

(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



PCT



(10) 国际公布号

WO 2011/103700 A1

(43) 国际公布日
2011 年 9 月 1 日 (01.09.2011)

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/000511
- (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:
201010125241.0 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): 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)。 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)。 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)。
- (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 HUMANIZED ANTI-HER2 ANTIBODY, PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种全人源抗 HER2 单克隆抗体、其制备方法及其用途

(57) Abstract: The invention provides a fully humanized anti-HER2 antibody, which has the amino acid sequence of heavy chain variable region as defined in SEQ ID NO : 6 and the amino acid sequence of light chain variable region as defined in SEQ ID NO : 8. The invention also discloses the nucleotide sequence encoding the antibody, the expression vector and the host cell comprising the nucleotide sequence, and the use of the antibody for manufacturing the medicament for the treatment of tumor.

(57) 摘要:

本发明提供了一种全人源抗 HER2 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。本发明还公开了编码该抗体的核苷酸序列、含有该核苷酸序列的表达载体和宿主细胞, 以及该抗体在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

WO 2011/103700 A1

一种全人源抗 HER2 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抗体、其制备方法及用途。

背景技术

乳腺癌是女性最为常见的恶性肿瘤之一。全世界每年新增 100 万以上的乳腺癌病例，而且每年近 40 万人死于乳腺癌。近年来，乳腺癌的发病率在范围内呈明显的上升趋势。无论是在高流行区还是低流行区，乳腺癌发病率均以 5~20% 的速度上升。亚洲妇女的乳腺癌发病率的增长趋势已明显高于欧美国家。在中国，乳腺癌在一些城市已发展为女性恶性肿瘤发病的首位。乳腺癌通常的治疗手段有手术治疗，放化疗和内分泌治疗等等，这些常规治疗手段虽然在很大程度上延长了病人生存期，然而它们副作用很大，其疗效难以进一步提高。肿瘤靶向治疗是近年来兴起的一种新的肿瘤治疗方式，其中具有代表性的是抗肿瘤单克隆抗体。

HER2 (人表皮生长因子受体 2, human epidermal growth factor receptor 2) 是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白，分子量约为 185 KD。抗 HER2 人源化单克隆抗体可以特异性的和 HER2 结合，其抗肿瘤机制包括以下几点：特结合于 HER2 受体胞外段从而阻断 HER2 同源二聚体的组成性激活并干扰 HER2 与其它 ErbB 家族成员形成异源二聚体。介导 HER2 受体的内吞和在溶酶体中的降解；活化 PTEN (与 tensin 同源的磷酸酯酶) 阻断 PI3K (磷酸肌醇 3-激酶) 信号通路；调节细胞周期而抑制肿瘤细胞增殖；促进肿瘤细胞凋亡；抗肿瘤血管生成；ADCC (抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用) 作用；抑制 DNA 修复；增加化疗药物的细胞毒性；逆转肿瘤细胞对宿主细胞因子杀伤作用的抵抗等 (Pergram M, Ngo D, Application and potential limitations of animal models utilized in the development of trastuzumab (Herceptin[®]): A case study. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58:723-34.)。

抗 HER2 人源化单克隆抗体 (Trastuzumab, 商品名 Herceptin) 已被用于临床试验，作为单药治疗 HER2 过度表达的转移性乳腺癌，这些患者曾接受过

针对其转移灶 1 个或 1 个以上化疗方案化疗而失败。本药在临床试验中还与紫杉醇或蒽环类药物（阿霉素或表阿霉素）加环磷酰胺合用作为一线药物，治疗 HER2 过度表达的转移性乳腺癌（Merlin JL, Barberi-Heyob M, Bachmann N, In vitro comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin) combined with paclitaxel (Taxol) or docetaxel (Taxotere) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. Ann Oncol. 2002;13:1743-8.）。但 Trastuzumab 是一个鼠源抗体，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。

