所述抗体在寻找细胞特异性抗原中的应用。

12、一种简便寻找细胞特异性抗原的方法，其特征在于，包括以下步骤：

A. 获得抗正常细胞或正常组织的血清；

B. 用步骤 A 获得的抗血清或纯化出来的多克隆抗体处理动物；

C. 用对应的癌细胞或癌变组织免疫步骤 B 处理过的动物；

D. 分离步骤 C 处理后动物的 B 细胞；

E. 分离后的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，获得单克隆抗体细胞株；用单克隆抗体细胞株制备单克隆抗体；

F. 步骤 E 获得的单克隆抗体亲和纯化癌细胞的细胞裂解液，得到与其结合的抗原蛋白。

13、根据权利要求 12 所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，其特征在于，进一步包括：

G. 质谱分析步骤 F 获得的抗原蛋白。

14、根据权利要求 12 所述获得未知特异性抗原癌细胞特异性抗体的方法，其特征在于，所述步骤 A 进一步包括：

A1. 收集细胞；

A2. 重选细胞；

A3. 免疫后获得血清。

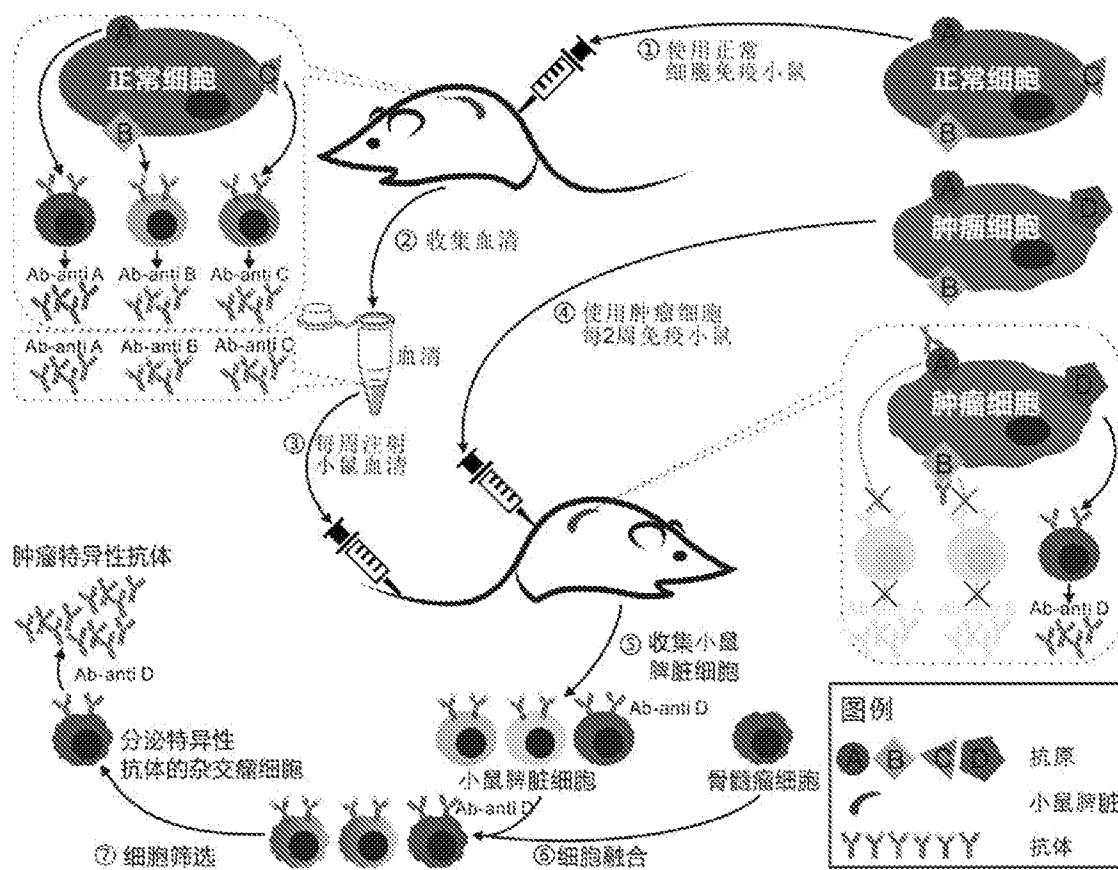


图 1

