

(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2009-531036

(P2009-531036A)

(43) 公表日 平成21年9月3日 (2009. 9. 3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 4
C O 7 K 14/71 (2006.01)	C O 7 K 14/71	4 C O 7 6
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-501824 (P2009-501824)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月29日 (2007. 3. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年9月30日 (2008. 9. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2007/001021
 (87) 国際公開番号 W02007/112675
 (87) 国際公開日 平成19年10月11日 (2007. 10. 11)
 (31) 優先権主張番号 200610066257.2
 (32) 優先日 平成18年3月31日 (2006. 3. 31)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

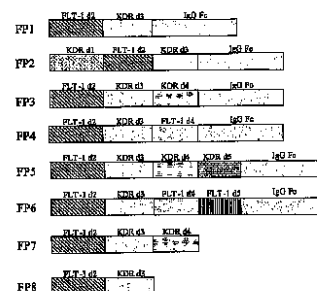
(71) 出願人 506405437
 ツェンドゥー カンホン バイオテクノロ
 ジーズ カンパニー リミテッド
 中華人民共和国, スーチョワン プロヴィ
 ンス 6 1 0 0 3 6, ツェンドゥー シテ
 イ, ジンニユウ ディストリクト, シュー
 シー ロード ナンバー 3 6
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人原謙三国際特許事務所
 (72) 発明者 ユ, デチャオ, マイケル
 中華人民共和国, スーチョワン プロヴィ
 ンス 6 1 0 0 3 6, ツェンドゥーシテイ
 , ジンニユウ ディストリクト, シューシ
 ー ロード ナンバー 3 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V E G F 受容体融合タンパク質およびそれらの使用

(57) 【要約】

F 1 t - 1 の I g ドメイン 2 と I g ドメイン 3 とを、ま
 たは F 1 t - 1 の I g ドメイン 2 と K D R の I g ドメイ
 ン 3 と K D R の I g ドメイン 4 とを含む血管内皮細胞成
 長因子 (V E G F) 受容体融合タンパク質、融合タンパ
 ク質をコードする遺伝子、融合タンパク質を含む薬学的
 組成物、ならびに融合タンパク質の薬学的使用を提供す
 る。当該融合タンパク質は、糖尿病性網膜症のような血
 管形成を含む眼疾患のための処置に用いることができる
 。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

それぞれ配列番号 2 および 4 に示されるアミノ酸配列を有する F P 7 および F P 8 から選択された V E G F 受容体融合タンパク質。

【請求項 2】

配列番号 1 および 3 に示される D N A 配列を有する V E G F 受容体融合タンパク質 F P 7 および F P 8 をコードする遺伝子。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の V E G F 受容体融合タンパク質 F P 7 および / または F P 8 をコードする遺伝子を含む発現ベクター。

10

【請求項 4】

以下の手順：

F l t - 1 および K D R 遺伝子の増幅、上記増幅により得られた遺伝子の制限酵素消化による F l t - 1 および K D R 断片の取得、F L T - 1 の 2 番目の I g 様ドメインと K D R の 3 番目の I g 様ドメインと K D R の 4 番目の I g 様ドメインとの、もしくは F L T - 1 の 2 番目の I g 様ドメインと K D R の 3 番目の I g 様ドメインとのライゲーション；

融合遺伝子の発現ベクターの構築；ならびに

融合タンパク質を作製するため、宿主細胞へのベクターの導入を含む、請求項 1 に記載の V E G F 受容体融合タンパク質 F P 7 および F P 8 の調製方法。

20

【請求項 5】

薬学的に受容可能な任意に 1 以上の、および薬学的に有効量の担体中に、V E G F 受容体融合タンパク質 F P 7 および F P 8 の 1 つまたは両者を含む、異常な血管形成に起因する眼疾患の処置に用いられる薬学的組成物。

【請求項 6】

上記薬学的に受容可能な担体は、水、マンニトール、グリセロール、エタノール、ポリソルベート、およびグルコースの任意の 1 つまたは組み合わせである、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

融合タンパク質は、F P 1、F P 2、F P 3、F P 4、F P 5、F P 6、F P 7、および F P 8 の 1 つまたは組み合わせから選択される、血管形成に関連する眼疾患を処置するための薬物の調製における V E G F 受容体融合タンパク質の使用。

30

【請求項 8】

上記血管形成に関連した眼疾患が、A M D、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜血管閉塞、処置の失敗に関する血管形成（例えば、レーザー凝固法、および外科的網膜移植）である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

眼疾患に罹患した患者に対して、F P 3、F P 7 および / または F P 8 のように、V E G F 受容体融合タンパク質 F P 1、F P 2、F P 3、F P 4、F P 5、F P 6、F P 7、および F P 8 からなる群から選択された 1 つまたは組み合わせを投与することを特徴とする、血管形成に関連する眼疾患の処置方法。

40

【請求項 10】

上記血管形成に関連する眼疾患は、A M D、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜血管閉塞、処置の失敗に関する血管形成（例えば、レーザー凝固法、および外科的網膜移植）からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【発明の詳細な説明】****【0001】**

〔発明の分野〕

本発明は、血管形成に起因する多様な眼疾患のための、V E G F 受容体融合タンパク質

50

、 V E G F 受容体融合タンパク質を含む薬学的組成物、および関連する治療用途に関する。

【 0 0 0 2 】

〔 発明の背景 〕

網膜血管および脈絡膜(chorodial)血管は、網膜の必須の構成要素である。創傷および疾患に起因する血管壁構造および血管の機能の異常な変化は、視力低下および失明を導く主な要因である。例えば、網膜血管の過形成およびそれ以後の網膜の分離をもたらす真性糖尿病を原因とする糖尿病性網膜症(diabetic retinopathy)は、失明を導く主な要因である。また、網膜血管新生は、眼の傷または手術からの回復の間に起こる。網膜血管におけるこの種の過形成は、精神的変化または失明を導く重要な要因である (Nature 438: 932-938, 2005)。

10

【 0 0 0 3 】

加齢性黄斑変性症 (A M D) は、網膜の中心領域で起こる細胞もしくは組織の分解および血管増殖を原因とする疾患である。 A M D は、ウェットフォーム (浸出性形態) およびドライフォームに分類できる。ウェット A M D は、脈絡膜血管新生を最も一般的に原因とし、かつ失明を導く主要な要因でもある。

【 0 0 0 4 】

血管内皮細胞成長因子 (V E G F) は、特に、血管形成を媒介するタンパク質である (Am. J. Pathol. 167: 1451-1459, 2005)。 V E G F は、内皮細胞の分裂および増殖を刺激し、血管新生の開始を誘導し、かつ酸素および栄養素を組織細胞へ提供する。多くの研究は、一度栄養素の不足により網膜の光受容体細胞が変性 (虚血性萎縮症) し始めると、網膜における V E G F の濃度が増加し始めて血管新生を促進することを示している。この過程は血管形成(angiogenesis)と呼ばれる。眼において、新たに生成された血管は、形態に関して正常の血管とは異なり、その血管内腔は、不規則であり、かつ多くの場合、その血管壁は漏れやすい。高い浸透性のまたは漏れやすい血管のこの種の異常な成長は、多くの場合、次々と視力に影響を与える網膜における傷、および分離でさえももたらす。

