

(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
2016 年 12 月 1 日 (01.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/188449 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/083469
- (22) 国际申请日: 2016 年 5 月 26 日 (26.05.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
2015102783797 2015 年 5 月 27 日 (27.05.2015) CN
- (71) 申请人: 江苏春申堂药业有限公司 (JIANGSU CHUNSHENTANG PHARMACEUTICAL CO.,LTD) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市江阴市东盛西路 2 号 A3 楼 2 单元三层, Jiangsu 214434 (CN)。
- (72) 发明人: 万亚坤 (WAN, Yakun); 中国江苏省无锡市江阴市东盛西路 2 号 A3 楼 2 单元三层, Jiangsu 214434 (CN)。 孟红 (MENG, Hong); 中国江苏省无锡市江阴市东盛西路 2 号 A3 楼 2 单元三层, Jiangsu 214434 (CN)。 卞忠华 (BIAN, Zhonghua); 中国江苏省无锡市江阴市东盛西路 2 号 A3 楼 2 单元三层, Jiangsu 214434 (CN)。
- (74) 代理人: 济南鼎信专利商标代理事务所 (普通合伙) (JINAN DINGXIN PATENT AND TRADE-

MARK AGENT OFFICE (GENERAL PARTNER-SHIP)); 中国山东省济南市天桥区生产路湖滨苑小区 9 号楼 2 单元 501, Shandong 250033 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: SINGLE-DOMAIN ANTIBODY TARGETING CD47

(54) 发明名称: 一种针对 CD47 的单域抗体

(57) Abstract: Provided is a single-domain antibody targeting the extracellular region of CD47, the amino acid sequence of the single-domain antibody being as shown in SEQ ID NO: 9. Also provided are a nucleic acid coding the antibody, an expression vector containing the nucleic acid, and a host cell containing the expression vector.

(57) 摘要: 本发明提供了一种针对 CD47 胞外区的单域抗体, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示。本发明还提供了编码该抗体的核酸, 含有该核酸的表达载体, 含有该表达载体的宿主细胞。



WO 2016/188449 A1

一种针对 CD47 的单域抗体

技术领域

本发明涉及一种针对 CD47 的单域抗体，具体设计一种针对 CD47 分子胞外段的驼源单域抗体，属于纳米抗体技术领域。

背景技术

CD47 是一种广泛表达于多个物种和各个组织之间的膜糖蛋白，其与抑制性受体信号调节蛋白 a 互为受体和配体，并可以形成 CD47-SIRPa 信号复合体，该信号复合物具有介导双向信号调节并调控多种免疫反应进程的作用。在正常造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 上，CD47 表达的意义在于保持其在机体内的相对稳定。在白血病、非霍奇金淋巴瘤、膀胱癌和乳腺癌等恶性疾病的研究中，发现肿瘤细胞存在 CD47 的升高，且 CD47 的高表达提示临床预后不良；一些类型的肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 中存在 CD47 的过表达。肿瘤细胞通过借此“别吃我”信号，逃避了肿瘤免疫。通过使用抗 CD47 抗体阻断 CD47 和 SIRPa 的相互作用具有靶向性治疗的效果，对正常细胞的影响非常小。在白血病的治疗中，可在现有的经典化疗的基础上联合 CD47 抗体针对白血病肿瘤干细胞进行靶向杀伤，可在最大限度上增加抗肿瘤疗效，为白血病的治疗提供新的探索方向，对治疗的个体化和进一步提高疗效具有什么重要的意义。

纳米抗体技术，是生物医学科学家在传统抗体的基础上，运用分子生物学技术结合纳米粒子科学的概念进行的抗体工程革命，从而研发出的最新和最小的抗体分子，最初由比利时科学家 Hamers, R 从骆驼血液中的单独重链抗体中分离得到，因此也叫做驼源单域抗体。该种抗体的单域性质使其较普通抗体具有一些独特的性质。(1) 分子量小，结构稳定，溶解性高，可有序固定。纳米抗体是已知分子量最小的抗体，为普通抗体的十分之一 (15KD)。由于纳米抗体的 FR2 (frame-work 2) 中的疏水残基被亲水残基取代，使纳米抗体水溶性增加，聚合性减少。研究发现，在 37°C 孵育 1 周后纳米抗体仍保持 80 % 的结合活性，说明其在室温下更易于使用和长时间保存。在高于 90°C 的环境中长期放置后仍能重新获得抗原结合能力。同时，纳米抗体在强变性剂和极度 pH 值环境下也表现出高度的稳定性，而普通的抗体则发生不可逆的聚合。由于纳米抗体拥有很小的体积且结构规整，所以固定起来更加容易，可实现有序固定。(2) 亲和力高，特异性强。相对于普通抗体的凹形或平面的抗原结合面，其拥有较长的 CDR3 (complementarity-determining region 3)，可形成稳定、暴露的凸形结构的结合面。这个凸形结构可以深入抗原内部，更有效的与抗原表位形成的凹形拓扑结构结合，不

