

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-510427

(P2020-510427A)

(43) 公表日 令和2年4月9日(2020.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/81 (2006.01)	C 1 2 N 15/81 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-546906 (P2019-546906)
 (86) (22) 出願日 平成30年2月14日 (2018.2.14)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年8月27日 (2019.8.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2018/076847
 (87) 国際公開番号 WO2018/161798
 (87) 国際公開日 平成30年9月13日 (2018.9.13)
 (31) 優先権主張番号 201710130518.0
 (32) 優先日 平成29年3月7日 (2017.3.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

(71) 出願人 512320009
 北京東方百泰生物科技有限公司
 BEIJING DONGFANG BIOTECH CO. LTD.
 中華人民共和国北京市▲経▼▲済▼技▲術
 ▼▲開▼▲発▼区▲栄▼京▲東▼街2号1
 幢406室
 Room 406, Building 1
 , No. 2 Rongjing East
 Road, Beijing Economic-Technological
 Development Area, Beijing 100176, CHINA
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】改良型抗VEGFR-2モノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、生物医薬品の技術分野に属し、改良型抗VEGFR-2モノクローナル抗体及びその応用を提供する。本発明は、コンピュータ支援シミュレーション設計により、新たなファージ・ディスプレイ抗体ライブラリを設計し、複数回スクリーニングして改良型抗VEGFR-2モノクローナル抗体を取得する。前記抗体の親和力及び生物学的活性がいずれも原の抗体より高く、体外でVEGFR-2とその配位子VEGFRとの結合を効果的に阻害でき、腫瘍及び黄斑変性症などの新生児血管による疾患の治療に用いられる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可変領域のアミノ酸配列が SEQ NO. 1、SEQ NO. 2 又は SEQ NO. 3 のうちのいずれか 1 種を含む軽鎖と、可変領域のアミノ酸配列が SEQ NO. 4 を含む重鎖と、を含むことを特徴とする抗 VEGFR - 2 モノクローナル抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の上記軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域を含む抗体、ポリペプチド又はタンパク質。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域のアミノ酸配列を含むポリヌクレオチド配列又は組み合わせ。

10

【請求項 4】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチド配列又は組み合わせを含む組換え DNA 発現ベクターであって、前記組換え DNA 発現ベクターの DNA 配列は、抗 VEGFR - 2 抗体の前記重鎖の可変領域、重鎖の定常領域、前記軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードするアミノ酸配列を含む組換え DNA 発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の組換え DNA 発現ベクターが導入される宿主細胞であって、哺乳動物細胞、昆虫細胞、大腸菌又はイーストを含み、好ましくは哺乳動物細胞を含み、さらに好ましくは HEK 293E 細胞、CHO 細胞又は NS0 細胞を含む宿主細胞。

20

【請求項 6】

重鎖の定常領域は、ヒトの IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4 又はマウスの IgG 1、IgG 2a、IgG 2b から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域を含む全長抗体及び抗 T1h モノクローナル抗体断片であって、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 又は ScFv を含むがそれらに限定されない断片。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域のアミノ酸配列を含む一本鎖抗体、単ドメイン抗体、二重特異抗体、抗体薬物複合体及びキメラ抗原受容体 T 細胞免疫治療法。

30

【請求項 9】

請求項 1 に記載の軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域を含むモノクローナル抗体、人工ベクター、薬物又は薬物組成物。

【請求項 10】

完全ヒト型であることを特徴とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域を含む検出試薬又は検出キット。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域を含む抗体の使用であって、腫瘍及び黄斑変性症を含む、新生血管による疾患を治療するために用いられる使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物製薬の技術分野に関し、具体的には改良型抗 VEGFR - 2 モノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍の増殖が新生血管の形成に依存することは、腫瘍生物学において既に徹底的に研究

50

されている。血管新生が酸素、栄養物質、成長因子、ホルモン及びタンパク質分解酵素を提供でき、それにより腫瘍細胞の遠い所への拡散及び転移を促進し、腫瘍の増殖及び悪化を加速する。血管新生は、非常に複雑な動的過程であり、多くの血管新生促進分子/抑制分子によって調節される。血管新生のスイッチは、血管新生促進が血管新生抑制を超えたという悪性マーカーであると考えられる。VEGF/VEGFR軸が多重シグナル・ネットワークを活性化し、上皮細胞の生存、有糸分裂、転移及び分化、血管浸透を引き起こし、VEGF及びその受容体は、正常と病的血管新生において中枢作用を発揮している。ヒトの様々な癌症には、増加した腫瘍血管新生作用及び腫瘍の血管新生促進因子の発現が腫瘍の等級付け及び悪性であるか否かに関連することが証明されている。

【0003】

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は、血管透過性因子とも呼ばれ、内皮細胞の特異的有糸分裂源であり、有効な血管形成と透過性誘導因子でもあり、既に鑑定された対応する受容体がVEGFR-1(Flt-1、FMS様チロシナーゼ1)、VEGFR-2(KDR/Flk-1とも呼ばれ、キナーゼ挿入ドメイン含有受容体、胎児肝キナーゼ-1)、VEGFR-3(Flt4)、神経フィブリン-1(neuropilin-1)、神経フィブリン-2である。VEGFR-2は、血管内皮細胞の主要なVEGF受容体であり、糖タンパク質であり、その細胞外ドメインに7つの免疫グロブリン様領域(配位体結合ドメイン及び受容体二量化ドメインを含む)が含まれ、細胞内にチロシナーゼ触媒用ドメインが挿入され、主に内皮細胞に発現し、その他は、例えば巨核球、網膜前駆細胞、間葉系幹細胞、黒色腫細胞、脳腫瘍及び一部の白血病細胞などに発見する。VEGF及びVEGFR-2受容体は、重要な血管内皮細胞特異的因子シグナル伝達経路の分子として腫瘍新生血管の新生に関与し、VEGFの主要な生物学的機能がいずれもVEGFR-2により実現され、VEGFR-2とVEGFとが結合した後に二量化され、そしてVEGFR-2細胞内のチロシン残基自体がリン酸化され、それにより活性化されて細胞膜/細胞質キナーゼ・カスケード反応シグナルを細胞核に伝達し、血管内皮細胞の増殖、生存、細胞骨格の再配列、細胞の遊走及び遺伝子発現などを含む内皮細胞の一連の変化を発生させ、最終的に血管増殖を引き起こすことが可能である。