20

【 0 0 0 5 】

多くの研究において、ウェット A M D 患者の脈絡膜組織が高レベルの V E G F 発現を示すことが示されている (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci 37: 855-868, 1996; Microvascular Res. 64: 162-169, 2002)。 V E G F の発現レベルとウェット A M D との間の相関関係を考慮すると、 V E G F は、 A M D 診断において生化学的指標として用いることができる (Br. J. Ophthalmol. 88: 809-815, 2004)。

30

【 0 0 0 6 】

いくつかの V E G F 抑制剤は、内皮細胞の V E G F と V E G F 受容体 (f l t - 1、 K D R など) との間の相互作用を阻害できる。従って、上記 V E G F 抑制剤は、網膜の出血を予防しかつ止めるように、 V E G F によって媒介される情報伝達を阻害でき、かつ高レベルの V E G F 発現に起因する血管形成を阻害する。この種の V E G F 阻害剤としては、マクゲン (ペガプタニブソディウム(pegaptanib sodium))、ルセンティス (Lucentis)、 V E G F - T r a p、アバスチン (Avastin) (ベバシズマブ) (bevacizumab)、および A d P E D F などが挙げられる。特に、マクゲンおよびアバスチンは米国食品医薬品庁 (F D A) により承認されており、かつ市場に流通している。

40

【 0 0 0 7 】

〔 発明の要旨 〕

本発明の一態様は、アミノ酸配列が配列番号 2 および 4 として示される、 V E G F を抑制する新規の融合タンパク質 F P 7 および F P 8 を提供することである。

【 0 0 0 8 】

F P 7 は、 F L T - 1 の 2 番目の I g 様ドメインと K D R の 3 番目の I g 様ドメインと K D R の 4 番目の I g 様ドメインとからなる。 F P 8 は、 F L T - 1 の 2 番目の I g 様ドメインと K D R の 3 番目の I g 様ドメインとからなる。

【 0 0 0 9 】

50

本発明の他の態様は、DNA配列が配列番号1および3として示される、VEGF受容体融合タンパク質FP7およびFP8をコードする遺伝子を提供することである。

【0010】

本発明の他の態様は、VEGF受容体融合タンパク質FP7およびFP8をコードする上記遺伝子を含む発現ベクターを提供することである。上記発現ベクターは、プラスミドベクター、ファージ、ウイルスなどのような、任意の一般的なベクターであってよい。

【0011】

本発明の他の態様は、VEGF抑制性融合タンパク質FP7およびFP8の調製方法を提供することである。当該方法は、Flt-1およびKDRの遺伝子増幅、制限酵素消化によるFlt-1およびKDR断片の調製、Flt-1の2番目のIg様ドメインとKDRの3番目のIg様ドメインと4番目のIg様ドメインとの、もしくはFlt-1の2番目のIg様ドメインとKDRの3番目のIg様ドメインとのライゲーション；ライゲーションの結果産物を含む発現ベクターの構築；ならびに融合タンパク質を産生するための上記ベクターの宿主細胞への形質移入を含む。

10

【0012】

本発明の他の態様は、眼疾患に関連する血管形成を処置するための薬学的組成物を提供することである。当該薬学的組成物は、薬学的有効量のVEGF受容体融合タンパク質FP1、FP2、FP3、FP4、FP5、FP6、FP7、およびFP8の任意の1つまたは組み合わせ（例えば、FP7および/またはFP8など）、ならびに任意に1以上の薬学的に受容可能な担体（特に1以上の一般的に眼科の処置に用いられる担体）を含む。

20

【0013】

本発明のさらなる態様は、血管形成に関連する眼疾患の処置におけるVEGFを抑制する融合タンパク質の使用を提供することである。ここで、上述の融合タンパク質は、VEGFに結合可能である組み換え受容体融合タンパク質である。より具体的には、上述の融合タンパク質は、中国特許出願第200510073595.4号明細書（抗血管形成融合タンパク質およびそれらの利用）に記載されたFP1、FP2、FP3、FP4、FP5、FP6、ならびに本明細書に記載したFP7およびFP8からなる群より選択された任意の1つまたは組み合わせである。上記融合タンパク質の中でも、融合タンパク質FP1、FP2、FP3、FP4、FP5、FP6のアミノ酸配列は、上記中国特許出願第200510073595.4号明細書（上述の明細書は、その全体が引用によって本明細書に組み込まれる）に開示された。FP1は、Flt-1の2番目のIg様ドメイン、KDRの3番目のIg様ドメイン、およびヒト免疫グロブリンFcからなる。FP2は、KDRの1番目のIg様ドメイン、Flt-1の2番目のIg様ドメイン、KDRの3番目のIg様ドメイン、およびヒト免疫グロブリンFcからなる。FP3は、Flt-1の2番目のIg様ドメイン、KDRの3番目および4番目のIg様ドメイン、ならびにヒト免疫グロブリンFcからなる。FP4は、Flt-1の2番目のIg様ドメイン、KDRの3番目のIg様ドメイン、Flt-1の4番目のIg様ドメイン、およびヒト免疫グロブリンFcからなる。FP5は、Flt-1の2番目のIg様ドメイン、KDRの3番目から5番目のIg様ドメイン、およびヒト免疫グロブリンFcからなる。FP6は、Flt-1の2番目のIg様ドメイン、KDRの3番目のIg様ドメイン、Flt-1の4番目から5番目のIg様ドメイン、およびヒト免疫グロブリンからなる。融合タンパク質FP7およびFP8のアミノ酸配列は、配列表における配列番号2および4として示される。眼疾患に関連する上述の血管形成は、限定されないが、AMD、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜血管閉塞、処置（例えば、レーザー凝固法、および外科的網膜移植）の失敗に関する血管形成を含む。

30

40

【0014】

本発明の他の態様は、処置を必要とする患者に対して、薬学的有効量のFP3、FP7および/またはFP8の投与を含む処置方法を提供することである。

【0015】

本発明の他の態様は、VEGF受容体融合タンパク質FP1、FP2、FP3、FP4

50

、F P 5、F P 6、F P 7、およびF P 8からなる群から選択した任意の1つまたは組み合わせを上記疾患に罹患した患者に対して投与することにより、血管形成に関連する眼疾患を処置する方法を提供することである。ここで、当該眼疾患は、限定されないが、A M D、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜血管閉塞、処置（例えば、レーザー凝固法、および外科的網膜移植）の失敗に関する血管形成を含む。

【0016】

上記融合タンパク質は、精製された形態において使用され得るか、またはそれらの溶媒和物、または塩、または塩の溶媒和物として使用され得る。本発明において述べられる上記融合タンパク質は、これらの全ての形態を含む。

【0017】

本発明において述べられるV E G F受容体融合タンパク質F P 1、F P 2、F P 3、F P 4、F P 5、およびF P 6は、中国特許出願第200510073595.4号明細書に記載されており、かつ当該明細書中の方法および他の同様の方法に従って調製され得る。F P 7およびF P 8は、新規の化合物であり、その調製は、中国特許出願第200510073595.4号明細書に記載された方法と同様の方法により実施され得る。そして、以降の本発明の実施例に当該調製の詳細について記載されている。

