

(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
2017 年 9 月 21 日 (21.09.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/157323 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 7/08 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/076969
- (22) 国际申请日: 2017 年 3 月 16 日 (16.03.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610150319.1 2016 年 3 月 16 日 (16.03.2016) CN
- (71) 申请人: 苏州大学 (SOOCHOW UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路
199 号, Jiangsu 215123 (CN)。
- (72) 发明人: 武艺 (WU, Yi); 中国江苏省苏州市苏州工
业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 谢展利
(XIE, Zhanli); 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁
爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 阳艾珍 (YANG,
Aizhen); 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路
199 号, Jiangsu 215123 (CN)。
- (74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司 (SU-
ZHOU CREATOR PATENT AND TRADEMARK
AGENCY, LTD); 中国江苏省苏州市姑苏区干将西
路 93 号 5 楼/陶海锋, Jiangsu 215002 (CN)。

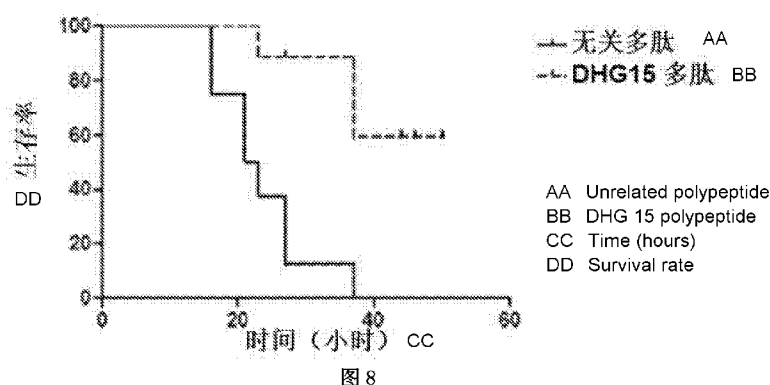
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR,
IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, 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,
RW, 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, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: LIPOPOLYSACCHARIDE BINDING PROTEIN POLYPEPTIDE AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种脂多糖结合蛋白多肽及其制药用途



(57) Abstract: Provided are a lipopolysaccharide (LPS) binding protein polypeptide and the pharmaceutical use thereof, wherein the amino acid sequence of the lipopolysaccharide binding protein polypeptide is DHGKHKHKGHGK, and the lipopolysaccharide binding protein polypeptide is derived from a high molecular weight kininogen (HK) protein in human plasma itself. The lipopolysaccharide binding protein polypeptide is injected into a mouse through intraperitoneal injection, and can reduce the mortality of endotoxemia caused by LPS in mice and inhibit the production of inflammatory factors.

(57) 摘要: 提供了一种脂多糖 (LPS) 结合蛋白多肽及其制药用途, 该脂多糖结合蛋白多肽的氨基酸序列为 DHGKHKHKGHGK, 其源自人体自身血浆高分子量激肽原 (HK) 蛋白。该脂多糖结合蛋白多肽经腹腔注射注入小鼠体内, 可以降低小鼠由 LPS 导致的内毒素血症的死亡率, 并且抑制炎症因子的产生。



WO 2017/157323 A1

发明名称：一种脂多糖结合蛋白多肽及其制药用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种包含15个氨基酸的脂多糖结合蛋白多肽及其在制备用于预防和/或治疗由革兰氏阴性细菌引起的败血症的药物中的用途。

背景技术

[0002] 败血症是致病菌或条件致病菌侵入血液循环中生长繁殖，产生毒素和其他代谢产物所引起的急性全身性感染，临床上以寒战、高热、皮疹、关节痛及肝脾肿大特征，部分可有感染性休克和迁徙性病灶。引起败血症的原因有二：一、人体因素：当皮肤粘膜有破损或发生化脓性炎症时，细菌则容易侵入体内；人体的免疫反应可分为非特异性免疫反应及特异性免疫反应两种，后者又可分为细胞免疫与体液免疫两方面，当机体免疫功能下降时，不能充分发挥其吞噬杀灭细菌的作用，就会引起败血症；条件致病菌所引起的医源性感染也逐渐增多。二、细菌因素：主要与病原菌的毒力和数量有关。毒力强或数量多的致病菌进入机体，引起败血症的可能性较大。