【0004】

VEGF/VEGFR2シグナル経路が腫瘍の発生進行において重要な役割を果たすため、VEGF/VEGFR2のシグナル経路に対処する薬物が多くあり、例えば、抗VEGF抗体であるベバシズマブ及び抗VEGFR-2抗体であるラムシルマブである。

【0005】

抗体は、生物医薬品の中で技術含有量が最も高く、難易度が最も大きい薬物であり、2012年から、全世界で販売量のトップ10の単剤のうちの6つが抗体系薬物であり、したがって、抗体系薬物の潜在的な市場が非常に大きい。抗体薬物スクリーニングにおいて最も一般的に応用される技術は、ファージ・ディスプレイ抗体ライブラリ技術であり、ファージ・ディスプレイ抗体ライブラリ技術は、ファージ・ディスプレイ技術から開発した遺伝子抗体工事の新たな技術であり、異なる物種の全ての抗体の可変領域遺伝子を含む遺伝子ライブラリを、ファージ表面にディスプレイされるタンパク質ライブラリに変換でき、モノクローナル抗体を体外でより容易に、迅速に、高効率に製造できるだけでなく、モノクローナル抗体のヒト化の新たなアプローチを開拓し、ヒト・モノクローナル抗体の製造の開発を促進する。弊社の特許番号CN103333247Bの特許は、コンピュータ支援設計及びファージ・ディスプレイ抗体ライブラリ技術によりスクリーニングして得られた一連の抗VEGFR-2抗体であり、抗VEGFR-2抗体薬物を取得するための基礎を定めている。弊社は、さらなる研究において、上記特許に係る抗体が親和力及び生物学的活性などの面においてさらに改善する可能性があることを見付けて、これを基に、我々は、従来の研究に基づき、上記抗体を改良することによって最適化させた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

10

20

30

40

50

本発明は、改良型抗 V E G F R - 2 モノクローナル抗体を提供し、本発明は、中国特許 C N 1 0 3 3 3 3 2 4 7 B に係る親和力が最も高い 2 つの抗体をテンプレートとして、コンピュータ支援シミュレーション設計を行い、新たなファージ・ディスプレイ抗体ライブラリを設計し、そして複数回スクリーニングして、親和力も生物学的活性も原の特許に係る抗体より高い新たな抗 V E G F R - 2 モノクローナル抗体を取得した。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記目的を達成するため、本発明は、

可変領域のアミノ酸配列が S E Q N O . 1、S E Q N O . 2 又は S E Q N O . 3 のうちのいずれか 1 種を含む軽鎖と、可変領域のアミノ酸配列が S E Q N O . 4 を含む重鎖と、を含む改良型抗 V E G F R - 2 モノクローナル抗体を提供する。

10

【0008】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む抗体、ポリペプチド又はタンパク質を提供する。

【0009】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域のアミノ酸配列を含むポリヌクレオチド配列又は組み合わせを提供する。

【0010】

本発明はさらに、上記ポリヌクレオチド配列又は組み合わせを含む組換え D N A 発現ベクターであって、前記組換え D N A 発現ベクターの D N A 配列は、抗 V E G F R - 2 抗体の上記重鎖の可変領域、重鎖の定常領域、前記軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードするアミノ酸配列を含む組換え D N A 発現ベクターを提供する。

20

【0011】

本発明はさらに、上記組換え D N A 発現ベクターが導入される宿主細胞であって、哺乳動物細胞、昆虫細胞、大腸菌又はイーストを含み、好ましくは哺乳動物細胞を含み、さらに好ましくは H E K 2 9 3 E 細胞、C H O 細胞又は N S 0 細胞を含む宿主細胞を提供する。

【0012】

ここで、本発明の重鎖の定常領域は、ヒトの I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 又はマウスの I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b から選択される。

30

【0013】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む全長抗体及び抗 T 1 h モノクローナル抗体断片であって、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v 又は S c F v を含むがそれらに限定されない断片を提供する。

【0014】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域のアミノ酸配列を含む一本鎖抗体、単ドメイン抗体、二重特異抗体、抗体薬物複合体及びキメラ抗原受容体 T 細胞免疫治療法を提供する。

【0015】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含むモノクローナル抗体、人工ベクター、薬物又は薬物組成物を提供する。

40

【0016】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む検出試薬又は検出キットを提供する。

【0017】

前記抗体は、新生血管による疾患を治療するために用いられ、前記疾患は、腫瘍及び黄斑変性症を含むが、それらに限定されない。

【0018】

前記 S c F v は、単鎖抗体 (s i n g l e - c h a i n f r a g m e n t v a r i a b l e) であり、前記 H E K 2 9 3 E 細胞は、ヒト胎児腎 2 9 3 E 細胞 (h u m a n