【0018】

遺伝子組み換え技術により得られた本発明の組み換えタンパク質は、医薬品品位に精製され得、そしてそれから、所望の製剤の必要に応じて、従来の薬学的に受容可能な担体および/または他の補助剤と混合され得、かつ従来の製剤方法論に従って好適な薬学的製剤として調製され得る。これらの製剤は、静脈内投与、硝子体内投与、腹腔内投与、皮下投与、眼に局所的な投与（例えば、点眼）に関して使用され得；中でも、好ましいのは、溶液製剤、または使用前に水分補給されて溶液になり得る凍結乾燥製剤である。

【0019】

本発明において記載されている製剤において、融合タンパク質の濃度は、0.01mg/mL ~ 1000mg/mLの間である。具体的な投与量は、製剤の形態、臨床的な必要性などに依存する。一般的なガイドラインでは、各処置ごとに0.1mg ~ 3000mg、好ましくは1mg ~ 2000mgを毎日、2日に1回、3日に1回、4日に1回、5日に1回、6日に1回、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、1月に1回、または1日に数回（例えば、1日に2 ~ 3回）投与することを提案している。

【0020】

薬学的に受容可能な上述の担体は、本発明に記載される製剤の形態に好適な任意の担体、好ましくは以下のもの：リン酸ナトリウム(sodium phosphate)、コハク酸ナトリウム(sodium succinate)、ヒスチジン(histidine)、マンニトール(mannitol)、トレハロース無水物(trehalose dihydrate)、ポリソルベート20(polysorbate 20)、塩化ナトリウム(sodium chloride)、スクロース(sucrose)、トロメラモル(tromeramol)、セルロース、修飾されたセルロースまたはラクトースのうちの1つ以上であり得る。上述の製剤は、0 ~ 100mM（例えば、1 ~ 100mM）の濃度、および3 ~ 9まで変動するpHを有する、リン酸塩(phosphate)、クエン酸塩(citrate)、酢酸塩(acetate)、コハク酸塩(succinate)、トロメラモル(tromeramol)（トリス(Tris)）、ヒスチジン(histidine)、またはそれらの組み合わせのようなpH製剤緩衝液(formulation buffer)を含むことができ；そしてまた、塩化ナトリウム(sodium chloride)（0 ~ 200mM、例えば1 ~ 100mMまで変動する濃度）、ブドウ糖(dextrose)（0% ~ 50%、例えば1% ~ 30%まで変動する濃度）のような浸透圧調節剤を含むことができ；そして、0% ~ 40%、好ましくは1% ~ 30%の濃度を有する、アミノ酸(amino acid)、グリセロール(glycerol)、シクロデキストリン(cyclodextrin)、スクロース(sucrose)、トレハロース無水物(trehalose dihydrate)のような安定化剤を含むことができ；チメロサル(thimerosal)、亜硫酸水素ナトリウム(sodium bisulfite)、ベンジルアルコール(benzyl alcohol)などの保存剤を含むことができる。凍結乾燥製剤において、マンニトール(mannitol)のような賦形剤は、0% ~ 40%、好ましくは0.1% ~ 10%の濃度を有して含まれ得る。一方、溶液製剤において

、ポリソルベート 20 (polysorbate 20) またはポリソルベート 80 (polysorbate 80)、S D S のような界面活性剤は、0 % ~ 2 %、好ましくは 0 . 0 1 % ~ 1 % の濃度を有して含まれ得る。また、本発明において記載した上記製剤は、保存剤、安定化剤、溶媒、共溶媒を含むことができる。好ましい溶媒は、注入のための水、エタノール、グリセロール (glycerol) のような有機溶媒、またはその他の等浸透圧溶液である。

【 0 0 2 1 】

驚くべきことに、本発明では、本明細書における融合タンパク質が眼疾患に関連する多様な血管形成の処置に有効であることを見出している。当該眼疾患は、例えば、A M D、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、糖尿病性黄斑浮腫、網膜血管閉塞、処置（例えば、レーザー凝固法、および外科的網膜移植）の失敗に関する血管形成である。加えて、当該融合タンパク質は、安定性が高く、安全性が高く、副作用が小さく、効果的である。実験によって、以下の実施例において詳細が示されるとともに、本発明の利点の実証されている。

10

【 0 0 2 2 】

〔図面の簡単な説明〕

図 1：本発明に記載された融合タンパク質の 8 つの融合タンパク質の模式図；

図 2：融合タンパク質の V E F G 結合親和性の比較；

図 3：虚血性萎縮症を原因とする網膜の血管形成における融合タンパク質の効果；

図 4：脈絡膜血管新生における融合タンパク質の効果。

20

【 0 0 2 3 】

〔本発明を実施する最良の形態〕

以下の実施例では、本発明をさらに明確にするが、当該実施例は、本発明の保護範囲を限定するために解釈されるべきではない。

【 0 0 2 4 】

（実施例 1 . F P 7 の構築）

融合タンパク質 F P 7 は、鋳型として H U V E C 細胞由来の m R N A 抽出物、および以下のプライマーを用いた増幅によって得られた c D N A の F 1 t - 1 遺伝子断片および K D R 遺伝子断片から構築された。

【 0 0 2 5 】

F L T - 1 D 2 (F) : 5 ' - c c t t t c g t a g a g a t g t a c a g t g a - 3 ' 30

F L T - 1 D 2 (R) : 5 ' - t a t g a t t g t a t t g g t t t g t c c a t - 3 ' 30

K D R D 3 (F) : 5 ' - g a t g t g g t t c t g a g t c c g t c t c a - 3 ' 30

K D R D 3 - 4 (R) : 5 ' - c g g t g g g a c a t a c a c a a c c a g a - 3 ' 。 30

【 0 0 2 6 】

具体的な条件は、F 1 t - 1 および K D R I g 様ドメインの P C R 産物を得るための、9 5 において 3 0 分間の変性、5 6 において 4 5 秒間のアニーリング、7 2 において 2 分間の伸張の、3 0 サイクルの P C R 増幅である。上記 P C R 産物を T A クローニング (cloning) キットを用いて、P C R 2 . 1 プラスミドにクローニングした。その後、E . c o l i を形質転換し、白いコロニーを選択し、かつ L B 培地で一晚培養した。上記プラスミドをキアゲン (Qiagen) プラスミド精製キットで抽出し、そしてそれから制限酵素消化および塩基配列の確認を行った。F 1 t - 1 断片、K D R 断片、および I g G ヒンジ領域の c D N A をソーイング P C R (Sewing PCR) により共にライゲーションした。E c o R I 部位を末端のプライマーに導入した。P C R 産物は、キアゲンキットを用いて精製され、E c o R I を用いた制限酵素消化に続いて、そしてそれから、p c D N A 3 . 1 プラスミドにクローニングされた。上記組み換えプラスミドを使用して E c o l i が形質転換され、続いて陽性コロニーが選択され、L B 培地で一晚培養された。上記プラスミドをキアゲン (Qiagen) キットで抽出し、かつ制限酵素消化および塩基配列の確認を行った。確認したプラスミドを用いて、融合タンパク質 F P 7 を安定して産生する細胞株を得るために、C H O 細胞がトランスフェクトされた。F P 7 のアミノ酸配列は、配列番号 3 に示されており、F P 7 の D N A 配列は、配列番号 1 に示されている。ヒンジ (hinge) 領域の部

