

# (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  
2024年11月21日 (21.11.2024)



(10) 国际公布号  
**WO 2024/234609 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C07K 14/78* (2006.01) *A61K 38/39* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01) *A61P 19/08* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01) *C12N 5/077* (2010.01)  
*C12N 1/21* (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/134277

(22) 国际申请日: 2023年11月27日 (27.11.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310537499.9 2023年5月12日 (12.05.2023) CN

(71) 申请人: 山西锦波生物医药股份有限公司 (SHANXI JINBO BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。

(72) 发明人: 杨霞 (YANG, Xia); 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。 兰小宾 (LAN, Xiaobin); 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。 王玲玲 (WANG, Lingling); 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。 张永健 (ZHANG, Yongjian); 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。 刘欣 (LIU, Xin); 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。 刘增耀 (LIU, Zengyao); 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。 杨文飞 (YANG, Wenfei); 中国山西省太原市山西综改示范区太原唐槐园区锦波街18号, Shanxi 030032 (CN)。

(74) 代理人: 北京市柳沈律师事务所 (LIU, SHEN & ASSOCIATES); 中国北京市海淀区彩和坊路10号1号楼10层, Beijing 100080 (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: COLLAGEN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 胶原蛋白及其用途

(57) Abstract: Provided are collagen and a use thereof. The collagen comprises an N-terminus sequence and a C-terminus sequence, wherein the N-terminal sequence comprises one or more repeat units, and the repeat units comprise an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO. 15. Recombinant type II humanized collagen prepared in the present invention has high activity of promoting cell adhesion, will not cause any immune response when applied to the human body, can be obtained on a large scale, and is expected to be widely applied in the field of cartilage repair.

(57) 摘要: 提供了胶原蛋白及其用途。胶原蛋白包含N端序列和C端序列, 其中N端序列包含一个或多个重复单元, 该重复单元包含以SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列。本发明制备得到的重组II型人源化胶原蛋白具有高促进细胞黏附的活性, 应用于人体不会产生免疫反应, 可大规模获得重组II型人源化胶原蛋白, 并在软骨修复领域有望得到广泛的应用。



## 胶原蛋白及其用途

本申请要求申请日：2023年5月12日，申请号：202310537499.9，发明名称“多肽及其用途”的中国发明专利申请的优先权权益。上述申请的内容通过引用并入本文。

### 技术领域

本发明属于合成生物技术领域，并且具体涉及人体结构性材料以及其生物合成制备方法。

### 背景技术

胶原蛋白是广泛分布于人体结缔组织的一类蛋白质，也是人体含量最多的蛋白质，可以占到蛋白质总量的25%~35%，目前发现人体至少有28种胶原蛋白亚型，分别位于不同组织器官。

II型胶原蛋白主要存在于软骨组织、玻璃体和眼角膜中，是一种高分子蛋白质，其丝状胶原蛋白纤维与弹性蛋白及多糖蛋白相互交织形成网状结构，又称复合骨胶原。II型胶原蛋白是软骨和骨型形成、骨骼生长和成熟软骨维持等所必需的成分，所以非变性的胶原蛋白可作为软骨的一种结构功能性成分。

II型胶原蛋白作为关节软骨基质的主要组成成分，与透明质酸和蛋白多糖等润滑成分共同保护软骨，免于磨损。随着年龄的增加，胶原蛋白的合成速度逐渐降低，胶原蛋白的流失加剧，关节软骨退变，骨与骨之间的摩擦加剧，会引发关节处炎症发生。目前对骨关节炎常见的治疗方法是食用胶原蛋白，但是其蛋白利用率低，导致软骨再生的速度缓慢，不利于病人的康复，并影响治疗的进程和效率。因目前的治疗手段疗效不理想，往往患者最终不得不选择人工关节置换术，不仅花费大，而且可能存在术后血栓形成，置换术后感染以致截肢等灾难性并发症。

然而，目前用作软骨的胶原蛋白材料主要源自于动物软骨提取，动物源胶原蛋白的免疫源性无法消除，其除杂和提取过程仍然较为复杂，很难保障胶原蛋白的三螺旋结构，无法用于大规模生产。

同时，动物源性免疫反应也是导致胶原蛋白在应用中受限的重要原因。

随着我国胶原蛋白产业的日益壮大，利用生物合成路径获得胶原蛋白日趋成熟，尤其是人源化胶原蛋白已经走在世界前列。2021年国家药监局对生物合成胶原蛋白做了命名分类，其中，重组人源化胶原蛋白是指由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列功能区，或是含人胶原蛋白功能的功能区的组合。

生产胶原蛋白的传统方法是利用酸、碱、酶解法处理动物来源的组织，提取胶原蛋白衍生物，这些方法提取的胶原蛋白已经丧失了原本的生物学活性，无法应用于生物医学领域发挥真正的功能。随着现代技术的发展，国内外出现了一些对动物软骨进行除杂和酶解提取得到非变性II型胶原蛋白的提取方法。虽其制备得到的胶原蛋白可以应用于软骨修复，但是该方法除杂和提取的时间长，产品纯度低，产品稳定性差，不利于规模生产。针对现有技术的缺陷，有公司提出采用毕赤酵母菌作为宿主菌株，制备得到II型类胶原蛋白以用于软骨修复，但是该胶原蛋白并不属于人源化胶原蛋白，所以具有一定的免疫原性反应。

因此，亟需一种可直接注射于人体，且不会引起免疫原性反应的重组II型人源化胶原蛋白，以作为人体结构材料应用于软骨修复。

## 发明内容

人体结构性材料主要是包含胶原蛋白之内的结构性蛋白，这类蛋白结构复杂、功能精确，对人体组织修复再生有重要意义，但用常规生产方法不容易获得。本发明运用合成生物与结构生物学技术，开发了一种具有人II型胶原蛋白三螺旋结构、并能行使人胶原蛋白功能的一种大分子功能蛋白。发明人进行了大规模功能区筛选，一是序列筛选，在天然II型胶原蛋白螺旋区的Gly-X-Y的重复基因序列上含有大量的带电氨基酸，这些电荷通过相互作用来结合细胞，因此排除不含有这些重要电荷基序的区域；二是借助计算机辅助蛋白结构预测的方法来帮助筛选出最多链间氢键结构、最能稳定三聚体聚集形式的潜在螺旋功能区；三是依据蛋白质表达性质的预测方法，筛选出蛋白表达量最高，易于纯化，稳定性好的人II型胶原蛋白功能区域；四是将这些区域的氨基酸片段通过n次重复（重复是为了保证重组II型人源化胶原蛋白的分子量在一定范围易于纯化和稳定）直接连接进行优化。

本发明包含了重组II型人源化胶原蛋白的核心功能区筛选、合成工艺及

应用场景。本专利设计首次发明了一种直接注射人体的重组 II 型人源化胶原蛋白的功能区筛选和蛋白合成工艺，可用于软骨修复。

本发明部分基于发明人如下的意料不到的发现。与其他重组 II 型人源化胶原蛋白相比，重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10 在重组表达时表达量更大，更易于分离和纯化，并且与牛 I 型胶原蛋白相比具有优异的细胞粘附效果。

在一方面，本发明提供了胶原蛋白或多肽，包含多个重复单元，该重复单元包含以 SEQ ID NO. 15 所示的氨基酸序列（gtpglpgvkghrgypgldgakgtplpgvkghrgypgldgak）或与其具有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的变体，各重复单元是直接连接的或间隔一个或多个氨基酸残基。在一个实施方案中，重复单元可以是 SEQ ID NO.15 的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的突变（取代、插入、删除或添加）后得到的氨基酸序列。

在一个实施方案中，重复单元的数目是 1-20。在一个实施方案中，重复单元的数目是 6-10。在一个实施方案中，重复单元的数目是 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。

在一个实施方案中，胶原蛋白或多肽包含以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列。在一个实施方案中，胶原蛋白或多肽包含 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO.3 或 10 的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的突变（取代、插入、删除或添加）后得到的氨基酸序列或与 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列具有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的变体。在一个实施方案中，在胶原蛋白或多肽序列发生突变的情况下，得到的胶原蛋白或多肽保留本发明的功能，如细胞粘附、软骨修复的能力等。

在一方面，本发明提供了多核苷酸，其编码本文所述的胶原蛋白或多肽。

在一个实施方案中，多核苷酸包含 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列。

在一方面，本发明提供了核酸，其包含本文所述的多核苷酸。任选地，核酸还包含编码纯化标签，例如 His 标签、GST 标签、MBP 标签、SUMO 标签或 NusA 标签的核苷酸。任选地，核酸还包含编码前导序列的核苷酸。

在一方面，本发明提供了载体，其包含本文所述的多核苷酸或本文所述的核酸。

在一个实施方案中，载体是表达载体。在一个实施方案中，载体包含与多核苷酸或核酸可操作连接的表达控制元件，如启动子、终止子和/或增强子。

在一方面，本发明提供了宿主细胞，其包含本文所述的多核苷酸、本文所述的核酸或本文所述的载体。在一个实施方案中，宿主细胞是细菌、真菌或动物细胞。在一个实施方案中，细菌是大肠杆菌。在一个实施方案中，真菌是酵母，例如酿酒酵母。

在一方面，本发明提供了生产本文所述的胶原蛋白或多肽的方法，其包括：

- (1) 在合适的培养条件下培养本文所述的宿主细胞；
- (2) 收获包含胶原蛋白或多肽的宿主细胞和/或培养基；和
- (3) 纯化胶原蛋白或多肽。

在一方面，本发明提供了组合物，其包含本文所述的胶原蛋白或多肽。在一个实施方案中，组合物是试剂盒。在一个实施方案中，组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D 打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种。在一个实施方案中，组合物为注射用组合物或口服用组合物。

在一个实施方案中，组合物是用于软骨修复的组合物。在一个实施方案中，组合物是用于软骨修复的注射用组合物。

在一方面，本发明提供了用于增加细胞粘附的方法，其包括将细胞与本文所述的胶原蛋白或多肽、本文所述的多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、和/或本文所述的组合物接触。

在一方面，本发明提供了本文所述的胶原蛋白或多肽、本文所述的多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、和/或本文所述的组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于增加细胞粘附或软骨修复。在一方面，本发明提供了本文所述的胶原蛋白或多肽、本文所述的多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、和/或本文所述的组合物在生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D 打印

人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种中的用途。

本发明的优点包括:

1. 本发明提供了重组 II 型人源化胶原蛋白的核心功能区及氨基酸序列。
2. 本发明首次成功合成了可注射于人体的重组 II 型人源化胶原蛋白,用于软骨修复。
3. 生产的重组 II 型人源化胶原蛋白其氨基酸组成与天然胶原蛋白氨基酸序列相应部分 100% 相同,应用于人体不会产生免疫排斥和过敏反应。
4. 本文的制备方法简单,可大规模生产高产量的重组 II 型人源化胶原蛋白。
5. 就表达、分离和纯化效果而言,与其他重组 II 型人源化胶原蛋白相比,重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10 实现最佳的效果。
6. 本发明的重组 II 型人源化胶原蛋白具有更加优秀的生物黏附活性,即重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10>牛 I 型胶原蛋白。

#### 附图说明

- 图1: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-a6 和 HC2B-b5 的粗纯情况;
- 图2: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-b1、HC2B-a3 和 HC2B-b3 的粗纯情况;
- 图3: 重组 II 型人源化胶原蛋白 B3Q、HC2B-A8 和 HC2B-A7 的纯化情况;
- 图4: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10 的纯化情况和 HC2B-B9 的粗纯情况;
- 图5: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A9 的纯化情况;
- 图6: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-B8、HC2B-B7 和 HC2B-B10 的粗纯情况;
- 图7: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-B7 和 HC2B-B9 的精纯情况;
- 图8: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10 的活性检测情况;
- 图9: pET-28a-Trx-His 表达载体图谱。

#### 具体实施方式

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明的实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

重组胶原蛋白是利用前沿的结构生物学、基因工程等技术，以人特定型别胶原蛋白功能区基因编码为模板，进行筛选、制备得到与人胶原蛋白氨基酸序列相同或类似的一类新型生物材料。

