

(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2006-516113

(P2006-516113A)

(43) 公表日 平成18年6月22日(2006.6.22)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	Z N A 4 B 0 2 4
C07K 14/745 (2006.01)	C07K 14/745	4 B 0 5 0
C12N 9/50 (2006.01)	C12N 9/50	4 B 0 6 4
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02	C 4 C 0 7 6
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/09	A 4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2004-533177 (P2004-533177)	(71) 出願人 505079305 中華人民解放軍軍事医学科学院放射医学研究所 中華人民共和国北京市太平路27号
(86) (22) 出願日	平成15年9月3日 (2003.9.3)	
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月22日 (2005.4.22)	
(86) 國際出願番号	PCT/CN2003/000743	
(87) 國際公開番号	W02004/022598	(71) 出願人 505079316 北京魯銀利華医薬科技发展有限公司
(87) 國際公開日	平成16年3月18日 (2004.3.18)	中華人民共和国北京市大興工業開発区科苑路18号
(31) 優先権主張番号	02129086.5	(74) 代理人 100057874 弁理士 曾我 道照
(32) 優先日	平成14年9月3日 (2002.9.3)	(74) 代理人 100110423 弁理士 曾我 道治
(33) 優先権主張国	中国(CN)	(74) 代理人 100084010 弁理士 古川 秀利

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血栓溶解および抗凝固両方の機能を有する融合タンパク質、ならびにその使用

(57) 【要約】

本発明は、血栓溶解および抗凝固両方の機能を有する融合タンパク質、ならびにこれと接合するペプチドを扱ったものであり、特に、本発明は、抗凝固タンパク質、および、プロフィブリノリシン活性の機能を有するタンパク質分子を扱ったものであり、これらは、凝固因子により同定され開裂されるアミノ酸配列を有する該接合ペプチドにより繋がれた。この融合タンパク質の医学的使用、ならびに、血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を繋げるに有用な、凝固因子により同定される該アミノ酸配列を有する接合ペプチドの使用。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血栓溶解タンパク質、抗凝固タンパク質、およびリンカーペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 2】

前記血栓溶解タンパク質が、他の血栓溶解因子を活性化させるか、または、それら自体が血栓溶解活性を持っているスタフィロキナーゼ（S A K）、組織型プラスミノーゲン活性化因子（t - P A）、ストレプトキナーゼ（S K）、ウロキナーゼ（U K）、ウロキナーゼ様プラスミノーゲン活性化因子（u - P A）、毒物、およびこれらの変異体を含む群から選択される、請求項 1 に記載の融合タンパク質。 10

【請求項 3】

前記血栓溶解タンパク質が、スタフィロキナーゼ（S A K）またはこれの変異体である、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

前記抗凝固タンパク質が、ヒルジン、抗トロンビン I I I 、毒物、およびこれらの変異体を含む群から選択される、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記抗凝固タンパク質が、ヒルジンまたはこれの変異体である、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記リンカーペプチドが、血液凝固因子により認識され得るペプチドを含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。 20

【請求項 7】

前記リンカーペプチドが、血液凝固因子 F X a により認識され得るアミノ酸配列 I E G R 、または、I E G R を含有するペプチドである、請求項 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記リンカーペプチドが、血液凝固因子 F X I I a (トロンビン) により認識され得るアミノ酸配列 G P R (G l y P r o A r g) 、または、G P R を含有するペプチドである、請求項 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

前記融合タンパク質が、リンカーペプチド G S I E G R により繋がれたスタフィロキナーゼおよびヒルジンの融合タンパク質（S A K - G S I E G R - H V 2 ）、リンカーペプチド P R I E G R により繋がれた組織型プラスミノーゲン活性化因子（t - P A ）およびヒルジンの融合タンパク質（t P A - P R I E G R - H V 2 ）、またはリンカーペプチド G S G P R により繋がれたスタフィロキナーゼおよびヒルジンの融合タンパク質（S A K - G S G P R - H V 2 ）である、請求項 1 に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 10】

