

(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
2011 年 9 月 1 日 (01.09.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/103702 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/000513
- (22) 国际申请日: 2010 年 4 月 16 日 (16.04.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010125263.7 2010 年 2 月 25 日 (25.02.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 百迈博药业有限公司 (BIOMAB PHARMACEUTICALS LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙尖沙咀广东路 30 号新港中心第一座 511 室, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王淑蕙 (WANG, Shuhui) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙尖沙咀广东路 30 号新港中心第一座 511 室, Hong Kong (CN)。李川 (LI, Chuan) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙尖沙咀广东路 30 号新港中心第一座 511 室, Hong Kong (CN)。阙颖 (KAN, Ying) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙尖沙咀广东路 30 号新港中心第一座 511 室, Hong Kong (CN)。仝昕 (TONG, Xin) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙尖沙咀广东路 30 号新港中心第一座 511 室, Hong Kong (CN)。
- (74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司 (LECOMTE INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 B16 层, Beijing 100098 (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 根据细则 4.17 的声明:
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
 - 发明人资格(细则 4.17(iv))
- 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: FULLY HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY TO VEGF, PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种全人源抗 VEGF 单克隆抗体、其制备方法及其用途

(57) Abstract: Provided is a fully human monoclonal antibody to VEGF, the preparation method and use thereof. The fully human monoclonal antibody to VEGF is obtained by using the antibody phage display technology, which has higher antibody affinity and stronger capacity for inhibiting tumor cell proliferation in comparison with humanized antibody bevacizumab, and can be used for preparing the anti-tumor drug.

(57) 摘要:

提供了一种全人源抗 VEGF 单克隆抗体、其制备方法和用途。该全人源抗 VEGF 单克隆抗体是通过利用抗体噬菌体展示技术得到的, 与人源化抗体 bevacizumab 相比具有更高的抗体亲和力, 更强的抑制肿瘤细胞增殖的能力, 可用于抗肿瘤药物的制备。

WO 2011/103702 A1

一种全人源抗 VEGF 单克隆抗体、其制备方法及用途

技术领域

本发明涉及生物技术领域，更具体地，本发明公开了一种全人源单克隆
5 抗体、其制备方法及用途。

背景技术

肿瘤尤其是恶性肿瘤是当今世界严重危害人类健康的疾病，在各种疾病所
致死亡中高居第二位。而且近年来，其发病率呈明显上升趋势。恶性肿瘤治疗
10 效果差，晚期转移率高，预后多不佳。目前临床上所采用的常规治疗方法如放、
化疗和手术治疗虽然在很大程度上缓解了病痛，延长了生存时间，但这些方法
均存在很大的局限性，其疗效难以进一步提高。

肿瘤的生长有两个明显不同的阶段，即从无血管的缓慢生长期转为有血管
的快速增殖期，血管的生成使肿瘤能获得足够的营养而完成血管切换期，如果
15 没有血管的生成，原发肿瘤的生长不超过 1-2mm，转移则无法实现。血管内
皮生长因子(VEGF)是一类能促进内皮细胞分裂增殖、促进新生血管的形成、
提高血管通透性的生长因子，它与细胞表面的血管内皮生长因子受体结合，通
过激活酪氨酸激酶信号转导途径发挥功能。在肿瘤组织中，肿瘤细胞、肿瘤侵
入的巨噬细胞和肥大细胞能分泌高水平的 VEGF，以旁分泌的形式刺激肿瘤血
20 管内皮细胞，促进内皮细胞增殖、迁移，诱导血管形成，促进肿瘤持续生长，并提高
血管通透性，引起周围组织纤维蛋白沉着，促进单核细胞、成纤维细胞内皮细胞
浸润，有利于肿瘤基质形成和肿瘤细胞进入新生血管，促进肿瘤转移，因而抑制
肿瘤血管生成被认为是当前最具有前途的肿瘤治疗方法之一。