40

50

分は、融合タンパク質のC末端に維持された。

【0027】

(実施例2．FP8の構築)

融合タンパク質FP8を鋳型としてFP7、およびプライマーf1t-1 D2(F): 5'-cctttcgtagagatgtacagtga-3'を用いてPCR増幅した。後者のDNA配列は、KDR D3-hing(R): 5'-agggtgctgggcacagtgggcatgtgtgagttttgtctttttcatggaccctgacaaatg-3'であった。融合タンパク質FP8は、KDRの3番目のIg様ドメインの相補的な配列、およびヒトIgGFcヒンジの部分配列を含む。PCR反応の増幅条件および遺伝子クローニングは、実施例1と同様に行った。最後に、クローニングしたFP8を有するpcDNA3.1プラスミドを用いてCHO細胞にトランスフェクトし、かつFP8融合タンパク質を産生するための安定した細胞株を得た。FP8のアミノ酸配列は、配列番号4に示され、そのDNA配列は配列番号2に示される。

10

【0028】

(実施例3．融合タンパク質のVEGFに対する結合親和性実験)

本発明において、VEGFの量を測定することで、多くの融合タンパク質のVEGFに対する親和力を決定した。実験において、既知量のVEGF(10PM)を試験管に添加し、そしてそれから異なる程度まで希釈された融合タンパク質(図2に示されている)を等しい量にして、添加し、そして混合して、37℃で1時間インキュベートした。1時間後、試験管における遊離VEGFの量をVEGF分析キット(VEGF assay Kit)(R&D systems)を用いて決定した。分析後のアッセイの結果を図2に示す(FP1、FP3、FP7、およびFP8は、それぞれ11.2PM、4.3PM、4.1PM、および11.2PMのIC50として示される親和性を有して、VEGFと効率的に結合できることを実証している)。この実験は、FP3およびFP7が、インビトロにおいてVEGFに対する同様の親和性を有し、一方、FP8およびFP1が、同様であるが、前者の2つよりも低い親和性であることを証明している。FP1~FP6のVEGF親和性は、実施例3に記載した中国特許出願第200510073595.4号明細書に既に記載されている。

20

【0029】

この実験は、KDRの4番目のIg様ドメインのアミノ酸配列が、融合タンパク質のVEGF結合能をさらに増強できることを示している。

30

【0030】

(実施例4．網膜虚血萎縮症に起因する血管形成を阻害する融合タンパク質の実験結果)

7日齢の新生マウスを、高酸素分圧(75%±2%)、23±2℃に制御された温度、および日照条件を有するインキュベーターに置いた。数日後には、網膜の中心に血管新生が起こっておらず；さらに5日後、上記幼いマウスを正常の酸素分圧のインキュベーターに戻した。比較的低い酸素分圧に起因する、マウスの網膜における低酸素状態のために、虚血性萎縮症に起因する糖尿病性網膜症およびその他の網膜の変性における血管形成成長と同様に、血管形成成長が誘導された。

40

【0031】

モデルを用いて、3つの融合タンパク質(FP1、FP2、およびFP7)を、網膜虚血萎縮症と関連する血管形成への抑制性の影響について評価した。

【0032】

高酸素分圧を有するインキュベーターに5日間おいた後、幼いマウスを正常の酸素分圧のインキュベーターに戻した。幼いマウスは、各10匹ずつ5群に分けられ、かつそれから、1日後に30mg/kgの融合タンパク質を腹腔内に投与された。上記投与を、2日に1回、計4回行った。コントロール群におけるマウスは、同量のFcタンパク質を用いて注射された。処置の後、各群からの6匹のマウスは、蛍光FAMの心臓注入を受けた。10分後、幼いマウスの網膜が取り出されて、血管形成成長を分析した。蛍光顕微鏡下において、網膜を水らにし、かつ血管形成および蛍光の漏れについて観察した。各群の他の

50

4匹のマウスについては、眼を取り出してパラフィンで包埋した。そしてそれから、切片化してH & Mで染色した。顕微鏡下において、血管内皮細胞核の数を数えて、血管形成に対する融合タンパク質の影響を分析した (Investigative Ophthalmology Visual Science 43, 1994-2000, 2002)。その結果を図3に示す。Fcタンパク質の注入を受けた若いマウスの網膜は、いくつもの病変を示している。多くの不規則な血管が脈絡膜上に観察され得る。融合タンパク質の注入を受けた若いマウスの網膜は、明らかな血管形成を全く示していない (図3に示されている)。中でも、FP3は最も有効であり、かつFP1およびFP7も効果的であった (Fc領域の不足が、おそらくこれらの安定性に影響を及ぼしている)。

【0033】

一方で、我々は、硝子体内投与したこれらの融合タンパク質の抗血管形成効果について試験している。同じ動物モデルにおいて、正常酸素分圧のインキュベーターに戻した1日後、各眼について0.5 µgの融合タンパク質の硝子体内投与を1動物につき1回だけ行った。処置の7日後、動物の網膜を上述のように回収し、かつ処置した。血管形成に対するこれらの融合タンパク質の効果を図3に示す。その結果は、これらの融合タンパク質が、硝子体内投与後、血管形成に対する顕著な抑制を示すことを示している。硝子体内投与は、腹腔内投与と比べてよりよい有効性を示している。一方、我々は、これらの実験において、FP7はFP3同様であることをこれらの実験において観察しており、かつ両者ともFP1よりより良好であった。この実験では、硝子体内投与のために、FP7は血液循環に入る必要がなく、従って、血液の循環におけるその低い安定性は、その有効性に影響を与えなかった。

【0034】

(実施例5. レーザー誘導脈絡膜血管新生に対する融合タンパク質の影響)

公開文献 (American Journal Pathology 153, 1641-1646, 1998) に従って、我々は、眼におけるレーザー誘導新血管新生による、AMDモデルをラットにおいて確立している。約150匹のラットを4群に分け、その中のコントロール群におけるラット10匹は、Fcタンパク質 (20 mg / kg) の皮下注射を受け、一方、各試験群におけるラット10匹は、レーザー処置の前日、およびレーザー処置の3、6、9および12日後に、計5回の20 mg / kgのFP1、FP3およびFP7の皮下注射を受けた。レーザー処置の15日後、上記ラットは、50 mgの蛍光標識したデキストランを受け取った。麻酔処置下で眼球を取り出した後、脈絡膜新血管新生 (CNV) 病変を分析するために、速やかに脈絡膜を分離し、かつ平坦化するかまたは凍結切片化し、かつそれから蠟を用いて包埋した。図4に示されるように、結果は、融合タンパク質処置を受けたラットにおいて、コントロール群に由来するCNV領域と比べてCNV領域が小さかった (中でも、FP3の有効性は、FP1またはFP7の有効性よりも良好であった) ことを示している。FP7およびFP1のCNVに対する抑制効果は同程度であった。

【0035】

(実施例6. 眼疾患処置における融合タンパク質の応用)