[0003] 革兰氏阴性细菌感染是导致败血症的重要原因，其胞壁成分脂多糖（LPS）诱导产生的系统性炎症和微循环障碍对败血症发生的多器官功能障碍和败血性休克起关键作用。脂多糖（LPS）是革兰氏阴性杆菌细胞壁的组成成分之一，一般位于细胞壁的最外层，厚度约为8~10nm，具有很强的致炎作用。

[0004] 尽管目前败血症的治疗已采取抗感染、免疫调控和支持治疗等综合措施，但是败血症的发病率和死亡率仍然居高不下。究其原因，主要是对败血症发病机理的认识远远不足。血液中LPS不存在游离形式。已知生物体具有LPS清除机制，包括LBP、sCD14、CTBP及其它脂蛋白，它们与LPS的结合将其递呈给肝脏的三种细胞（包括枯否细胞、肝细胞及星状细胞），通过细胞内的降解排入胆汁，而被解毒。然而，在发生败血症时，血液中的LPS浓度居高不下，说明LPS借助于与宿主蛋白的结合而逃逸了清除机制，但迄今为止，仍不清楚LPS到底劫持了

哪些宿主蛋白。

技术问题

问题的解决方案

技术解决方案

[0005] 针对上述情况，本发明首次发现：血浆高分子量激肽原（high molecular weight kininogen, HK）可以通过其与LPS中的糖链的相互作用来保持其与LPS的高亲和力结合，可以作为一种新型的脂多糖结合蛋白。本发明进一步发现：HK中的一段高度保守的氨基酸序列（DHGHKHKHGHGHGKH）是其与LPS发生特异性结合的位点。合成该多肽序列，并经腹腔注射注入小鼠体内，可以显著改善由LPS导致的内毒素血症的死亡率，并且抑制炎症因子的产生。

[0006] 一方面，本发明提供了一种脂多糖结合蛋白多肽，将其命名为DHG15，其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 另一方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含上述脂多糖结合蛋白多肽和一种或多种药学上可接受的辅料，所述药学上可接受的辅料包括（但不限于）pH调节剂、渗透压调节剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、稳定剂、防腐剂、赋形剂、填充剂、崩解剂、粘合剂、矫味剂、矫嗅剂和润滑剂。所述药物组合物可以通过注射给药、鼻腔给药、肺部给药、透皮给药、口服给药等多种方式施用于患者。

[0008] 最后一方面，本发明提供了上述脂多糖结合蛋白多肽在制备用于预防和/或治疗由革兰氏阴性杆菌引起的败血症的药物中的用途。在上述药物中，本发明的脂多糖结合蛋白多肽既可以作为单独的药效活性物质，又可以与其他抗败血症药物联用。所述抗败血症药物包括（但不限于）头孢类抗生素和喹诺酮类抗生素；其中：所述头孢类抗生素选自头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮中的任意一种；所述喹诺酮类抗生素选自氧氟沙星、环丙沙星、氟罗沙星中的任意一种。

发明的有益效果

有益效果

[0009] 与现有技术相比，采用上述技术方案的本发明具有如下有益效果：

[0010] （1）本发明的脂多糖结合蛋白多肽DHG15具有很好的可溶性，并且序列源自人体自身HK蛋白，无细胞毒性；

[0011] （2）经腹腔注射DHG15后，可以降低小鼠由LPS导致的内毒素血症的死亡率，并且抑制炎症因子的产生；

[0012] （3）DHG15与LPS的多糖链结合后，阻断了LPS与HK蛋白的结合（使其解离或释放）；于此同时，LPS中的脂质A部分仍然暴露在外，LBP、sCD14、CTBP及其它脂蛋白仍然可以与之结合，并将其递呈至肝脏解毒，因此具有双重保护作用。

对附图的简要说明

附图说明

[0013] 图1为血浆HK蛋白中重链（HC）和轻链（LC）蛋白片段的Western Blotting鉴定结果图。

[0014] 图2为研究血浆HK蛋白与LPS结合的实验结果图。

[0015] 图3为HK和LC与LPS结合的亲和力结果图。

[0016] 图4为LC中的D4、D5和D6蛋白片段的Western Blotting鉴定结果图以及与LPS结合的实验结果图。

[0017] 图5为8个多肽片段在D5上的分布情况以及与LPS结合的实验结果图。

[0018] 图6为DHG15多肽与突变多肽在抑制HK轻链与LPS结合方面的比较结果图。

[0019] 图7为研究LPS与血浆HK蛋白结合的实验结果图。

[0020] 图8为DHG15多肽改善小鼠由LPS导致的死亡率的结果示意图。

[0021] 图9为DHG15单体对血浆中主要炎症因子水平的影响结果示意图。

发明实施例

本发明的实施方式

[0022] 下面结合附图和具体实施例对本发明做出进一步的描述。需要说明的是，下列实施例仅用于解释本发明的技术方案，而并不旨在限制其保护范围。另外，除非特殊说明，下列实施例中使用各种试剂、药品和仪器均可通过商业手段获得。