10 发明内容

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 HER2 抗体 3E12。

更具体地，本发明提供全人源抗 HER2 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；

15 本发明提供的上述全人源抗 HER2 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；

本发明还提供了一种分离的核苷酸，其编码上述的全人源抗 HER2 抗体；

20 本发明提供的上述核苷酸，其中编码全人源抗 HER2 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 HER2 抗体轻链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:7 所示；

本发明提供的上述核苷酸，其中编码全人源抗 HER2 抗体重链的核苷酸序列为 SEQ ID NO:9 所示，编码全人源抗 HER2 抗体轻链的核苷酸序列为 SEQ ID NO:11 所示；

25 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 (+)；

本发明还公开了上述表达载体转化的宿主细胞，为 CHO-K1 细胞；

30 本发明进一步提供上述全人源抗体的制备方法，包括从噬菌体人源抗体库筛选获得高亲和力全人源抗 HER2 单链抗体；全人源抗 HER2 完整抗体分子真核表达载体的构建；全人源抗 HER2 完整抗体分子在 CHO 细胞中的表达；全人源抗 HER2 完整抗体分子的纯化。

本发明最后公开的上述的全人源抗体在制备治疗肿瘤药物中的用途,所述的肿瘤为 HER2 高表达肿瘤,更具体的为乳腺癌。

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 Trastuzumab (rhUmAb 4D5) 和中国专利申请号 01132225.X 申请日 2001 年 11 月 16 日发明名称为《人源化抗 HER2 单克隆抗体及其制法和药物组合物》中公开的人源化抗体 hGH0/1 相比,3E12 具有更高的抗体亲和力,更强的 HER2 高表达乳腺癌细胞增殖抑制作用、细胞凋亡诱导活性;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。

10 附图说明

图 1. 抗 HER2 抗体的凋亡实验结果(其中图 1-1 为 SK-BR3 细胞,图 1-2 为 BT-474 细胞,图 1-3 为 MCF-7 细胞);

图 2. 抗 HER2 抗体的生长抑制实验结果(其中图 2-1 为 SK-BR3 细胞,图 2-2 为 BT-474 细胞,图 2-3 为 MCF-7 细胞);

15 图 3. 抗 HER2 抗体的体内抗肿瘤实验结果。

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。

20 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

(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_HBack, V_HFor, V_LBack 和 V_LFor 引物。V_HBack, V_HFor, V_LBack 和 V_LFor 的序列见 Immunotechnology,1998,3:271-278。其中在 V_HBack 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_HFor 引物的 5'端加上序列 gcc aga acc acc gcc gcc gga gcc acc acc gcc, 在 V_LBack 引物的 5'端加上序列 tcc ggc ggc ggt ggt tct ggc gga ggc gga tct, 在 V_LFor 引物的 5'端加上含有 Not I 位点的序列 atg cgg ccg c。

(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 recombinant Phage antibody system 试剂盒说明书进行, 用于淘选的特异性抗原“人 HER2 膜外区蛋白”按照参考文献 (Proc Natl Acad Sci USA,1992,89: 4285-4289) 的方法制备。经多次淘选抗体库后获得了一株抗人 HER2 单链抗体 3E12ScFv, 测序后获得其基因序列。SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 分别显示了 3E12 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 3E12 ScFv 轻链可变区 V_L 的核苷酸序列和氨基酸序列。

(5)全人源抗体在真核细胞中的表达

以 3E12ScFv 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℃ 15 分钟; 94℃ 50 秒, 58℃ 50 秒, 72℃ 50 秒, 30 个循环; 72℃ 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 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

(ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCA
GTCATAATATCCAGAGGA)。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。
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
5 人源抗体重链片段3E12V_HC_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 (+)
(3E12V_HC_H)。

以 3E12ScFv 基因和 pGEM-T/C_L 载体为模板，通过重叠 PCR 合成全人源
化抗体轻链基因，反应条件为： 95℃ 15 分钟；94℃ 50 秒，58℃ 50 秒，72℃
10 50 秒，30 个循环；72℃ 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

(ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCA
GTCATAATATCCAGAGGA)。挑选测序正确的克隆用 HindIII和 EcoR I 酶切，
15 经琼脂糖凝胶电泳纯化回收全人源抗体轻链片段 3E12V_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(+) (3E12V_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 10μg(质
20 粒 pcDNA3.1(+)(3E12V_HC_H)4μg，质粒 pcDNA3.1/ZEO(+) (3E12V_LC_L)6μg)和
20μl 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 600μg/ml G418
(Invitrogen 公司产品) 和 250μg/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
25 人 IgG (Fc) (KPL 公司) 包被于 ELISA 板，4℃ 过夜，
用 2% BSA-PBS 于 37℃ 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℃ 温育 2h，加入 HRP - 羊抗人 IgG(κ)
(Southern Biotechnology Associates 公司) 进行结合反应，37℃ 温育 1h，加
入 TMB 显色液于 37℃ 作用 5min，最后用 H₂SO₄ 终止反应，测 A₄₅₀ 值。将筛
30 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 3E12。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 3E12 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 3E12 的轻链核苷酸序列和氨基酸序列。

5 实验例

hGH0/1 按中国专利申请号 01132225.X 申请日 2001 年 11 月 16 日发明名称为《人源化抗 HER2 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。

抗 HER2 抗体的凋亡实验

10 将人乳腺癌细胞 SK-BR-3 (HER2 高表达, ATCC 号: HTB-30)、BT-474 (HER2 中表达, ATCC 号: HTB-20) 及 MCF-7 (HER2 低表达, ATCC 号: HTB-22) 分别与不同稀释度的抗 HER2 抗体 (包括 Trastuzumab, hGH0/1, 3E12) 在 37℃ 培养 20 小时, 洗细胞后用 AnnexinV/PI 试剂盒 (BD 公司产品) 按照产品说明书检测早期凋亡细胞百分率。抗凋亡实验如图 1 所示: 3E12
15 抗体杀伤 SK-BR3 细胞的能力明显强于 Trastuzumab 抗体和 hGH0/1 (在抗体浓度 ≥ 0.025 nM 的浓度的时候, $P < 0.05$, t 检验, 同样的结果也在 BT-474 细胞中得到证实 (在抗体浓度 ≥ 0.025 nM 的浓度的时候, $P < 0.05$, t 检验。然而, 在 HER2 低表达的 MCF-7 细胞中, 3E12 抗体杀伤能力与 Trastuzumab 抗体和 hGH0/1 抗体差不多。这些结果显示了 3E12 抗体杀伤细胞的 HER2 特异
20 性, 且其杀伤 HER2 中高表达的细胞的能力要强于 Trastuzumab 抗体和 hGH0/1 抗体。

抗 HER2 抗体的细胞生长抑制实验

将人乳腺癌细胞 SK-BR-3、BT-474 及 MCF-7 细胞分别与不同稀释度的抗 HER2 抗体在 37℃ 进行孵育, 第五日用 MTT 染色法染色读数后计算生长
25 抑制率。生长抑制实验如图 2 所示: 3E12 抗体对 SK-BR3 细胞的生长抑制能力明显强于 Trastuzumab 抗体和 hGH0/1 (在抗体浓度 ≥ 0.1 nM 的浓度的时候, $P < 0.05$, t 检验), 同样的结果也在 BT-474 细胞中得到证实 (在抗体浓度 ≥ 0.1 nM 的浓度的时候, $P < 0.05$, t 检验)。然而, 在 HER2 低表达的 MCF-7 细胞中, 3E12 抗体对细胞的抑制能力与 Trastuzumab 抗体和 hGH0/1 抗体差

不多。这些结果显示了 3E12 抗体对细胞生长抑制的的 HER2 特异性，且其抑制 HER2 中高表达的细胞的能力要强于 Trastuzumab 抗体和 hGH0/1 抗体。