仅提高了纳米抗体的抗原特异性和亲和力，同时识别许多普通抗体无法识别的抗原。甚至，当蛋白紧密包裹隐藏了普通抗体识别位点时，纳米抗体也可对其进行表位识别。(3)免疫原性弱，穿透性强。纳米抗体对人体的免疫原性弱，与人的生物相容性好。免疫原性与分子的大小、化学结构有关，相对分子量越小免疫原性越小。研究证明，动物实验中纳米抗体未引起任何体液和细胞免疫应答。同时，纳米抗体的组织穿透能力强，可进入致密的组织，多余未结合的纳米抗体能够被快速清除，有利于疾病的诊断及治疗。(4)成本低廉，可规模化生产。纳米抗体相对于分子质量小，且结构简单，能被单个基因编码，利用基因工程可在酵母菌、*E. coli* 等微生物中大量表达。

纳米抗体因其特殊的结构性质，兼具了传统抗体和小分子药物的优势，几乎完美地克服了传统抗体的开发周期长，稳定性低，保存条件苛刻等缺陷。这种分子量仅为常规抗体 1/10 的驼源单域抗体逐渐成为新一代抗体诊断及治疗中的新兴力量。因此应用纳米抗体技术研发 CD47 治疗性抗体药物具有广阔的前景。

发明内容

针对上述现有技术，本发明提供了一种针对 CD47 胞外段的单域抗体，同时提供了该单域抗体的编码序列，含有该编码序列的载体、宿主细胞。

本发明是通过以下技术方案实现的：

一种针对 CD47 的单域抗体，为针对 CD47 胞外段的单域抗体，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，由 4 个框架区和 3 个互补决定区组成，其中，4 个框架区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 所示，3 个互补决定区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 所示。互补决定区主要负责抗原的识别，框架区结构相对稳定，主要起着支撑维持蛋白质结构的作用。

一种编码上述单域抗体的核酸，其核苷酸序列为以下序列之一：

- (1) 如 SEQ ID NO. 8 所示的核苷酸序列；
- (2) SEQ ID NO. 8 所示的核苷酸序列添加、取代、缺失或插入一个或若干个核苷酸的序列；
- (3) 在严格条件下，与(1)或(2)的核苷酸序列杂交的核苷酸序列；
- (4) 由于遗传密码子的简并性区别于(1)、(2)、(3)的核苷酸序列的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 1 FR1: QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS。

SEQ ID NO: 2 FR2: WVRQAPGKGLEWVSG。

SEQ ID NO: 3 FR3: YYEDSVKGRFTISRSNAKNTLYLQLNSLKTDDTAMYYC。

SEQ ID NO: 4 FR4: WGQGTQVTSS。

SEQ ID NO: 5 CDR1: GFTFSSYDMS。

SEQ ID NO: 6 CDR2: MNSGGGRT。

SEQ ID NO: 7 CDR3: VTSDFAIY。

SEQ ID NO: 8: cag gtg cag ctg cag gag tct gga gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg
tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc aca ttc agt agc tac gac atg agc tgg gtc
cgc cag gct ccg ggg aag ggg ctc gag tgg gtc tca ggt atg aat agt ggt ggt ggt aga aca
tac tat gaa gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc agg tcc aac gcc aag aac acg ctg
tat ctg caa ctg aac agc ctg aaa act gac gac acg gcc atg tat tac tgt gtc aca tcc gac
ttt gct tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca 。

SEQ ID NO: 9:

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSGMNSGGGRTYYEDSVKGRFTISRNAK
NTLYLQLNSLKTDDTAMYYCVTSDFAYWGQGTQVTSS。

本发明的核苷酸序列或至少部分序列可以通过合适的表达系统进行表达以得到相应的蛋白质或多肽。这些表达系统包括细菌，酵母菌，丝状真菌，动物细胞，昆虫细胞，植物细胞，或无细胞表达系统。