如本文中所示，“多肽”是指通过肽键连接的多个氨基酸残基。在本文中，胶原蛋白、重组胶原蛋白、重组II型人源化胶原蛋白或多肽之间可以互换使用。

在本文中，胶原蛋白或多肽可以包含一个或多个重复单元，该重复单元包含以 SEQ ID NO. 15 所示的氨基酸序列或者该氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的突变（取代、添加、插入或缺失）后的氨基酸序列。重复单元的数目可以是 1-20。例如，重复单元的数目是 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。特别地，突变可以是取代，例如保守氨基酸取代。SEQ ID NO.15 的氨基酸序列为 gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak。各重复单元可以是直接连接的或间隔一个或多个氨基酸残基。

在胶原蛋白或多肽序列发生突变或存在间隔序列的情况下，得到的胶原蛋白或多肽保留本发明的功能，如细胞粘附、软骨修复的能力等。

本发明的胶原蛋白或多肽可以是合成的或者可以通过重组表达。在重组表达的情况下，本发明的胶原蛋白或多肽可以由多核苷酸编码。多核苷酸可以针对进行表达的宿主细胞进行密码子优化。编码胶原蛋白或多肽的多核苷酸可以与表达控制元件，如启动子、终止子和/或增强子可操作连接以构成核酸，或者表达盒。该核酸还可以包含编码纯化标签，例如 His 标签、GST 标签、MBP 标签、SUMO 标签或 NusA 标签的核苷酸或者编码前导序列的核苷酸，以便于胶原蛋白或多肽的纯化或分泌。

如本文中所示，术语“载体”是可将多核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白质获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物

质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体可以包含本发明的核酸以便于导入细胞进行表达。载体可以包含与所述核酸可操作连接的表达控制元件，如启动子、终止子和/或增强子。

如本文中所示，术语“宿主细胞”是已经通过分子生物学技术将核酸分子引入的细胞。这些技术包括转染病毒载体，用质粒载体转化，以及通过电穿孔、脂转染、和粒子枪加速引入裸DNA。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。例如，真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞。原核细胞可以是大肠杆菌细胞。

本发明还提供了生产胶原蛋白或多肽的方法，其包括：(1) 在合适的培养条件下培养本文的宿主细胞；(2) 收获包含胶原蛋白或多肽的宿主细胞和/或培养基；和(3) 纯化胶原蛋白或多肽。本发明的方法可以包括酶切标签的步骤。

本发明的胶原蛋白或多肽可以制备成组合物或试剂盒。组合物或试剂盒可以是组织填充和/或增容用的组合物或试剂盒。组合物或试剂盒还可以包含辅助物质。本发明的组合物可以是软骨修复剂，其包含本文所述的胶原蛋白或多肽。本发明的组合物可以是可注射的。本发明的组合物可以是人体结构性材料，例如可用于软骨修复，且不引起人体的免疫应答。

如本文中所示，两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。出于本发明的目的，使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS: 欧洲分子生物学开放软件套件, Rice等人, 2000, *Trends Genet.* [遗传学趋势] 16: 276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 48: 443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出(使用非简化选项获得)用作同一性百分比并且计算如下:

$(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

出于本发明的目的，使用如在EMBOSS软件包（EMBOSS：欧洲分子生物学开放软件套件，Rice等人，2000，同上）（优选5.0.0版本或更新版本）的尼德尔程序所实施的尼德曼-翁施算法（Needleman和Wunsch，1970，同上）来确定两个脱氧核苷酸序列之间的序列同一性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5、和EDNAFULL（NCBI NUC4.4的EMBOSS版）取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出（使用非简化选项获得）用作同一性百分比并且计算如下：

$(\text{相同的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

在本文中，本发明的胶原蛋白或多肽的重复单元或胶原蛋白或多肽可以存在一定的突变。例如，这些部分中的一个或多个的氨基酸序列可以存在氨基酸残基的取代、缺失、添加或插入。在氨基酸突变的上下文中，“多个”可以是2-40，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、31、32、33、34、35、36、37、38或39，或者它们之间的任何数值范围。

也就是说，本发明可以使用重复单元变体，只要变体保留促进细胞黏附的活性。具体而言，变体可以与指定的序列（本文中所述的任何胶原蛋白或多肽序列）具备一定的百分比同一性，例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。指定的序列可以是本发明的任何序列，例如SEQ ID NO. 1-16，但是优选的是这些变体保留意图的功能，例如增加细胞粘附或软骨修复。

## 本发明的方法

针对目前的研究现状，本发明提供了一种生物合成重组II型人源化胶原蛋白的方法，即人体结构性材料的制备方法。方法可以包括以下一个或多个步骤：(1)功能区筛选、菌种的构建；(2)大规模生物发酵培养和蛋白的诱导表达；(3)人源化II型胶原蛋白的纯化和任选的酶切。

功能区筛选和菌种的构建可如下进行：(1)大规模功能区筛选，得到目的基因功能区；(2)将得到的目的基因功能区插入PET-28a-Trx-His表达载体中得到重组表达质粒；(3)将重组表达质粒转入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)中，筛选得到阳性大肠杆菌基因工程菌。

大规模生物发酵可如下进行：将筛选得到的阳性大肠杆菌基因工程菌加入抗生素储液的摇瓶中，并在 220 rpm、37℃ 恒温摇床中培养。

蛋白的诱导表达可如下进行：(1)将培养后的摇瓶降温至 16-30℃；(2)添加 IPTG 母液，进行诱导表达；(3)将诱导表达后的菌液装于离心瓶中，6000 rpm、4℃ 离心 12 min 后收集菌体。

人源化 II 型胶原蛋白的纯化和任选的酶切可如下进行：(1)在 Ni 亲和层析柱粗纯人源化 II 型胶原蛋白；(2)按一定比例添加 TEV 酶酶切；(3)离子交换柱精纯人源化 II 型胶原蛋白。

筛选出的功能区如下所示：(1)HC2B-a3 的氨基酸序列：  
gkpgddgeagkpgkagergppgpqgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgeagapgvkgesgspgeng  
spgpmgprglpgergrtgpaagargndgqp；(2) HC2B-a6 的氨基酸序列：  
gkpgkagergppgpqgargfpgtgpplgvkghrgkpgkagergppgpqgargfpgtgpplgvkghrgkpg  
kagergppgpqgargfpgtgpplgvkghrgkpgkagergppgpqgargfpgtgpplgvkghrgkpgkager  
gppgpqgargfpgtgpplgvkghrgkpgkagergppgpqgargfpgtgpplgvkghrgkpgkagerg  
；  
(3) HC2B-b1 的氨基酸序列：  
gepgregspgadgppgrdgaagvkgdrgetgavgapgapppgspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgps  
gpagargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgdqgasgpagpsgprgppgpvgp  
sgkdgangipgpigppgprgrsgetgpa；(4) HC2B-b3 氨基酸序列：  
gspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgr  
pmpsgdqgasgpagpsgpr；(5) HC2B-b5 的氨基酸序列：  
gargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgargiqgpqgprgdkgagepgerglk  
ghrgftglqglpgrpmpsgargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgargiqgpqg  
prgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglp  
grpmpsgargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgargiqgpqgprgdkgagep  
gerglkghrgftglqglpgrpmpsgargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgs；(6)  
B3Q 的氨基酸序列：  
gspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgr  
pmpsgdqgasgpagpsgprgspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgage  
pgerglkghrgftglqglpgrpmpsgdqgasgpagpsgprgspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpag  
argiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgdqgasgpagpsgprgspgpagptgkqg  
drgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpgrpmpsgdqgasgpa

gpsgpr ; ( 7 ) HC2B-A7 的 氨 基 酸 序 列 :  
gpqgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgpqgargfpgt  
glpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtgpplgvkghrgy  
pgldgakgpqgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgpqg  
argfpgtgpplgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtgpplg  
vkghrgypgldgak ; ( 8 ) HC2B-A8 的 氨 基 酸 序 列 :  
gargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgargfpgtgpplgvkghr  
gypgldgakgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgargfpgt  
glpgvkghrgypgldgakgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgargfpgtgpplgvkghrgypgldgak  
gargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgargfpgtgpplgvkghr  
gypgldgakgargfpgtgpplgvkghrgypgldgak ; ( 9 ) HC2B-A9 的 氨 基 酸 序 列 :  
gfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgak  
gfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgak  
gfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgak  
gfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgak  
gfpgtgpplgvkghrgypgldgakgfpgtgpplgvkghrgypgldgak ; ( 10 ) HC2B-A10 的 氨 基  
酸 序 列 :  
gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgv  
kghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypg  
ldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpg  
lpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghr  
gypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak ; ( 11 ) HC2B-B7 的 氨  
基 酸 序 列 :  
gerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpag  
psgprgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgsgdqga  
sgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgps  
gdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpg  
ppgsgdqgasgpagpsgpr ; ( 12 ) HC2B-B8 的 氨 基 酸 序 列 :  
gerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagerglk  
hrftglqglpgppgsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagerglkghrgftglq  
glpgppgsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppg

psgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgsgdqga  
 sgpagerglkghrgftglqglpgppgsgdqgasgpa; ( 13 ) HC2B-B9 的氨基酸序列:  
 gerglkghrgftglqglpgppgsgdqgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgerglkghrgftglqglpgp  
 ppgsgdqgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgerglkghrgftg  
 lqglpgppgsgdqgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgerglk  
 ghrgftglqglpgppgsgdqgerglkghrgftglqglpgppgsgdqgerglkghrgftglqglpgppgsgd  
 qgerglkghrgftglqglpgppgsgdq; ( 14 ) HC2B-B10 的氨基酸序列:  
 gerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftgl  
 qglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgergl  
 kghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglp  
 gppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghr  
 gftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgpp。

本发明制备的重组 II 型人源化胶原蛋白氨基酸序列可以源自人天然 II 型胶原蛋白的功能区，包含该功能区及类似的功能区、对氨基酸序列分别进行突变和修饰后的蛋白。

本发明制备得到的重组 II 型人源化胶原蛋白完全匹配人体胶原蛋白的氨基酸序列，所以可直接注射人体用于软骨修复而不产生免疫原性反应。

本发明的胶原蛋白或多肽

本发明提供了胶原蛋白或多肽，其包含 SEQ ID NO.1-14 中任一项的氨基酸序列或者该氨基酸经过突变的氨基酸序列。突变可以是取代、添加、缺失或插入。优选地，取代可以是保留的取代。本发明的胶原蛋白或多肽可以衍生自从 II 型人胶原蛋白衍生得到的肽段。本发明的胶原蛋白或多肽可以包含多个如此得到的肽段。肽段可以通过接头或直接连接形成本发明的胶原蛋白或多肽。接头可以是一个或多个氨基酸残基。例如，接头可以是本领域中通常使用的柔性接头。

本发明提供了多个重复单元，如实施例的下划线表示的氨基酸序列所示。特别地，本发明提供了 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列的重复单元。本发明的胶原蛋白或多肽可以包含多个重复单元，例如 2-30，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 或 29。

### 实施例

提供以下实施例来阐述本发明。本领域技术人员应当理解实施例仅仅是例示性的，而非限制性的。本发明仅仅由所附权利要求书的范围限定。

### 实施例1：重组II型人源化胶原蛋白构建及表达

1. 进行大规模功能区筛选，一是序列筛选，在天然II型胶原蛋白螺旋区的Gly-X-Y的重复基因序列上含有大量的带电氨基酸，这些电荷通过相互作用来结合细胞，因此排除不含有这些重要电荷基序的区域；二是借助计算机辅助蛋白结构预测的方法来帮助筛选出最多链间氢键结构、最能稳定三聚体聚集形式的潜在螺旋功能区；三是依据蛋白质表达性质的预测方法，筛选出蛋白表达量最高，易于纯化，稳定性好的人II型胶原蛋白功能区域；四是将这些区域的氨基酸片段通过n次重复（重复是为了保证重组II型人源化胶原蛋白的分子量在一定范围易于纯化和稳定）直接连接进行优化；得到以下不同的重组II型人源化胶原蛋白的目的基因功能区：