贝伐单抗(Avastin, bevacizumab)是抗人 VEGF 的人源化抗体(Cancer Res
25 1997;57:4593-9)，它于 2004 年被美国食品药品监督管理局批准为转移性结直肠癌
的一线治疗药物。但 Bevacizumab 是一个人源化抗体，保留了鼠源 CDR 区和
少量 FR 区鼠源残基，仍未能达到全人源化，且存在着亲和力不高的问题。

发明内容

30 本发明构建了大容量的天然人源噬菌体抗体库，从中筛选获得了一株全人

源抗 VEGF 抗体 11A7。

更具体地，本发明提供一种全人源抗 VEGF 抗体，其重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:6 所示，轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:8 所示；

本发明所述的全人源抗 VEGF 抗体，其重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:10 所示，轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:12 所示；

本发明还提供一种分离的核苷酸，其编码上述的全人源抗 VEGF 抗体；

本发明所述的核苷酸，其中编码全人源抗 VEGF 抗体重链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:5 所示，编码全人源抗 VEGF 抗体轻链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:7 所示；

本发明所述的核苷酸，其中编码全人源抗 VEGF 抗体重链的核苷酸序列为 SEQ ID NO:9 所示，编码全人源抗 VEGF 抗体轻链的核苷酸序列为 SEQ ID NO:11 所示；

本发明还提供一种表达载体，含有上述的核苷酸，为 pcDNA3.1/ZEO(+) 或 pcDNA3.1 (+)；

本发明还提供了上述表达载体转化的宿主细胞，为 CHO-K1 细胞；

本发明进一步提供上述全人源抗 VEGF 抗体的制备方法，包括从噬菌体人源抗体库筛选获得高亲和力全人源抗 VEGF 单链抗体；全人源抗 VEGF 完整抗体分子真核表达载体的构建；全人源抗 VEGF 完整抗体分子在 CHO 细胞中的表达；全人源抗 VEGF 完整抗体分子的纯化。

本发明也提供上述的全人源抗 VEGF 抗体在制备治疗肿瘤药物中的用途，其中肿瘤为结直肠癌。

本发明利用得到的抗体进行了一系列实验，实验结果表明：与人源化抗体 bevacizumab 和人源抗 VEGF 抗体 6A6（按照中国专利申请号 02111093.X，申请日 2002 年 3 月 20 日，发明名称为《人源化抗血管内皮生长因子单克隆抗体及其制法和药物组合物》中公开的方法制备得到）相比，本发明得到的抗体具有更高的抗体亲和力，更强地抑制肿瘤细胞增殖的能力；体内抗肿瘤实验结果表明，本发明得到的抗体可以明显抑制肿瘤的增长。

附图说明

图 1，细胞增殖实验结果；

图 2, 肿瘤生长曲线图。

具体实施方式

以下实施例、实验例仅仅对本发明进行进一步的说明, 不应理解为对本发明的限制。

实施例 抗体的制备

(1) 人抗体轻、重链恒定区基因的克隆

用淋巴细胞分离液(鼎国生物技术发展公司产品)分离健康人淋巴细胞, 用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司产品)提取总 RNA, 根据文献 (Cell, 1980, 22: 197-207) 和文献 (Nucleic Acids Research, 1982, 10: 4071-4079) 报道的序列分别设计引物采用 RT-PCR 反应扩增抗体重链和轻链恒定区基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收并克隆到 pGEM-T 载体 (Promega 公司产品) 中, 测序验证后确认获得了正确的克隆。SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 分别显示了重链恒定区 (C_H) 的核苷酸序列和氨基酸序列。SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 分别显示了轻链恒定区 (C_L) 的核苷酸序列和氨基酸序列。本例中的正确克隆记作 pGEM-T/ C_H 和 pGEM-T/ C_L 。