50

embryonic kidney 293E cell) であり、CHO細胞は、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(chinese hamster ovary cell) であり、NS0細胞は、マウスNS0胸腺腫瘍細胞である。

【発明の効果】

【0019】

従来技術に比べて、本発明は以下の利点を有する。

本発明に係る抗VEGFR-2モノクローナル抗体は、高い親和力を有し、体外でVEGFR-2とその配位子VEGFとの結合を効果的に抑制でき、体外で良好な生物学的活性を有し、開発において大きな将来性がある。

本発明に係る抗VEGFR-2モノクローナル抗体は、腫瘍新生血管の新生による疾患を治療するために用いられ、前記疾患は、非小細胞肺癌、転移性非小細胞肺癌、神経膠腫、結腸直腸癌、肝細胞癌、転移性肝細胞癌、HER2陰性の転移性乳癌、転移性胃腺癌、転移性結腸直腸癌、転移性黒色腫、転移性腎細胞癌などの癌症及び黄斑変性症を含むが、それらに限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】 pScFvDisb-Sプラスミドのプロファイルである。

【図2】 階段的ELISAによる抗VEGFR-2単鎖抗体の相対的親和力の比較である。

【図3】 タンパク質発現pTSEプラスミドのプロファイルである。

【図4】 抗VEGFR-2モノクローナル抗体とKDRとの結合能力の比較である。

【図5】 本発明の抗体と細胞表面のVEGFR-2との結合状況である。

【図6】 本発明の抗体のヒト臍帯静脈内皮細胞HUEC増殖に対する抑制作用である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の詳細な実施方法について実施例を参照するが、実施例に記載する実験方法及び試薬は、特別に説明がない限りいずれも一般的な実験方法及び試薬である。以下の実施例は、単に本発明を説明し解釈するのみで、本発明を何ら制限するものではない。

【0022】

本発明は、

可変領域のアミノ酸配列がSEQ NO. 1、SEQ NO. 2又はSEQ NO. 3のうちのいずれか1種を含む軽鎖と、可変領域のアミノ酸配列がSEQ NO. 4を含む重鎖と、を含む改良型抗VEGFR-2モノクローナル抗体を提供する。

【0023】

SEQ NO. 1 (VEGFR-2軽鎖可変領域の配列1) は、DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQAIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYEGSNLNTGVP SRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDFAVYFCQQAKSFPPTFGGGTKVDIKであり、

SEQ NO. 2 (VEGFR-2軽鎖可変領域の配列2) は、DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASDAIDQWLGWYQQKPGKAPKLLIYEA SNLDTGVP SRFSGSGSGTDFTLTIS SLQANQFAVYFCQQAKSFPPTFGGGTKVDIKであり、

SEQ NO. 3 (VEGFR-2軽鎖可変領域の配列3) は、DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDQWLGWYQQKPGKAPKLLIYEGSNLNTGVP SRFSGSGSGTDFTLTIS SLQANQFAVYFCQQAKSFPPTFGGGTKVDIKであり、

SEQ NO. 4 (VEGFR-2重鎖可変領域の配列1) は、QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASAFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARVTD AFDLWGQGTMTVTVSSである。

【0024】

好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域を含む抗体、ポリペプチド又はタンパク質を提供する。

【0025】

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域のアミノ酸配列を含むポリヌクレオチド配列又は組み合わせを提供する。

【0026】

より好ましくは、本発明はさらに、上記ポリヌクレオチド配列又は組み合わせを含む組換えDNA発現ベクターであって、前記組換えDNA発現ベクターのDNA配列は、抗VEGFR-2抗体の上記重鎖の可変領域、重鎖の定常領域、前記軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードするアミノ酸配列を含む。

10

【0027】

より好ましくは、本発明はさらに、上記組換えDNA発現ベクターが導入される宿主細胞であって、哺乳動物細胞、昆虫細胞、大腸菌又はイーストを含み、好ましくは哺乳動物細胞を含み、さらに好ましくはHEK293E細胞、CHO細胞又はNS0細胞を含む宿主細胞を提供する。

【0028】

より好ましくは、本発明の重鎖の定常領域は、ヒトのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4又はマウスのIgG1、IgG2a、IgG2bから選択される。

【0029】

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む全長抗体及び抗T1hモノクローナル抗体断片であって、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv又はScFvを含むがそれらに限定されない断片を提供する。

20

【0030】

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域のアミノ酸配列を含む一本鎖抗体、単ドメイン抗体、二重特異抗体、抗体薬物複合体及びキメラ抗原受容体T細胞免疫治療法を提供する。

【0031】

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含むモノクローナル抗体、人工ベクター、薬物又は薬物組成物を提供する。

30

【0032】

より好ましくは、前記モノクローナル抗体は、完全ヒト型である。

【0033】

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む検出試薬又は検出キットを提供する。

【0034】

より好ましくは、前記抗体は、新生血管による疾患を治療するために用いられ、前記疾患は、非小細胞肺癌、転移性非小細胞肺癌、神経膠腫、結腸直腸癌、肝細胞癌、転移性肝細胞癌、HER2陰性の転移性乳癌、転移性胃腺癌、転移性結腸直腸癌、転移性黒色腫、転移性腎細胞癌などの癌症及び黄斑変性症を含むがそれらに限定されない。

40

【実施例】

【0035】

以下、図面及び実施例を参照しながら、本発明を詳細に説明する。

実施例1、抗VEGFR-2単鎖抗体のバイオパンニング

一連の遺伝子クローン方法でpCom3ベクター(中国プラスミド・ベクター細菌株細胞株遺伝子保存センターから購入される)を改造して、それをファージ単鎖抗体ライブラリの構築及び発現に用いる。改造されたベクターはpScFvDisb-Sと名付けられ、そのプラスミド・プロファイルを図1に示すとおりであり、このベクターを基礎として、特許CN10333247Bに係る抗体配列に基づく新たな全合成ファージ・ディスプレイ抗体ライブラリを構築する。