一种表达载体，其包含有上述编码针对 CD47 的单域抗体的核酸。

一种宿主细胞，包含上述表达载体。

所述宿主细胞的受体菌优选大肠杆菌。

所述针对 CD47 的单域抗体在检测 CD47 中的应用，具体应用时，利用本发明的针对 CD47 的单域抗体与 CD47 特异性结合的能力，采用酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，荧光免疫法 (Fluoroimmunoassay, FIA)，免疫芯片法和亲和层析法等进行检测。

所述针对 CD47 的单域抗体在制备检测 CD47 的试剂或试剂盒中的应用；所述检测 CD47 的试剂或试剂盒中含有针对 CD47 的单域抗体。

所述针对 CD47 的单域抗体在制备 CD47 治疗性抗体药物中的应用。

本发明首先合成 CD47 多肽（胞外段），并使其具有免疫原性，然后将 CD47 多肽分子偶联在酶标板上，展示该蛋白的正确空间结构，以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选免疫纳米抗体基因库（骆驼重链抗体噬菌体展示基因库），从而获得了 CD47 特异性的纳米抗体基因，将此基因转至大肠杆菌中，从而建立了能在大肠杆菌中高效表达的纳米抗体株。本发明的针

对 CD47 的单域抗体在研发 CD47 治疗性抗体药物方面具有广阔的应用前景。

附图说明

图 1: CD47 驼源单域抗体文库插入率检测图, 从左到右的条带分别是: 第一道为 DNA 分子标记, 其余孔道为 VHH 插入片段的 PCR 产物 (单域抗体基因片段), 其大小约为 500bp。

图 2: CD47 单域抗体纯化图, 经镍柱树脂凝胶亲和层析纯化后的 SDS-PAGE 的电泳图, 结果显示, CD47 单域抗体经过该纯化过程, 其纯度可达到 90%以上。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

下述实施例中所涉及的仪器、试剂、材料等, 若无特别说明, 均为现有技术中已有的常规仪器、试剂、材料等, 可通过正规商业途径获得。下述实施例中所涉及的实验方法, 检测方法等, 若无特别说明, 均为现有技术中已有的常规实验方法, 检测方法等。

实施例 1 针对于 CD47 的纳米抗体文库的构建

(1) 首先合成 CD47 多肽, 将 1 mg CD47 与弗氏佐剂等体积混合, 免疫一只新疆单峰驼, 每周一次, 共免疫 7 次, 刺激 B 细胞表达抗原特异性的纳米抗体;

(2) 7 次免疫结束后, 抽取 100 mL 骆驼外周血, 分离淋巴细胞并提取总 RNA;

(3) 合成 cDNA 并利用巢式 PCR 扩增 VHH;

(4) 利用限制性内切酶 *Pst*I 及 *Not*I 酶切 16 μ g pCMECS3 噬菌体展示载体及 8 μ g VHH 并连接两个片段;

(5) 将连接产物转化至电转感受态细胞 TG1 中, 构建 CD47 纳米抗体文库并测定库容, 库容大小为 5.85×10^8 CFU; 另外, 对构建文库的插入率进行检测, 随机挑选 24 颗单克隆进行插入片段的 PCR 检测, 判断 VHH 片段的插入率, 结果显示构建文库的插入率达到了 95.8% (如图 1)。

实施例 2 针对 CD47 的纳米抗体筛选过程

(1) 将溶解在 100 mM NaHCO_3 、pH 8.2 中的 20 μ g CD47 偶联在 NUNC 酶标板上, 4°C 放置过夜;

(2) 第二天加入 100 μ L 0.1%BSA, 室温封闭 2h;

(3) 2h 后, 加入 100 μ L 噬菌体 (2×10^{11} 个免疫骆驼单域抗体噬菌体), 室温作用 1h;

(4) 用 PBS+0.05%Tween-20 洗 5 遍, 以洗掉不结合的噬菌体;

(5) 用 100 mM TEA (triethylamine) 将与 CD47 特异性结合的噬菌体洗脱下来, 并感染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1 细胞, 37°C 培养 1h, 产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选,

相同筛选过程重复 3~4 轮，逐步得到富集。

实施例 3 用噬菌体的酶联免疫方法 (ELISA) 筛选特异性单个阳性克隆

(1) 从上述 3~4 轮筛选后含有噬菌体的细胞培养皿中，挑选 96 个单菌落并接种于 1mL 含有 100ug/mL 的氨苄青霉素的 TB 培养基 (1L TB 培养基中含有 2.3g KH_2PO_4 , 12.52g K_2HPO_4 , 12g peptone, 24g yeast extract, 4mL glycerol) 中，生长至对数期后，加终浓度 1mM 的 IPTG, 28℃培养过夜。