( 1 ) HC2B-a3 的 氨 基 酸 序 列 :  
gkpgddgeagkpgkagergpppgqargfpgtgpplgvkghrgypgldgakgeagapgvkgesgspgeng  
spgpmgprglpgergrtgpageagargndgqp ( SEQ ID NO.1 );

( 2 ) HC2B-a6 的 氨 基 酸 序 列 :  
gkpgkagergpppgqargfpgtgpplgvkghrgkpgkagergpppgqargfpgtgpplgvkghrgk  
pgkagergpppgqargfpgtgpplgvkghrgkpgkagergpppgqargfpgtgpplgvkghrgkpgkag  
ergpppgqargfpgtgpplgvkghrgkpgkagergpppgqargfpgtgpplgvkghrgkpgkagerg  
( SEQ ID NO.2, 下划线为重复单元部分 );

( 3 ) HC2B-b1 的 氨 基 酸 序 列 :  
gepgregspgadgppgrdgaagvkgdrgetgavgapgapppgspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgps  
gpagargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpmpgsgdqgasgpagpsgprgppgpv  
sgkdgangipgipppgprgrsgetgpa ( SEQ ID NO.3 );

( 4 ) HC2B-b3 氨 基 酸 序 列 :  
gspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgspgpagargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglp  
ppsgdqgasgpagpsgpr ( SEQ ID NO.4 );

( 5 ) HC2B-b5 的 氨 基 酸 序 列 :  
gargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpmpgsg  
gargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpmpgsg  
gargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpmpgsg  
gargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpmpgsg  
gargiqgpqgprgdkgagepgerglkghrgftglqglpmpgsg

glpgppgpsgargiqgpqgprgdkgeagepgerglkghrgftglqglpgppgpsgargiqgpqgprgdkgeagepgerglkghrgftglqglpgppgps (SEQ ID NO.5, 下划线为重复单元部分);

( 6 ) B3Q 的 氨 基 酸 序 列 :

gspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgeagepgerGlkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgprgspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgeagepgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgprgspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgeagepgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgprgspgpagptgkqgdrgeagaqgpmgpsgpagargiqgpqgprgdkgeagepgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgpr (SEQ ID NO.6, 下划线为重复单元部分);

( 7 ) HC2B-A7 的 氨 基 酸 序 列 :

gpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgpqgargfpgtplpgvkghrgypgldgak (SEQ ID NO.7, 下划线为重复单元部分);

( 8 ) HC2B-A8 的 氨 基 酸 序 列 :

gargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgakgargfpgtplpgvkghrgypgldgak (SEQ ID NO.8, 下划线为重复单元部分);

( 9 ) HC2B-A9 的 氨 基 酸 序 列 :

gfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgVkgghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgakgfpgtplpgvkghrgypgldgak (SEQ ID NO.9, 下划线为重复单元部分);

( 10 ) HC2B-A10 的 氨 基 酸 序 列 :

**gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak**

Gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak  
Gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak  
Gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak  
Gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak  
Gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak  
Gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak  
gtpglpgvkghrgypgldgakgtpglpgvkghrgypgldgak ( SEQ ID NO.10 );

( 11 ) HC2B-B7 的 氨 基 酸 序 列 :

gerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasg  
pagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgpsgd  
qgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgpp  
gpsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagpsgprgerglkghrgftglqgl  
pgppgpsgdqgasgpagpsgpr ( SEQ ID NO.11, 下划线为重复单元部分 );

( 12 ) HC2B-B8 的 氨 基 酸 序 列 :

gerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagergl  
kghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagerglkghrgftg  
lqglpgppgpsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgp  
pgpsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpagerglkghrgftglqglpgppgpsgdq  
gasgpagerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgasgpa ( SEQ ID NO.12 );

( 13 ) HC2B-B9 的 氨 基 酸 序 列 :

gerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgerglkghrgftglqglpg  
ppgpsgdqgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgerglkghrgft  
glqglpgppgpsgdqgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgergl  
kghrgftglqglpgppgpsgdqgerglkghrgftglqglpgppgpsgdqgerglkghrgftglqglpgppgpsg  
dqgerglkghrgftglqglpgppgpsgdq ( SEQ ID NO.13 );

( 14 ) HC2B-B10 的 氨 基 酸 序 列 :

gerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgft  
glqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppger  
glkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqg  
lpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkghrgftglqglpgppgerglkg

hrgftglqglpgppgerglkg hrgftglqglpgpp (SEQ ID NO.14)。

2. 将合成的基因功能区插入pET-28a-Trx-His表达载体(如图9)中得到对应的重组表达质粒。

3. 将构建成功的表达质粒转化大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)。具体过程为:(1)在超低温冰箱中取出大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)置于冰上,待半融时取2 $\mu$ l待转化的质粒加入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)中,稍微混匀2-3次。(2)将混合物置于冰上冰浴30min,然后于42 $^{\circ}$ C水浴热激45-90s,取出后置于冰上冰浴2min。(3)转移至生物安全柜中,并加入700 $\mu$ l液体LB培养基,然后于37 $^{\circ}$ C、220rpm条件下培养60min。(4)取200 $\mu$ l的菌液均匀涂布在含有硫酸卡那霉素(50mg/L) LB平板上。(5)将平板在37 $^{\circ}$ C的培养箱中培养15-17h,待其长出大小均匀的菌落。

4. 从转化好的LB平板中挑取5-6个单菌落于含有抗生素储液(氨苄青霉素100mg/L)的摇瓶中,在220 rpm, 37 $^{\circ}$ C恒温摇床中培养一定时间,直至其呈现雾状。再将培养后的摇瓶降温至16-30 $^{\circ}$ C,添加IPTG(0.5mM)诱导表达一段时间后,将菌液分装于离心瓶中,于6000 rpm、4 $^{\circ}$ C离心12 min,收集菌体,并记录菌体重量,取样进行电泳检测。

5. 将收集的菌体用平衡工作液(200mM氯化钠, 25mM Tris, 20mM咪唑)重悬,将菌液降温至 $\leq 15^{\circ}$ C,进行均质两次或超声细胞破碎,完成后收集菌液。将细胞破碎后的菌液分装至离心瓶中,于17000 rpm、4 $^{\circ}$ C离心30 min,收集上清液。

6. 将重组人源化II型胶原蛋白的进行纯化和酶切,具体过程是:(1)粗纯: a.平衡柱材:使用平衡液(200mM氯化钠, 25mM Tris, 20mM咪唑)将柱材平衡,流速为10mL/min。 b.上样:将离心后的上清液加入柱材中,直至液体流完后,流速为5mL/min。 c.清洗杂蛋白:添加洗杂液100 mL(200 mM氯化钠, 25 mM Tris, 20mM咪唑)至液体流完,流速为10mL/min。 d.收集目的蛋白:添加20 mL洗脱液(200mM氯化钠, 25mM Tris, 250mM咪唑),流速为10mL/min,并收集流穿液,采用紫外可见分光光度法检测蛋白浓度,按以下公式( $C(\text{mg/ml}) = A_{280} \times \text{稀释倍数} \times \text{消光系数}$ )计算蛋白浓度,并进行电泳检测)。 e.用1M咪唑工作液清洗柱材,流速为10mL/min。(2)酶切:按蛋白总量与TEV酶总量比为20:1,添加TEV酶,16 $^{\circ}$ C酶切2 h。将酶切后的蛋白液放入透析袋,于4 $^{\circ}$ C透析2 h,再转移至新的透析液(20mM氯化钠, 20mM

Tris)中4℃过夜透析。(3)精纯: a.平衡柱材: 使用A液(20 mM Tris, 20 mM 氯化钠)将柱材平衡, 流速为10 ml/min。b.上样: 流速为5 ml/min, 上样并收集流穿样品, 并进行电泳检测, 将蛋白储存在4℃环境中。c.洗脱: 用B液(1M氯化钠, 20mM Tris)清洗柱材5个CV。d.清洗柱材。

#### 试验结果:

各重组蛋白在制备过程中所涉及到的电泳检测结果见图1-图7。图1显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-a6、HC2B-b5电泳检测结果, 显示了粗纯后目的蛋白表达量较少。图2显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-a3、HC2B-b1、HC2B-b3电泳检测结果, 显示了蛋白粗纯和精纯后杂蛋白较多。图3显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-A7、HC2B-A8电泳检测结果, 显示了粗纯后目的蛋白表达量较少。图3还显示了重组II型人源化胶原蛋白B3Q电泳检测结果, 显示了精纯后蛋白量较少。图4显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-A10电泳检测结果, 显示了粗纯蛋白表达量较高, 酶切效果较好, 精纯后蛋白纯度高(图4的左侧和中间图)。图4和图7还显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-B9电泳检测结果, 显示了粗纯蛋白表达量较少, 且杂带较多, 酶切效果较差。图5显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-A9电泳检测结果, 显示了粗纯蛋白表达量较高, 杂带较多, 纯度较低。图6的左图显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-B8电泳检测结果, 显示了粗纯蛋白表达量较少, 杂带较多, 不再进行后续精纯。图6的右图和图7显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-B7电泳检测结果, 显示了粗纯蛋白表达量较少, 杂带较多, 酶切效果较差。图6的中间图显示了重组II型人源化胶原蛋白HC2B-B10电泳检测, 结果显示了粗纯蛋白表达量较少, 杂带较多, 不再进行后续精纯。

因此, 就表达、分离和纯化效果而言, 与其他重组II型人源化胶原蛋白相比, 重组II型人源化胶原蛋白HC2B-A10实现最佳的效果。

#### 实施例2: 重组II型人源化胶原蛋白HC2B-A10的生物活性检测

胶原蛋白的活性检测方法可以参考文献Juming Yao, Satoshi Yanagisawa, Tetsuo Asakura, Design, Expression and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens, J Biochem. 136, 643-649(2004)。具体实施方法如下:

(1) 利用紫外吸收法检测待测蛋白样品的浓度, 包括牛I型胶原标准品

(Sigma, 编号: 380002)、本发明提供的纯化和酶切效果较好的重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10 (编号为 015)。

具体为分别测定样品在 215nm 和 225nm 下的紫外光吸收, 利用经验公式  $C(\mu\text{g/mL})=144 \times (A_{215}-A_{225})$  计算蛋白质浓度, 注意需在  $A_{215}<1.5$  的情况下检测。该方法的原理是: 测定肽键在远紫外光下的特征吸收, 不受生色团含量的影响, 干扰物质少, 操作简便, 适合检测考马斯亮蓝不显色的人胶原蛋白及其类似物。(参考文献为 Walker JM. The Protein Protocols Handbook, second edition. Humana Press. 43-45.)。检测完蛋白浓度后, 用 PBS 将所有待测蛋白浓度调整到 0.5mg/mL。

(2) 向 96 孔板中加入 100 $\mu\text{L}$  各种蛋白溶液和空白 PBS 溶液对照, 室温静置 60min。

(3) 每孔中加入  $10^5$  个培养状态良好的 3T3 细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 60min。

(4) 每孔用 PBS 清洗 4 次。

(5) 用 LDH 检测试剂盒 (Roche, 04744926001) 检测 OD<sub>492nm</sub> 的吸光度。根据空白对照的数值, 可以计算出细胞的贴壁率。计算公式如下: 细胞

$$\text{贴壁率} = \frac{\text{测试孔} - \text{空白孔}}{\text{阳性孔} - \text{空白孔}} \times 100\%$$
。细胞的贴壁率即可以反应胶原蛋白的活性。蛋白的活性越高, 越能在短时间给细胞提供优质的外环境, 帮助细胞贴壁。

结果如图 8 所示, 从对比中可知, 相比于牛 I 型胶原蛋白 (B col I), 本发明的重组 II 型人源化胶原蛋白具有更加优秀的生物黏附活性, 即重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10 > 牛 I 型胶原蛋白。出乎意料地, 本发明人证明了对于 HC2B-A10, 重复序列在 8 个时可以保证重组 II 型人源化胶原蛋白的分子量易于纯化和稳定, 且具有优秀的生物黏附活性。