抗 HER2 抗体的体内抗肿瘤实验

SCID 小鼠（购自上海斯莱克公司）于 0 天时分别皮下接种高度表达表
5 达 HER2 的人乳腺癌细胞 BT-474，待肿瘤长至 0.3 cm^3 时给荷瘤小鼠分别腹
腔注射 0.5, 5 mg/kg 的各种抗 HER2 抗体，每周 2 次，连续治疗 3 周。定期
观测各组小鼠体重和肿瘤大小的变化，共观察 120 天。评价抗 HER2 抗体的
抗肿瘤治疗效果。体内抗肿瘤实验如图 3 所示：3E12 抗体对高表达 HER2
的 BT-474 乳腺癌的生长抑制能力明显强于 Trastuzumab 抗体和 hGH0/1
10 （在 25 mg/kg 的剂量时，第 50、60、70、80、90、100、110、120 天的时
候， $P < 0.05$ ，Mann-Whitney 检验）。

权利要求书

1. 一种全人源抗 HER2 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 HER2 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. 一种分离的核苷酸，其编码权利要求 1~2 任一所述的全人源抗 HER2 抗体。

10 4. 权利要求 3 所述的核苷酸，其具有如 SEQ ID NO:5 所示的编码全人源抗 HER2 抗体重链可变区的核苷酸序列，以及如 SEQ ID NO:7 所示的编码全人源抗 HER2 抗体轻链可变区的核苷酸序列。

5. 权利要求 4 所述的核苷酸，其具有如 SEQ ID NO:9 所示的编码全人源抗 HER2 抗体重链的核苷酸序列，以及如 SEQ ID NO:11 所示的编码全人源抗 HER2 抗体轻链的核苷酸序列。