50

【0036】

VEGFR-2細胞外ドメインを抗原として免疫チューブを被覆し、抗原の被覆量を2ug/500ul/チューブとし、4で一晚被覆する。次に4%の脱脂粉乳/PBSTでそれぞれ免疫チューブ及び全合成ファージ・ディスプレイ抗体ライブラリを密封し、常温で1時間密封する。密封したファージ・ディスプレイ抗体ライブラリを免疫チューブ内に入れて抗原と抗体とを結合させ、ファージの添加量を約 $10^9 - 10^{12}$ 個とし、室温で1時間反応させる。PBST-PBSで複数回洗浄して結合していないファージを除去し、0.1MのPH2.2のグリシンで溶出させ、1.5MのPH8.8のTris-HClで、溶出したファージ抗体溶液をPH7.0程度まで中和させる。

【0037】

上記中和させたファージで、対数期に増殖した10mlのTG1細菌溶液を感染させ、37のインキュベータ内で30min静置し、一部の細菌溶液を取り出して段階的に希釈し、2YTAGプレートにコーティングし、ファージの生産量を計算する。残りの細菌溶液を遠心分離して上清を除去し、沈殿された菌体を少量の培地に再懸濁してから、吸い出して2YTAG大きなプレートにコーティングし、次のスクリーニングのために用意する。

【0038】

上記感染してプレートにコーティングされた菌体を大きなプレートから掻き落とし、2YTAG液体培地に植菌し、対数期になるまで揺動してM13補助ファージを添加して重複感染させ、28で一晚培養してファージを増殖させ、PEG6000-NaClでファージを沈降させ精製して次のスクリーニングのために用意する。合計3回のファージライブラリ富化スクリーニングを行う。

【0039】

実施例2、抗VEGFR-2ファージ単鎖抗体陽性クローンの測定

3回スクリーニングした後、上手く分離しているモノクローナル・コロニーを選び出し、2YTAG液体培地が添加された96ウェルのディープ・ウェル・プレートに接種し、37で220rpmで対数増殖期になるまで培養し、各ウェルに約 10^{10} 個の補助ファージM13KO7を添加し、37で30分間静止感染させる。4000rpmで、4で15分間遠心分離し、上清を捨て、菌体を2YTA再懸濁して沈殿させ、28で、220rpmで一晩培養する。ファージを含む上清を吸い取ってELISA測定を行い、同じベクター及び同様な構築方法によるCN10333247Bの生物学的抗体配列(重鎖は、CN10333247Bの配列No.3であり、軽鎖は、CN10333247Bの配列No.9である)のファージを陽性対照(O-1と名付けられた)とする。スクリーニングして親和力の高いモノクローナル抗体N-1、N-2及びN-3を得て、遺伝子配列測定により元の特許CN10333247Bにおける配列と異なると決定した。

【0040】

実施例3、段階的希釈ファージELISAによる抗VEGFR-2単鎖抗体の相対的親和力の比較

実施例2で得られたクローンに対してモノクローナル・ファージのディスプレイ及び精製を行い、ファージ段階的希釈ELISA実験を行って親和力を測定した。

【0041】

PH9.6の炭酸塩緩衝液でVEGFR-2細胞外ドメインを被覆し、20ng/ウェル/100ulとし、4で一晚被覆する。PBSTで3回洗浄し、4%のmilk-PBSTで37で1時間密封する。純粋化されたファージを4%のmilk-PBSTで5倍段階的に希釈し、各ウェルに100ulの希釈されサンプルを添加し、常温で1時間静置する。PBSTでELISAプレートを洗浄し、4%のmilk-PBSTで希釈されたHRP-anti-M13モノクローナル抗体をELISAプレート内に添加し、常温で1h静置する。TMB発色キットで発色し、室温で10分間発色する。2MのH₂SO₄で終了した後、450nm/630nmで数値を読取る。結果を図2に示し、スクリーニングされた3株の異なる単鎖抗体は、いずれもVEGFR-2と特異的に結合でき、

10

20

30

40

50

かつ結合能力がいずれも O - 1 より高い。

【 0 0 4 2 】

実施例 4、抗 K D R 全抗体の作製

上記 3 つの抗体 N - 1、N - 2 及び N - 3 の重鎖 V H 及び軽鎖 k 遺伝子をそれぞれ重鎖及び軽鎖定常領域遺伝子を備えたベクター p T S E (図 3 を参照)、ヒト I g G 1 の定常領域 (S E Q . 5 を参照) 及び k 鎖の定常領域 (S E Q . 6 を参照) をコードする p T S E ベクター (p T S E ベクターは図 3 に示され、作製過程は C N 1 0 3 5 2 5 8 6 8 A 明細書の第 3 ページの第 [0 0 1 9] 段落を参照) にクローンする。

【 0 0 4 3 】

S E Q N O . 5 (ヒト I g G 1 の定常領域の配列) は、 A S T K G P S V F P L A P
S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F
P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K
G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L
T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G であり、

10

S E Q N O . 6 (k 鎖の定常領域の配列) は、 R T V A A P S V F I F P P S D E Q
L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
V T K S F N R G E C であり、

20

【 0 0 4 4 】

H E K 2 9 3 E 細胞に一過的に導入し、全抗体発現を行う。 A K T A 器械 p r o t e i n A 親和性カラムを用いて精製して全抗体タンパク質を取得する。 B C A キットを用いてタンパク質の濃度を測定する。