前記融合タンパク質が、リンカーペプチド G S I E G R により繋がれたスタフィロキナーゼおよびヒルジンの融合タンパク質（S A K - G S I E G R - H V 2 、すなわち S F H ）である、請求項 1 に記載の融合タンパク質。 40

【請求項 11】

血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を含む融合タンパク質の調製方法であって、I E G R もしくは G P R 含有ペプチドをコード化する配列を介して、該血栓溶解タンパク質の遺伝子および該抗凝固タンパク質の遺伝子と一緒にして繋げて、該融合タンパク質の遺伝子を形成させ、次いで、大腸菌 E . c o l i 、イースト、もしくは動物細胞において該融合タンパク質の遺伝子を発現させ、該融合タンパク質を産生させることを含む方法。

【請求項 12】

融合タンパク質と、医薬的に許容可能なキャリアもしくは賦形剤とを含む、医薬組成物。
50

【請求項 1 3】

血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を含む融合タンパク質の調製における、血液凝固因子により認識されるリンカーペプチドの使用。

【請求項 1 4】

血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質間のリンカーとしての、血液凝固因子により認識され開裂されるリンカーペプチドの使用。

【請求項 1 5】

血栓症に関連した疾患または病状の処置方法であって、血栓症を患う患者へと、治療に有効な量の前記融合タンパク質を投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0 0 0 1】**

本願は融合タンパク質に関し、これは、血栓溶解タンパク質、抗凝固タンパク質、およびリンカーペプチドから構成される。特に、該融合タンパク質は、抗凝固タンパク質およびプラスミノーゲン活性化活性を持つタンパク質分子から構成され、ここでこれら2つのタンパク質は、リンカーペプチドを介して一緒に繋がれ、これは、血液凝固因子により認識され、開裂され得るものである。本願はまた、該融合タンパク質の医学的使用、ならびに、血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を繋げることにおける、血液凝固因子により認識され得る該リンカーペプチドの使用に関する。

【背景技術】

20

【0 0 0 2】

心臓血管疾患は、ヒトの死因の筆頭である。現在、ウロキナーゼおよび組織型プラスミノーゲン活性化因子が、主要な血栓溶解薬剤として臨床において使用される一方、ヘパリンおよびヒルジンが、主要な抗凝固薬剤として使用されている。血栓溶解治療は、血栓症を患う患者の死亡割合を減少させることに成功してはいるが、小さな血の塊の血液循環中の進入のために、再血栓化がしばしば起きる。このため、今では、ヘパリンまたはヒルジンが、血栓治療用血栓溶解剤と組み合わせて、抗凝固剤として使用されている。

【0 0 0 3】

しかしながら、血栓溶解剤および抗凝固剤は通常、これらの有する乏しい特異性のために、システムティックな血栓溶解および抗凝固を引き起こし、これにより、システムティックな出血に至る。

30

【0 0 0 4】

特に、組織型プラスミノーゲン活性化因子(t - P A)、ストレプトキナーゼ(S K)、ウロキナーゼ(U K)、およびウロキナーゼ様プラスミノーゲン活性化因子(u - P A)は、プラスミノーゲンを活性化させることができ、これが今度は、血栓部位において血餅を溶解させる。しかしながら、活性化されたこのプラスミノーゲンはまた、非血栓部位においても出血を引き起こす。スタフィロキナーゼ(S A K)は天然起源の新たなプラスミノーゲン活性化因子であり、血栓溶解に対してある種の特異性を持っている。

【0 0 0 5】

ヒルジン(H V)は小さなタンパク質であるが、トロンビンに対するその高い親和性および選択的阻害性のために、新たな抗凝固剤と見なされている。しかしながら、ヒルジンは臨床において、システムティックな出血を引き起こす傾向にある。更に、ヒルジンに対するアンタゴニストはない。