これらの融合タンパク質は、血管形成に関連する多様な眼疾患を処置するために、硝子体内投与および静脈内投与のような好適な製剤形態によって投与され得る。上記眼疾患としては、AMD、糖尿病性網膜症 (diabetic retinopathy)、糖尿病性黄斑浮腫 (diabetic macular edema)、網膜血管閉塞 (central retinal vein occlusion) が挙げられる。一方、これらの融合タンパク質は、血管形成に起因する治療の失敗の危険を減らすために、光線感作物質またはレーザー治療 (光凝固) (photocoagulation) のような他の治療法と組み合わせ利用され得る。また、これらの融合タンパク質は手術 (例えば、網膜移植後に、血管形成のために当該手術が失敗することもあり得る) と組み合わせられ得る。例えば、当該手術の時点においてこれらの融合タンパク質の処置を受けている場合、患者は、網膜移植の成功率を向上できることもあり得る。AMD患者は、所定の眼の検査の後、視力の基準を設定され得、かつそれからこれらの融合タンパク質 (例えば、FP3またはFP7) を硝子体内投与によって受け取ればよい。処置後、AMDに対するこれらの融合タンパク

10

20

30

40

50

質の影響を記録するために、患者は、病院で観察および検査を受けた。代表的に、検査を、処置の1、2、6、14、30、および90日後のそれぞれ1回を起こす。一方、患者は、2～8週間毎にそれぞれの注入の複数の処置を受けてもよい。各注入投与量は、眼ごとに10 μ g から5 mg まで変動し得る。

【0036】

AMD、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫の患者からの臨床提供者に由来して、融合タンパク質FP3、FP7は、対照実験と比較されている。

【0037】

(I) AMD

1. 融合タンパク質FP3の有効性

10

コントロール群は、光凝固治療を受け；一方、試験群はFP3を受けた。

【0038】

【表1】

有効性の比較					
群	眼の個数	顕著に有効	有効	無効	有効率
試験群	46	13	27	8	86.9%
コントロール群	40	4	19	14	57.5%

20

【0039】

評価基準は、中国保健省 (Chinese Department of Health) 「従来の中国製医薬品および新規医薬品によるAMD処置の臨床検査指針」の有効性評価基準に従った。

【0040】

(1) 顕著に有効である：(i) 変視症などの顕著な症状改善；(ii) 中心の視野が、少なくとも4ラインだけ向上される；(iii) 小さな収縮または視野中央の中心暗点の明らかな菲薄化；(iv) 黄斑浸出物および出血の明らかな吸着、神経性上皮細胞および色素上皮細胞の分離の消失もしくはまたは明らかな収縮；(v) 蛍光眼底血管造影法により分析した網膜の血管形成の進行がないことまたは低下；蛍光の浸出の大幅な減少；コントラスト感度の若干の改善。

30

【0041】

上述の条件の4つを満たせば、顕著な有効性という評価がつけられる。

【0042】

(2) 有効である：(i) 変視症などの症状改善；(ii) 中心の視野が少なくとも2ラインだけ改善する；(iii) 視野中央の中心暗点の菲薄化；(iv) 黄斑浸出物および出血の部分的な吸着、神経性上皮および色素上皮細胞の分離のいくつかの収縮；(v) 網膜血管造影法における減少した蛍光色素の浸出；コントラスト感度の若干の改善。

40

【0043】

上記条件の2～3つを満たせば、有効という評価がつけられる。

【0044】

(3) 無効である：有効な基準を満たさない。

【0045】

結果は、融合タンパク質FP3がAMDの処置に関して顕著な有効性を示すことを示している。

【0046】

2. FP7の有効性

50

コントロール群に光凝固治療を受け；一方、試験群はF P 7を受けた。

【 0 0 4 7 】

【 表 2 】

有効性の比較					
群	眼の個数	顕著に有効	有効	無効	有効率
試験群	45	16	21	8	82.2%
コントロール群	42	6	19	17	59.5%

10

【 0 0 4 8 】

評価基準は上述のものと同じである。

【 0 0 4 9 】

結果は、A M D 処置に関する融合タンパク質 F P 7 の有効性が、光凝固処置と同じか、より良好であることを示している。

【 0 0 5 0 】

20

(I I) 糖尿病性網膜症

コントロール群は網膜光凝固を受け；一方、試験群はF P 3を受けた。

【 0 0 5 1 】

【 表 3 】

有効性の比較							
群	個数	有効性				Z	P
		SE(%)	E(%)	IE(%)	W(%)		
試験群	107	43(40.2)	44(41.1)	20(18.7)	0(0.0)	-1.963	0.050
コントロール群	105	31(29.5)	44(41.9)	30(28.6)	0(0.0)		

30

【 0 0 5 2 】

【 表 4 】

両群における総有効性の比較					
群	個数	有効性		Z	P
		SE + E (%)	IE + W (%)		
試験群	107	87 (81.3)	20 (18.7)	-1.690	0.091
コントロール群	105	75 (71.4)	30 (28.6)		

40

【 0 0 5 3 】

有効性評価基準は、「従来の中国製医薬品および新規医薬品の臨床検査指針」の糖尿病

50

性網膜症の有効性評価基準に従った。上記評価基準は、4段階の有効性：S E（顕著に有効である）、E（有効である）、I E（無効である）、およびW（悪化する）を含む。

【0054】

1．顕著に有効である（S E）：

（1）視力が、少なくとも4ラインだけ改善するか、または1．0以上に良い。

【0055】

（2）網膜の微細動脈瘤の数が（+++）から（++）に減少するか、または（++）から（+）に減少するか、または（+）から消失する；網膜の出血が、（+++）から（+）に減少するか、または（++）から消失する；浸出物が（+++）から（++）に減少するか、または（++）から（+）に減少するか、または（+）から消失することが、眼底試験において示される。微細動脈瘤、出血、および浸出物の少なくとも2つが上述した要求を満たす。

10

【0056】

（3）平均血液循環時間が顕著に減少し、黄斑浮腫が顕著に緩和し、網膜の毛細血管の非灌流領域が減少し、血管の漏れが明らかに低減することが、蛍光眼底血管造影法によって示される。上述の基準の少なくとも2つを、少なくとも20%の向上の度合いを有して、満たすべきである。

【0057】

2．有効である（E）：

（1）視力が少なくとも2ライン改善する。

20

【0058】

（2）網膜の微細動脈瘤の数が（+++）から（++）に減少するか、または（++）から（+）に減少するか、または（+）から消失する；網膜の出血が（+++）から（+）に減少するか、または（++）から消失する；浸出物が（+++）から（++）に減少するか、または（++）から（+）に減少するか、（+）から消失する。微細動脈瘤、出血、および浸出物の少なくとも1つが上述の要求を満たすべきである。

【0059】

（3）平均血液循環時間が減少し、黄斑浮腫が緩和し、網膜の毛細血管の非灌流領域が減少し、血管の漏れが明らかに低減することが、蛍光眼底血管造影法によって示される。上述の基準の少なくとも2つを、少なくとも10%の向上の度合いを有して、満たすべきである。

30

【0060】

3．無効である（I E）：上述に示される要求を満たさない。

【0061】

4．悪化する（W）：

（1）視力が2ライン以上悪くなる。

【0062】

（2）眼底のカラー撮影法が、血管形成のような増殖性の変化を示す。

【0063】

（3）網膜の毛細血管の非灌流領域が増加し、黄斑浮腫が悪化し、および血管の漏れが増加することが、蛍光眼底血管造影法によって示される。

40

【0064】

注釈：

（1）視力試験は、標準の視力表を用いて行われる（1の目盛）。0．1よりも低い場合は、0．02毎に1ラインとして数える。

【0065】

（2）眼底の変化は、検眼鏡またはカラー撮影法に従って評価され、かつ微細動脈瘤は、蛍光眼底血管造影法の陰性によって評価された。

【0066】

（3）（+）は、多くないもしくは数えられる微細動脈瘤、出血、または浸出物を示；

50

(++)は、多くのもしくは数えることが困難な微細動脈瘤、出血、または浸出物を示す；(+++)は、多くの数えることができない微細動脈瘤ならびに顕著な出血および顕著な浸出物、ならびに同時に融合したものを表す。