(2) cDNA 的制备

收集 50 健康人的外周血各 20ml, 混合, 用淋巴细胞分离液(医科院天津血研所生产)分离单个核细胞。用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 从分离的人外周血淋巴细胞中提取细胞的总 RNA。用 cDNA 反转录试剂盒 (上海申能博彩生物科技有限公司) 反转录出 cDNA。以上步骤按照厂家提供的说明书进行。

(3) 引物设计

参考文献 (Immunotechnology, 1998, 3: 271-278) 设计并合成克隆人抗体重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 基因的 V_H Back, V_H For, V_L Back 和 V_L For 引物。 V_H Back, V_H For, V_L Back 和 V_L For 的序列见 Immunotechnology, 1998, 3: 271-278。其中在 V_H Back 引物的 5'端加上含有 Sfi I 位点的序列 atg gcc cag ccg gcc atg gcc, 在 V_H For 引物的 5'端加上序列 gcc aga acc acc gcc gcc gga gcc acc acc gcc, 在 V_L Back 引物的 5'端加上序列 tcc ggc ggc ggt ggt tct ggc gga ggc gga tct, 在 V_L For 引物的 5'端加上含有 Not I 位点的序列 atgcggccgc。

(4) 噬菌体抗体库的构建及筛选

采用 (2) 中的 cDNA 和 (3) 中的引物, 利用 recombinant Phage antibody system 试剂盒 (Amersham Biosciences 公司) 构建噬菌体单链抗体库, 然后用特异性抗原对文库进行淘选。抗体库构建和淘选方法参照

- 5 recombinant Phage antibody system 试剂盒说明书进行, 用于淘选的特异性抗原“重组人 VEGF165 蛋白”(购自 R&D 公司)。经多次淘选抗体库后获得了一株抗人 VEGF 单链抗体 11A7ScFv, 测序后获得其基因序列。SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 分别显示了 11A7 ScFv 重链可变区 V_H 的核苷酸序列和氨基酸序列。SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 分别显示了 11A7 ScFv 轻链可变区 V_L 的核苷酸
10 序列和氨基酸序列。

(5) 全人源抗体在真核细胞中的表达

- 以 11A7ScFv 基因和 pGEM-T/ C_H 为模版, 通过重叠 PCR 合成全人源抗体重链基因, 反应条件为: 95°C 15 分钟; 94°C 50 秒, 58°C 50 秒, 72°C 50 秒, 30 个循环; 72°C 10 分钟。并使此全人源抗体重链基因的 5' 端含有限制酶位点
15 HindIII 和信号肽基因序列, 3' 端含有翻译终止密码 TAA 和限制酶位点 EcoR I。信号肽基因序列为 (ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGA)。最后琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 回收目的条带并克隆到 pGEM-T 载体 (Promega 公司产品) 中, 筛选阳性克隆测序。
20 挑选测序正确的克隆用 HindIII 和 EcoR I 酶切, 经琼脂糖凝胶电泳纯化回收全人源抗体重链片段 11A7 $V_H C_H$, 与用 HindIII 和 EcoR I 酶切的质粒 pcDNA3.1(+) (Invitrogen 公司) 进行连接, 构建成全人源重链真核表达载体 pcDNA3.1 (+) (11A7 $V_H C_H$)。

- 以 11A7ScFv 基因和 pGEM-T/ C_L 载体为模板, 通过重叠 PCR 合成全人源
25 化抗体轻链基因, 反应条件为: 95°C 15 分钟; 94°C 50 秒, 58°C 50 秒, 72°C 50 秒, 30 个循环; 72°C 10 分钟, 得到 PCR 产物, 其 5' 端含有限制酶位点 HindIII 和信号肽基因序列, 3' 端含有翻译终止密码 TAA 和限制酶位点 EcoR I。信号肽基因序列为

- (ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGA)。挑选测序正确的克隆用 HindIII 和 EcoR I 酶切,
30