【 0 0 4 5 】

実施例 5、全抗体と V E G F R 2 細胞外ドメインとの結合実験

p H 9 . 6 の炭酸塩緩衝液で V E G F R 細胞外ドメインを被覆し、 2 0 n g / ウェル /
1 0 0 u l とし、 4 ° で一晚被覆する。 3 0 0 u l / ウェルの P B S T で 3 回洗浄し、次
に 4 % の m i l k - P B S T を添加して 3 7 ° で 1 h 密封する。異なる希釈度のビオチン
で標識された全抗体を添加した。ヒト I g G (h I g G) をアイソタイプ対照としながら
、様々な全抗体の最大濃度が 1 0 0 n g / m l であり、 5 倍で 8 段階希釈して、 3 7 ° で
2 - 3 h 保育する。 3 0 0 u l / ウェルの P B S T で 5 回洗浄し、次に 4 % の m i l k -
P B S T で 1 : 1 0 0 0 0 に希釈されたストレプトアビジンを添加して 3 7 ° で 1 h 保育
する。 3 0 0 u l / ウェルの P B S T で 8 回洗浄し、 T M B 発色キットで発色させ、 1 0
0 u l / ウェルとし、室温で 1 0 m i n 発色させ、次に 2 M の H ₂ S O ₄ で終了する。 4
5 0 n m / 6 3 0 n m で数値を読取る。実験結果は、図 4 に示すように、全ての抗体は、
いずれも細胞表面の K D R 分子と上手く結合でき、そのうち N 3 の親和力が比較的が高く、
N - 1、N - 2、N - 3 はいずれも従来の O - 1 より高い。

30

40

【 0 0 4 6 】

実施例 6、全抗体と細胞表面 V E G F R 2 との結合特異性についての分析

本発明は V E G F R - 2 が過剰発現した C H O 細胞を用いて異なる二重特異抗体と細胞
表面 E G F R との結合状況を検出し、ヒト I g G (h I g G) をアイソタイプ対照とする
。 0 . 2 5 % のパンクレアチンで細胞を消化して、遠心分離して収集する。同時に様々な
抗体を希釈し、最高濃度を 1 0 0 n M とし、 4 倍段階的に希釈する。収集した細胞を P B
S + 1 % の B S A で 3 回洗浄し、次に P B S + 1 % の B S A で細胞を再懸濁し、その後
に 1 × 1 0 ⁵ 個の細胞 / ウェルで細胞を 9 6 ウェルのプレート内に敷き広げ、 1 0 0 u l の
希釈された二重特異的抗体を添加し、常温で 1 時間保育し、遠心分離して上清を除去し、
P B S で細胞を 3 回洗浄し、次に希釈された A l e x a 4 8 8 で標識された抗ヒト I g G

50

FC抗体で細胞を再懸濁し、常温で1時間遮光保育し、PBSで3回洗浄し、さらに100ulのPBSで再懸濁し、フロー・サイト・メトリーで蛍光強度を検出する。結果をGraphpad Prismで分析する。結果によれば、N3は、細胞が発現したVEGFR-2とより上手く結合でき、N1、N2、N3の結合能力は、いずれもO-1より強い(図5を参照)。

【0047】

実施例7、全抗体がHUVEC細胞増殖を抑制する実験

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、既に血管内皮細胞の増殖、細胞シグナル経路及び様々な腫瘍発生メカニズムの研究に広く応用され、本発明では異なる抗VEGFR-2抗体がHUVEC細胞の増殖に対する抑制作用を研究した。HUVEC細胞が存在率80%まで増殖すると、5%のFBSを含む新鮮なEGM培地と交換し、6時間後にパンクレアチンで消化し、さらに無血清培地で消化された細胞を4-5回洗浄し、遠心分離した際に培地をできるだけ完全に捨て、細胞を再懸濁してカウントし、5000個の細胞/ウェルで96ウェル・プレートに接種し(但し、96ウェル・プレートのふちウェルを接種せず)、100ulの無血清培地/ウェルとし、一晚飢餓する。14-16時間後に上清を吸い取り、最終濃度が100ng/mlになるまで50ulのVEGF/ECM(200ng/ml)を添加し、異なる濃度の異なる抗体と均一に混合してから24時間培養する。その後、CKK-8を添加し、細胞の増殖状況を検出する。結果によれば、N1、N2及びN3のIC₅₀(ng/L)は、それぞれ12.76、17.32及び10.53であり、O-1のIC₅₀(ng/L)は、18.59であり、N1、N2、N3の血管内皮細胞増殖の抑制能力はいずれもO-1より高く、そのうちN3が最もよい(図6を参照)。実施例5~7を組み合わせて分かるように、N1、N2、N3は、分子的にも細胞学的にも、結果がいずれも元の特許CN103525868Aの最適な抗体O-1より優れ、これは本願の候補の分子が開発及び応用においてより大きな将来性を有することを意味する。

【0048】

本発明の上記抗体は、新生血管による疾患を治療するために用いられ、前記疾患は、非小細胞肺癌、転移性非小細胞肺癌、神経膠腫、結腸直腸癌、肝細胞癌、転移性肝細胞癌、HER2陰性の転移性乳癌、転移性胃腺癌、転移性結腸直腸癌、転移性黒色腫、転移性腎細胞癌などの癌症及び黄斑変性症を含むがそれらに限定されない。