### 实施例 3: 重组 II 型人源化胶原蛋白 HC2B-A10 的质谱检测

#### 实验方法



RGYPGLDGAKGTPGLPGVKGHRGYPGLDGAKGTPGLPGVKGHRGYPGL  
DGAK

HC2B-a3 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.16):

GGTAAACCAGGAGATGATGGAGAAGCAGGAAAACCAGGAAAAGCAGGAGAAAGA  
GGACCGCCTGGACCGCAAGGAGCACGTGGATTTCCAGGAACCCCGGGACTGCCGG  
GTGTGAAAGGTCATAGAGGATATCCGGGACTGGATGGAGCAAAGGAGAAGCAGG  
GGCACCGGGAGTTAAAGGTGAGAGCGGAAGCCCGGGAGAAAATGGAAGCCCTGG  
TCCGATGGGTCCGAGAGGGCTGCCGGGTGAAAGAGGGCGTACCGGTCCGGCAGGA  
GCAGCAGGTGCAAGAGGAAATGATGGACAGCCG

HC2B-a6 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.17):

GGAAAACCCGGGAAGGCCGGTGAGCGCGGTCCACCGGGTCCGCAGGGCGCGCGT  
GGGTTCCCGGGCACCCCGGGTCTGCCGGGTGTTAAAGGTCATCGTGGCAAGCCGGG  
CAAGGCTGGCGAGCGCGGTCCGCCAGGTCCGCAAGGTGCGAGAGGCTTTCCGGGC  
ACTCCGGGTTTGCCGGGTGTCAAAGGTCACCGTGGTAAACCGGGCAAGGCCGGGTG  
AGCGTGGCCACCGGGTCCGCAGGGTGCGCGTGGTTTTCCGGGCACGCCGGGTTT  
GCCGGGCGTTAAAGGCCACCGCGGCAAACCGGGCAAGGCCGGGTGAACGTGGCCCA  
CCGGTCCGCAAGGTGCACGTGGCTTCCCGGGCACCCCGGGTCTGCCTGGCGTGA  
AAGGTCACCGTGGCAAGCCGGGCAAAGCTGGTGAACGTGGTCCGCCCGGTCCGCA  
GGGCGCGCGTGGCTTTCCGGGAACCCCGGGCCTGCCGGGCGTTAAGGGTTCATCGTG  
GCAAACCGGGCAAGGCTGGTGAGCGCGGGCCACCGGGTCTCAAGGTGCCCGTGG  
CTTCCCGGGCACCCCGGGTCTGCCGGGTGTGAAGGGTCACCGCGGTAAACCGGGC  
AAGGCAGGCGAACGCGG

HC2B-b1 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.18):

GTGAACCAGGTTCGTGAAGGTAGCCCAGGTGCAGATGGACCACCAGGTTCGTGATGG  
TGCAGCAGGAGTGAAAGGAGATCGTGGTGAAACCGGTGCAGTAGGTGCACCTGGT  
GCGCCAGGTCCGCCAGGTAGCCCTGGTCCAGCCGGTCTTACCAGGAAAACAAGGGG  
ATAGAGGAGAAGCAGGAGCACAGGGTCCGATGGGTCCGTCAGGTCCGGCGGGTGC  
ACGTGGTATTCAGGGTCCGCAGGGTCCGCGTGGTGATAAAGGTGAAGCAGGTGAA  
CCGGGGGAAAGAGGATTAAGGGCATCGTGGTTTTACGGGTCTGCAGGGTCTGCC  
TGGTCCGCCTGGTCCGAGCGGTGATCAGGGTGCAAGCGGTCCGGCAGGTCCGAGC  
GGACCTCGTGGACCTCCGGGTCTGTGGGTCTAGTGGTAAGGATGGGGCAAATGG  
TATTCCTGGTCTTATTGGTCCGCCGGGTCCGCGTGGGAGATCAGGTGAAACCGGAC  
CGGCA

HC2B-b3 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.19):

GGTAGCCCAGGTCCAGCAGGTCCGACAGGTAAACAAGGAGATCGTGGTGAAGCAG  
GAGCACAAGGACCAATGGGTCCAAGCGGTCCGGCAGGTGCAAGAGGTATTCAAGG  
GCCGCAAGGGCCACGCGGTGATAAAGGGGAAGCAGGTGAACCAGGTGAGAGAGG  
GTTAAAGGACATCGTGGATTTACAGGACTGCAGGGTTTACCAGGTCCGCCGGGAC  
CGAGCGGAGATCAAGGTGCAAGCGGTCCGGCGGGTCCGAGTGGTCTCTCGT

HC2B-b5 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.20):

GGAGCTAGGGGTATCCAGGGTCCGCAGGGCCCGCGGGGAGATAAAGGGGAAGCGG  
GTGAACCGGGTGAACGTGGCTTGAAGGGTCATCGTGGCTTACCGGCCTGCAGGG  
CTTGCCGGGTCCGCCGGGTCCGTCCGGTGCCCGTGGCATCCAGGGACCGCAAGGA  
CCGCGTGGAGACAAAGGTGAAGCGGGTGAACCGGGTGAAGCGCGGCCTCAAGGGC  
CACCGCGGCTTACCAGGTTTGCAAGGCCTGCCGGGTCCGCCGGGTCCGTCCGGGCGC  
GCGTGGTATTCAAGGCCCGCAAGGTCCACGCGGCGACAAAGGCGAAGCGGGTGAG

CCGGGCGAACGCGGCCTGAAAGGTCACCGCGGTTTTACGGGTCTGCAGGGCCTGC  
 CGGGTCCACCGGGTCCGAGCGGTGCTCGCGGCATCCAGGGCCCAGAGGTCCGCG  
 TGGTGATAAGGGTGAAGCGGGTGAAGCCGGGAGAACGTGGTCTGAAGGGTCATAGA  
 GGCTTCACCGGTCTGCAAGGTCTGCCGGGTCCACCGGGCCCAGCGGGCCTAGGG  
 GCATTCAGGGCCCCGAGGGGCCGCGTGGTGATAAGGGCGAGGCCGGTGAGCCGGG  
 CGAACGTGGTTTAAAAGGTCATCGCGGCTTCACGGGCCTCCAAGGTCTGCCTGGCC  
 CACCGGGTCCGAGCGGCGCGCGTGGCATTCAAGGCCACAGGGTCCTCGTGGCGA  
 CAAAGGCGAGGCAGGCGAGCCGGGTGAGCGCGGTCTGAAAGGGCACCGTGGTTTT  
 ACCGGTTTGCAAGGCCTGCCGGGCCACCGGGCCCCTCCGGTGCACGTGGCATTCA  
 GGGTCCGCAGGGTCCGCGTGGCGACAAGGGCGAAGCTGGTGAGCCGGGTGAGCG  
 CGGCCTTAAGGGTACCGTGGCTTTACCGGTTTACAAGGTTTGCCGGGCCCTCCGG  
 GTCCAAGCGGTGCACGTGGTATCCAAGGCCACAGGGTCCGCGTGGGGATAAAGG  
 CGAAGCGGGTGAACCGGGCGAGCGCGGGCTGAAGGGTCACCGTGGCTTTACTGGC  
 CTGCAGGGTCTGCCGGGTCCACCGGGTCCGTCT

B3Q 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.21):

GGATCACCCGGGCCGGCGGGCCCCGACCGGTAAACAGGGTGACCGCGGTGAGGCG  
 GGTGCGCAGGGGCCGATGGGTCCGAGCGGTCCGGCTGGTGCGCGTGGTATCCAGG  
 GACCGCAGGGCCCACGCGGTGATAAAGGCGAAGCAGGCGAACCGGGTGAAGCGCG  
 GTTTGAAGGGCCACCGTGGTTTTACCGTCTGCAGGGCCTGCCGGGCCCGCCGGGT  
 CCGTCAGGCGATCAGGGTGCTAGCGGTCCGGCTGGCCCCGTCCGGCCCCGCGCGGTA  
 GCCCGGGCCCCAGCTGGCCCCACTGGTAAACAGGGCGACCGTGGCGAGGCCGGTGC  
 CCAAGGCCCTATGGGCCCGAGCGGTCCGGCAGGCGCGCGGGGCATCCAGGGTCCG  
 CAAGGACCAAGAGGCGACAAGGGTGAGGCAGGCGAGCCTGGCGAACGTGGCCTG  
 AAGGGTCACCGCGGTTTTACCGTCTCCAAGGTCTGCCTGGTCCACCGGGTCCGTC  
 TGGAGATCAAGGCGCCAGCGGCCCGCGGGTCCCTCCGGTCCGCGTGGCAGCCCCG  
 GGTCCGGCAGGACCAACGGGTAAAGCAGGGTGATAGAGGCGAAGCCGGTGCAGCAG  
 GGCCCCGATGGGTCTTCCGGGTCCAGCGGGGGCGCGTGGCATTCAAGGTCCGCAGG  
 GCCCGCGTGGTGACAAAGGTGAGGCGGGCGAACCGGGCGAGCGCGGCTTGAAGG  
 GTCATCGTGGATTACCGGTTTGCAAGGCCTGCCGGGCCCCCCGGGCCCGAGCGGT  
 GACCAAGGAGCTAGCGGGCCGGCTGGTCCGTCGGGCCCGCGTGGCAGTCCGGGTG  
 CGGCGGGCCCCAACGGGCAAGCAAGGAGATCGTGGTGAGGCGGGTGCGCAAGGTC  
 CGATGGGTCCGTCTGGTCCGGCGGGTGACGCGGTATTCAAGGTCCGCAGGGGCC  
 GCGTGGTGATAAAGGAGAAGCAGGCGAACCGGGTGAACGTGGTCTGAAAGGTCA  
 TCGTGGCTTACCGGCCTGCAGGGTTTACCAGGTCCACCGGGTCCGTCTGGCGACC  
 AGGGTGCCAGCGGTCCGGCGGGGCCCGTCCGGACCGCGTTAA

HC2B-A7 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.22):

GGACCCCAAGGGGCGCGTGGTTTTCCGGGCACCCCGGGCCTGCCGGGCGTGAAGG  
 GTCACCGCGGTTATCCGGGGCTGGATGGCGCGAAGGGTCCGCAAGGTGCTCGCGG  
 TTTCCCGGGAACCCCGGGCCTGCCGGGCGTTAAAGGTCATCGTGGTTATCCGGGTG  
 TGGATGGTGCGAAGGGCCCACAGGGTGCGCGTGGTTTCCCGGGCACCCCTGGGCT  
 CCCGGGTGTGAAAGGTCACAGAGGTTACCCGGGCCTGGATGGTGCCAAAGGTCCG  
 CAAGGTGCGCGTGGTTTTCCGGGCACGCCGGGCTTGCCGGGTGTTAAAGGTCACC  
 GTGGTTATCCGGGTCTGGACGGCGCAAAGGGTCCTCAGGGTGCACGCGGCTTCCC  
 GGGTACGCCGGGCCTTCCGGGCGTGAAGGGCCACCGCGGTTATCCGGGTTTGGAC  
 GGTGCCAAGGGTCCGCAGGGTGCAGCGTGGATTCCCGGGAACCCAGGCCTGCCAG  
 GTGTGAAGGGCCACCGTGGCTACCCGGGCTTGGACGGTGCTAAAGGACCGCAGGG  
 CGCACGTGGCTTTCCGGGTACCCCGGGCCTGCCTGGCGTCAAGGGCCATCGTGGTT  
 ACCCGGGCCTGGATGGTGCAAAGGCCACAGGGTGCCCGTGGTTTTCCCGGGTAC  
 TCCGGGCCTGCCGGGCGTAAAAGGCCATCGCGGTTACCCGGGTTTGGATGGCGCT  
 AAAGGCCACAAGGTGCTAGAGGGTTCCCTGGCACCCCGGGTCTGCCGGGCGTTA