(2) 利用渗透法获得粗提抗体，并将抗体转移到经抗原包被的 ELISA 板中，在室温下放置 1h。

(3) 用 PBST 洗去未结合的抗体，加入 mouse anti-HA tag antibody (抗鼠抗 HA 抗体，购自北京康为世纪生物科技有限公司)，在室温下放置 1h。

(4) 用 PBST 洗去未结合的抗体，加入 anti-mouse alkaline phosphatase conjugate (山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记抗体，购自艾美捷科技有限公司)，在室温下放置 1h。

(5) 用 PBST 洗去未结合的抗体，加入碱性磷酸酶显色液，置于酶标仪上，在 405nm 波长，读取吸收值。

(6) 当样品孔 OD 值大于对照孔 OD 值 3 倍以上时，判为阳性克隆。

(7) 将阳性克隆的菌转摇在含有 100ug/mL 的 LA 液体中以便提取质粒并进行测序。

根据序列比对软件 Vector NTI 分析各个克隆株的基因序列，把 CDR3 序列相同的株视为同一克隆株，而其序列不同的菌株视为不同克隆株，其抗体的 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，由 4 个框架区和 3 个互补决定区组成，其中，4 个框架区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 所示，3 个互补决定区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 所示。

实施例 4 纳米抗体在宿主菌大肠杆菌中表达、纯化

(1) 将上述测序分析所获得不同克隆株的质粒电转化到大肠杆菌 WK6 中，并将其涂布在 LA+2%Glcose (即含有氨苄青霉素和葡萄糖) 培养平板上，37℃培养过夜；

(2) 挑选单个菌落接种在 5mL 含有氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃摇床培养过夜；

(3) 接种 1mL 的过夜菌种至 330mL TB 培养液中，37℃摇床培养，培养到 OD 值达到 0.6~0.9 时，加入 IPTG，28℃摇床培养过夜 (约 12-16h)；

(4) 离心，收菌；

(5) 利用渗透法，获得抗体粗提液：用 4mL 高糖溶液 TES 处理细胞 2h，然后 8mL 1/4 TES

处理 2h；离心后取上清液用于后续纯化；

(6) 使用镍柱离子亲和层析的方法纯化单域抗体：蛋白液与镍柱混合反应 1h；10×PBS 洗涤 5 次，含 20mM 咪唑的 PBS 洗涤 2 次，含 50mM 的 PBS 洗涤 1 次，1mL 含 100mM 咪唑的 PBS 洗涤，含 500mM 咪唑的 PBS 洗脱 3 次；收集洗脱的蛋白液，跑胶观察其纯度（图 2 所示），并将其超滤至 1×PBS 中置于-80℃保存。

权利要求书

1. 一种针对 CD47 的单域抗体，其特征在于：其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，由 4 个框架区和 3 个互补决定区组成，其中，4 个框架区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 所示，3 个互补决定区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 所示。
2. 权利要求 1 所述的针对 CD47 的单域抗体在检测 CD47 中的应用。
3. 权利要求 1 所述的针对 CD47 的单域抗体在制备检测 CD47 的试剂或试剂盒中的应用。
4. 权利要求 1 所述的针对 CD47 的单域抗体在制备 CD47 治疗性抗体药物中的应用。
5. 一种编码权利要求 1 所述的单域抗体的核酸，其特征在于：其核苷酸序列为以下序列之一：
 - (1) 如 SEQ ID NO. 8 所示的核苷酸序列；
 - (2) SEQ ID NO. 8 所示的核苷酸序列添加、取代、缺失或插入一个或若干个核苷酸的序列；
 - (3) 在严格条件下，与(1)或(2)的核苷酸序列杂交的核苷酸序列；
 - (4) 由于遗传密码子的简并性区别于(1)、(2)、(3)的核苷酸序列的核苷酸序列。
6. 一种表达载体，其特征在于：其包含有权利要求 4 所述的核酸。
7. 一种宿主细胞，其特征在于：其包含有权利要求 6 所述的表达载体。
8. 根据权利要求 7 所述的宿主细胞，其特征在于：所述宿主细胞的受体菌为大肠杆菌。