经琼脂糖凝胶电泳纯化回收全人源抗体轻链片段 11A7V_LC_L，与用 HindIII 和 EcoR I 酶切的质粒 pcDNA3.1/ZEO(+) (Invitrogen 公司) 载体进行连接，构建成全人源轻链真核表达载体 pcDNA3.1/ZEO(+) (11A7V_LC_L)。

于 3.5cm 组织培养皿中接种 3×10^5 CHO-K1 细胞 (ATCC CRL-9618) ，细胞培养至 90%-95% 融合时进行转染：取质粒 10 μ g (质粒 pcDNA3.1(+)(11A7V_HC_H)4 μ g，质粒 pcDNA3.1/ZEO(+) (11A7V_LC_L)6 μ g) 和 20 μ l Lipofectamine2000 Reagent (Invitrogen 公司产品) 按 Lipofectamine2000 Reagent 试剂盒说明书进行转染。转染进行 24h 后细胞换含 600 μ g/ml G418 (Invitrogen 公司产品) 和 250 μ g/ml Zeocin (Invitrogen 公司产品) 的 DMEM 培养基筛选抗性克隆。取细胞培养上清用 ELISA 检测筛选高表达克隆：羊抗人 IgG (Fc) (KPL 公司) 包被于 ELISA 板，4 $^{\circ}$ C 过夜，用 2% BSA-PBS 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h，加入待测的抗性克隆培养上清或标准品 Human myeloma IgG1, κ (Sigma)，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，加入 HRP-羊抗人 IgG(κ) ((Southern Biotechnology Associates 公司) 进行结合反应，37 $^{\circ}$ C 温育 1h，加入 TMB 显色液于 37 $^{\circ}$ C 作用 5min，最后用 H₂SO₄ 终止反应，测 A₄₅₀ 值。将筛选得到的高表达克隆用无血清培养基扩大培养，用 Protein A 亲和柱 (GE 公司产品) 分离纯化全人源抗体 11A7。将纯化抗体用 PBS 进行透析，最后以紫外吸收法定量。SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 分别显示了全人源抗体 11A7 的重链核苷酸序列和氨基酸序列。SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 分别显示了全人源抗体 11A7 的轻链核苷酸序列和氨基酸序列。

实验例

人源抗体 6A6：按照中国专利申请号 02111093.X 申请日 2002 年 2 月 30 日发明名称《人源化抗血管内皮生长因子单克隆抗体及其制法和药物组合物》中公开的方法制备得到

实验例 1.VEGF 抗体亲和力测定

运用 Biacore T100 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 检测 VEGF 抗体的亲和力常数。将 VEGF165 (R&D 公司产品) 通过氨基共价结合与 CM5 生物传感芯片 (GE Healthcare) 上，将全人源抗体 11A7，Bevacizumab，人源抗体 6A6 (按照中国专利申请号 02111093.X 申请日 2002 年 2 月 30 日发明名称《人源化抗血管内皮生长因子单克隆抗体及其制法和药物组合物》中公开的方法制备得到)

和阴性对照抗体（Rituximab 市售产品）（以 PBS/0.05%TWEEN-20(ICI Americas)（去污剂）配）溶液，配成不同的浓度(2 倍比浓度稀释)，以 50μl/min 的流速通过芯片。每次检查之后，用 5μl 50mM 盐酸水溶液以 3μl/min 的流速洗涤，从而将残留的抗体从固定化的配体上洗脱下来。用 BIAevaluation 软件（T100 evalution 2.0 版，GE Healthcare 公司），通过非线性回归法分析结合曲线。结果如表 1 所示，全人源抗体 11A7 的 KD 值显著低于 Bevacizumab 和人源抗体 6A6，说明全人源抗体 11A7 对 VEGF 的亲合力高于 Bevacizumab 和人源抗体 6A6，亲和力实验结果见表 1。