【0067】

(4)有効性を評価する場合、視力、眼底の変化、および蛍光観察法の少なくとも2つがに注意しなければならない。

【0068】

結果は、融合タンパク質FP3は、糖尿病性網膜症の処置において、レーザー光凝固と同様の有効性を有することを示している。

【0069】

(III)糖尿病性黄斑浮腫

コントロール群は光凝固を受け、試験群はFP3を受けた。

【0070】

【表5】

10

20

有効性の比較							
群		眼の個数	視力の変化				P
			SE(%)	E(%)	IE(%)	χ^2	
3月	試験群	42	19(45.24)	18(42.86)	5(11.90)	0.261	P>0.05
	コントロール群	45	20(44.44)	18(40.00)	7(15.56)		
6月	試験群	42	20(47.62)	18(42.86)	4(9.52%)	0.64	P>0.05
	コントロール群	45	18(40.00)	21(46.67)	6(13.33)		

【0071】

【表6】

30

群		眼の個数	黄斑浮腫の吸着			P
			E(%)	IE(%)	χ^2	
3月	試験群	42	30(71.43)	12(28.57)	0.83	P>0.05
	コントロール群	45	28(66.22)	17(37.78)		
6月	試験群	42	32(76.19)	10(23.81)	1.43	P>0.05
	コントロール群	45	29(64.44)	16(35.56)		

40

【0072】

有効性の評価基準は、Ren Lianerによる「糖尿病性網膜症に関するアルゴンレーザー凝固の臨床試験」(Journal of Ophthalmology, 1998, 7 (2): 86-88)に従った。

【0073】

視力の評価基準は標準の視力表に従った。顕著に有効である(SE)という評価は、処置後に視力が少なくとも2ライン向上した場合に、つけられた。無効である(IE)という評価は、視力が少なくとも2ライン悪化した場合に、つけられ；その他は、視力の変化

50

無し（E）という評価がつけられた。処置前に、視力が0.1以下である場合、 ± 0.02 の変化が、視力の向上または悪化として評価され、その他は、変化無しとみなされた。

【0074】

黄斑浮腫の低減の程度は、レーザーの光凝固の前または後に、眼底蛍光血管造影法に従って評価された。有効である（E）という評価は、黄斑の領域に浸出物が無いか、または浸出物が少なくとも領域の4分の1に縮小した場合に、つけられた。無効である（IE）評価は、浸出物が顕著に減少しなかったか、または増加でもした場合につけられた。

【0075】

結果は、VEGF受容体融合タンパク質の硝子体内投与が、黄斑浮腫の患者における処置後に、短期（3ヶ月）または比較的長期（6ヶ月）の両者においてレーザー光凝固よりも有効性が高いことを示している。

10

【0076】

（IV）網膜静脈閉塞

コントロール群は、光凝固を受け；一方、試験群はFP3を受けた。

【0077】

【表7】

有効性の比較					
群	眼の個数	顕著に有効	有効	無効	有効率
試験群	71	25	33	13	81.69%
コントロール群	68	10	43	15	77.94%

20

30

【0078】

有効性は、Zhang Huirongによる「網膜静脈閉塞の評価」（Journal of Beijing Medical College, 1982, 14: 118）に従って評価された。

【0079】

（実施例7．眼科系凍結乾燥製剤における融合タンパク質FP3の調製）

最初に、製剤緩衝液(formulation buffer)（10mmol/L ヒスチジン、9% トレハロース無水物、および0.05% ポリソルベート20（pH6.0）を含む）が調製され、それからFP3の好適な製剤原料(drug substance)が溶解され、所要のタンパク質濃度（10mg/mL）にまで上記製剤緩衝液を用いてそれが希釈され、そしてそれによって薬学的組成物が得られた。滅菌ろ過後、所要量の薬学的組成物がピペッターまたは分配器によって無菌バイアル（規格：0.5mL/2mL）に分配され、かつ当該バイアルは、無菌のブチルラバーの栓を用いて付けられた（半分締め状態）。上記バイアルが凍結乾燥機に置かれ、それから、好適な凍結乾燥の手順（凍結前、凍結、真空ポンプ、時間、温度、真空度の項目などを含む）を設定することによって凍結乾燥された。凍結乾燥の完成後、栓が完全に締められ、それからバイアルが凍結乾燥機から取り出され、かつアルミニウム蓋を用いて封がされた。標識した後、当該バイアルは、紙箱に収納され、かつ好適な温度下に保存され得る。

40

【0080】

（実施例8．眼への利用のため溶液中の融合タンパク質FP3の精製）

最初に、製剤緩衝液(formulation buffer)（5mmol/L リン酸二ナトリウム、5

50

mmol/L クエン酸、100mmol/L 塩化ナトリウム、20% スクロース、および0.1% ポリソルベート20 (pH 6.0)を含む)が調製され、それから、F P 3の好適な製剤原料溶解され、かつ所要のタンパク質濃度(10mg/mL)にまで製剤緩衝液を用いてそれを希釈され、そしてこれらによって薬学的組成物が得られた。滅菌ろ過後、所要量の薬学的組成物が、ピペッターまたは分配器によって無菌バイアル(規格: 5mL/20mL)に分配された。上記バイアルは、無菌のブチルラバーの栓を用いてしっかりと付けられ、アルミニウムの蓋を用いて封をされ、バイアルに対して標識され、かつ好適な温度で紙箱に保存された。

【0081】

(実施例9. 眼への利用のため溶液中の融合タンパク質F P 3の精製)

最初に、製剤緩衝液(10mmol/L コハク酸ナトリウム、9% トレハロース無水物、および0.1% ポリソルベート20 (pH 6.0)を含む)が調製され、それからF P 3に好適な製剤原料(drug substance)が溶解され、所要のタンパク質濃度(10mg/mL)にまで製剤緩衝液を用いてそれが希釈され、そしてそれによって薬学的組成物が得られた。滅菌ろ過後、所要量(100μl)の薬学的組成物が無菌バイアル(規格: 0.5mL)にピペッターによって分配された。当該バイアルは、無菌のブチルラバーの栓を用いてしっかりと付けられ、アルミニウムの蓋を用いて封をされ、バイアルに対して標識された。また、当該薬学的組成物がシリンジ(1mL、灰色のゴムピストンおよび内径27の針)に所要量(100μl)導入され、ゴム栓がピストンに付けられ、かつ灰色のゴムの覆いおよび硬質プラスチックさを針に順に付けられた。それから、当該シリンジがアルミニウム袋を用いて封をされ(加えて、プラスチックのねじ込みフランジおよび白いフランジ継ぎ手が別のアルミニウム袋に封入された)。それらは、好適な温度で紙箱に保存された。

【0082】

(実施例10. 眼製剤用の融合タンパク質F P 1の精製)