AAGGCCATCGTGGTTACCCGGGCTTGGACGGCGCGAAGGGTCCGCAAGGCGCGCG  
TGGTTTTCCGGGTACCCCGGGTCTGCCAGGCGTTAAGGGTCACCGCGGTTACCCGG  
GTTTAGACGGTGCGAAA

HC2B-A8 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.23):

GGTGCTAGGGGATTCCCGGGAACCCCGGGTCTGCCAGGCGTGAAAGGTCACCGCG  
GTTACCCGGGCCTCGACGGCGCGAAGGGTGCCCGTGGTTTTCCGGGAACCCCGGG  
CTTGCCAGGTGTCAAGGGCCATCGTGGTTACCCGGGTCTCGATGGTGCAAAGGGTG  
CGAGAGGCTTCCCGGGCACCCCGGGCCTGCCAGGGGTGAAAGGCCACAGAGGCTA  
TCCTGGCTTGGATGGTGCCAAGGGTGACGTGGATTCCCGGGCACTCCGGGTCTGC  
CGGGCGTGAAGGGCCACCGCGGTTATCCGGGCCTGGACGGTGCTAAAGGCGCGCG  
TGGTTTTCCGGGTACGCCGGGCTTGCCAGGTGTTAAGGGCCACCGTGGCTACCCGG  
GGCTGGATGGTGCCAAAGGTGCTCGCGGTTTCCCGGGAACCCCGGGTCTGCCTGGC  
GTGAAGGGTCATCGTGGTTACCCGGGCTTGGACGGCGCTAAGGGTGCGCGTGGTTT  
TCCGGGCACCCCGGGTCTGCCGGGGGTGAAAGGTCACCGCGGTTATCCCGGTCTGG  
ATGGTGCGAAGGGTGCGCGTGGCTTCCCGGGCACCCCGGGCCTGCCGGGTGTTAAA  
GGTCATCGTGGTTACCCGGGCCTGGATGGTGCCAAGGGCGCTCGCGGTTTTCCGGG  
CACGCCAGGTTTACCGGGGGTCAAAGGCCATCGTGGCTATCCGGGTTTAGATGGCG  
CGAAAGGCGCACGCGGATTCCCGGGAACCCCGGGCCTGCCTGGCGTTAAAGGCCA  
CCGCGGTTACCCGGGCCTTGACGGCGCGAAAGGCGCGCGTGGTTTTCCGGGCACCC  
CGGGTCTGCCGGGTGTTAAAGGTCACCGTGGCTATCCGGGTCTGGACGGTGCAAAA  
GGTGCACGTGG  
TTTTCCCGGGGACTCCGGGCCTGCCGGGTGTTAAGGGCCATCGTGGTTACCCGGGTT  
TGGACGGTGCGAAG

HC2B-A9 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.24):

GGATTTCCCGGGACTCCAGGTCTGCCCGGCGTGAAGGGCCACCGCGGTTATCCGGG  
CTTGGACGGTGCGAAAGGCTTCCCGGGCACGCCAGGCTTACCTGGTGTGAAGGGC  
CATCGTGGTTACCCGGGGCTGGATGGTGCGAAGGGTTTTCCGGGCACCCCGGGTCT  
GCCGGGCGTAAAGGGCCACCGCGGTTATCCGGGCCTGGACGGTGCAAAAGGTTTTT  
CGGGCACCCCGGGCCTGCCGGGTGTGAAGGGCCACCGCGGTTACCCGGGTTTGG  
CGGTGCCAAGGGATTCCAGGTACGCCGGGTCTGCCGGGGGTGAAGGGCCATAGA  
GGCTACCCGGGCTTGGATGGTGCGAAAGGTTTTCCCGGGAACCCCTGGTCTGCCGGG  
CGTTAAGGGCCACCGTGGTTATCCGGGTCTGGATGGCGCGAAAGGTTTTCCGGGAA  
CCCCAGGTCTGCCGGGCGTTAAAGGTCATCGTGGTTACCCGGGGCTCGATGGTGCC  
AAAGGTTTTCCGGGCACCCCGGGTCTGCCGGGCGTCAAAGGTCACCGCGGTTATCC  
GGGTCTGGATGGTGCGAAAGGCTTCCCGGGAACCCCGGGCCTGCCTGGCGTGAAA  
GGCCATCGTGGTTATCCGGGTCTGGATGGTGCTAAAGGATTCCCGGGAACCCCGGG  
CCTGCCGGGCGTTAAGGGTCACCGTGGTTACCCGGGCCTGGATGGCGCTAAGGGTT  
TCCCGGGTACGCCCGGCCTGCCGGGCGTCAAAGGTCATCGTGGTTACCCGGGTTTA  
GACGGCGCAAAGGTTTTCCCGGGAACCCCGGGTCTGCCGGGTGTTAAGGGCCATC  
GTGGCTATCCGGGCTTGGACGGTGCAAAGGGTTTTCTGGTACTCCAGGCTTGCCC  
GGCGTTAAGGGCCACCGTGGTTACCCGGGTTTGGACGGCGCTAAAGGCTTTCCGGG  
AACCCCGGGTCTTCCGGGCGTGAAAGGTCACCGTGGTTACCCGGGTCTGGACGGC  
GCGAAG

HC2B-A10 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.25):

GGAACACCCGGGCTGCCGGGTGTTAAGGGCCATCGTGGCTACCCGGGTTTGGACGG  
TGCGAAAGGCACCCCTGGCCTGCCGGGTGTCAAAGGCCATCGTGGTTATCCGGGTCT  
TCGACGGTGCGAAGGGTACCCAGGACTGCCGGGTGTTAAAGGTCACCGCGGTTAC  
CCGGGTCTGGACGGCGCAAAGGTAAGGTTACTCCAGGCCTGCCGGGCGTGAAGGGTCATC

GTGGTTACCCGGGCCTGGACGGCGCGAAAGGGCACCCCGGGCTTACCCGGGCGTGAA  
 AGGCCATCGTGGTTATCCGGGGTTGGATGGCGCAAAGGGTACCCCGGGTCTGCCTG  
 GTGTTAAGGGCCACCGCGGTTATCCGGGCCTGGATGGTGCGAAAGGTACGCCGGGA  
 TTGCCGGGTGTGAAGGGTCATCGTGGTTACCCGGGTCTGGATGGTGCCAAAGGCAC  
 GCCAGGCCTTCCGGGCGTCAAGGGCCACCGCGGTTACCCGGGCCTGGATGGTGCG  
 AAAGGTACCCCGGGTTTGCCTGGTGTAAAGGGCCACCGCGGTTATCCTGGTTTGA  
 CGGCGCGAAAGGAACCCCGGGCCTGCCGGGTGTAAAGGCCATCGTGGCTACCCG  
 GGTCTGGACGGCGCTAAAGGCACTCCGGGTCTGCCGGGCGTGAAGGGCCACCGTG  
 GTTATCCGGGTTTAGACGGCGCGAAAGGCACCCAGGCCTGCCGGGTGTCAAGGGT  
 CACCGCGGTTACCCGGGTCTGGATGGTGCCAAGGGCACCCCGGGCTTGCCGGGCGT  
 GAAAGGACATCGTGGTTACCCGGGCCTGGATGGTGCTAAGGGCACGCCAGGTCTTC  
 CGGGTGTGAAAGGTCACCGTGGTTATCCGGGTCTGGACGGTGCAAAGGGAACCC  
 GGGCTGCCGGGCGTAAAAGGCCACAGAGGTTATCCGGGTCTTGATGGTGCGAAG  
 GGCACCCCGGGCCTGCCGGGCGTAAAGGTCACCGTGGTTACCCGGGTTTGGACGG  
 CGCTAAA

HC2B-B7 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.26):

GGAGAAAGGGGGTTGAAGGGACACCGCGGTTTTACTGGTTTGCAAGGCCTGCCGG  
 GCCCTCCGGGTCCGTCTGGCGATCAGGGTGCAAGCGGCCCGGCGGGTCCGTCCGG  
 CCCGCGTGGTGAGCGCGGTCTTAAGGGCCATCGTGGTTTACCGGTTTACAAGGTC  
 TGCCGGGCCCCGCGGGTCCGAGCGGTGATCAAGGGGCCTCCGGTCCGGCTGGCCC  
 GTCCGGCCAAGAGGGCGAACGTGGTCTGAAAGGTCATCGTGGATTACCCGGACTG  
 CAGGGTCTGCCTGGTCCGCCTGGTCCGTCAGGCGACCAAGGTGCGAGCGGTCCGG  
 CGGGTCCGTCCGGTCCGCGTGGTGAACGTGGTCTGAAAGGCCACCGCGGCTTAC  
 CGTTTTGCAAGGCCTGCCAGGCCACCCGGGTCCGTCTGGCGACCAGGGAGCCAGC  
 GGTCCGGCTGGCCATCTGGCCCACGCGGCGAGCGCGGTCTGAAAGGCCACCGTG  
 GCTTTACGGGCTTGCAAGGTCTCCCGGGCCCACCGGGCCCGAGCGGTGATCAGGGT  
 GCCAGCGGACCCGGCAGGCCCTCTGGTCCGCGTGGTGAACGTGGCCTGAAAGGTC  
 ATCGTGGTTTTACCGGTTTACAGGGCCTGCCAGGTCCCCGGGTCCGTCCGGCGAC  
 CAGGGCGCAAGCGGTCCGGCTGGCCCAGCGGTCCGCGTGGCGAGCGCGGCCTTA  
 AGGGCCACAGAGGCTTACGGGTCTGCAAGGTTTGCCGGGTCCGCCTGGCCCCGTC  
 GGGCGATCAGGGCGCGAGCGGCCCGGCGGGTCCGAGCGGTCCGCGTGGCGAGCGT  
 GGTCTGAAGGTCACCGCGTTTTTACCGGTCTGCAAGGTCTGCCGGGTCCGCCTGG  
 CCCGAGCGGCGACCAGGGAGCGAGCGGTCCGGCGGGTCCGAGTGGTCCGCGT

HC2B-B8 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.27):

GGGGAAGGGGACTCAAAGGTCACCGCGGTTTACGGGCCTTCAAGGTCTGCCGG  
 GTCTCCGGGTCCGAGCGGCGACCAAGGTGCGTCTGGCCCAGCGGGTGAGCGTGG  
 TTTAAAAGGCCACCGCGGTTTACCGGCCTGCAGGGTTTACCGGGTCCGCCTGGCC  
 CGAGCGGTGATCAAGGTGCAAGCGGCCCGGCAGGCGAACGCGGTCTG  
 AAAGGCCATAGAGGTTTTACCGGCCTGCAGGGCTTGCCGGGCCCCGCGGGCCCCGA  
 GTGGCGATCAAGGTGCTTCCGGCCCCGGCGGGTGAACGTGGCCTGAAGGGCCATCG  
 TGGCTTTACCGGTCTGCAGGGCCTGCCAGGTCCGCCGGGCCCCGTCTGGCGACCAGG  
 GTGCGAGCGGTCCAGCCGGTGAGCGCGGCTTGAAGGGCCACCGCGGCTTTACGGG  
 TTTGCAAGGTCTGCCTGGTCCGCCGGGCCCCGTCAGGCGATCAAGGGGCGAGCGGC  
 CCGGCGGGTGAACGTGGTCTGAAAGGTCATCGTGGATTACCGGCCTGCAGGGTC  
 TGCCGGGCCCCG  
 CCGGCCCGTCCGGTGACCAGGGTGCTTCCGGTCCGGCTGGTGAGCGCGGTCTTAAG  
 GGACACCGTGGCTTACCGGTCTGCAGGGCTTGCCGGGTCTCCGGGGCCGAGCG  
 GCGACCAGGGTGCCTCCGGCCCCGGCGGGTGAACGTGGTCTGAAGGGCCACCGTGG  
 TTTTACCGGCTTGAAGGTCTGCCGGGTCCACCGGGTCCGTCTGGCGATCAGGGAG  
 CCAGCGGTCCGGCAGGCGAGCGTGGTTTGAAGGGTCACCGTGGATTACCGGCCT