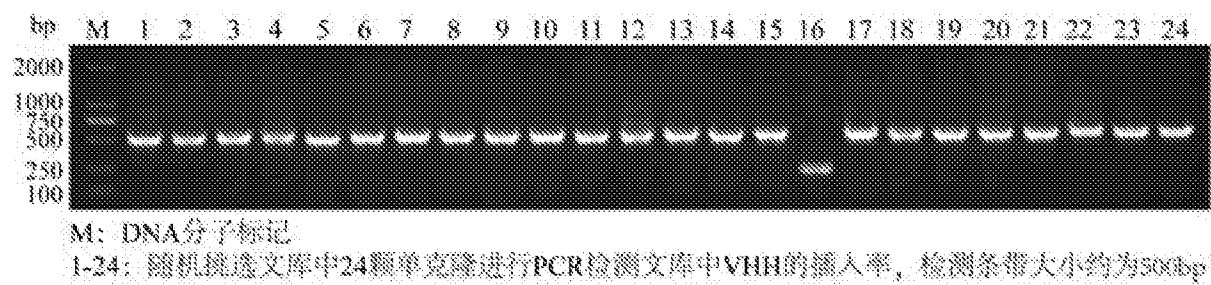


图1 CD47靶源单域抗体文库插入率检测图

图 1

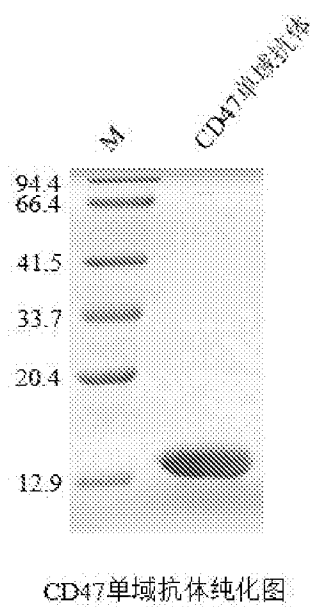


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/083469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; G01N 33/53 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (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)

C07K; C12N; 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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and searched terms: CD47, single domain antibody, nanobody, heavy chain antibody etc. ; GENBANK, EMBL, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched sequences: SEQ ID NOs: 1-9

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2014093678 A2 (FRAZIER WILLIAM A et al.) 19 June 2014 (19.06.2014) see the whole document, especially claims 1-22	1-8
A	CN 104271757 (A INHIBRX LLC) 07 January 2015 (07.01.2015) see the whole document, especially claims 1-33	1-8
A	CN 101133083 A (CHUGAI PHARM CO., LTD.) 27 February 2008 (27.02.2008) see the whole document, especially claims 1-22	1-8
PX	CN 104804093 A (JIANGSU CHUNSHENTANG PHARM CO., LTD.) 29 July 2015 (29.07.2015) claims 1-8	1-8

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

* Special categories of cited documents:	"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
"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	"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
"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)	"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
"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	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 23 August 2016	Date of mailing of the international search report 06 September 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Chen Telephone No. (86-10) 62411100

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/083469

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2014093678 A2	19 June 2014	IL 239339 D0	30 July 2015
		PH 12015501318 A1	24 August 2015
		US 2014363442 A1	11 December 2014
		IL 239339 A	30 July 2015
		AU 2013359167 A1	11 June 2015
		JP 2016501892 A	21 January 2016
		EP 2931751 A2	21 January 2015
		CN 105102479 A	25 November 2015
		CA 2894439 A1	19 June 2014
		US 2015274826 A1	01 January 2015
		EP 2931751 A4	13 July 2016
		SG 11201504469 XA	30 July 2015
		WO 2014093678 A3	27 November 2014
		WO 2015191861 A1	17 December 2015
		KR 20150093770 A	18 August 2015
CN 104271757 A	07 January 2015	MX 2015007446 A	07 December 2015
		CA 2863834 A1	15 August 2013
		CL 2014002086 A1	27 February 2015
		PE 19082014 A1	21 December 2014
		US 2015238604 A1	27 August 2015
		JP 2015508072 A	16 March 2015
		HK 1205195 A1	11 December 2015
		EP 2812443 A4	04 November 2015
		US 9045541 B2	02 June 2015
		AU 2013217114 A1	18 September 2014
		IL 233934 D0	30 September 2014
		CR 20140406 A	10 December 2014
		EP 2812443 A1	17 December 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/083469