40

【0 0 0 6】

このため、副作用を抑え、血栓溶解薬剤の治療効果を向上させるためには、それらの選択性、標的特性、および血栓血餅への局所的集中性を向上させること、ならびに、血栓がない部位への薬剤の集中、もしくは、血栓がない部位での薬剤の作用、および、出血という副作用を抑えることが、重要である。先行技術の融合タンパク質は、出血という副作用を抑えることができない。

【0 0 0 7】

50

このため、抗血栓薬剤の開発は、血栓溶解活性および抗凝固活性両方を持つ「2機能」医薬品に焦点を当てている。血栓溶解活性を抗凝固活性と組み合わせるために、ヒルジンのS A KもしくはS Kとの融合が研究されてきた。これは、もしヒルジンのN末端がS A KもしくはS KのC末端へと結合されると、該ヒルジンはその抗トロンビン活性を失うであろう一方、血栓溶解タンパク質のプラスミノーゲン活性化活性は保持されるか、もしくは、部分的に保持されること；もしヒルジンのC末端がS A KのN末端へと結合されると、その後、S A KのN末端のin vivoでの急速な分解のために、該融合タンパク質は機能する前に分解してしまうであろうということを示した。このため、血栓治療においては、血栓溶解活性および抗凝固活性両方を持つ融合タンパク質を開発することが、魅力的である。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、血栓溶解活性および抗凝固活性両方を持つ融合タンパク質を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、以下の認識に基づいている。

融合タンパク質は、血液凝固因子認識可能配列を含有するペプチドを介して、血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を繋ぐことにより、構築され得る。こうして構築された融合タンパク質は、以下のような幾つかの利点を提供する。

20

第1に、該融合タンパク質は、プラスミノーゲン活性化活性を保持し、これ故に血栓溶解活性を保持する。

第2に、ヒルジンのような抗凝固タンパク質のN末端が、血栓溶解タンパク質のC末端へと繋がれ、このため、該融合タンパク質全体は、血栓のない部位およびin vitroでは抗凝固活性を示さず、これにより、ヒルジンのような抗凝固タンパク質により引き起こされる出血という副作用を除くかもしくは抑える。

30

第3に、該融合タンパク質は、血栓部位におけるトロンビンに対するヒルジンの高い親和性のために、血餅を標的とすることができる能力を持っており、このためにこれは、血栓部位での薬剤濃度を増加させ、該薬剤の治療に要する量を減らす。

第4に、該融合タンパク質が血栓部位へと循環して行く時に、血栓に含まれ血栓の特徴である血液凝固因子が、設計された認識部位において該融合タンパク質を急速に開裂させ、遊離の血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を解き放ち、これにより、血栓溶解活性および抗凝固活性両方を機能させる。本発明は、以上の利点に鑑みて、確立された。

【0010】

1つの態様において、本発明は、血栓溶解タンパク質、抗凝固タンパク質、およびリンカーペプチドから構成される融合タンパク質に関する。

【0011】

もう1つ別の態様において、本発明は、血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を含む融合タンパク質の調製方法に関し、本方法は、IEGRまたはGPRをコード化する塩基配列を介して、血栓溶解タンパク質遺伝子および抗凝固タンパク質遺伝子を繋ぎ、該融合タンパク質をコード化する遺伝子を形成させること、ならびに、E. coli(大腸菌)、イースト、または動物細胞株において、該融合タンパク質をコード化する該遺伝子を発現させ、該融合タンパク質を產生させることを含む。

40

【0012】

更なる態様において、本発明は、該融合タンパク質と、医薬的に許容可能なキャリアもしくは賦形剤とを含む医薬組成物に関する。

【0013】

更なる態様において、本発明は、血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質を含む融合タンパク質の調製における、血液凝固因子により認識される配列を含有するリンカーペ

50

プチドの使用に関する。

【0014】

更なる態様において、本発明は、血栓溶解タンパク質および抗凝固タンパク質のリンカーペプチドとしての、血液凝固因子により認識され開裂され得る配列の使用に関する。

【0015】

尚更なる態様において、本発明は、血栓症に関連した疾患もしくは病状の処置法に関する、本方法は、血栓症を患う患者へ、治療に有効な量の該融合タンパク質を投与することを含む。