表 1 亲和力实验结果

抗体	$K_{on} (M^{-1}S^{-1}/10^4)$	$K_{off} (10^4S^{-1})$	$K_D (nM)$
11A7	8.24	0.71	0.86
Bevacizumab	5.12	1.03	2.01
6A6	4.19	0.95	2.27
Rituximab	ND	ND	ND

实验例2.VEGF抗体抑制HUVEC细胞增殖实验

实验步骤：取生长状态良好的 HUVEC 细胞（Cascade Biologics），调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^4/ml$ ，接种于 96 孔细胞培养板，200μl/孔，于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后换无血清培养基，继续培养 72 h，加入不同浓度梯度的 VEGF 抗体,以抗 CD20 抗体 Rituximab 为阴性对照，每个浓度取 3 个平行孔，37℃孵育 1 h，加入终浓度为 25 ng/ml 的 VEGF165（R&D）继续培养 24 h 后，加入 10μl[3 H]. TdR(18.5 kBq/孔)，37℃孵箱中孵育 7 h，细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤膜上，采用 [3H]液闪计数仪进行测定。如图 1 所示。

结果表明：阴性对照抗体(Rituximab)不能有效抑制 VEGF 引起的 HUVEC 细胞增殖,而全人源抗体 11A7, Bevacizumab,人源抗体 6A6（均可有效抑制 VEGF 引起的 HUVEC 细胞增殖。全人源抗体 11A7 抑制 VEGF 引起的 HUVEC 细胞增殖的活性明显强于 Bevacizumab 和人源抗体 6A6（ $P<0.05$ ，t 检验，抗体浓度范围为 0.4-3.2 nM）。

实验例 2.VEGF 抗体体内抑制肿瘤生长实验

实验步骤：为检测 VEGF 抗体体内抑瘤活性,首先用 LM3 细胞(人肝癌细胞，来自复旦大学医学院肝癌研究所，中国上海)，接种于到雌性重症免疫缺陷小鼠（第二军医大学实验动物中心）右肋侧皮下,接种肿瘤当天给予各 VEGF

抗体 25mg/kg 及无关对照蛋白 Rituximab,然后隔天皮下注射持续 4 周.6 周后,每 3 天测量肿瘤的长宽,计算肿瘤体积,结果如图 2 所示。

结果表明: 阴性对照抗体 (Rituximab) 不能有效抑制肿瘤的生长,而全人源抗体 11A7, Bevacizumab,人源抗体 6A6 (均可有效抑制重症免疫缺陷小鼠接种肿瘤的生长, 且从第 18 天起, 全人源抗体 11A7 对肿瘤生长的抑制作用较 Bevacizumab 和人源抗体 6A6 强, 有显著差异 ($P<0.05$, Mann-Whitney 检验, 当观察时间大于 35 天以后)。

权利要求书

1. 一种全人源抗 VEGF 单克隆抗体, 其具有如 SEQ ID NO:6 所示的重链可变区氨基酸序列, 以及如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区氨基酸序列。

5 2. 权利要求 1 所述的全人源抗 VEGF 单克隆抗体, 其具有如 SEQ ID NO:10 所示的重链氨基酸序列, 以及如 SEQ ID NO:12 所示的轻链氨基酸序列。

3. 编码权利要求 1 所述的全人源抗 VEGF 单克隆抗体的核苷酸, 其具有如 SEQ ID NO:5 所示的重链可变区的核苷酸序列, 以及如 SEQ ID NO:7 所示的轻链可变区的核苷酸序列。

10 4. 权利要求 3 所述的核苷酸, 其具有如 SEQ ID NO:9 所示的重链核苷酸序列, 以及如 SEQ ID NO:11 所示的轻链核苷酸序列。

5. 含有权利要求 3 或 4 所述核苷酸的表达载体, 为 pcDNA3.1/ZEO(+)或 pcDNA3.1 (+)。

6. 含有权利要求 5 所述的表达载体的宿主细胞, 为 CHO-K1 细胞。

15 7. 权利要求 1 或 2 所述的全人源抗 VEGF 单克隆抗体的制备方法, 包括从噬菌体人源抗体库筛选获得高亲和力全人源抗 VEGF 单链抗体、全人源抗 VEGF 完整抗体分子真核表达载体的构建、全人源抗 VEGF 完整抗体分子在 CHO 细胞中的表达和全人源抗 VEGF 完整抗体分子的纯化四个步骤。

