

(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
2020 年 6 月 18 日 (18.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/119666 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/10 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/42* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 31/16* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/124218

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 10 日 (10.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811526028.3 2018 年 12 月 13 日 (13.12.2018) CN

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 万晓春 (WAN, Xiao Chun); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。李俊鑫 (LI, Jun Xin); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路 99 号楼 2 单元 905, Beijing 100123 (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, 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: ANTI-H7N9 FULLY HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY 3F12, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 及其制法与应用

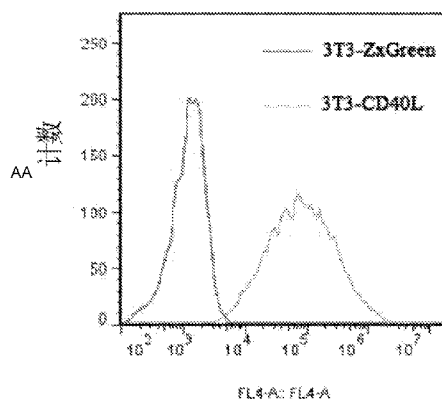


图 1

(57) Abstract: Provided are an anti-H7N9 fully human monoclonal antibody 3F12, a preparation method therefor and use thereof. Said antibody can target hemagglutinin HA binding to H7N9 virus, and has significant neutralization activity against H7N9 viral infection. Said antibody does not produce toxic side effects such as anti-mouse antibody reaction, and has better biocompatibility, being more suitable and more potential to be a macro-molecular drug for treating influenza virus.

(57) 摘要: 提供的是抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 及其制法与应用。所述抗体可靶向结合 H7N9 病毒的血凝素 HA, 具有显著地抗 H7N9 病毒感染的中和活性; 所述抗体不发生抗鼠抗体等毒副作用, 具有更好的生物相容性, 更适合和更有潜力成为治疗流感病毒的大分子药物。

WO 2020/119666 A1

抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 及其制法与应用

技术领域

本申请属于免疫学领域，具体地涉及抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 及其制法
5 与应用。

背景技术

在 2015 年全球十大畅销药中，有 6 个是全人源或人源化单克隆抗体药物。排名第一的是艾伯维公司治疗关节炎的抗 TNF α 单克隆抗体 Humira，这是一个全人源单
10 克隆抗体，已经是连续 3 年销售额 100 亿以上的药王。从 1986 年第一个单克隆抗体药物上市开始，单抗药物经历了鼠源单抗药物（如 Orthoclone OKT3）、嵌合单抗药物（Rituximab）、人源化单抗药物（Herceptin）和全人源单抗药物（Humira）等阶段。由于人体出现抗鼠抗体反应（HAMA），鼠源单抗药物、嵌合单抗药物已经逐渐被淘汰，目前占据市场的单克隆抗体药物全都是人源化单克隆抗体药物。与国际先进的人
15 源抗体生产技术相比，深圳乃至全中国都有很大差距，主要表现在人源抗体药物领域的创新能力薄弱，自主研发的品种少，目前还没有原创人源化单克隆抗体药物上市报道，庞大的抗体药物市场被国外药企占领。我国要改变落后局面，争夺消费潜力巨大的国内外抗体药物市场，亟需攻克全人源单克隆抗体技术。

人源单克隆抗体在治疗炎症、癌症特别是流行性感冒方面具有高特异性的显著疗效。流行性感冒是由流感病毒引起的传染性疾病，严重威胁人类健康。全球每年约有
20 10 亿人受季节性流感病毒感染，其中有 25-50 万人死亡。H7N9 病毒是一种流感病毒，对传统的抗病毒药金刚烷胺(amantadine)和金刚烷乙胺(rimantadine)有耐药性，目前尚没有有效治疗手段。H7N9 病毒在入侵细胞时需要依赖病毒自身表达的特定分子与人细胞上的受体结合，才能感染细胞，并进一步扩增。中和病毒的人源抗体是人 B
25 淋巴细胞产生的某些特异抗体，能够与病毒表面的抗原结合，从而阻止该病毒黏附靶细胞受体，防止病毒侵入细胞，能够高效防治 H7N9 流行性感冒。

发明内容

一方面，本申请涉及抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够中和 H7N9 病毒的生物活性片段。

5 另一方面，本申请涉及编码所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的基因及含该基因的载体或细胞。

另一方面，本申请涉及产生所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 的方法。

另一方面，本申请涉及包含所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的药物组合物。

10 另一方面，本申请涉及本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段或所述药物组合物的应用。

另一方面，本申请涉及一种检测 H7N9 病毒的试剂盒。

附图说明

图 1 为实施例 1 中 NTH-3T3 表达 CD40L 的流式检测结果图。

15 图 2 为实施例 1 中流式细胞仪分选记忆 B 细胞结果图。

图 3 为实施例 1 中 ELISA 实验结果图。

图 4 为实施例 3 中和实验结果图。

具体实施方式

20 为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现对本发明的技术方案进行以下详细说明，但不能理解为对本发明的可实施范围的限定。