【0016】

本明細書中使用される場合、用語「血栓溶解タンパク質」は、血栓溶解活性を持つタンパク質、例えば、スタフィロキナーゼ (S A K)、組織型プラスミノーゲン活性化因子 (t - P A)、ストレプトキナーゼ (S K)、ウロキナーゼ (U K)、ウロキナーゼ様プラスミノーゲン活性化因子 (u - P A)、毒物、およびこれらの変異体に関し、これらは他の血栓溶解因子を活性化させるか、または、これら自体が血栓溶解活性を持っている。スタフィロキナーゼ (S A K) またはこれの変異体が、好ましい。10

【0017】

本明細書中使用される場合、用語「抗凝固タンパク質」は、ヒルジン、抗トロンビン I I I、毒物、およびこれらの変異体のような、抗凝固活性を持っているタンパク質に関する。ヒルジンまたはこれの変異体が、好ましい。

【0018】

本明細書中使用される場合、用語「血液凝固因子により認識されるリンカーペプチド」は、テトラペプチド I E G R (I l e G l u G l y A r g)、該 I E G R 配列を含有するペプチド、トリペプチド G P R (G l y P r o A r g)、または該 G P R 配列を含有するペプチドに関する。20

【0019】

本明細書中使用される場合、用語「血栓症に関連した疾患または病状」は、脳血栓、動脈血栓、発作、および粥状(アテローム)硬化のような、血栓により引き起こされる如何なる疾患または病状にも関する。

【0020】

本明細書中使用される場合、用語「患者」は動物、特にヒトに関する。30

【0021】

本発明によれば、本発明の融合タンパク質は、好ましくは、G S I E G R により繋がれたスタフィロキナーゼおよびヒルジンから構成される S F H 融合タンパク質 (S A K - G S I E G R - H V 2)、P R I E G R により繋がれた組織型プラスミノーゲン活性化因子 (t - P A) およびヒルジンから構成される融合タンパク質 (t P A - P R I E G R - H V 2)、または G S G P R により繋がれたスタフィロキナーゼおよびヒルジンから構成される融合タンパク質 (S A K - G S G P R - H V 2) である。

【0022】

本発明によれば、本融合タンパク質は、E . c o l i (大腸菌)、P i c h i a p a s t o r i s、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e、または動物細胞中発現されてよい。好ましくは、E . c o l i またはイースト菌細胞中発現される。40

【0023】

以下の実施例は、本発明を例証すべく意図されるが、本発明を限定することを意味するものではない。

【実施例】

【0024】

[実施例 1：融合タンパク質 S F H (S A K - G S I E G R - H V 2) の調製および該 S F H の 2 機能活性]

E c o R I および B a m H I 制限部位がそれぞれ、S A K 遺伝子の 2 つの末端へと加えられる。停止コドンを持たない該 S A K 遺伝子が、p B V 2 2 0 ベクター中へと導入され50