GCAGGGGCTGCCGGGCCCCGCCGGGTCCGTCGGGCGATCAGGGAGCGAGCGGTCCG  
GCAGGTGAGCGTGGTCTGAAAGGCCATCGTGGCTTCACTGGTTTGAAGGCCTGCC  
TGGCCACCGGGTCCGAGCGGTGACCAGGGTGCCAGCGGTCCGGCT

HC2B-B9 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.28):

GGAGAAAGGGGGCTTAAGGGCCATCGTGGCTTACGGGTTTGCAGGGCCTGCCGG  
GCCCACCGGGTCCGAGCGGCGATCAAGGCGAGCGGGGCCTGAAAGGTCATCGTGG  
CTTTACCGGTTTGCAGGGCCTGCCGGGCCACCGGGACCGAGCGGTGATCAGGGG  
GAGCGTGGTCTGAAAGGTCATCGTGGTTTTACCGGTCTGCAGGGTTTGCCGGGTCC  
TCCGGGTCCGTCTGGCGACCAAGGTGAGCGTGGTCTGAAAGGTCATCGTGGTTTTCA  
CCGTTTTACAAGGCCTGCCGGGCCACCGGGTCCGAGCGGTGACCAAGGCGAGCG  
TGGCCTGAAAGGCCACCGCGGTTTACCGGTCTTCAGGGTCTGCCGGGCCACCGG  
GTCCCAGCGGTGACCAGGGTGAACGCGGTCTGAAGGGTCACAGAGGCTTACCGG  
TCTCCAAGGCTTACCGGGTCCGCCGGGCCGAGCGGTGATCAGGGCGAACGTGGT  
CTGAAGGGCCACCGTGGCTTTACCGGTCTGCAAGGCCTGCCGGGTCCGCCGGGTCC  
CGTCGGGCGACCAGGGTGAAGCGGTTTGAAGGGCCACCGTGGATTACCGGCCT  
GCAGGGCCTGCCGGGACCGCCTGGTCCGTCAGGTGATCAGGGTGAAGCGCGGTCTC  
AAGGGTCATCGTGGTTTTACCGGTTTACAAGGTTTGGCCGGGTCCGCCTGGCCCGTC  
TGGTGATCAAGGCGAACGTGGTCTGAAAGGCCACCGCGGCTTCACTGGTCTGCAG  
GGCTTGCCGGGCCACCGGGTCCGTCCGGCGATCAAGGCGAACGTGGTCTGAAGG  
GTCACCGCGGATTACCGGCCTGCAGGGCCTGCCGGGTCCGCCAGGTCCGTCCGG  
CGACCAGGGCGAACGCGGGCTGAAAGGTCACCGTGGCTTTACCGGTTTGAAGGA  
CTGCCGGGTCCGCCGGGCCGAGCGGCGACCAG

HC2B-B10 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.29):

GGAGAAAGGGGGCTGAAGGGTCACCGTGGTTTTACCGGTTTGAAGGTTTGCCGG  
GTCCGCCGGGTGAGCGCGGCTGAAGGGTCATCGTGGCTTACCGGCCTGCAAGG  
CCTGCCGGGTCCGCCGGGTGAGCGTGGTCTCAAGGGTCATCGTGGCTTTACCGGTT  
TACAGGGTCTGCCGGGCCACCGGGCGAGCGCGGTCTGAAAGGCCATCGTGGATT  
ACCGGCCTGCAGGGCTTGCCGGGTCCACCGGGCGAAAGAGGCTTAAAAGGTCACC  
GTGGTTTTACCGGTCTGCAAGGTCTGCCGGGTCCGCCGGGTGAACGTGGCCTTAAG  
GGTACCGCGGCTTCACTGGTCTGCAGGGTTTGGCCGGTCCGCCTGGTGAAGGG  
GTCTGAAAGGCCATCGTGGTTTTACCGGTCTGCAGGGCCTGCCGGGCCACCGGGT  
GAGAGAGGCTTGAAGGGTCACCGTGGTTTTACGGGCCTGCAGGGTCTGCCGGGCC  
CGCCGGGTGAGCGCGGTCTTAAGGGCCACCGTGGATTACCGGCCTTCAAGGTCTG  
CCGGGTCCGCCGGGGGAGCGTGGCCTGAAAGGTCATCGCGGCTTACCGGTTTGC  
AAGGTTTGGCAGGGCCACCGGGCGAACGTGGCCTGAAAGGGCACCGTGGTTTTAC  
TGGTTTTGCAGGGCCTGCCGGGCCCGCCGGGCGAGCGCGGTTTGAAGGGCCACCGT  
GGTTTACGGGCCTGCAAGGTCTGCCGGGCCCTCCGGGAGAACGCGGTCTGAAAG  
GTCACCGTGGCTTACCGGCCTGCAGGGTCTACCGGGTCCACCGGGCGAGCGCGG  
ACTGAAAGGTCATCGCGGCTTACCGGTCTGCAGGGCCTGCCGGGTCCGCCGGGTG  
AACGTGGCCTGAAAGGCCACCGCGGTTTTACCGGTTTACAAGGCTTGGCCGGGTCCG  
CCGGGTGAACGTGGCTTGAAGGGCCATCGTGGCTTTACCGGTCTTCAAGGGCTGCC  
GGCCCGCCT

## 权利要求书

1. 胶原蛋白，包含多个重复单元，该重复单元包含以 SEQ ID NO.15 所示的氨基酸序列、SEQ ID NO.15 的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的突变（取代、插入、删除或添加）后得到的氨基酸序列或与其具有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 同一性的氨基酸序列，各重复单元是直接连接的或间隔一个或多个氨基酸残基；优选地，其中重复单元的数目是 1-20；优选地重复单元的数目是 6-10，例如 7、8 或 9；优选地，胶原蛋白包含以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列、SEQ ID NO.10 的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的突变（取代、插入、删除或添加）后得到的氨基酸序列或与其具有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 同一性的变体；优选地，胶原蛋白是重组 II 型人源化胶原蛋白。

2. 多核苷酸，其编码根据权利要求 1 所述的胶原蛋白；优选地，所述多核苷酸包含 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列。

3. 核酸，其包含根据权利要求 2 所述的多核苷酸，任选地还包含编码纯化标签，例如 His 标签、GST 标签、MBP 标签、SUMO 标签或 NusA 标签的核苷酸，任选地还包含编码前导序列的核苷酸。

4. 载体，其包含根据权利要求 2 所述的多核苷酸或根据权利要求 3 所述的核酸，优选地，其中载体是表达载体，优选地，其中载体包含与多核苷酸或核酸可操作连接的表达控制元件，如启动子、终止子和/或增强子。

5. 宿主细胞，其包含根据权利要求 2 所述的多核苷酸、根据权利要求 3 所述的核酸或根据权利要求 4 所述载体；优选地，其中宿主细胞是细菌、真菌或动物细胞，优选地，细菌是大肠杆菌；优选地，真菌是酵母，例如酿酒酵母。

6. 生产根据权利要求 1 所述的胶原蛋白的方法，其包括：

- (1) 在合适的培养条件下培养根据权利要求 5 所述的宿主细胞；
- (2) 收获包含胶原蛋白的宿主细胞和/或培养基；和
- (3) 纯化胶原蛋白。

7. 组合物，其包含根据权利要求 1 所述的胶原蛋白，优选地，组合物是试剂盒；优选地，组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、

妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D 打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种，优选地其中组合物为注射用组合物或口服用组合物。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物，其是用于软骨修复的组合物，优选是用于软骨修复的注射用组合物。

9. 用于增加细胞粘附的方法，其包括将细胞与根据权利要求 1 所述的胶原蛋白、根据权利要求 2 所述的多核苷酸、根据权利要求 3 所述的核酸、根据权利要求 4 所述的载体、根据权利要求 5 所述的宿主细胞、和/或根据权利要求 7 或 8 所述的组合物接触。

10. 根据权利要求 1 所述的胶原蛋白、根据权利要求 2 所述的多核苷酸、根据权利要求 3 所述的核酸、根据权利要求 4 所述的载体、根据权利要求 5 所述的宿主细胞、和/或根据权利要求 7 或 8 所述的组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于增加细胞粘附或软骨修复，或者在生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D 打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种中的用途。