一方面，本申请提供抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段，其中，该抗体的重轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 区的氨基酸序列分别如下所示：

25 重链 CDR1:GYIFNSYD

重链 CDR1:MTPDSGDN

重链 CDR3:ANGTADCSSGGSCYTWFD

轻链 CDR1:RALRSYY

轻链 CDR2:GKT

轻链 CDR3:TSRDNSGYHLV。

在一些实施方式中，该抗体的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；和/或

5 该抗体的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

在一些实施方式中，该抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；和/或

10 该抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

经 ELISA 实验验证，本申请所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 可以靶向结合 H7N9 病毒的血凝素 HA，亲和力为 $3.5 \times 10^{-9} \text{M}$ ；在病毒感染细胞模型中，其 IC_{50} 值仅为 14.35uM 左右。本申请所述抗体为全人源性单克隆抗体，相比鼠源抗体，全人源抗体的基因完全来源于人的基因，没有其他种属的成分，在人体内不发生抗鼠抗抗体等毒副作用，具有更好的生物相容性，更适合和更有潜力成为治疗流感病毒的大分子药物。

另一方面，本申请提供编码本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 的基因。在一些实施方式中，所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸的核苷酸序列，在一些实施方式中，该核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；和/或

20 所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸的核苷酸序列，在一些实施方式中，该核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

在一些体实施方式中，所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:6 的氨基酸的核苷酸序列，在一些实施方式中，该核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示；和/或

25 所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸的核苷酸序列，在一些实施方式中，该核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。

本申请 SEQ ID NO:1~8 的序列如序列表所示，其中：

(1) SEQ ID NO:1 中第 76~99 位序列以及 SEQ ID NO:5 中第 124~147 位序列：用于编码重链 CDR1 区序列；

(2) SEQ ID NO:1 中第 151~174 位序列以及 SEQ ID NO:5 中第 199~222 位序列：

用于编码重链 CDR2 区序列；

(3) SEQ ID NO:1 中第 289~345 位序列以及 SEQ ID NO:5 中第 337~393 位序列；

用于编码重链 CDR3 区序列；

(4) SEQ ID NO:3 中第 76~96 位序列以及 SEQ ID NO:7 中第 124~144 位序列；

5 用于编码轻链 CDR1 区序列；

(5) SEQ ID NO:3 中第 148~156 位序列以及 SEQ ID NO:7 中第 196~204 位序列；

用于编码轻链 CDR2 区序列；

(6) SEQ ID NO:3 中第 265~297 位序列以及 SEQ ID NO:7 中第 313~345 位序列；

用于编码轻链 CDR3 区序列；

10 (7) SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:7 中的第 1~48 位序列为用于编码信号肽的序列。

(8) SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:6 中的第 26-33 位氨基酸序列为重链 CDR1 序列；SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:6 中的第 51-58 位氨基酸序列为重链 CDR2 序列；SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:6 中第 97-115 位氨基酸序列为重链 CDR3 序列。

15 (9) SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:8 中的第 26-32 位氨基酸序列为轻链 CDR1 序列；SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:8 中的第 50-52 位氨基酸序列为轻链 CDR2 序列；SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:8 中的第 89-99 位氨基酸序列为轻链 CDR3 序列。

另一方面，本申请提供含如上所述基因的载体。

再一方面，本申请提供含如上所述基因或如上所述载体的细胞。

20 再一方面，本申请提供一种产生所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的方法，该方法包括培养含编码抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 的重轻链的上述基因或上述载体的基因工程细胞或直接培养上述细胞，收集，纯化得所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12。

25 现有技术中存在采用噬菌体展示技术制备抗 H7N9 病毒人源单克隆抗体的方法，尽管该方法具有生产成本低、不经过免疫和细胞融合等繁琐工作的优点，但是其缺点也比较明显，从非免疫抗体库中获得的抗体往往亲和力不足、受外源基因转化率的限制、抗体库的库容量不足以涵盖动物的抗体多样性等。本申请从病人的血液中分离分泌功能抗体的 B 细胞，然后提取 RNA 和合成 cDNA，从中克隆分泌目的抗体的基因，最后重组和表达全人源单克隆抗体。该技术操作简单快捷，生产的人源抗体具有高亲

和力和特异性，此外，可进一步采用改进的从记忆 B 细胞中分离具有中和病毒功能或杀伤肿瘤功能的本申请所述单克隆抗体技术，更是大大减少了繁琐操作和成本。

另一方面，本申请提供一种药物组合物，其包含本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段。

5 另一方面，本申请提供所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段或所述的药物组合物在制备用于治疗由 H7N9 病毒引起的疾病的药物中的应用。

10 另一方面，本申请提供一种检测 H7N9 病毒水平的试剂盒，其含有本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段；在一些实施方式中，所述的试剂盒还含有第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物，以及缓冲液；所述第二抗体例如为抗本申请所述单克隆抗体 3F12 的抗抗体。