【0049】

当業者に対しては、具体的には実施例は、単に本発明を例示的に説明するのみで、明らかに本発明の具体的な実現が上記方式に制限されず、本発明の方法の構想及び技術的解決手段を用いて行った様々な非実質的な改良、又は本発明の構想及び技術的解決手段を改良せず、他の場面に直接的に応用することは、いずれも本発明の保護の範囲内にある。

10

20

30

【 図 1 】

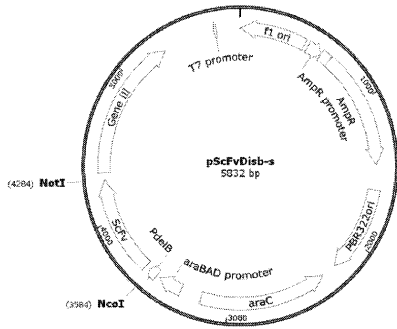


图 1

【 図 3 】

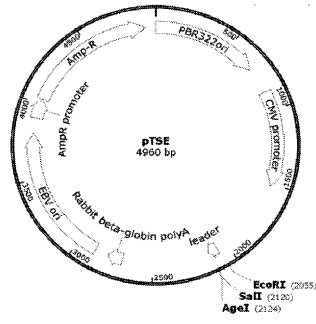


图 3

【 図 2 】

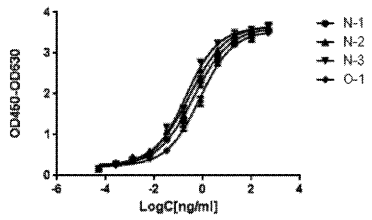


图 2

【 図 4 】

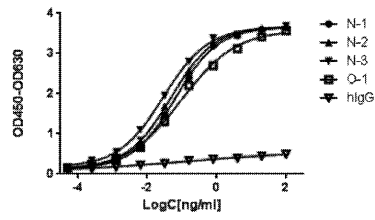


图 4

【 図 5 】

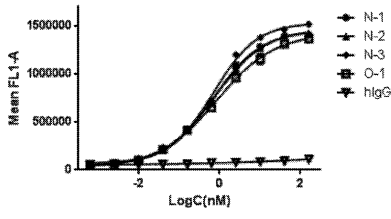


图 5

【 図 6 】

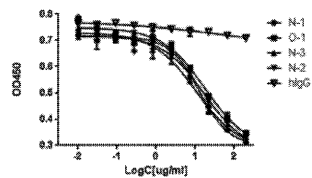


图 6

【配列表】

2020510427000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年8月27日(2019.8.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

上記目的を達成するため、本発明は、
 可変領域のアミノ酸配列が SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 又は SEQ ID NO:3 のうちのいずれか1種を含む軽鎖と、可変領域のアミノ酸配列が SEQ ID NO:4 を含む重鎖と、を含む改良型抗VEGFR-2モノクローナル抗体を提供する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域のアミノ酸配列を コードするポリヌクレオチド配列 を提供する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明はさらに、上記ポリヌクレオチド配列又は組み合わせを含む組換えDNA発現ベクターであって、前記組換えDNA発現ベクターは、抗VEGFR-2抗体の上記重鎖の可変領域、重鎖の定常領域、前記軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードする DNA配列を含む組換えDNA発現ベクター を提供する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む全長抗体 提供する

。本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む断片 であって、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv又はScFvを含むがそれらに限定されない断片を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

本発明は、

可変領域のアミノ酸配列が SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 又は SEQ ID NO:3 のうちのいずれか 1 種を含む軽鎖と、可変領域のアミノ酸配列が SEQ ID NO:4 を含む重鎖と、を含む改良型抗 VEGFR - 2 モノクローナル抗体を提供する。

SEQ ID NO:1 (VEGFR - 2 軽鎖可変領域の配列 1) は、DIQMTQSPSSVSAASIGDRVTITCRASQAIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYEGSNLNTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDFAVYFCQQA KSF PPTFGGGTKVDIK であり、

SEQ ID NO:2 (VEGFR - 2 軽鎖可変領域の配列 2) は、DIQMTQSPSSVSAASIGDRVTITCRASDAIDQWLGWYQQKPGKAPKLLIYEASNLDTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSSLQANQFAVYFCQQA KSF PPTFGGGTKVDIK であり、

SEQ ID NO:3 (VEGFR - 2 軽鎖可変領域の配列 3) は、DIQMTQSPSSVSAASIGDRVTITCRASQGIDQWLGWYQQKPGKAPKLLIYEGSNLNTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSSLQANQFAVYFCQQA KSF PPTFGGGTKVDIK であり、

SEQ ID NO:4 (VEGFR - 2 重鎖可変領域の配列 1) は、QVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASAF TFS SYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARVTD AFDLWGQGTMTVTVSS である。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は重鎖の可変領域のアミノ酸配列を コードするポリヌクレオチド配列を提供する。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

より好ましくは、本発明はさらに、上記ポリヌクレオチド配列又は組み合わせを含む組換え DNA 発現ベクターであって、前記組換え DNA 発現 ベクターは、抗 VEGFR - 2 抗体の上記重鎖の可変領域、重鎖の定常領域、前記軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域を コードする DNA 配列を含む。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む 全長抗体を提供する。

より好ましくは、本発明はさらに、上記軽鎖の可変領域又は上記重鎖の可変領域を含む断片であって、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 又は ScFv を含むがそれらに限定されない断片を提供する。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