20 8. 权利要求 1 或 2 所述的全人源抗 VEGF 单克隆抗体在制备治疗肿瘤药物中的用途。

9. 权利要求 8 所述的用途, 其中所述肿瘤为结直肠癌。

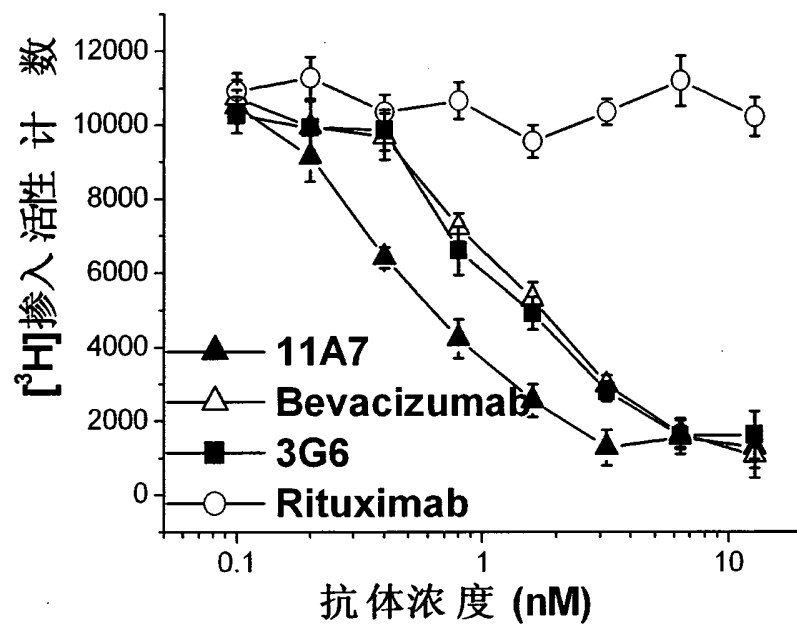


图 1

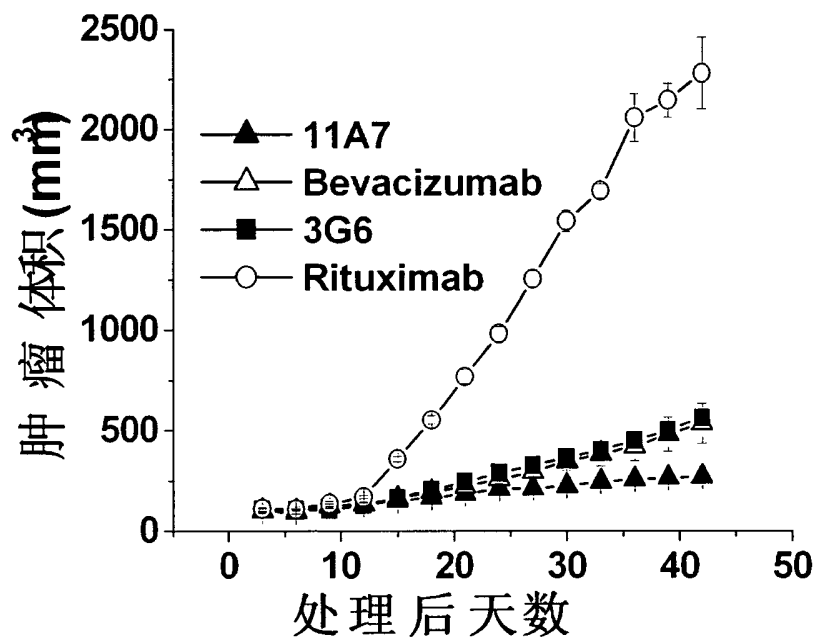


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

IPC: C07K; C12N; 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)

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; ISI WEB OF KNOWLEDGE and keywords: VEGF, vascular endothelial growth factor, vascular endothelial cell growth factor, antibody+, Mab, phage etc.