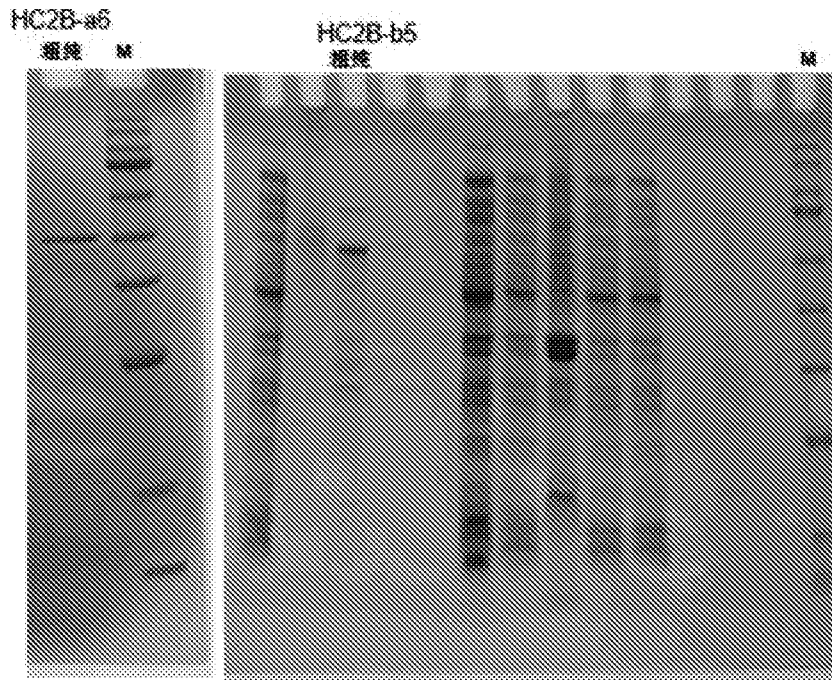


图1

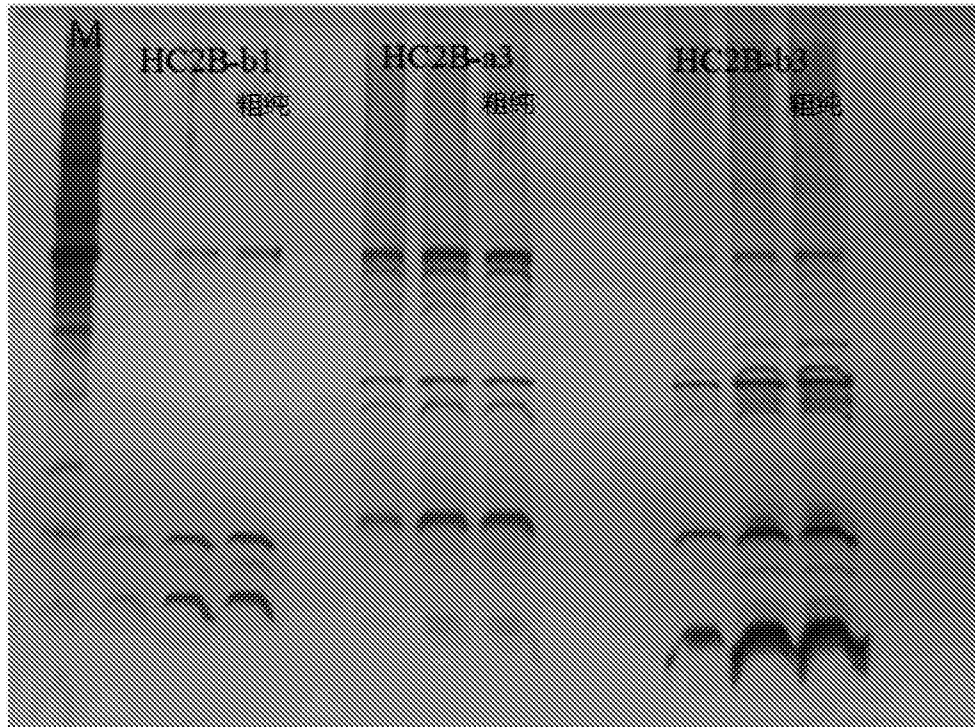


图2

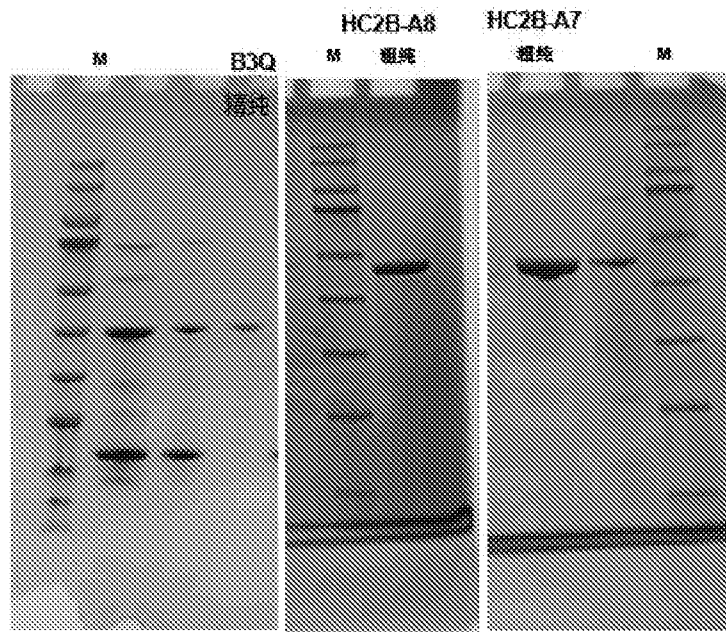


图3

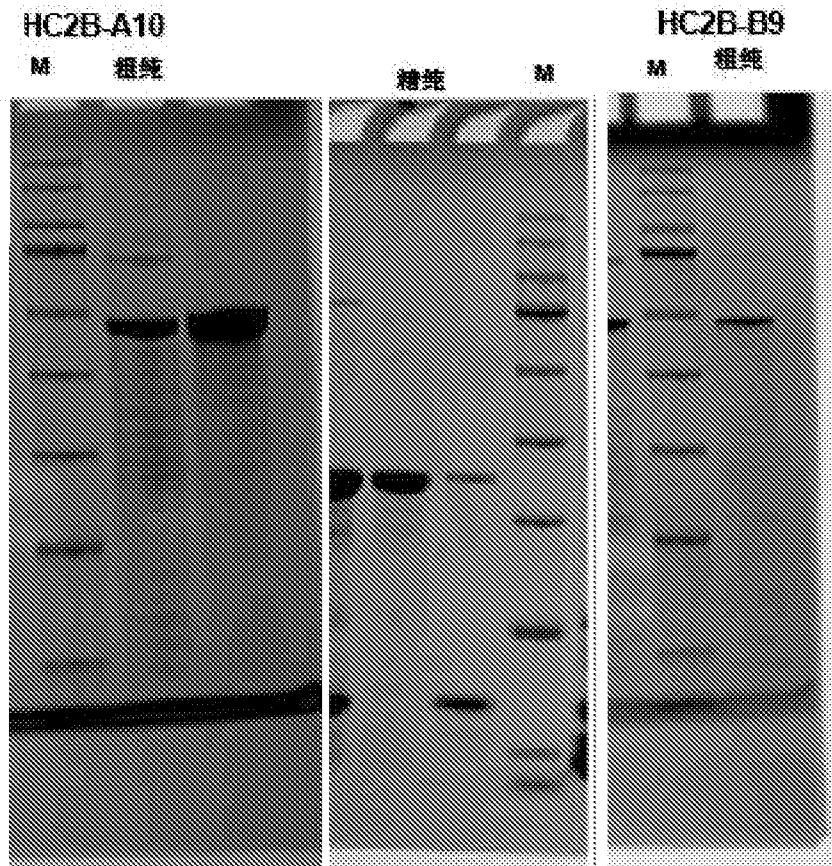


图4

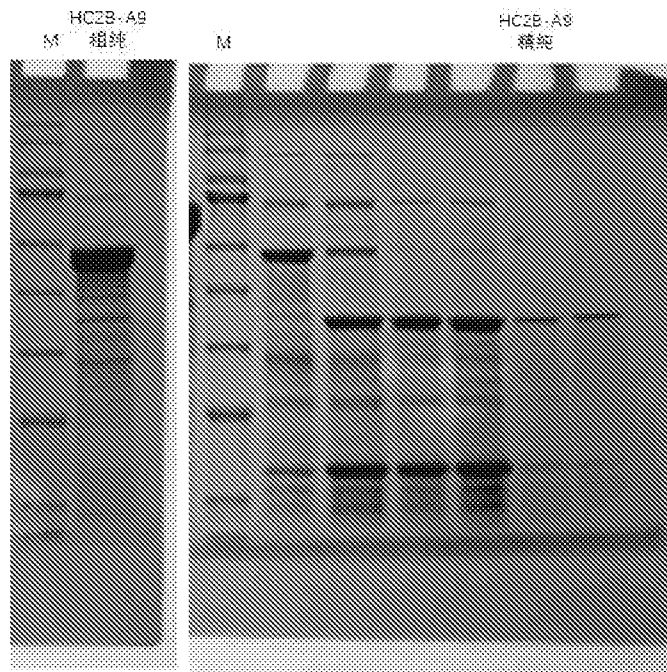


图5

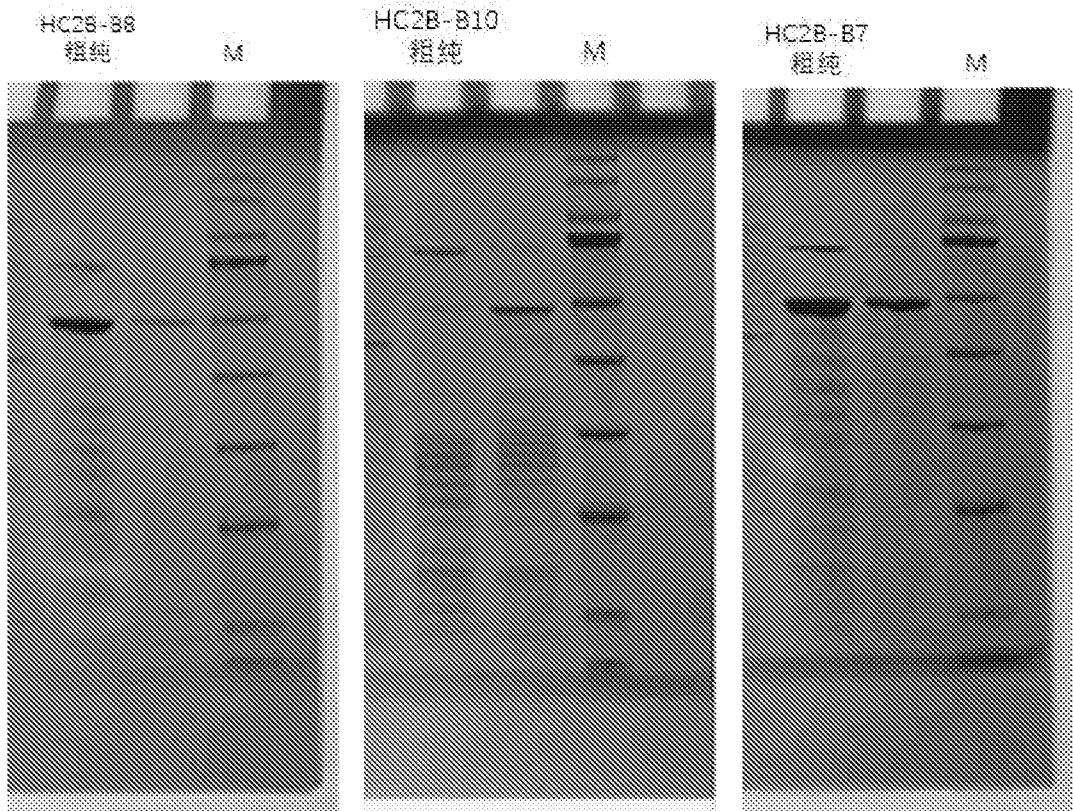


图6

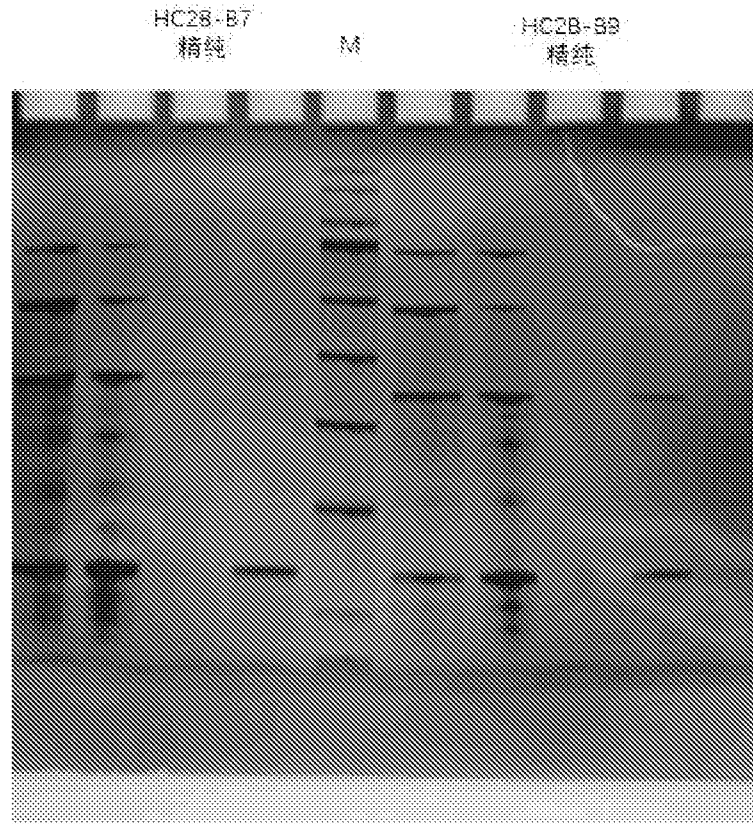


图7

NIH/3T3

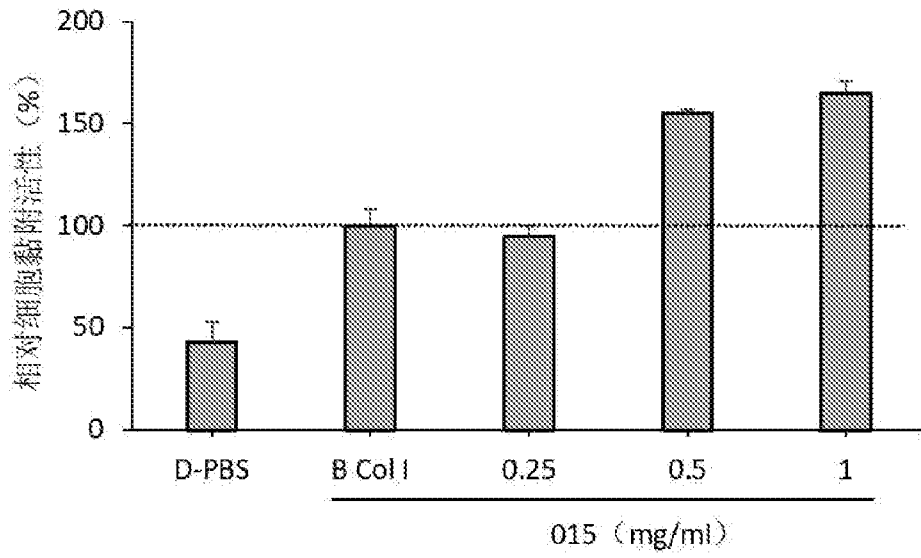


图8

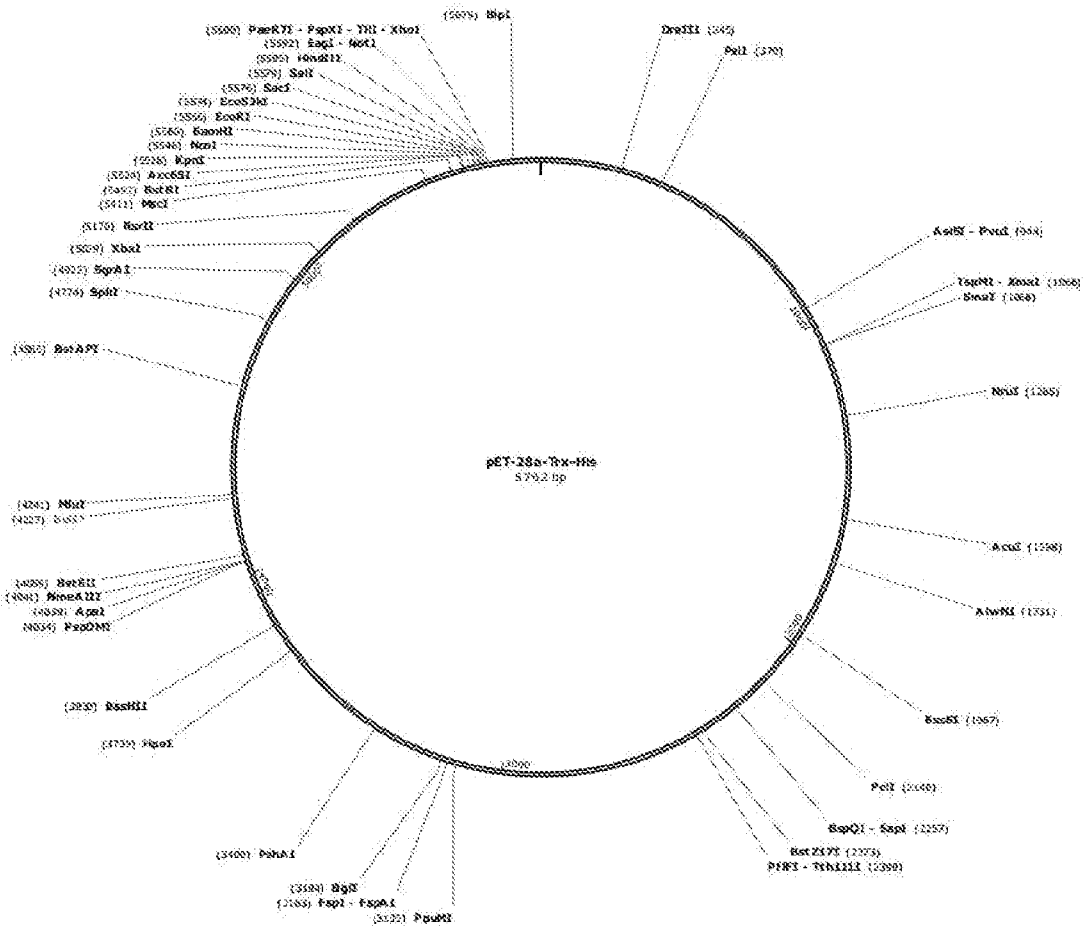


图9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/134277

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |  |  |
| C07K14/78(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; A61K38/39(2006.01)i; A61P19/08(2006.01)i; C12N5/077(2010.01)i; C12R1/19(2006.01)i   |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |  |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC:C07K,C12N,A61K,A61P,C12R  |  |  |
| 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)<br>DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, ENTXT, PUBMED, ISI Web of Science, CNKI, 万方数据知识服务平台, WANFANG DATA KNOWLEDGE SERVICE PLATFORM, 百度学术, Baidu Scholar, EMBL, GENBANK, STN, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System (and search terms): GTPGLPGVKGHRGYPGLDGAKGTPGLPGVKGHRGYPGLDGAK, +GTPGLPGVKGHRGYPGLDGAK+, 胶原, 明胶, 胶原蛋白肽, 胶原蛋白多肽, 胶原多肽, collagen, II 型胶原, COL II, COL2A1, etc.  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| PX   | CN 116715754 A (SHANXI JINBO BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 08 September 2023 (2023-09-08)<br>see abstract, and claims 1-10               | 1-8, 10  |
| A  | CN 109293783 A (SHANXI JINBO BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 01 February 2019 (2019-02-01)<br>see abstract, and claims 1-10                | 1-8, 10  |
| A  | CN 113621052 A (SHANXI JINBO BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 09 November 2021 (2021-11-09)<br>see abstract, and claims 1-10                | 1-8, 10  |
| A  | US 2006051794 A1 ( TSAI SHIH-FENG; LIU YU-FEN; CHEN WEI-MING) 09 March 2006 (2006-03-09)<br>see abstract, claims 1-10, and SEQ ID NO: 12 | 1-8, 10  |
| <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:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>26 February 2024</b>   |  | Date of mailing of the international search report<br><b>04 March 2024</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br><b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)<br/>China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>   |  | Authorized officer<br><br>Telephone No.                                    |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/134277

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category*                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A                                      | CN 110747198 A (JIANGSU YUEZHI BIOLOGICAL MEDICINE CO., LTD.) 04 February 2020 (2020-02-04)<br>see abstract, and claims 1-10 | 1-8, 10               |
| A                                      | CN 110862450 A (DONGGUAN GUANGJI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 06 March 2020 (2020-03-06)<br>see abstract, and claims 1-6 | 1-8, 10               |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/134277

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**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**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

|   |
|---|
| International application No.<br><b>PCT/CN2023/134277</b> |
|---|

| Patent document cited in search report |            |    | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|------------|----|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| CN                                     | 116715754  | A  | 08 September 2023                 | None                    |                                   |
| CN                                     | 109293783  | A  | 01 February 2019                  | None                    |                                   |
| CN                                     | 113621052  | A  | 09 November 2021                  | None                    |                                   |
| US                                     | 2006051794 | A1 | 09 March 2006                     | US 7718366 B2           | 18 May 2010                       |
| CN                                     | 110747198  | A  | 04 February 2020                  | None                    |                                   |
| CN                                     | 110862450  | A  | 06 March 2020                     | None                    |                                   |

| <p>A. 主题的分类</p> <p>C07K14/78(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; A61K38/39(2006.01)i; A61P19/08(2006.01)i; C12N5/077(2010.01)i; C12R1/19(2006.01)i</p> <p>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</p>  |  |            |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
|---|--|------------|-------------------------------|-------------------|---------|----|--|--------|---|--|--------|---|---|--------|---|--|--------|---|--|--------|---|---|--------|