融合タンパク質F P 3に代えて融合タンパク質F P 1を用いたこと以外は、全ての材料および方法は実施例9の場合と同じである。

【0083】

(実施例11. 眼製剤用の融合タンパク質F P 2の精製)

融合タンパク質F P 3に代えて融合タンパク質F P 2を用いたこと以外は、全ての材料および方法は実施例9の場合と同じである。

【0084】

(実施例12. 眼製剤用の融合タンパク質F P 4の精製)

融合タンパク質F P 3に代えて融合タンパク質F P 4を用いたこと以外は、全ての材料および方法は実施例9の場合と同じである。

【0085】

(実施例13. 眼製剤用の融合タンパク質F P 5の精製)

融合タンパク質F P 3に代えて融合タンパク質F P 5を用いたこと以外は、全ての材料および方法は実施例9の場合と同じである。

【0086】

(実施例14. 眼製剤用の融合タンパク質F P 6の精製)

融合タンパク質F P 3に代えて融合タンパク質F P 6を用いたこと以外は、全ての材料および方法は実施例9の場合と同じである。

【0087】

(実施例15. 眼製剤用の融合タンパク質F P 4の精製)

融合タンパク質F P 3に代えて融合タンパク質F P 7を用いたこと以外は、全ての材料および方法は実施例9の場合と同じである。

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1】図1は、本発明に記載した8つの融合タンパク質の模式図である。

10

20

30

40

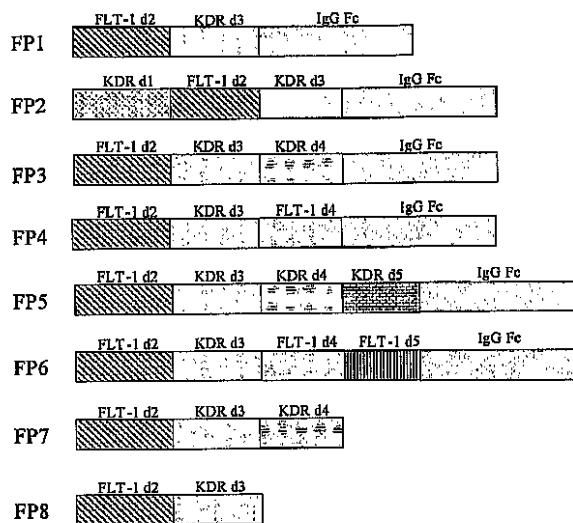
50

【図 2】図 2 は、融合タンパク質の V E G F 結合親和性の比較を示す。

【図 3】図 3 は、虚血性萎縮症を原因とする網膜の血管形成における融合タンパク質の効果を示す。

【図 4】図 4 は、脈絡膜血管新生における融合タンパク質の効果を示す。

【図 1】



【図 2】

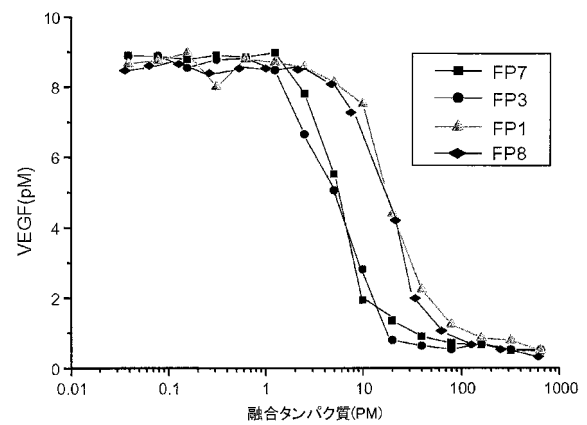
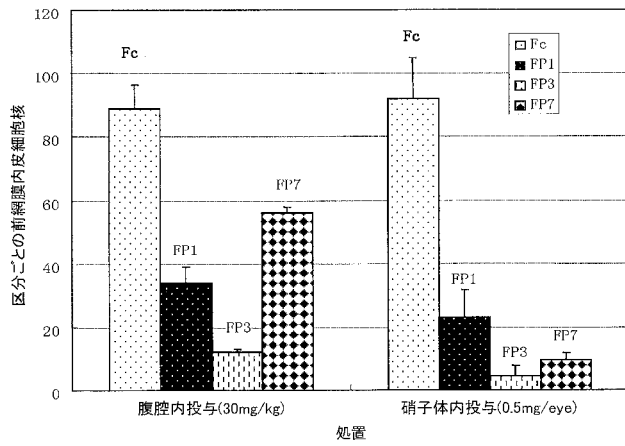
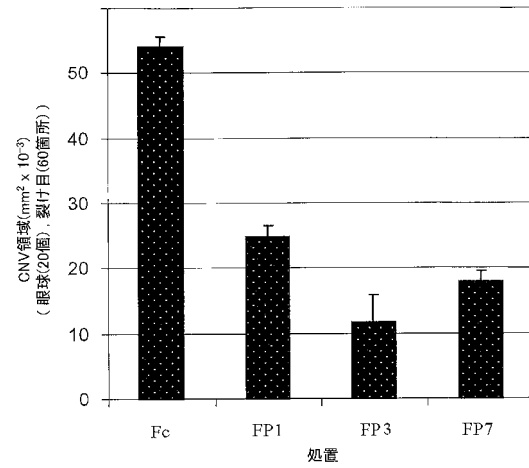


图 1

【 図 3 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

2009531036000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2007/001021
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)		
CNPAT; CNKI; WPI; EPODOC; PAJ; MEDLINE and keyword: VEGF, vascular endothelial growth factor, receptor, Flt, KDR, Flk, R1R2, trap, fus+, chimeric etc.		
GenBank: SEQ ID Nos: 1-4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1706867 A (CHENGDU KANGHONG SCI TECH IND GROUP CORP) 14 Dec. 2005 (14.12. 2005) claims 1, 8-10, from page 1 line 3 to line 4, page 2 line 10 and page 5 line 28 of the description	7-8
Y	claims 1, 5-6, 8-10, from page 1 line 3 to line 4, page 2 line 10, page 5 line 28 and examples 1-2 of the description, SEQ ID Nos: 1,4-5 of the sequence listing, and figure no.1 of the drawings	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 20 Jun. 2007 (20.06.2007)		Date of mailing of the international search report 05 Jul. 2007 (05.07.2007)
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)62085096

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/001021

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.: 9, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Methods for treatment of human or animal body by therapy (see PCT Rule 39.1(iv)).
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ 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. ☐ 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**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/001021

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005000895 A2 (REGENERON PHARM INC.) 06 Jan. 2005 (06.01.2005) paragraphs [0002], [0003] and [0025] of the description	1-8
A	WO 0075319 A1 (REGENERON PHARM INC.) 14 Dec. 2000 (14.12. 2000) the whole document	1-8
A	WULFF, C et al., Prevention of Thecal Angiogenesis, Antral Follicular Growth, and Ovulation in the Primate by Treatment with Vascular Endothelial Growth Factor Trap R1R2. Endocrinology. July 2002, Vol.143, No.7, Pages 2797-2807, the whole document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/001021