与现有技术相比，本申请具有如下有益效果：

15 (1) 本申请所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 可以靶向结合 H7N9 病毒的血凝素 HA，具有显著抗 H7N9 病毒感染的中和活性。

(2) 相比鼠源抗体，本申请全人源抗体的基因完全来源于人的基因，没有其他种属的成分，在人体内不发生抗鼠抗体等毒副作用，具有更好的生物相容性，更适合和更有潜力成为治疗流感病毒的大分子药物。

20 (3) 相较于现有技术提供的噬菌体展示技术制备抗 H7N9 病毒人源单克隆抗体的方法，本申请采用的单个 B 细胞开发抗 H7N9 病毒的抗体具有操作简单快捷，生产的人源抗体具有高亲和力和特异性等优点。

为了对本申请的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现结合具体实施例对本申请的技术方案进行以下详细说明，应理解这些实例仅用于说明本申请而不适用于限制本申请的范围。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条件的
25 实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，或按照仪器制造商所建议的条件。

实施例 1

(1) 构建稳定表达 CD40L 的 NTH-3T3 细胞系 (3T3-CD40L)

利用慢病毒建立 3T3-CD40L 饲养细胞。构建慢病毒表达载体 pLVX-CD40L，转染 293T 细胞，转染第四天收集病毒上清液。活化 NIH-3T3 细胞，培养 3 代后用慢病

毒感染，继续培养并传代 3 次。利用流式细胞仪进行分选 FITC 荧光强度在 MFI 附近的细胞，重新加入至培养瓶中，37℃，5%CO₂ 培养箱中培养和检测，检测结果如图 1 所示，其是将表达 CD40L 的 3T3 细胞和空载体 pLVX(带有 ZxGreen)转染的 3T3 细胞分别用带有 APC 的抗 CD40L 染色，然后上流式细胞仪分析。结果发现，所有 3T3-CD40L 饲养细胞都表达 CD40L。当细胞长到 80%~90%时，消化收集细胞，浓度为每毫升 1×10⁷ 细胞。置于辐射仪中进行 5000 rads 辐射，冻存液重悬细胞，浓度为每毫升 3.5×10⁷ 细胞，分装 1ml 在冷冻小管，液氮冻存（可以保存 2 年）。

(2) 记忆 B 细胞的分选和活化

用淋巴分离液分离和冻存曾经感染 H7N9 病毒的康复病人的 PBMC，每管 10~50×10⁶ 细胞，冻存在液氮罐中。配制 PBMC 流式染色液，其成分如下表 1 所示

表 1 PBMC 流式染色液

抗体	体积 (μL)
CD19-PE-Cy7	0.5
IgM-PE	1.0
IgA-APC	2.5
IgD-FITC	2.5
PBS-1% (wt/vol) BSA	43.5

解冻 PBMC，加入上述 PBMC 流式染色液并在流式细胞仪上分选，结果如图 2 所示，分选出 CD19⁺ IgM⁻ IgA⁻ IgD⁻ 的记忆 B 细胞，细胞纯度需在 90%以上，若低于 90%，重复分选过程。配制激活 B 细胞的混合培养基，如下表 2 所示：

表 2

组分	体积
完全 IMDM 培养基	336 mL
IL-2 (10,000 U mL ⁻¹)	3.5 mL
IL-21 (100 μg mL ⁻¹)	175 μL
步骤 (1) 中得到的 3T3-CD40L	10 mL

将记忆 B 细胞加入到混合培养基中，混匀后有限稀释在 384 孔板，每孔 1 个细胞，体积为 50μl，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中静置培养。13 天后，取上清液进行 ELISA。

(3) 获得人源单克隆抗体 3F12

流感病毒血凝素 HA 是病毒包膜表面柱状抗原，能与人、鸡、豚鼠等多种红细胞受体结合引起红细胞凝集，具有免疫原性，抗血凝素抗体可以中和流感病毒。本发明中，通过 ELISA 发现了能够分泌结合 H7N9 病毒的抗体 3F12 的 B 细胞，其分泌的人源单克隆抗体 3F12 可以靶向结合 H7N9 病毒的血凝素 HA（图 3）。

ELISA 实验具体操作：

(1) 将 100ng/100 μ l 的 H7N9 病毒的 HA 蛋白（购自 ACROBiosystems）包被在 96 孔酶标板中，每孔 100 μ l；

(2) 放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜；

10 (3) 用 PBST 溶液洗涤三遍，每孔加 5%的脱脂奶粉溶液 200 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时；

(4) 用 PBST 溶液洗涤三遍，加 100 μ l 没有感染病毒的正常人血清（阴性对照）或加感染病毒的病人血清或抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12，各三个重复；