実施例 4、抗 K D R 全抗体の作製

上記 3 つの抗体 N - 1、N - 2 及び N - 3 の重鎖 V H 及び軽鎖 k 遺伝子をそれぞれ重鎖及び軽鎖定常領域遺伝子を備えたベクター p T S E (図 3 を参照)、ヒト I g G 1 の定常領域 (SEQ ID NO: 5 を参照) 及び k 鎖の定常領域 (SEQ ID NO: 6 を参照) をコードする p T S E ベクター (p T S E ベクターは図 3 に示され、作製過程は C N 1 0 3 5 2 5 8 6 8 A 明細書の第 3 ページの第 [0 0 1 9] 段落を参照) にクローンする。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0043】

SEQ ID NO: 5 (ヒト I g G 1 の定常領域の配列) は、A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G であり、

SEQ ID NO: 6 (k 鎖の定常領域の配列) は、R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C であり、

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

実施例 6、全抗体と細胞表面 V E G F R 2 との結合特異性についての分析

本発明は V E G F R - 2 が過剰発現した C H O 細胞を用いて異なる全抗体と細胞表面 V E G F R - 2 との結合状況を検出し、ヒト I g G (h I g G) をアイソタイプ対照とする。0.25% のパンクレアチンで細胞を消化して、遠心分離して収集する。同時に様々な抗体を希釈し、最高濃度を 100 n M とし、4 倍段階的に希釈する。収集した細胞を P B S + 1 % の B S A で 3 回洗浄し、次に P B S + 1 % の B S A で細胞を再懸濁し、その後 1 × 10⁵ 個の細胞 / ウェルで細胞を 96 ウェルのプレート内に敷き広げ、100 u l の希釈された全抗体を添加し、常温で 1 時間保育し、遠心分離して上清を除去し、P B S で細胞を 3 回洗浄し、次に希釈された A l e x a 4 8 8 で標識された抗ヒト I g G F C 抗体で細胞を再懸濁し、常温で 1 時間遮光保育し、P B S で 3 回洗浄し、さらに 100 u l の P B S で再懸濁し、フロー・サイト・メトリーで蛍光強度を検出する。結果を G r a p

h p a d P r i s mで分析する。結果によれば、N 3は、細胞が発現したV E G F R - 2とより上手く結合でき、N 1、N 2、N 3の結合能力は、いずれもO - 1より強い(図5を参照)。

【手続補正12】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2又はSEQ ID NO:3のうちのいずれか1種を含む軽鎖可変領域と、SEQ ID NO:4を含む重鎖可変領域と、を含むことを特徴とする抗VEGFR-2モノクローナル抗体。

【請求項2】

重鎖の定常領域は、ヒトのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4又はマウスのIgG1、IgG2a、IgG2bから選択されることを特徴とする、請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体。

【請求項3】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域を含むポリペプチド又はタンパク質。

【請求項4】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。

【請求項5】

請求項4に記載のポリヌクレオチド配列を含む組換えDNA発現ベクターであって、前記組換えDNA発現ベクター、抗VEGFR-2抗体の前記重鎖可変領域、重鎖の定常領域、前記軽鎖可変領域及び軽鎖の定常領域をコードするDNA配列を含む組換えDNA発現ベクター。

【請求項6】

請求項5に記載の組換えDNA発現ベクターが導入される宿主細胞であって、哺乳動物細胞、昆虫細胞、大腸菌又はイーストを含み、好ましくは哺乳動物細胞を含み、さらに好ましくはHEK293E細胞、CHO細胞又はNS0細胞を含む宿主細胞。

【請求項7】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体を含む全長抗体。

【請求項8】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体を含む断片であって、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv又はScFvを含むがそれらに限定されない断片。

【請求項9】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域を含む二重特異抗体又は抗体薬物複合体。

【請求項10】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域を含む人工ベクター、薬物又は薬物組成物。

【請求項11】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域を含む検出試薬又は検出キット。

【請求項12】

請求項1に記載の抗VEGFR-2モノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域を含む抗体の使用であって、腫瘍及び黄斑変性症を含む、新生血管による疾患を治療す

るために用いられる使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/076847

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.: 8, 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv)—a surgery method or treatment method for treating the human body or animal body. The subject matter which might reasonably be expected with respect to said claims are: “claim 8. a single chain antibody, single domain antibody, bispecific antibody and antibody drug conjugate which contain an amino acid sequence of the light chain variable region or heavy chain variable region as claimed in claim 1” and “claim 12. a use of an antibody which contains the light chain variable region or heavy chain variable region as claimed in claim 1 for preparing drugs for treating diseases caused by angiogenesis, the diseases containing tumour and macular degeneration”.
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 membersInternational application No.
PCT/CN2018/076847

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103333247 A	02 October 2013	CN 103333247 B	08 October 2014
CN 103012589 A	03 April 2013	CN 103012589 B	16 July 2014
CN 106674349 A	17 May 2017	CN 106674349 B	13 March 2018
CN 103965355 A	06 August 2014	None	
CN 105646710 A	08 June 2016	None	
CN 103965356 A	06 August 2014	None	