| <p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:C07K,C12N,A61K,A61P,C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, ENTXT, PUBMED, ISI Web of Science, CN-KI, 万方数据知识服务平台, 百度学术, EMBL, GENBANK, STN, 中国专利生物序列检索系统(和检索词): GTPGLPGVKGHRGYPGLDGAKGTPGLPGVKGHRGYPGLDGAK,+GTPGLPGVKGHRGYPGLDGAK+,胶原,明胶,胶原蛋白肽,胶原蛋白多肽,胶原多肽,collagen, II型胶原, COL II, COL2A1等。</p>   |  |            |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| <p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 116715754 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2023年9月8日 (2023 - 09 - 08)<br/>参见摘要, 权利要求1-10</td> <td>1-8,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109293783 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2019年2月1日 (2019 - 02 - 01)<br/>参见摘要, 权利要求1-10</td> <td>1-8,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113621052 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2021年11月9日 (2021 - 11 - 09)<br/>参见摘要, 权利要求1-10</td> <td>1-8,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2006051794 A1 ( TSAI SHIH-FENG;LIU YU-FEN;CHEN WEI-MING;) 2006年3月9日 (2006 - 03 - 09)<br/>参见摘要, 权利要求1-10,SEQ ID NO:12</td> <td>1-8,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110747198 A (江苏悦智生物医药有限公司) 2020年2月4日 (2020 - 02 - 04)<br/>参见摘要, 权利要求1-10</td> <td>1-8,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110862450 A (东莞光极生物科技有限公司) 2020年3月6日 (2020 - 03 - 06)<br/>参见摘要, 权利要求1-6</td> <td>1-8,10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input 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。</p> <p>* 引用文件的具体类型:<br/>         “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br/>         “D” 申请人在国际申请中引证的文件<br/>         “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br/>         “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)<br/>         “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br/>         “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<br/>         “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<br/>         “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<br/>         “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<br/>         “&amp;” 同族专利的文件</p> |  |            | 类型*                           | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | PX | CN 116715754 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2023年9月8日 (2023 - 09 - 08)<br>参见摘要, 权利要求1-10 | 1-8,10 | A | CN 109293783 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2019年2月1日 (2019 - 02 - 01)<br>参见摘要, 权利要求1-10 | 1-8,10 | A | CN 113621052 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2021年11月9日 (2021 - 11 - 09)<br>参见摘要, 权利要求1-10 | 1-8,10 | A | US 2006051794 A1 ( TSAI SHIH-FENG;LIU YU-FEN;CHEN WEI-MING;) 2006年3月9日 (2006 - 03 - 09)<br>参见摘要, 权利要求1-10,SEQ ID NO:12 | 1-8,10 | A | CN 110747198 A (江苏悦智生物医药有限公司) 2020年2月4日 (2020 - 02 - 04)<br>参见摘要, 权利要求1-10 | 1-8,10 | A | CN 110862450 A (东莞光极生物科技有限公司) 2020年3月6日 (2020 - 03 - 06)<br>参见摘要, 权利要求1-6 | 1-8,10 |
| 类型*   | 引用文件, 必要时, 指明相关段落  | 相关的权利要求    |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| PX  | CN 116715754 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2023年9月8日 (2023 - 09 - 08)<br>参见摘要, 权利要求1-10   | 1-8,10     |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| A   | CN 109293783 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2019年2月1日 (2019 - 02 - 01)<br>参见摘要, 权利要求1-10   | 1-8,10     |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| A   | CN 113621052 A (山西锦波生物医药股份有限公司) 2021年11月9日 (2021 - 11 - 09)<br>参见摘要, 权利要求1-10  | 1-8,10     |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| A   | US 2006051794 A1 ( TSAI SHIH-FENG;LIU YU-FEN;CHEN WEI-MING;) 2006年3月9日 (2006 - 03 - 09)<br>参见摘要, 权利要求1-10,SEQ ID NO:12 | 1-8,10     |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| A   | CN 110747198 A (江苏悦智生物医药有限公司) 2020年2月4日 (2020 - 02 - 04)<br>参见摘要, 权利要求1-10   | 1-8,10     |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| A   | CN 110862450 A (东莞光极生物科技有限公司) 2020年3月6日 (2020 - 03 - 06)<br>参见摘要, 权利要求1-6  | 1-8,10     |                               |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| 国际检索实际完成的日期   | 2024年2月26日   | 国际检索报告邮寄日期 | 2024年3月4日                     |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |
| ISA/CN的名称和邮寄地址  | 中国国家知识产权局<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088  | 授权官员       | 张宁<br>电话号码 (+86) 010-62411548 |                   |         |    |  |        |   |  |        |   |   |        |   |  |        |   |  |        |   |   |        |

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的:
  - b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 9  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
PCT细则39.1 (iv) ——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法，以及诊断方法。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2023/134277

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |         |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|---------|----|----------------|
| CN          | 116715754  | A  | 2023年9月8日      | 无    |         |    |                |
| CN          | 109293783  | A  | 2019年2月1日      | 无    |         |    |                |
| CN          | 113621052  | A  | 2021年11月9日     | 无    |         |    |                |
| US          | 2006051794 | A1 | 2006年3月9日      | US   | 7718366 | B2 | 2010年5月18日     |
| CN          | 110747198  | A  | 2020年2月4日      | 无    |         |    |                |
| CN          | 110862450  | A  | 2020年3月6日      | 无    |         |    |                |