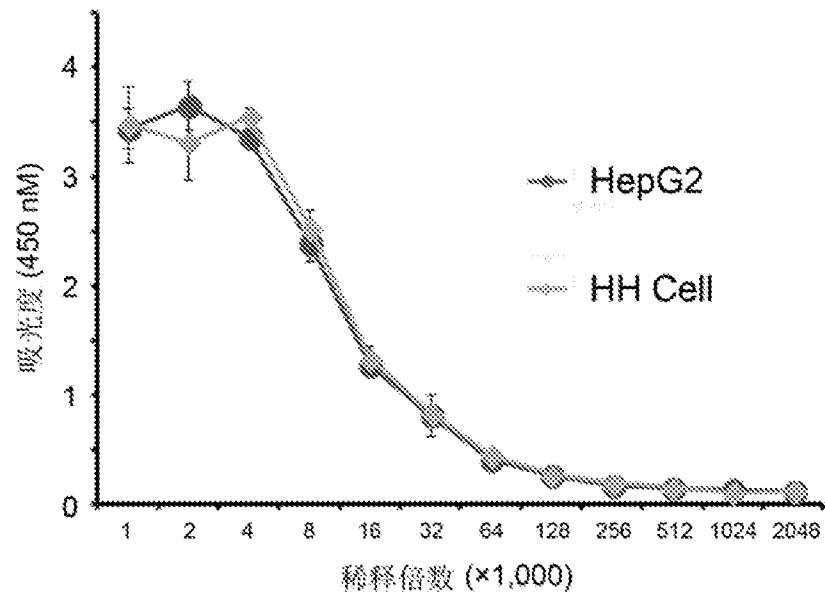


图 2

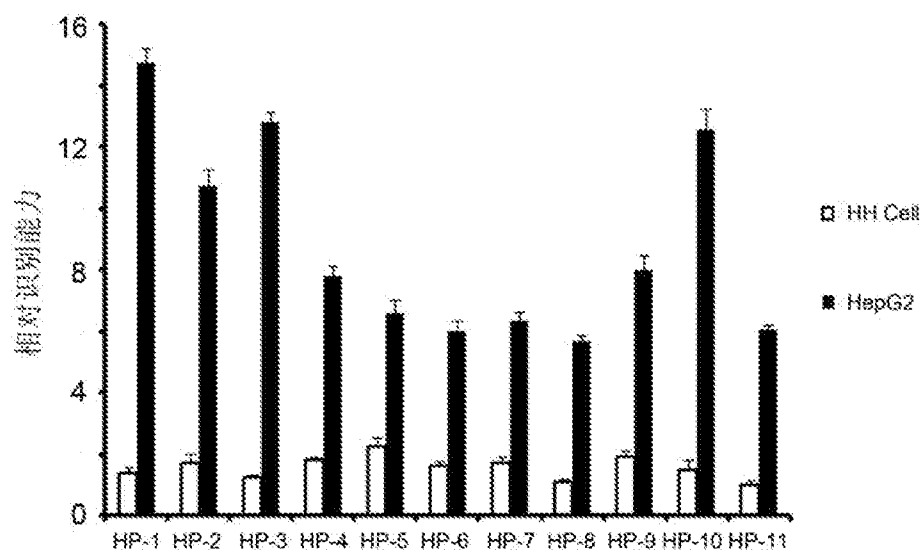


图 3

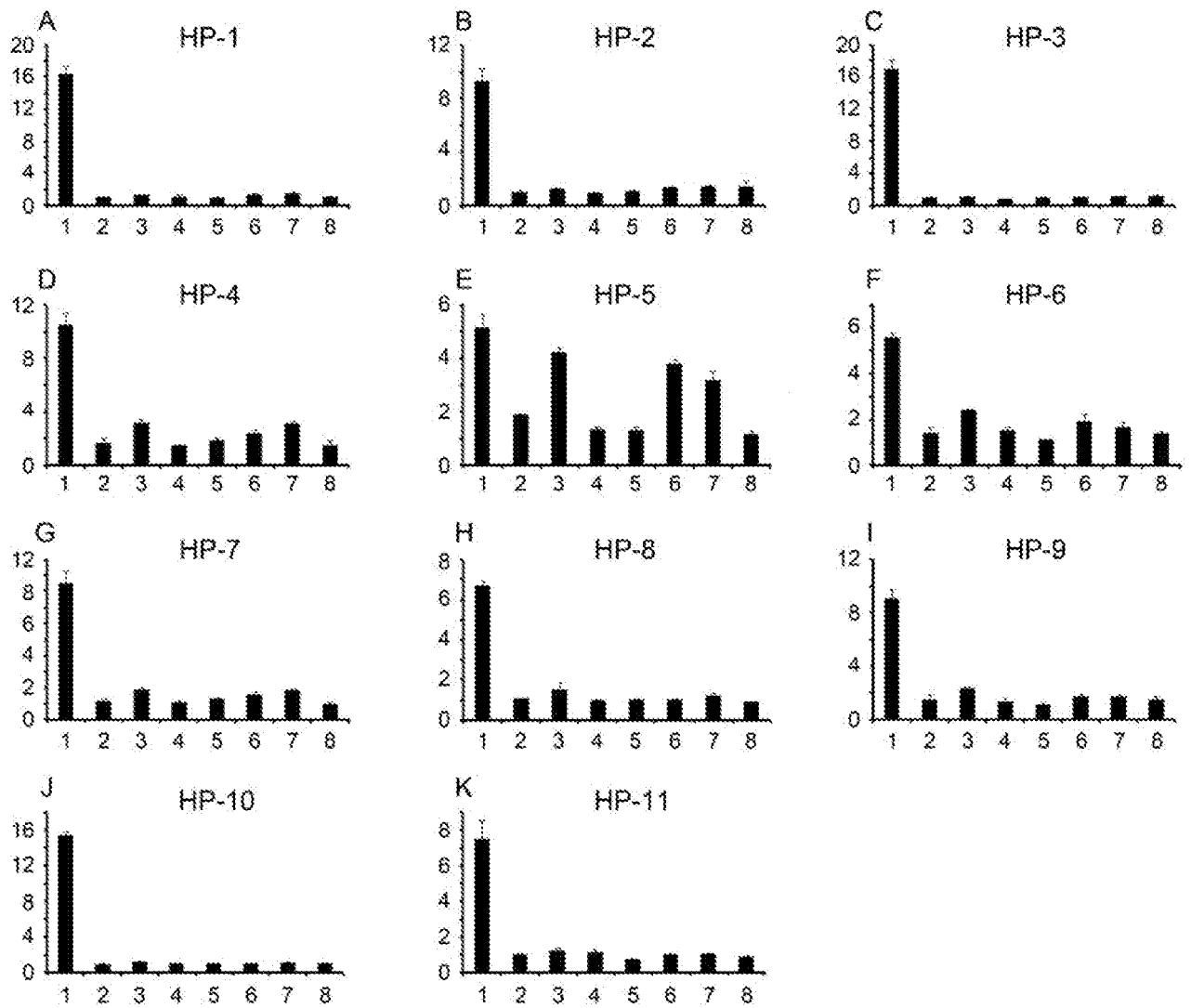


图 4

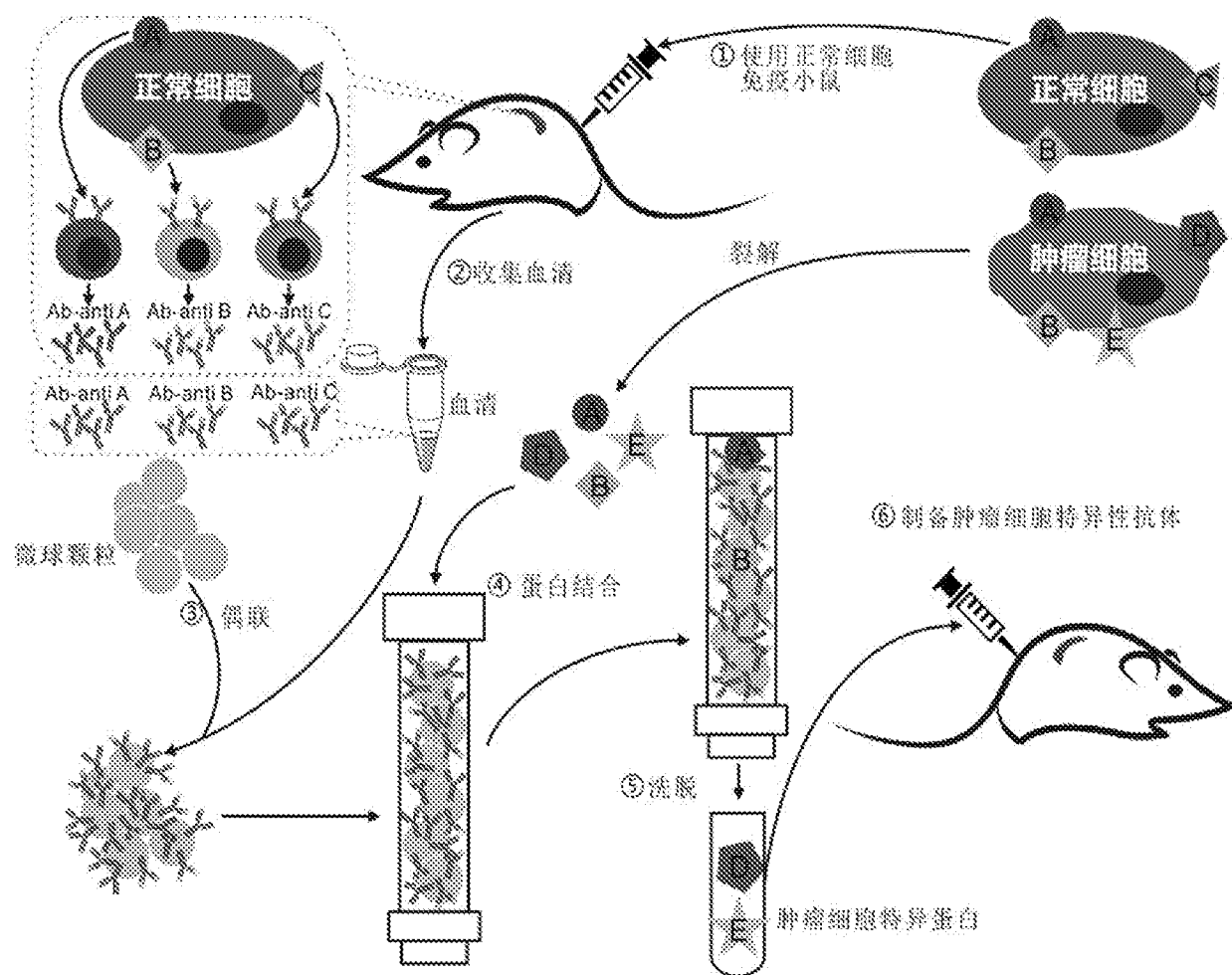


图 5

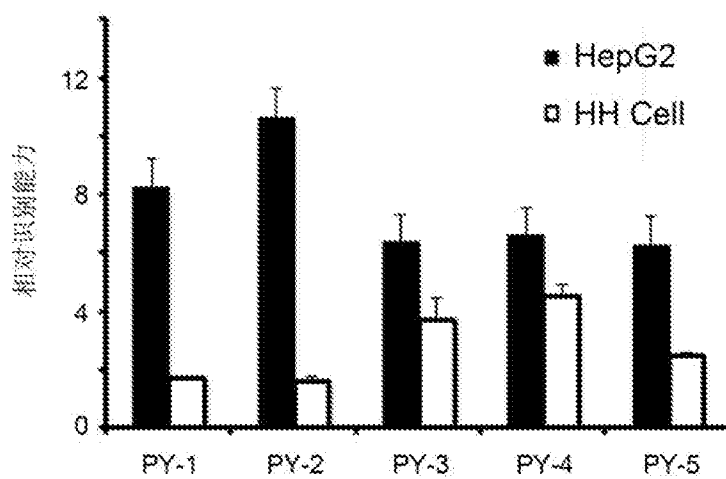


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/093245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/30(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)n

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)

C07K16; A61K39

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)