- [0023] 实施例一：从血浆HK蛋白中筛选功能性多肽DHG15并检测其结合性能。
- [0024] 血浆中的HK蛋白共有6个结构域，其中第一至第三结构域（D1~D3）组成HK的重链（Heavy chain, HC），第四至第六结构域（D4~D6）组成HK的轻链（Light chain, LC）。运用Bac-to-Bac昆虫细胞表达系统制备了HK的重链与轻链蛋白，并使用Western blotting鉴定所纯化的HC（55KD）与LC（35KD）蛋白，其结果如图1所示。
- [0025] 为了研究HK蛋白与LPS的结合位点，分别将200 ng HK、HC、LC蛋白与LPS或PBS孵育（4°C，30 min）。吸取30 μ l混匀的Polymyxin-B（Sigma）至1.5 ml离心管中，离心去上清，1 ml PBS洗两次（7000 rpm，2 min）。将各种蛋白样品与处理后的Polymyxin-B孵育（4°C，5 min），离心去上清，PBS洗两遍。采用60 μ l蛋白上样缓冲液重悬Polymyxin-B沉淀，100°C煮10 min，吸取10 μ l进行Western blotting鉴定，并孵育HK抗体（百奇生物）。
- [0026] 如图2所示，HK和LC能够与LPS结合，从而被polymyxin-B微珠共沉淀，提示HK可能通过LC与LPS结合。
- [0027] 为了进一步验证上述结论，使用Biacore分析方法，分别检测HK和LC与LPS结合的亲和力。采用pH=7.4的Running buffer稀释HK样品，稀释一系列浓度至0 nM、6.4 nM、19.3 nM、57.7 nM、173 nM、520 nM。按照Biacore X100 control soft的protocol，将HK蛋白偶联到HPA芯片上，偶联水平为3000 RU。设置进样时间为180 s，解离时间为500 s，再生液为0.1M HCl，再生时间为120 s。按照Biacore X100 control soft的protocol，进行上机测试。
- [0028] 如图3所示，HK、LC与LPS均有物理性的直接结合，Kd值分别为 1.713×10^{-7} M和 1.524×10^{-9} M。上述结果说明，与HK相比，LC与LPS的结合力更强，进一步提示LC含有HK与LPS直接结合的位点。
- [0029] 为了进一步研究究竟是LC中的哪一个结构域与LPS发生了结合，使用Bac-to-Bac昆虫细胞表达系统制备了LC中的第四结构域（D4）、第五结构域（D5）和第六结构域（D6）蛋白，并经过Western blotting鉴定。使用polymyxin-B微珠与D4、D5或D6蛋白孵育后，检测其与LPS的结合情况，只有D5可以被polymyxin-B共

沉淀下来，提示D5是HK与LPS的结合位点，其结果如图4所示。

[0030] 随后，合成了D5上的8个多肽片段（南京金斯瑞生物科技有限公司），每个多肽片段包含30个氨基酸。将8个多肽片段分别和LPS共孵育后，再和LC相互作用，然后使用同上的实验方法检测结合情况，只有多肽6和多肽7可以抑制LPS与LC的结合，其结果如图5所示。比对多肽片段6和7的氨基酸序列可知，其共有的序列为DHGHKHKHGHGHGKH（将其命名为DHG15）。

[0031] 据文献报道，富含组氨酸的多肽可以中和由LPS导致的宿主炎症反应，而本发明的DHG15多肽中恰恰含有大量组氨酸，因此推测组氨酸是HK与LPS结合的主要氨基酸。随后，将DHG15多肽中的组氨酸（H）突变为同样带正电荷的赖氨酸（K），即为DKGKKKKKGKKGK。将DHG15多肽以及突变多肽分别与LPS预孵育后，使用polymyxin-B微珠与上述混合物孵育，经Western blotting检测其与LPS的结合情况。