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101133083 A	27 February 2008	US 2013224188 A1	29 August 2013
		SG 11201404638 SA	26 September 2014
		KR 20150008049 A	21 January 2015
		MX 2014009427 A	11 May 2015
		WO 2013119714 A1	15 August 2013
		PH 12014501758 A1	10 November 2014
		CO 7111273 A2	10 November 2014
		EA 201400875 A1	30 January 2015
		KR 20060121150 A	28 November 2006
		US 2012156724 A1	21 June 2012
		US 2008107654 A1	08 May 2008
		CA 2545166 A1	19 May 2005
		EP 1693385 A1	23 August 2006
		US 8759025 B2	24 June 2014
		US 8101719 B2	24 January 2012
		JP 4637749 B2	23 February 2011
		AU 2004287722 A1	19 May 2005
		WO 2005044857 A1	19 May 2005
CN 104804093 A	29 July 2015	EP 1693385 A4	04 November 2009
		None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/083469

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(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)

C07K; C12N; 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))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词: CD47, 单域抗体, 纳米抗体, 重链抗体, single domain antibody, nanobody, heavy chain antibody等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 1-9

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	WO 2014093678 A2 (FRAZIER WILLIAM A等) 2014年 6月 19日 (2014 - 06 - 19) 参见全文, 特别是权利要求1-22	1-8
A	CN 104271757 A (印希彼有限责任公司) 2015年 1月 7日 (2015 - 01 - 07) 参见全文, 特别是权利要求1-33	1-8
A	CN 101133083 A (中外制药株式会社) 2008年 2月 27日 (2008 - 02 - 27) 参见全文, 特别是权利要求1-22	1-8
PX	CN 104804093 A (江苏春申堂药业有限公司) 2015年 7月 29日 (2015 - 07 - 29) 权利要求1-8	1-8

☐ 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

2016年 8月 23日

国际检索报告邮寄日期

2016年 9月 6日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

授权官员

李晨

电话号码 (86-10)62411100

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/083469

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)
WO	2014093678	A2	2014年 6月 19日	IL	239339	D0	2015年 7月 30日
				PH	12015501318	A1	2015年 8月 24日
				US	2014363442	A1	2014年 12月 11日
				IL	239339	A	2015年 7月 30日
				AU	2013359167	A1	2015年 6月 11日
				JP	2016501892	A	2016年 1月 21日
				EP	2931751	A2	2015年 10月 21日
				CN	105102479	A	2015年 11月 25日
				CA	2894439	A1	2014年 6月 19日
				US	2015274826	A1	2015年 10月 1日
				EP	2931751	A4	2016年 7月 13日
				SG	11201504469X	A	2015年 7月 30日
				WO	2014093678	A3	2014年 11月 27日
				WO	2015191861	A1	2015年 12月 17日
				KR	20150093770	A	2015年 8月 18日
				MX	2015007446	A	2015年 12月 7日
CN	104271757	A	2015年 1月 7日	CA	2863834	A1	2013年 8月 15日
				CL	2014002086	A1	2015年 2月 27日
				PE	19082014	A1	2014年 12月 21日
				US	2015238604	A1	2015年 8月 27日
				JP	2015508072	A	2015年 3月 16日
				HK	1205195	A1	2015年 12月 11日
				EP	2812443	A4	2015年 11月 4日
				US	9045541	B2	2015年 6月 2日
				AU	2013217114	A1	2014年 9月 18日
				IL	233934	D0	2014年 9月 30日
				CR	20140406	A	2014年 12月 10日
				EP	2812443	A1	2014年 12月 17日
				US	2013224188	A1	2013年 8月 29日
				SG	112014046385	A	2014年 9月 26日
				KR	20150008049	A	2015年 1月 21日
				MX	2014009427	A	2015年 5月 11日
				WO	2013119714	A1	2013年 8月 15日
				PH	12014501758	A1	2014年 11月 10日
CN	101133083	A	2008年 2月 27日	CO	7111273	A2	2014年 11月 10日
				EA	201400875	A1	2015年 1月 30日
				KR	20060121150	A	2006年 11月 28日
				US	2012156724	A1	2012年 6月 21日
				US	2008107654	A1	2008年 5月 8日
				CA	2545166	A1	2005年 5月 19日
				EP	1693385	A1	2006年 8月 23日
				US	8759025	B2	2014年 6月 24日
				US	8101719	B2	2012年 1月 24日
				JP	4637749	B2	2011年 2月 23日
				AU	2004287722	A1	2005年 5月 19日
				WO	2005044857	A1	2005年 5月 19日
CN	104804093	A	2015年 7月 29日	EP	1693385	A4	2009年 11月 4日
				无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)