CNXTX, CNABS, VEN, DWPI, SIPOABS, CNKI, EPTXT, USTXT, WOTXT, PubMed: 裴新辉, 山东设想生物技术, 单抗, 单克隆抗体, 多克隆抗体, 多抗, 抗体滤镜, 正常, 组织, 细胞, 抗原, 抗体, 决定簇, 骨髓瘤, 杂交瘤, 免疫, 血清, 筛选, 肝, 癌, HepG2, B细胞, monoclonal antibody, normal, cell, tissue, antigen, serum, antiserum, polyclonal antibody, cancer, liver, hepatic, B lymphocyte, immune, screening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107987165 A (PEI, XINHUI) 04 May 2018 (2018-05-04) description, paragraphs [0037]-[0115]	1-14
PX	CN 108250299 A (PEI, XINHUI) 06 July 2018 (2018-07-06) description, paragraphs [0057]-[0130]	1-14
PX	CN 108084266 A (PEI, XINHUI) 29 May 2018 (2018-05-29) description, paragraphs [0010]-[0102]	1-14
PX	CN 108250287 A (PEI, XINHUI) 06 July 2018 (2018-07-06) description, paragraphs [0010]-[0037]	12-14
PX	CN 108250298 A (PEI, XINHUI) 06 July 2018 (2018-07-06) description, paragraphs [0010]-[0026]	7-11
PX	CN 108264556 A (PEI, XINHUI) 10 July 2018 (2018-07-10) description, paragraphs [0010]-[0042]	1-11
X	CN 1344746 A (LIU, WENTAI) 17 April 2002 (2002-04-17) description, page 1, paragraph 3 to page 5, paragraph 3	1-14