(5) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后用 PBST 溶液洗涤三遍；

15 (6) 以 1:5000 稀释带 HRP 的抗人 IgG 抗体（abcam），加入酶标版中，每孔 100 μ l；

(7) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后用 PBST 溶液洗涤三遍；

(8) 每孔加 100 μ l TMB 底物溶液（Thermo Scientific），37 $^{\circ}$ C 5 分钟；

(9) 每孔加终止溶液 2M 硫酸 100 μ l，立刻在酶标仪中 450nm 波长检测吸光值。

20 其结果如图 3 所示，ELISA 实验表明本申请获得的人源单克隆抗体 3F12 可以靶向结合 H7N9 病毒的血凝素 HA。

实施例 2 人源化单克隆抗体 3F12 基因的克隆、重组、表达和纯化

将实施例 1 获得的能够分泌结合 H7N9 病毒的 3F12 抗体的 B 细胞进行裂解，取裂解液进行 RNA 的反转录，获得人源抗体基因的 PCR 模板 cDNA。设计和合成克隆抗体基因的引物，以 cDNA 为模板克隆抗体的重链和轻链的基因，并且重组在真核细胞 293F 或 HEK293 中进行表达和纯化。具体地：

(1) 将裂解后的 B 细胞液转移至 96 孔板（Eppendorf, 030133366）。

(2) 反转录体系：150 ng 随机引物（invitrogen, 48190-011）,0.5 μ l 10mM dNTP(Invitrogen, 18427-088), 1 μ l 0.1 M DTT (Invitrogen, 18080-044), 0.5% v/v Igepal

CA-630 (Sigma, I3021-50ML), 4 U RNAsin (Promega), 6 U Prime RNase Inhibitor (Eppendorf) and 50 U Superscript® III reverse transcriptase (Invitrogen, 18080-044), 补 DEPC 水至 14 µl/well。

(3) 反转录反应程序: 42℃, 10min; 25℃, 10min; 50℃, 60min; 94℃, 5min。

5 (4) cDNA 保存在-20℃。

(5) 引物的设计和合成:

正向引物 5' - 3' 序列 (Forward Primer 5' - 3' sequence)

重链可变区 PCR 引物:

10 5' VH1 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO:9)

5' VH1/5 CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO:10)

5' VH3 CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID NO:11)

15 5' VH3-23 CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG (SEQ ID NO:12)

5' VH4 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID NO:13)

20 5' VH 4-34 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG (SEQ ID NO:14)

5' VH 1-18 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTTCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO:15)

5' VH 1-24 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTCCAGCTGGTACAG (SEQ ID NO:16)

25 5' VH3-33 CTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID NO:17)

5' VH 3-9 CTGCAACCGGTGTACATTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID NO:18)

30 5' VH4-39 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID NO:19)

5' VH 6-1 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG (SEQ

ID NO:20)

3' JH 1/2/4/5 TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG (SEQ ID NO:21)

3' JH 3 TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG (SEQ ID NO:22)

3' JH 6 TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG (SEQ ID NO:23)
κ 轻链可变区 PCR 产物

5' Vκ 1-5 CTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC (SEQ ID NO:24)

5' Vκ 1-9 TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGACATCCAGTTGACCC AGTCT (SEQ ID NO:25)

5' Vκ 1D-43 CTGCAACCGGTGTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC (SEQ ID NO:26)

5' Vκ 2-24 CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC (SEQ ID NO:27)

5' Vκ 2-28 CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC (SEQ ID NO:28)

5' Vκ 2-30 CTGCAACCGGTGTACATGGGGATGTTGTGATGACTCAGTC (SEQ ID NO:29)

5' Vκ 3-11 TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACACAGTC (SEQ ID NO:30)

5' Vκ 3-15 CTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATAGTGATGACGCAGTC (SEQ ID NO:31)

5' Vκ 3-20 TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACG CAGTCT (SEQ ID NO:32)

5' Vκ 4-1 CTGCAACCGGTGTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC (SEQ ID NO:33)

3' Jκ 1/4 GCCACCGTACGTTTGATYTCCACCTTGGTC (SEQ ID NO:34)

3' Jκ 2 GCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC (SEQ ID NO:35)

3' Jκ 3 GCCACCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTC (SEQ ID NO:36)

3' Jk 5 GCCACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC (SEQ ID NO:37)

(6) 用 KOD-Plus-Neo (TOYOBO, KOD401) 试剂盒 PCR 分别扩增抗体基因的重链和轻链, 40μL 体系: 3.5μL cDNA, 20 nM 混合引物, 4μL 缓冲液 (buffer), 4μL 2mM dNTPs, 2.4μL MgSO₄, 1μL KOD。

5 (7) 反应程序: 94℃, 2min; 45 个循环: 98℃, 10s; 58℃, 30s; 68℃, 28s。

(8) 对扩增产物进行琼脂糖凝胶, 结果发现, 抗体轻链大小为 327bp, 重链大小是 375bp。

(9) 抗体基因重链可变区 PCR 产物测序结果如 SEQ ID NO:1 所示序列, 其相应的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示序列。抗体基因轻链可变区 PCR 产物测序结果如
10 SEQ ID NO:3 所示序列, 其相应的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示序列。

依据所得重轻链可变区序列, 设计并委托 Invitrogen 公司合成抗体基因重链全长 H 基因, 其带有 BamH1/EcoR1 双酶切位点; 及抗体基因轻链全长 L 基因, 其带有 Not1/Xho1 双酶切位点。