GenBank; EMBL: SEQ ID NOs: 5-12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1445242A (SHANGHAI CP GUOJIAN PHARM CO LTD) 01 Oct. 2003(01.10.2003), cited in the application the whole document	1-9

☒ 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
10 Nov. 2010(10.11.2010)Date of mailing of the international search report
02 Dec. 2010 (02.12.2010)Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

LIN, Junkai

Telephone No. (86-10)62411095

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000513

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1946422A (ABMAXIS INC) 11 Apr. 2007(11.04.2007) the whole document	1-9
A	CN 101148474A (SHANGHAI GENON BIOENGINEERING CO LTD) 26 Mar. 2008(26.03.2008) the whole document	1-9
A	TIAN, X. J et al. Construction of human antibody library and analysis of its diversity. Chin. J. Biochem. Mol. Biol. April 2000, vol. 16, No. 2, pages 200-205, ISSN 1007-7626 the whole document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/000513

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1445242A	01.10.2003	CN 1187373C	02.02.2005
CN 1946422A	11.04.2007	WO 2005054273A2	16.06.2005
		EP 1699484A2	13.09.2006
		AU 2004295339A1	16.06.2005
		KR 20070036018A	02.04.2007
		INDELNP 200602938E	03.08.2007
		JP 2008504215T	14.02.2008
		CN 101602806A	16.12.2009
		INDELNP 200903627E	07.05.2010
CN 101148474A	26.03.2008	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000513

Continuation of: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/22 (2006.01) i

C12N 15/13 (2006.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/000513

A. 主题的分类

参见附加页

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)

IPC: C07K; C12N; 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))

CPRS; CNKI 和关键词: VEGF, 血管内皮生长因子, 血管内皮细胞生长因子, 抗体, 噬菌体等;
WPI; EPODOC; ISI WEB OF KNOWLEDGE 和关键词: VEGF, vascular endothelial growth factor, vascular endothelial cell growth factor, antibody+, Mab, phage 等;
GenBank; EMBL: SEQ ID NOs: 5-12

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 1445242A (上海中信国健药业有限公司) 01.10 月 2003(01.10.2003), 在本申请中被引证 全文	1-9
A	CN 1946422A (埃博马可西斯公司) 11.4 月 2007(11.04.2007) 全文	1-9

☒ 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
10.11 月 2010(10.11.2010)

国际检索报告邮寄日期
02.12 月 2010 (02.12.2010)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
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

林峻凯
电话号码: (86-10) **62411095**

C(续). 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 101148474A (上海杰隆生物工程股份有限公司) 26.3 月 2008(26.03.2008) 全文	1-9
A	田学军等, 人源噬菌体抗体库的构建及抗 VEGF 抗体的初步筛选分析, 中国生物化学与分子生物学报, 4 月 2000, 第 16 卷, 第 2 期, 第 200-205 页, ISSN 1007-7626 全文	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/000513

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1445242A	01.10.2003	CN 1187373C	02.02.2005
CN 1946422A	11.04.2007	WO 2005054273A2	16.06.2005
		EP 1699484A2	13.09.2006
		AU 2004295339A1	16.06.2005
		KR 20070036018A	02.04.2007
		INDELNP 200602938E	03.08.2007
		JP 2008504215T	14.02.2008
		CN 101602806A	16.12.2009
		INDELNP 200903627E	07.05.2010
CN 101148474A	26.03.2008	无	

续：主题的分类

C07K 16/22 (2006.01) i

C12N 15/13 (2006.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i