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

14 September 2018

Date of mailing of the international search report

10 October 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (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/CN2018/093245**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1250782 A (WANG, SHENGJUN ET AL.) 19 April 2000 (2000-04-19) description, page 3, paragraph 2 to page 8, paragraph 4	1-14
X	CN 1195773 A (WANG, SHENGJUN) 14 October 1998 (1998-10-14) description, page 3, paragraph 2 to page 5, paragraph 3	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/093245

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	107987165	A	04 May 2018	None	
CN	108250299	A	06 July 2018	None	
CN	108084266	A	29 May 2018	None	
CN	108250287	A	06 July 2018	None	
CN	108250298	A	06 July 2018	None	
CN	108264556	A	10 July 2018	None	
CN	1344746	A	17 April 2002	None	
CN	1250782	A	19 April 2000	None	
CN	1195773	A	14 October 1998	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/093245

A. 主题的分类 C07K 16/30(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)n 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) C07K16; A61K39 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)) CNTXT, CNABS, VEN, DWPI, SIPOABS, CNKI, EPTXT, USTXT, WOTXT, PubMed:裴新辉, 山东设想生物技术, 单抗, 单克隆抗体, 多克隆抗体, 多抗, 抗体滤镜, 正常, 组织, 细胞, 抗原, 抗体, 决定簇, 骨髓瘤, 杂交瘤, 免疫, 血清, 筛选, 肝, 癌, HepG2, B细胞, monoclonal antibody, normal, cell, tissue, antigen, serum, antiserum, polyclonal antibody, cancer, liver, hepatic, B lymphocyte, immune, screening																										
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107987165 A (裴新辉) 2018年 5月 4日 (2018 - 05 - 04) 说明书0037-0115段</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108250299 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0057-0130段</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108084266 A (裴新辉) 2018年 5月 29日 (2018 - 05 - 29) 说明书0010-0102段</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108250287 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0010-0037段</td> <td>12-14</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108250298 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0010-0026段</td> <td>7-11</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108264556 A (裴新辉) 2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10) 说明书0010-0042段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1344746 A (刘文泰) 2002年 4月 17日 (2002 - 04 - 17) 说明书第1页第3段至第5页第3段</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 107987165 A (裴新辉) 2018年 5月 4日 (2018 - 05 - 04) 说明书0037-0115段	1-14	PX	CN 108250299 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0057-0130段	1-14	PX	CN 108084266 A (裴新辉) 2018年 5月 29日 (2018 - 05 - 29) 说明书0010-0102段	1-14	PX	CN 108250287 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0010-0037段	12-14	PX	CN 108250298 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0010-0026段	7-11	PX	CN 108264556 A (裴新辉) 2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10) 说明书0010-0042段	1-11	X	CN 1344746 A (刘文泰) 2002年 4月 17日 (2002 - 04 - 17) 说明书第1页第3段至第5页第3段	1-14
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 107987165 A (裴新辉) 2018年 5月 4日 (2018 - 05 - 04) 说明书0037-0115段	1-14																								
PX	CN 108250299 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0057-0130段	1-14																								
PX	CN 108084266 A (裴新辉) 2018年 5月 29日 (2018 - 05 - 29) 说明书0010-0102段	1-14																								
PX	CN 108250287 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0010-0037段	12-14																								
PX	CN 108250298 A (裴新辉) 2018年 7月 6日 (2018 - 07 - 06) 说明书0010-0026段	7-11																								
PX	CN 108264556 A (裴新辉) 2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10) 说明书0010-0042段	1-11																								
X	CN 1344746 A (刘文泰) 2002年 4月 17日 (2002 - 04 - 17) 说明书第1页第3段至第5页第3段	1-14																								
☒ 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		国际检索报告邮寄日期																								
2018年 9月 14日		2018年 10月 10日																								
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(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		刘明 电话号码 (86-512) 88996430																								

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	CN 1250782 A (王胜军 等) 2000年 4月 19日 (2000 - 04 - 19) 说明书第3页第2段至第8页第4段	1-14
X	CN 1195773 A (王胜军) 1998年 10月 14日 (1998 - 10 - 14) 说明书第3页第2段至第5页第3段	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/093245

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	107987165	A	2018年 5月 4日	无	
CN	108250299	A	2018年 7月 6日	无	
CN	108084266	A	2018年 5月 29日	无	
CN	108250287	A	2018年 7月 6日	无	
CN	108250298	A	2018年 7月 6日	无	
CN	108264556	A	2018年 7月 10日	无	
CN	1344746	A	2002年 4月 17日	无	
CN	1250782	A	2000年 4月 19日	无	
CN	1195773	A	1998年 10月 14日	无	