(10) 将 H 基因和 pcDNA3.1 分别进行 BamH1/EcoR1 双酶切后相连, 形成
15 pcDNA3.1-H 载体。

(11) 将 L 基因和 pcDNA3.1 分别进行 Not1/Xho1 双酶切后相连, 形成 pcDNA3.1-L 载体。

(12) 培养 293F 细胞。

(13) 20μg pcDNA3.1-H (该 H 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示) 载体
20 和 10μg pcDNA3.1-L (该 L 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示) 载体共转染 293F 细胞, 培养 96 小时。

(14) 取上清液进行 ELISA (ABC 是上清液, DEF 是阳性对照, GH 是阴性对照); ELISA 具体的实验步骤如前所述, ELISA 实验结果如下表 3 和图 3 所示:

表 3

数据	450nm	数据	450nm
A	2.311	E	1.185
B	2.781	F	1.201
C	2.056	G	0.0675
D	1.114	H	0.0554

由表 3 和图 3 数据可知：上清液中含有能够结合 H7N9 病毒的抗体。

(15) 纯化过程，具体地，全人源单克隆抗体 3F12 的纯化过程为：

(a) 200 μ g pcDNA3.1-L 载体和 100 μ g pcDNA3.1-H 载体共转染 300ml 293F 细胞，培养 96 小时。

5 (b) 收集上清液，加入 proteinA 亲和层析柱，用 10 倍 PBS 清洗，加入 2ml pH3.0, 0.1M 甘氨酸收集抗体。收集管中加入 100 μ l 中和缓冲液 (1M Tri-HCL)，以便及时中和洗脱所得抗体液的 pH 值。

(c) 在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中透析，透析完后，近期用的存放在 4 $^{\circ}$ C，长期储存在 -20 $^{\circ}$ C。共获得 500 μ g 3F12 纯抗体，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

10

实施例 3 纯化后的全人源单克隆抗体 3F12 的中和实验及抗体亲和力实验

(1) 实验目的

使用病毒感染细胞模型(犬肾细胞 MDCK)，通过微量中和-ELISA 实验评价 3F12 抗体对 H7N9 流感病毒的抑制作用和效果，检测抗体抗流感病毒活性。

15

(2) 实验步骤

(2.1) 细胞铺板

胰酶消化对数生长期 MDCK 犬肾细胞，终止后离心收集，吹散均匀，制备单细胞悬液；用细胞培养液将细胞浓度调整至 5×10^4 个/ml，接种于 96 孔细胞培养板，细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。

20

(2.2) 3F12 抗体与 H7N9 病毒 (该病毒 A/Anhui/1/2013 取自于中国科学院微生物研究所) 预处理

3F12 抗体设立 10 个浓度梯度，依次为 10^{-10} 倍稀释，各组各浓度均设 3 个平行孔。

25 (2.3) 病毒感染

弃步骤 (2.1) 培养的细胞培养上清，PBS 洗 3 遍。将预混的抗体-病毒混合液 (以 10^2 μ g/ml 的 3F12 单克隆抗体依次以 10^{-10} 倍稀释，将每个浓度的 3F12 抗体分别与等体积的 100 TCID₅₀ 病毒混合得该混合液)。加入 96 孔细胞培养板，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，吸弃混合液，PBS 洗 2 遍。

(2.4) 配置维持液

用无血清 DMEM 中加入终浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 TPCK-胰蛋白酶 (TPCK-Trypsin) (维持液)。弃去 96 孔板中的 PBS, 每孔加入 100 μl 维持液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培养箱培养 20 h。

5 (2.5) 中和实验-ELISA 法

(2.5.1) 弃去微量培养板中的维持液;

(2.5.2) 100 μl PBS 洗细胞一次;

(2.5.3) 弃去 PBS (不要让细胞干燥), 加入 50 μl /孔固定液 (体积比为丙酮: 无水乙醇=2: 3);

10 (2.5.4) 覆盖微量培养板, 于室温固定细胞 10 min;

(2.5.5) 弃去固定液, 用 100 μl PBS 液洗涤细胞, 重复洗涤 3 次 (轻轻晃动, 避免强烈清洗), 以去除残余的丙酮。

(2.5.6) 用 5 %脱脂奶粉于室温封闭细胞 1 h, 用 100 μl PBS 液洗涤细胞 1 次;

(2.5.7) 用 PBS 1: 2000 稀释 1 抗 (商购抗 H7N9 的 NP 单克隆抗体) 每孔加入
15 稀释后的 50 μl , 室温作用 1 小时。

(2.5.8) 用 100 μl PBST 洗板 5 次以除去 1 抗;