15 6. 一种表达载体，含有权利要求 3~5 任一所述的核苷酸，为 pcDNA3.1/ZEO(+)或 pcDNA3.1 (+)。

7. 一种转化权利要求 6 所述的表达载体的宿主细胞，为 CHO-K1 细胞。

8. 权利要求 1~2 任一所述的全人源抗 HER2 抗体在制备治疗肿瘤药物中的用途。

20 9. 权利要求 8 所述的用途，其中肿瘤为 HER2 高表达肿瘤。

10. 权利要求 9 所述的用途，其中 HER2 高表达肿瘤可为乳腺肿瘤。

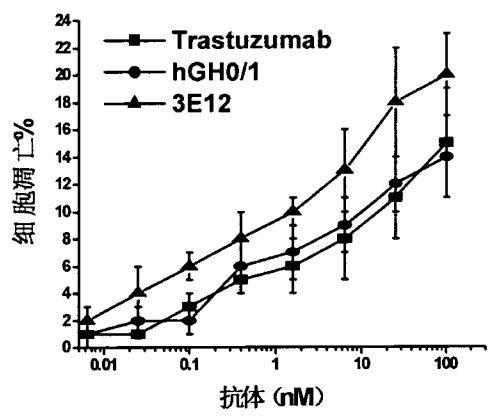


图 1-1

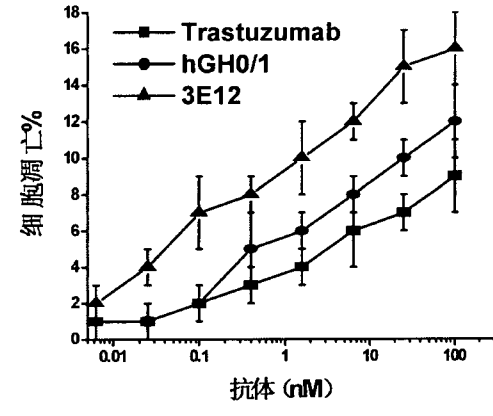


图 1-2

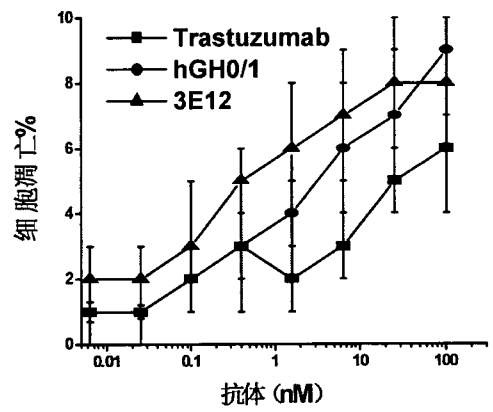


图 1-3

图 1

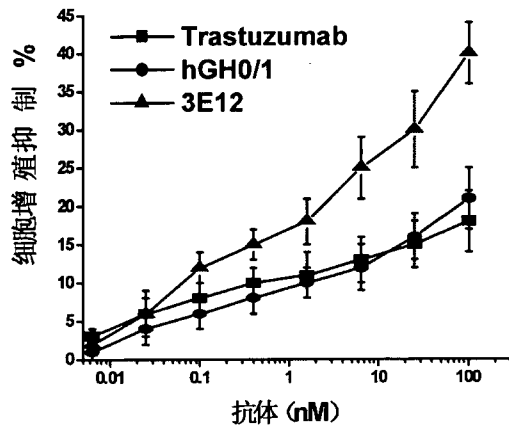


图 2-1

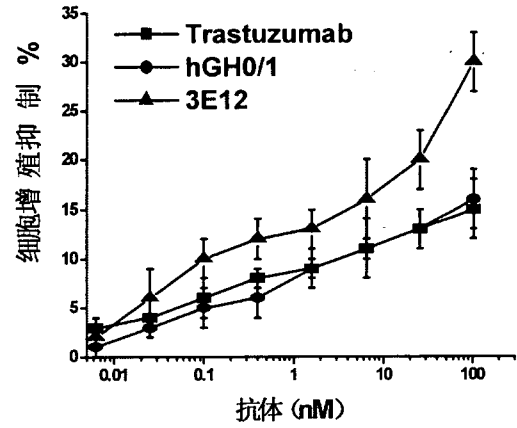


图 2-2

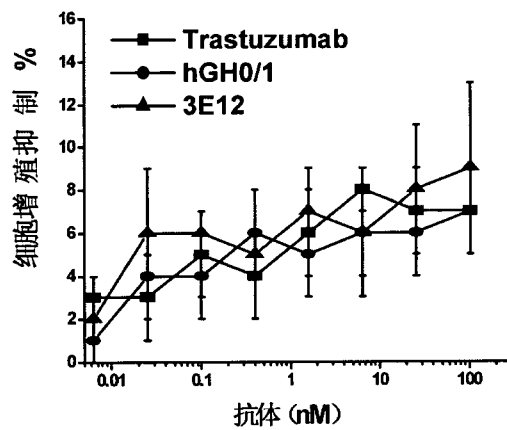


图 2-3

图 2

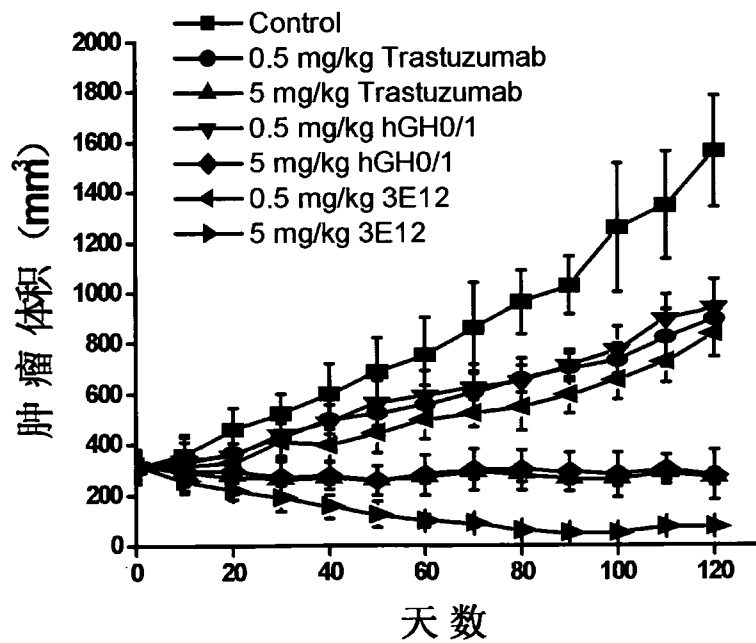


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000511

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, 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, ISI Web of Knowledge, NCBI: humanized, antibody, human epidermal growth factor receptor 2, HER2, tumor, sequence search on SEQ ID NO: 6-12.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1420128A (ZHONGXIN GUOJIAN PHARM CO LTD SHANGHA) 28 May 2003 (28.05.2003) See the whole document, especially the claims.	1-10
A	CN101165068A (SHANGHAI FUDAN ZHANGJIANG BIOLOGICAL MED) 23 Apr. 2008 (23.04.2008) See the whole document, especially the claims.	1-10
A	WO03087131A2 (GENENTECH INC) 23 Oct. 2003 (23.10.2003) See the whole document, especially the claims.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 18 Nov. 2010 (18.11.2010)	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 TIAN, Tian Telephone No. (86-10)62411042

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000511

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO2009123894A2 (MACROGENICS INC) 08 Oct. 2009 (08.10.2009) See the whole document, especially the claims.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/000511

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1420128 A	28.05.2003	CN 1210308C C	13.07.2005
CN 101165068 A	23.04.2008	None	
WO 03087131 A2	23.10.2003	US 2003228663 A1	11.12.2003
		AU 2003224916 A1	27.10.2003
		EP 1501856 A2	02.02.2005
		JP 2005522514 T	28.07.2005