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2018/076847
A. 主题的分类 C07K 16/22(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 27/02(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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: 血管内皮细胞生长因子, 血管通透因子, VEGF, VPF, 受体, VEGFR, VEGFR-2, KDR, Flk-1, 激酶插入嵌合受体, 胎肝激酶-1, Flt-1, VEGFR-1, FMS样酪氨酸激酶1, VEGFR-3, Flt4, 神经纤维蛋白-1, 神经纤维蛋白-2, 噬菌体抗体库, 噬菌体展示, 抗体, vascular endothelial growth factor, vascular permeability factor, receptor, kinase insert domain-containing receptor, fetel liver kinase-1, fms-like tyrosine kinase-1, neuropilin-1, neuropilin-2, phage antibody library, phage display, antibody等。中国专利生物序列检索系统: Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-6。		
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
Y	CN 103333247 A (北京东方百泰生物科技有限公司等) 2013年 10月 2日 (2013-10-02) 见权利要求1-12, 序列表	1-12
Y	CN 103012589 A (上海赛伦生物技术有限公司等) 2013年 4月 3日 (2013-04-03) 见说明书第1页第2段、第4页第27段, 权利要求14-17	1-12
PX	CN 106674349 A (北京东方百泰生物科技有限公司) 2017年 5月 17日 (2017-05-17) 见全文	1-12
A	CN 103965355 A (中国医学科学院基础医学研究所) 2014年 8月 6日 (2014-08-06) 见全文	1-12
A	CN 105646710 A (四川科伦药物研究院有限公司) 2016年 6月 8日 (2016-06-08) 见全文	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 2018年 5月 3日		国际检索报告邮寄日期 2018年 5月 22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		受权官员 王颖 电话号码 86-(10)-62412197

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/076847

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 103965356 A (中国医学科学院基础医学研究所) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 见全文	1-12

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/076847

第1栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)
<p>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:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> 作为国际申请的一部分提交的:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> 附件C/ST. 25文本文件形式</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 纸件或图形文件形式</p> <p>b. <input type="checkbox"/> 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:</p> <p>c. <input type="checkbox"/> 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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。</p> <p>3. 补充意见:</p>	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/076847

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： 8、12
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的外科方法或治疗方法。对上述权利要求合理预期的主题为：“权利要求8. 一种包含如权利要求1所述的轻链可变区或重链可变区的氨基酸序列的单链抗体、单域抗体、双特异抗体和抗体药物偶联物”和“权利要求12. 一种包含权利要求1所述的轻链可变区或重链可变区的抗体在制备治疗新生血管引起的疾病的药物中的应用，所述疾病包含肿瘤和黄斑变性”。
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/CN2018/076847

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	103333247	A	2013年 10月 2日	CN 103333247 B	2014年 10月 8日
CN	103012589	A	2013年 4月 3日	CN 103012589 B	2014年 7月 16日
CN	106674349	A	2017年 5月 17日	CN 106674349 B	2018年 3月 13日
CN	103965355	A	2014年 8月 6日	无	
CN	105646710	A	2016年 6月 8日	无	
CN	103965356	A	2014年 8月 6日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2016年1月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	V
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573	A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 白 義

中華人民共和国100176北京市北京 経 済 技 術 開 発 区 栄 京 東 街 2
号1幢406室

(72)発明者 谷 香果

中華人民共和国100176北京市北京 経 済 技 術 開 発 区 栄 京 東 街 2
号1幢406室

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA05 DA14
4B065 AA91X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 CC10 CC27 EE41 EE59 FF68
4C085 AA14 AA25 BB11 BB36 BB41 BB43 CC01 CC04 CC05 CC07
CC08 CC23 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 CA41 DA76 EA23 EA28 EA50 EA51 FA72
FA74 GA26

专利名称(译)	改良的抗Vegfr-2单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2020510427A	公开(公告)日	2020-04-09
申请号	JP2019546906	申请日	2018-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	北京东方百泰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京东方百泰生物科技有限公司		
发明人	白 ▲義▼ 谷 香果		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/81 C12N15/85 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/63 A61P35/00 A61P27/02 A61K39/395 A61K47/68 G01N33/53 G01N33/573 C07K16/28 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/22 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/56 G01N33/577		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/81.Z C12N15/85.Z C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/63.Z A61P35/00 A61P27/02 A61K39/395.N A61K47/68 G01N33/53.V G01N33/573.A C07K16/28 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC10 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF68 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/BB11 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC01 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	201710130518.0 2017-03-07 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请属于生物医学技术领域，提供了一种改良的抗血管内皮生长因子受体2 (VEGFR-2) 单克隆抗体及其应用。通过计算机辅助仿真设计，设计了新颖的噬菌体抗体库，经过多轮筛选获得了改良的抗VEGFR-2单克隆抗体。抗体的亲和力和生物学活性均高于原始抗体。该抗体能够在体外有效地抑制VEGFR-2及其配体血管内皮生长因子 (VEGF) 的组合，并且可以用于治疗由黄斑变性等血管生成引起的肿瘤和疾病。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2020-510427 (P2020-510427A) (43) 公表日 令和2年4月9日 (2020. 4. 9)
(51) Int. Cl. C12N 15/13 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)	FI C12N 15/13 ZNA C12N 15/81 Z C12N 15/85 Z C12N 1/19 C12N 1/21	テームコード (参考) 4B064 4B065 4C076 4C085 4H045
(21) 出願番号 特願2019-546906 (P2019-546906)	(71) 出願人 512320009 北京東方百泰生物科技有限公司 BEIJING DONGFANG BIOTECH CO. LTD. 中華人民共和國北京市▲経▼▲研▼技▲術▼▲開▼▲発▼区▲崇▼文▼東▼街2号1幢406室 Room 406, Building 1, No. 2 Rongjing East Road, Beijing Economic-Technological Development Area, Beijing 100176, CHINA	
(86) (22) 出願日 平成30年2月14日 (2018. 2. 14)		
(85) 翻訳文提出日 令和1年8月27日 (2019. 8. 27)		
(86) 国際出願番号 PCT/CN2018/076847		
(87) 国際公開番号 W02018/161798		
(87) 国際公開日 平成30年9月13日 (2018. 9. 13)		
(31) 優先権主張番号 201710130518.0		
(32) 優先日 平成29年3月7日 (2017. 3. 7)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)		
(74) 代理人 100108453 弁理士 村山 勇彦		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良型抗 VEGFR-2 モノクローナル抗体