(2.5.9) 用 PBS 1:2000 稀释 2 抗 (带 HRP 的抗鼠 IgG 抗体), 每孔加入 50 μl , 室温作用 1 小时。

(2.5.10) 用 100 μl PBST 洗涤板 6 次以除去 2 抗。

20 (2.5.11) 每孔加 TMB 显色液 50 μl 。

(2.5.12) 室温避光放 10 分钟左右显色后, 每孔加 2M 盐酸 50 μl 终止反应。

(2.5.13) 在 ELISA 测定仪上 (450 纳米) 读出每孔 OD 值。

(3) 统计分析

使用 GraphPad Prism 6.0.1 对数据进行分析并绘制剂量-效应曲线, 并计算 IC_{50} 。

25 抑制率计算公式:

抑制率 = $[(\text{OD}_{\text{病毒孔}} - \text{OD}_{\text{阴性细胞对照孔}}) - (\text{OD}_{\text{药物孔}} - \text{OD}_{\text{阴性细胞对照孔}})] / (\text{OD}_{\text{病毒孔}} - \text{OD}_{\text{阴性细胞对照孔}}) \times 100\%$ 。

所得结构如图 4 所示, 从图 4 中可以看出 3F12 的 IC_{50} =14.35 $\mu\text{g/ml}$ 。

从实施例 3 可以看出, 本申请 3F12 对 H7N9 有良好的 IC_{50} 值, 证明 3F12 的中

和病毒能力好。

本申请对比了 2016 年 05 年 10 日向中国国家知识产权局递交的，申请号为“201610303416.X”，发明名称为“抗 H7N9 全人源单克隆抗体 2L11 及其制法与应用”中的单克隆抗体 2L11，及 2016 年 05 月 03 日向中国国家知识产权局递交的，申请号为“201610288358.8”，发明名称为“抗 H7N9 全人源单克隆抗体 2J17 及其制法与应用”中的单克隆抗体 2J17。本申请 3F12 中和活性的 IC_{50} 为 14.35 ug/ml，而 2L11 及 2J17 抗体没有中和活性。

抗体亲和力检测：

亲和力检测的仪器为 PALL 的 Fortebio。配制 200 μ l 50 μ g/ml 3F12 抗体，结合 proteinA 传感器 120 秒，HA 抗原配制 100nM、50nM、2.5nM、12.5nM 和、6.25nM 和 0nM 浓度溶液，结合抗体 120 秒，解离时间为 5 分钟，显示 3F12 对 H7N9 病毒有较高亲和力， $KD=3.5\times 10^{-9}M$ 。

最后说明的是：以上实施例仅用于说明本申请的实施过程和特点，而非限制本申请的技术方案，尽管参照上述实施例对本申请进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解：依然可以对本申请进行修改或者等同替换，而不脱离本申请的精神和范围的任何修改或局部替换，均应涵盖在本申请的保护范围当中。

权利要求书

1. 抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段，其中，该抗体的重轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 区的氨基酸序列分别如下所示：

重链 CDR1:GYIFNSYD；

5 重链 CDR1:MTPDSGDN；

重链 CDR3:ANGTADCSSGGSCYTWFD；

轻链 CDR1:RALRSYY；

轻链 CDR2:GKT；

轻链 CDR3:TSRDNSGYHLV。

10 2. 根据权利要求 1 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段，其中，该抗体的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；和/或

该抗体的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，或 SEQ ID NO:4 所示序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；

15 优选地，该抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，或 SEQ ID NO:6 所示序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；和/或

该抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示，或 SEQ ID NO:8 所示序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

20 3. 编码权利要求 1 或 2 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的基因；优选地，所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸的核苷酸序列，更优选地，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；和/或

25 所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸的核苷酸序列，优选地，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

4. 根据权利要求 3 所述的基因，其中，所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸的核苷酸序列，优选地，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示；

和/或

所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸的核苷酸序列，优选地，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。

5. 一种载体，其含有权利要求 3 或 4 所述基因。

5 6. 一种细胞，其含有权利要求 3 或 4 所述基因、或含有权利要求 5 所述载体。

7. 一种产生权利要求 1 或 2 所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的方法，该方法包括：培养含编码抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 的重轻链的权利要求 3 或 4 所述的基因、或权利要求 5 所述的载体的基因工程细胞，或直接培养权利要求 6 所述的细胞；收集，纯化得
10 所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12。

8. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 或 2 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段。

9. 权利要求 1 或 2 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段、或权利要求 8 所述的药物组合物在制备
15 用于治疗由 H7N9 病毒引起的疾病的药物中的应用。

10. 一种检测 H7N9 病毒水平的试剂盒，其含有权利要求 1 或 2 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 3F12 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段；优选地，所述的试剂盒还含有：第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物，以及缓冲液；优选地，所述第二抗体为抗权利要求 1 或 2 所述单克隆抗体 3F12 的抗
20 抗体。