、結果 p B V S A K を与えた。P C R 法により、該 B a m H I 制限部位および F X a 認識配列 G S I E G R をコードする配列が、プライマー（5' - C G G G A T C C A T C G A A G G T C G T A T T A C T T A C A C T G A T T G T A C A G A A T C G - 3'）を介して、ヒルジン遺伝子の上流に取り込まれる。該ヒルジン遺伝子の下流とマッチされた該プライマーは、1つの P s t I 制限部位を含有する。F X a 認識配列 G S I E G R を伴った該ヒルジン遺伝子は、2つの酵素 B a m H I および P s t I により消化され、前記ベクター p B V S A K もまた、B a m H I および P s t I により消化される。この消化されたヒルジン断片は、この消化された p B V S A K ベクター中へと挿入され、プラスミド p B V S F H を形成する（図1参照）。これらの2つの遺伝子断片もまた、重複P C R法により、繋がれ得る。該プラスミド p B V S F H は E . c o l i 中へと導入されて形質転換を引き起こし、42において発現するよう誘導される。所望の融合タンパク質（S F H）が、イオン交換およびゲル濾過法により、96%より高い純度において得られる。該 S F H 融合タンパク質は、3つのドメイン、つまり、S A K 配列、F X a 認識配列 G S I E G R 、およびヒルジンを含む。該 S F H 融合タンパク質のアミノ酸配列は、以下の通り。

```

1 : s s s f d k g k y k   k g d d a s y f e p   t g p y l m v n v t   g
v d g k g n e l l   s p h y v e f p i k
61 : p g t t l t k e k i   e y y v e w a l d a   t a y k e f r v v e   l
d p s a k i e v t   y y d k n k k k e e
101 : s f p i t e k g   f v v p d l s e h i   k n p g f n l i t k   v i i
e k k g s i e   g r i t y t d c t e   s g q d l c l c e g
161 : s n v c g k g n k c   i l g s n g e e n q   c v t g e g t p k p   q
s h n d g d f e e   i p e e y l q
【0025】

```

この精製された融合タンパク質の血栓溶解活性は、色素基質 S - 2 2 5 1 を使用して求められた。I n v i v o において該融合タンパク質の血栓溶解活性および抗凝固活性をテストするために、マウスの尾における血栓（R T T）が、- カラゲナンにより誘導された。その結果は、該 S F H 融合タンパク質の抗凝固活性が、S A K のそれよりも有意により高いことを示す。特に、- カラゲナンによる誘導の24時間後、S A K が8時間毎に、体重1kg当たり1.2mgの投与量にて腹腔内（i.p.）注射され、尾における該血栓の阻害が36.6%である。しかしながら、当モルのS F T が体重1kg当たり1.8mgの投与量にて投与されると、尾における該血栓の阻害は100%である。- カラゲナンによる誘導の36時間後、上記同様に投与されたS A K およびS F H により、尾における該血栓の阻害がそれぞれ18.2%および90%に到達した。詳細な結果が、表1～3に示される。

【0026】

【表1】

表1：色素基質（S-2251）を使用して求められた、
融合タンパク質（S F H）およびスタフィロキナーゼ（S A K）の
血栓溶解活性

反応時間は5分。n=3、ΔOD₄₀₅

試料	S A K	S F H
ΔOD ₄₀₅	0.357±0.22	0.394±0.01

注：2nMの融合タンパク質および2nMのスタフィロキナーゼが使用された

【0027】

【表2】

表2 : FXaにより活性化された、融合タンパク質(SFH)の抗凝固活性

試料	抗凝固活性
FXaにより開裂されていない融合タンパク質	0
FXa 0.2Uにより10分間開裂された融合タンパク質	2560 ATU

注: 5. 8 μg の該融合タンパク質 SFH および 0. 2U の FXa が、37°Cにおいて 10 分間共にインキュベートされた。該抗凝固活性を求めるために、血餅法が使用された。

10

【0028】

【表3】

表3 : 該融合タンパク質(SFH)およびスタフィロキナーゼ(SAK)の
in vivoでの抗凝固活性(n=10)

κ-カラグナンによる誘導時間(時間)	各群の動物数	SAK	SFH
24	10	36.6 %	100 %
36	10	18.2 %	90 %

20

注: SAKが8時間毎に、体重1kg当たり1.2mgの投与量にて腹腔内(i.p.)投与され、当モルのSFHが体重1kg当たり1.8mgの用量にて投与される。使用された動物は、Kunmingマウス(KM)である。該抗凝固活性は、マウスの尾の血栓の阻害として表現される。

30

【0029】

表1は、該融合タンパク質 SFH が、無操作のスタフィロキナーゼと同じレベルの血栓溶解活性を呈することを示すものである。表2は、無操作の融合タンパク質 SFH が抗凝固活性を呈さず、しかし、一旦血液凝固因子 FXa により開裂されると、完全なる抗凝固活性を示すことを示すものである。表3は、SFH が有意な抗凝固効果を持っていることを実証するものである。これ故に、本発明の本融合タンパク質は、血栓溶解活性および抗凝固活性両方を、実際に持っている。