		US 7435797 B2	14.10.2008
		JP 2009149661 A	09.07.2009
		US 2009187007 A1	23.07.2009
		AU 2003224916 B2	08.01.2009
		AU 2009201370 A1	30.04.2009
		IL 164417 A	31.05.2010
WO 2009123894 A2	08.10.2009	WO 2009123894 A3	07.01.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000511

Continuation of:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28 (2006.01) i

C12N15/13 (2006.01) i

C12N15/63 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2010/000511

A. 主题的分类

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, 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, WPI, EPODOC, ISI Web of Knowledge, NCBI: 人源、抗体、人表皮生长因子受体 2、肿瘤、humanized、antibody、human epidermal growth factor receptor 2、HER2、tumor、基于 SEQ ID NO:6-12 的序列检索。

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	CN1420128A (上海中信国健药业有限公司) 28.5 月 2003 (28.05.2003) 参见全文, 特别是权利要求书	1-10
A	CN101165068A (上海复旦张江生物医药股份有限公司) 23.4 月 2008 (23.04.2008) 参见全文, 特别是权利要求书	1-10
A	WO03087131A2 (GENENTECH INC) 23.10 月 2003 (23.10.2003) 参见全文, 特别是权利要求书。	1-10
A	WO2009123894A2 (MACROGENICS INC) 08.10 月 2009 (08.10.2009) 参见全文, 特别是权利要求书	1-10



其余文件在 C 栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

18.11 月 2010 (18.11.2010)

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

受权官员

田甜

电话号码: (86-10) **62411042**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/000511

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 1420128 A	28.05.2003	CN 1210308C C	13.07.2005
CN 101165068 A	23.04.2008	无	
WO 03087131 A2	23.10.2003	US 2003228663 A1	11.12.2003
		AU 2003224916 A1	27.10.2003
		EP 1501856 A2	02.02.2005
		JP 2005522514 T	28.07.2005
		US 7435797 B2	14.10.2008
		JP 2009149661 A	09.07.2009
		US 2009187007 A1	23.07.2009
		AU 2003224916 B2	08.01.2009
		AU 2009201370 A1	30.04.2009
		IL 164417 A	31.05.2010
WO 2009123894 A2	08.10.2009	WO 2009123894 A3	07.01.2010

续:

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:

C07K16/28 (2006.01) i

C12N15/13 (2006.01) i

C12N15/63 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i