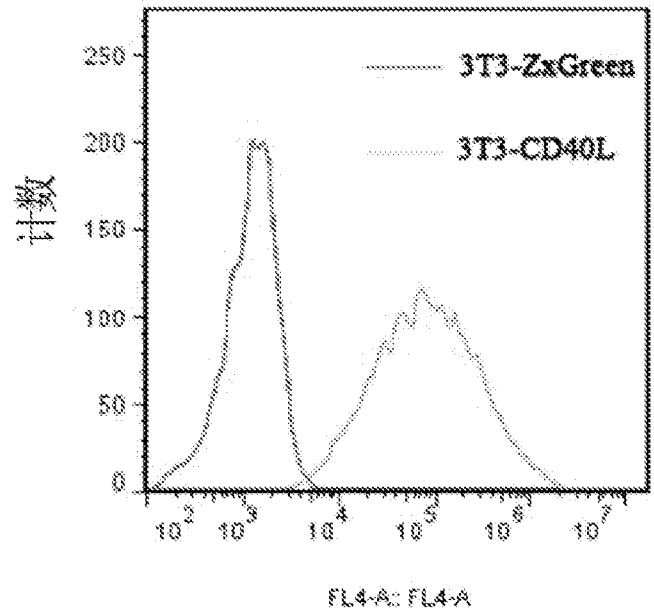


图 1

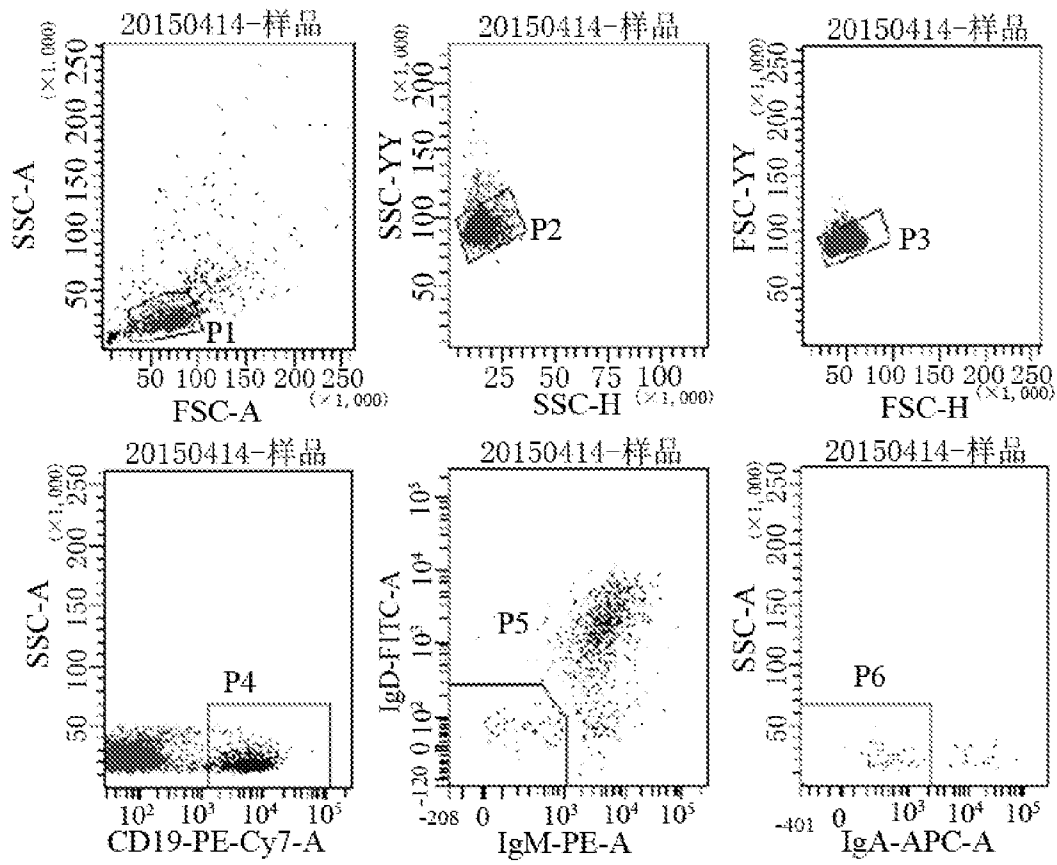


图 2

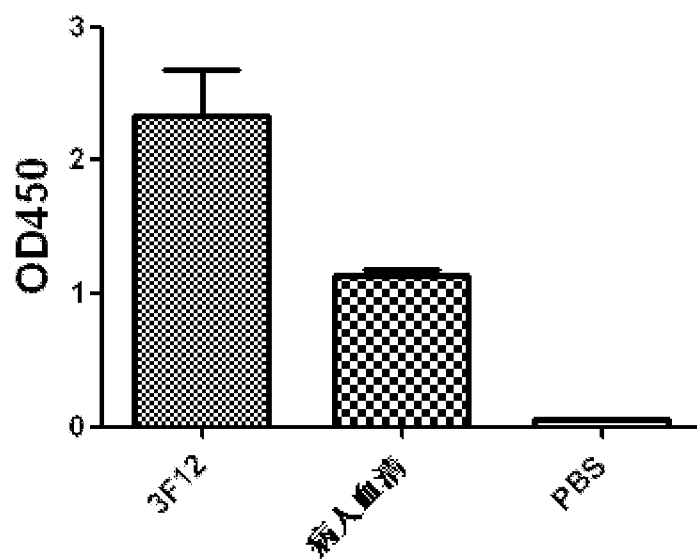


图 3

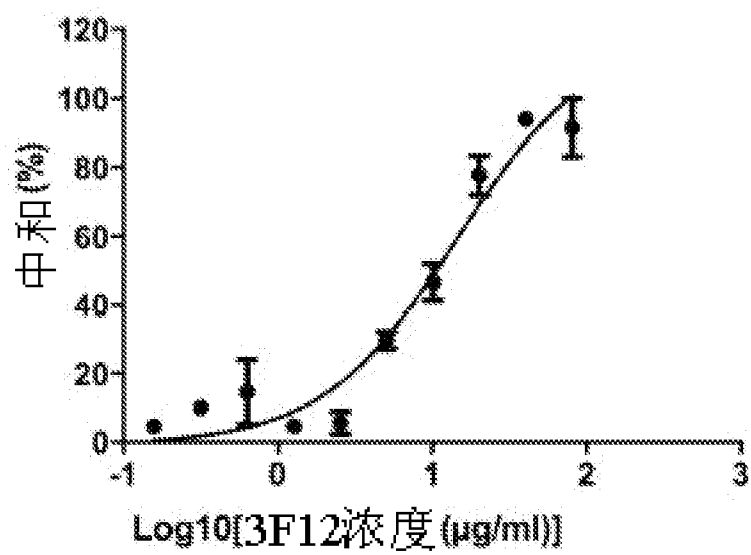


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/124218

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i; A61K 39/42(2006.01)i; A61P 31/16(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; G01N; 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, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI Web of Science and Search Terms: 流感, influenza, H7N9, antibody, humanized, etc.; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System and Searched Sequence: 权利要求1-4中涉及的序列, Sequence related in claims 1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107337732 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES; SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 10 November 2017 (2017-11-10) claims 1-10	1-10
A	CN 107353340 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 17 November 2017 (2017-11-17) claims 1-10	1-10
A	WO 2016100615 A2 (THE UNIVERSITY OF CHICAGO) 23 June 2016 (2016-06-23) claims 1-50	1-10



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

12 February 2020

Date of mailing of the international search report

13 March 2020

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/CN2019/124218

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/124218

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **1-10**
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:
 - [1] Claims 1-3 and 7-10 relate to term “biologically active fragment derived from the monoclonal antibody capable of specifically binding to H7N9”, wherein the term “derived from” leads not to clearly determine the specific sequence of the obtained biologically active fragment, for example, biologically active fragment may contain additional amino acid substitutions, missing addition, etc., which makes the scope of claims 1-10 unclear, and therefore claims 1-10 do not meet the requirements set out in PCT Rule 6. Such ambiguity prevents meaningful searches of claims. The search for claims 1-10 will be carried out on the basis of the subject matter that is reasonably expected to be modified, i.e., the claim subject matter that does not contain the expression above.