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01)i

C12N 15/62 (2006.01)i

C12N 15/63 (2006.01)i

A61K 38/17 (2006.01)i

A61P 27/02 (2006.01)i

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2007/001021

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1706867 A	14.12. 2005	CA 2569108 A1	22.12.2005
		WO 2005121176 A1	22.12.2005
		EP1767546 A1	28.03.2007
		CN 1304427 C	14.03.2007
WO 2005000895 A2	06.01.2005	US 2005043236 A1	24.02.2005
		US 7087411 B	08.08.2006
		EP 1639007 A2	29.03.2006
		NO 20060483 A	28.03.2006
		MXPA 05013641 A	01.03.2006
		AU 2004252175 A1	06.01.2005
		BRPI 0412125 A	15.08.2006
		CN 1816566 A	09.08.2006
		KR 20060096184 A	08.09.2006
		RU 2006102497A	10.06.2006
		CA 2529660 A1	06.01.2005
		AU 5040400 A	28.12.2000
WO 0075319 A1	14.12. 2000	EP 1183353 A1	06.03.2002
		NO 20016036 A	08.02.2002
		BRPI 0011407 A	02.04.2002
		KR 20020019070 A	09.03.2002
		HU 0201515 A2	28.08.2002
		CZ 20014387 A3	16.10.2002
		CN 1369009 A	11.09.2002
		JP 2003501089 T	14.01.2003
		US 2003017977 A1	23.01.2003
		ZA 200110068 A	26.02.2003
		SK 17522001 A3	01.04.2003
		MXPA 01012630 A	01.07.2003
		US 2004014667 A1	22.01.2004
		NZ 515913A	30.01.2004
		US 2004266686 A1	30.12.2004
		AU 779303 B2	13.01.2005
		EP 1183353 B1	13.04.2005
		AU 2005201365 A1	28.04.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2007/001021

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		DE 60019415 E	19.05.2005
		EP 1544299 A1	22.06.2005
		US 2005163798 A1	28.07.2005
		ES 2237429 T3	01.08.2005
		US 2005175610 A1	11.08.2005
		US 2005245447 A1	03.11.2005
		US 2005260203 A1	24.11.2005
		RU 2265661 C2	10.12.2005
		US 2006030529 A1	09.02.2006
		US 2006058234 A1	16.03.2006
		DE 60019415 T2	09.03.2006
		US 7070959 B1	04.07.2006
		MX 235102 B	22.03.2006
		US 7087411 B2	08.08.2006

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2007/001021
A. 主题的分类		
参见附加页		
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))		
CNPAT; CNKI 和关键词: 血管内皮生长因子, VEGF, 嵌合, Flt, KDR, Flk, R1R2, 受体, 融合等;		
WPI; EPODOC; PAJ; MEDLINE 和关键词: VEGF, vascular endothelial growth factor, receptor, Flt, KDR, Flk, R1R2, trap, fus+, chimeric etc.;		
GcnBank: SEQ ID Nos: 1-4.		
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
X	CN 1706867 A(成都康弘生物科技有限公司) 14.12 月 2005(14.12.2005)	
Y	权利要求 1、8-10, 说明书第 1 页第 3-4 行、第 2 页第 10 行、第 5 页第 28 行	7-8
Y	权利要求 1、5-6、8-10, 说明书第 1 页第 3-4 行、第 2 页第 10 行、第 5 页第 28 行、实施例 1-2, 序列表 SEQ ID Nos: 1, 4-5, 说明书附图 1	1-8
Y	WO 2005000895 A2 (REGENERON PHARM INC.) 06.1 月 2005 (06.01.2005) 说明书第[0002]、[0003]和[0025]段	1-8
<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 “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 20.6 月 2007 (20.06.2007)		国际检索报告邮寄日期 05.7 月 2007 (05.07.2007)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 <div style="text-align: center;">林峻凯</div> 电话号码: (86-10) 62085096

国际检索报告

 国际申请号
PCT/CN2007/001021

第II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2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. ☒ 权利要求: 9, 10

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:
对人体或动物体治疗的治疗方法 (参见 PCT 细则 39.1(iv))。

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到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。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被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. ☐ 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进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被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:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;
包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2007/001021

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	WO 0075319 A1 (REGENERON PHARM INC.) 14.12 月 2000 (14.12.2000) 全文	1-8
A	WULFF, C et al., Prevention of Thecal Angiogenesis, Antral Follicular Growth, and Ovulation in the Primate by Treatment with Vascular Endothelial Growth Factor Trap R1R2. Endocrinology. July 2002, Vol.143, No.7, Pages 2797-2807, 全文	1-8

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2007/001021

主题的分类

C07K 19/00 (2006.01)i

C12N 15/62 (2006.01)i

C12N 15/63 (2006.01)i

A61K 38/17 (2006.01)i

A61P 27/02 (2006.01)i

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2007/001021	
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 1706867 A	14.12. 2005	CA 2569108 A1	22.12.2005
		WO 2005121176 A1	22.12.2005
		EP1767546 A1	28.03.2007
WO 2005000895 A2	06.01.2005	CN 1304427 C	14.03.2007
		US 2005043236 A1	24.02.2005
		US 7087411 B	08.08.2006
		EP 1639007 A2	29.03.2006
		NO 20060483 A	28.03.2006
		MXPA 05013641 A	01.03.2006
		AU 2004252175 A1	06.01.2005
		BRPI 0412125 A	15.08.2006
		CN 1816566 A	09.08.2006
		KR 20060096184 A	08.09.2006
WO 0075319 A1	14.12. 2000	RU 2006102497A	10.06.2006
		CA 2529660 A1	06.01.2005
		AU 5040400 A	28.12.2000
		EP 1183353 A1	06.03.2002
		NO 20016036 A	08.02.2002
		BRPI 0011407 A	02.04.2002
		KR 20020019070 A	09.03.2002
		HU 0201515 A2	28.08.2002
		CZ 20014387 A3	16.10.2002
		CN 1369009 A	11.09.2002
		JP 2003501089 T	14.01.2003
		US 2003017977 A1	23.01.2003
		ZA 200110068 A	26.02.2003
		SK 17522001 A3	01.04.2003
		MXPA 01012630 A	01.07.2003
		US 2004014667 A1	22.01.2004
		NZ 515913A	30.01.2004
		US 2004266686 A1	30.12.2004
		AU 779303 B2	13.01.2005
		EP 1183353 B1	13.04.2005
		AU 2005201365 A1	28.04.2005
		DE 60019415 E	19.05.2005
		EP 1544299 A1	22.06.2005
		US 2005163798 A1	28.07.2005
		ES 2237429 T3	01.08.2005

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2007/001021	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		US 2005175610 A1	11.08.2005
		US 2005245447 A1	03.11.2005
		US 2005260203 A1	24.11.2005
		RU 2265661 C2	10.12.2005
		US 2006030529 A1	09.02.2006
		US 2006058234 A1	16.03.2006
		DE 60019415 T2	09.03.2006
		US 7070959 B1	04.07.2006
		MX 235102 B	22.03.2006
		US 7087411 B2	08.08.2006

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 47/10 (2006.01)		A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)		A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)		A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA63 CA05 CA20 DA02 EA04 GA11 GA18
 4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA03
 4C076 CC11 DD07F DD37 DD38 DD67 EE23F
 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA22 DB57 NA14 ZA332 ZA362
 4H045 AA10 BA09 BA41 CA40 DA51 EA20 FA74