【0030】

[実施例2：融合タンパク質 tPA - PRIEGR - HV2 の調製]

XhoI および AvrII 制限部位がそれぞれ、tPA 遺伝子の上流および下流へと加えられる。停止コドンを持たない該 tPA 遺伝子が、pPIC9ベクター中へと導入される。PCR 法を使用して、プライマーを介して、該 AvrII 制限部位および FXa 認識配列をコードする配列が、ヒルジン遺伝子の上流に取り込まれる。該ヒルジン遺伝子の下流とマッチされた該プライマーは、1つのNotI 制限部位を含有する。FXa 認識配列を伴った該ヒルジン遺伝子は、2つの酵素 AvrII および NotI により消化され、結果得られる断片は、前記のように構築されたベクター pPIC9 中へと組み込まれ、この導入された断片は tPA 遺伝子の下流に位置し、この融合遺伝子 PAFH 中へと組み込まれて、tPA と共に該融合遺伝子 PAFH を形成する。こうして構築されたプラスミドは、pPAFH として表記される。該プラスミド pPAFH および pPIC9K は、BamHI および SalI により消化される。該 PAFH 遺伝子はその後、pPIC9K 中へと挿入されて、pPAFH-K 遺伝子を形成する。該プラスミド pPAFH-K は直線状に

40

50

され、電気による形質転換により、イーストゲノム中へと取り込まれる。その発現を誘導するには、メタノールが使用される。所望の融合タンパク質は、3つのドメイン、つまり、t P A 配列、F X a 認識配列、およびヒルジンを含む。

【0031】

[実施例3：融合タンパク質S T H (S A K - G S L G P R - H V 2) の調製および該S T Hの2機能活性]

E c o R I および B a m H I 制限部位がそれぞれ、S A K 遺伝子の2つの末端へと加えられる。停止コドンを持たない該S A K 遺伝子が、p B V 2 2 0 ベクター中へと導入され、結果 p B V S A K を与えた。P C R 法により、プライマーを介して、該B a m H I 制限部位および F X I I a 認識配列 G S L G P R をコードする配列が、ヒルジン遺伝子の上流に取り込まれる。該ヒルジン遺伝子の下流とマッチされた該プライマーは、1つのP s t I 制限部位を含有する。F X I I a 認識配列 G S L G P R を伴った該ヒルジン遺伝子は、2つの酵素 B a m H I および P s t I により消化され、前記ベクター p B V S A K もまた、B a m H I および P s t I により消化される。この消化されたヒルジン断片は、この消化された p B V S A K ベクター中へと挿入され、プラスミド p B V S T H を形成する。この配列は、酵素による消化により確認される。あるいは、これら2つの遺伝子断片は、重複P C R 法により繋がれてもよい。該プラスミド p B V S T H は E . c o l i 中へと導入され形質転換を引き起こし、4 2 において発現するよう誘導される。所望の融合タンパク質(S T H)が、イオン交換およびゲル濃過法により、9 6 % より高い純度において得られる。該S T H 融合タンパク質は、3つのドメイン、つまり、S A K 配列、F X I I a 認識配列 G S L G P R 、およびヒルジンを含む。

【図面の簡単な説明】

【0032】

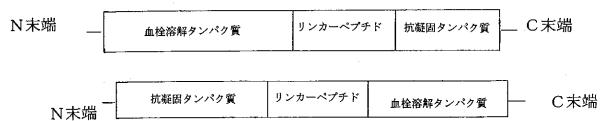
以下の図面は、本発明を例証するのに提示されるが、本発明を限定するよう意図されるものではない。