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/CN2019/124218

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107337732	A	10 November 2017	None			
CN	107353340	A	17 November 2017	None			
WO	2016100615	A2	23 June 2016	US	10357563	B2	23 July 2019
				US	2017360931	A1	21 December 2017
				WO	2016100615	A3	18 August 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/124218

A. 主题的分类

C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i; A61K 39/42(2006.01)i; A61P 31/16(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; G01N; 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, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI Web of Science和关键词: 流感, influenza, H7N9, antibody, humanized, 等; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: 权利要求1-4中涉及的序列

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	CN 107337732 A (中国科学院深圳先进技术研究院 深圳先进技术研究院) 2017年 11月 10日 (2017 - 11 - 10) 权利要求1-10	1-10
A	CN 107353340 A (深圳先进技术研究院) 2017年 11月 17日 (2017 - 11 - 17) 权利要求1-10	1-10
A	WO 2016100615 A2 (UNIV CHICAGO) 2016年 6月 23日 (2016 - 06 - 23) 权利要求1-50	1-10

☐ 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

“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

2020年 2月 12日

国际检索报告邮寄日期

2020年 3月 13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

杨振宇

电话号码 86-(10)-62412204

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1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：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 1-10
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：
[1] 权利要求1-3和7-10涉及用语“来源于该单克隆抗体的能够特异性结合H7N9的生物活性片段”，其中“来源于”一词导致无法清楚地确定所得到的生物活性片段的具体序列，例如其可能包含额外的氨基酸取代、缺失添加等，导致权利要求1-10的范围不清楚，不符合PCT条约第6条的规定。这种不清楚使得无法对权利要求进行有意义的检索。针对权利要求1-10的检索将针对合理预期修改的主题进行，即，不含有该表述的权利要求主题。
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/CN2019/124218

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	107337732	A	2017年 11月 10日	无			
CN	107353340	A	2017年 11月 17日	无			
WO	2016100615	A2	2016年 6月 23日	US	10357563	B2	2019年 7月 23日
				US	2017360931	A1	2017年 12月 21日
				WO	2016100615	A3	2016年 8月 18日