【図1】図1は、本融合タンパク質の例示である。

【図2】図2は、本融合タンパク質遺伝子、スタフィロキナーゼ(S A K)遺伝子、およびヒルジン(H V 2)遺伝子の電気泳動を示す。

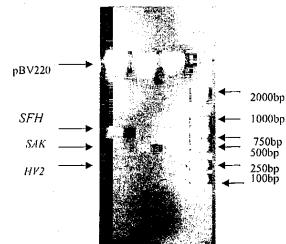
【図1】

本融合タンパク質のイラストレーション



【図2】

本融合タンパク質、スタフィロキナーゼ、およびヒルジンの遺伝子の電気泳動マップ



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN03/00743
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC ⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02 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 ⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02		
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) CNPAT WPI EPODOC NCBI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	CN1401662A 12 March 2003, Refer to the Whole document	1-14
PA	CN1398972A 26 Feb 2003, Refer to the Whole document	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 17 Sept 2003(17.09.03)	Date of mailing of the international search report 20 NOV 2003 (20.11.03)	
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer  Guo Xiaoyong Telephone No. 8610-62093435	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN03/00743
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos: 15 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claim 15 is directed to a method of treatment of the human/animal body. 2. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> Claims Nos: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) 		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 		
Remark on protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

国际检索报告	国际申请号 PCT/CN03/00743	
A. 主题的分类		
IPC ⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02 按照国际专利分类表(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(标明分类体系和分类号) IPC ⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02		
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, 如果实际可行的, 使用的检索词) CNPAT WPI EPDOC NCBI		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
PA	CN1401662A 12.3 月 2003, 参见全文	1-14
PA	CN1398972A 26.2 月 2003, 参见全文	1-14
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。		<input type="checkbox"/> 见同族专利附件。
* 引用文件的专用类型: "A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件 "B" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利 "L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 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 "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的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理 "X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或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, 权利要求记载的发明不具有创造性 "&" 同族专利成员的文件
国际检索实际完成的日期 17.9 月 2003(17.9.03)	国际检索报告邮寄日期 20.11.2003 20.11.03	
国际检索单位名称和邮寄地址 ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-10-62019451	受权官员  电话号码: 86-10-62093435	

国际检索报告	国际申请号 PCT/CN03/00743
第I栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第1项)	
按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> 权利要求 (编号) : 15 因为它们涉及到不要求本国际检索单位检索的主题, 即: 其涉及疾病的治疗和诊断方法。	
2. <input type="checkbox"/> 权利要求 (编号) : 因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以至于不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:	
3. <input type="checkbox"/> 权利要求 (编号) : 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。	
第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第2项)	
本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:	
1. <input type="checkbox"/> 由于申请人按时缴纳了所要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。	
2. <input type="checkbox"/> 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求都进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。	
3. <input type="checkbox"/> 由于申请人仅按时缴纳了部分所要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求 (编号) :	
4. <input type="checkbox"/> 申请人未按时缴纳所要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首先提到的发明; 包含该发明的权利要求是 (编号) :	
关于异议的说明: <input type="checkbox"/> 申请人的异议书随附加检索费同时提交。 <input type="checkbox"/> 支付附加检索费时未提交异议书。	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/45 (2006.01)	A 6 1 K 37/52	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 K 38/48 (2006.01)	A 6 1 K 37/547	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 37/64	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100094695
弁理士 鈴木 憲七

(74)代理人 100111648
弁理士 梶並 順

(74)代理人 100122437
弁理士 大宅 一宏

(72)発明者 石炳興
中華人民共和国北京市太平路27号

(72)発明者 吳祖澤
中華人民共和国北京市太平路27号

(72)発明者 于愛平
中華人民共和国北京市太平路27号

(72)発明者 董春娜
中華人民共和国北京市太平路27号

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA14 BA16 BA80 CA07 DA02 DA06 DA12 GA11 HA01
4B050 CC05 DD11 EE10 LL01
4B064 AG23 CA19 CC24 DA01
4C076 AA12 CC14 EE41 EE59 FF11 FF70
4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA36 DA32
DB01 DC05 DC25 DC32 DC35 MA02 MA05 MA17 MA66 NA05
NA14 ZA45 ZA54 ZC75
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA56 DA65 DA89 EA23 FA74