[0032] 如图6所示，DHG15多肽可以抑制HK轻链与LPS的结合，而将组氨酸（H）突变为赖氨酸（K）后，该突变多肽不能抑制HK轻链与LPS的结合。同时，采用D5中其它片段的无关多肽作为阴性对照，提示组氨酸是HK与LPS结合的关键。

[0033] 实施例二：LPS通过糖链与HK结合。

[0034] LPS主要由糖链和脂质A两部分组成，为了检测LPS通过其结构上的哪一部分与HK结合，向96孔板的每孔中加入2 μ g脂质A、脱脂LPS、LPS或BSA（内含0.1M Na_2CO_3 ，pH=9.6），4°C包被，过夜。PBS清洗孔板后，加入1%明胶，37°C封闭1 h。PBS清洗孔板后，各孔加入FITC标记的HK蛋白（100 nM），37°C孵育1 h。吸走液体后，采用酶标仪检测各孔中的荧光强度（激发光：494 nm，发射光：518 nm）。

[0035] 如图7所示，脱脂LPS与HK的结合能力最强，相比于脂质A与HK的结合能力，具有显著性差异，提示LPS上的糖链是LPS与HK结合的主要位点。

[0036] 实施例三：DHG15多肽的活性考察。

[0037] 为了研究DHG15多肽能否改善由LPS导致的小鼠死亡，将小鼠随机分为两组，通过腹腔注射方式进行给药，一组注射与无关多肽（200 g/只）共孵育的LPS（对照组），另一组注射与DHG15多肽（200 g/只）共孵育的LPS（治疗组），观

察两组小鼠的生存率。结果发现，经过DHG15多肽处理，可以显著改善小鼠由LPS导致的死亡率。

[0038] 为了研究DHG15是否会影响血浆中主要炎症因子的水平，比较对照组小鼠和DHG15治疗组小鼠血浆中主要炎症因子的含量。如图9所示，与对照组小鼠相比，DHG15治疗组小鼠血浆中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的水平明显降低，说明在由LPS导致的炎症反应中，DHG15可以显著抑制血浆中主要炎症因子的水平。

工业实用性

[0039] 以上结果说明，应用DHG15多肽可以阻断血浆HK蛋白与LPS的结合，有利于预防由革兰氏阴性杆菌引起的败血症的发病，同时有利于缓解发病后的症状，起到兼顾预防和治疗的双重效果。

序列表自由内容

[0040] <110> 苏州大学

[0041] <120> 一种脂多糖结合蛋白多肽及其制药用途

[0042] <160> 1

[0043] <170> PatentIn version 3.3

[0044] <210> 1

[0045] <211> 15

[0046] <212> PRT

[0047] <213> 人工序列

[0048] <220>

[0049] <223> DHG15多肽

[0050] <400> 1

[0051] Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His

[0052] 1 5 10 15

权利要求书

- [权利要求 1] 一种脂多糖结合蛋白多肽，其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
- [权利要求 2] 一种药物组合物，其包含根据权利要求1所述的脂多糖结合蛋白多肽和一种或多种药学上可接受的辅料。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的药物组合物，其特征在于：
所述药学上可接受的辅料包括pH调节剂、渗透压调节剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、稳定剂、防腐剂、赋形剂、填充剂、崩解剂、粘合剂、矫味剂、矫嗅剂和润滑剂。
- [权利要求 4] 根据权利要求2所述的药物组合物，其特征在于：
所述药物组合物通过注射给药、鼻腔给药、肺部给药、透皮给药或口服给药方式施用于患者。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的脂多糖结合蛋白多肽在制备用于预防和/或治疗由革兰氏阴性杆菌引起的败血症的药物中的用途。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的用途，其特征在于：
在所述用于预防和/或治疗由革兰氏阴性杆菌引起的败血症的药物中，根据权利要求1所述的脂多糖结合蛋白多肽作为单独的药效活性物质。
- [权利要求 7] 根据权利要求5所述的用途，其特征在于：
在所述用于预防和/或治疗由革兰氏阴性杆菌引起的败血症的药物中，根据权利要求1所述的脂多糖结合蛋白多肽与其他抗败血症药物联用。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的用途，其特征在于：
所述抗败血症药物包括头孢类抗生素和喹诺酮类抗生素。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的用途，其特征在于：
所述头孢类抗生素选自头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮中的任意一种。
- [权利要求 10] 根据权利要求8所述的用途，其特征在于：
所述喹诺酮类抗生素选自氧氟沙星、环丙沙星、氟罗沙星中的任意一

种。

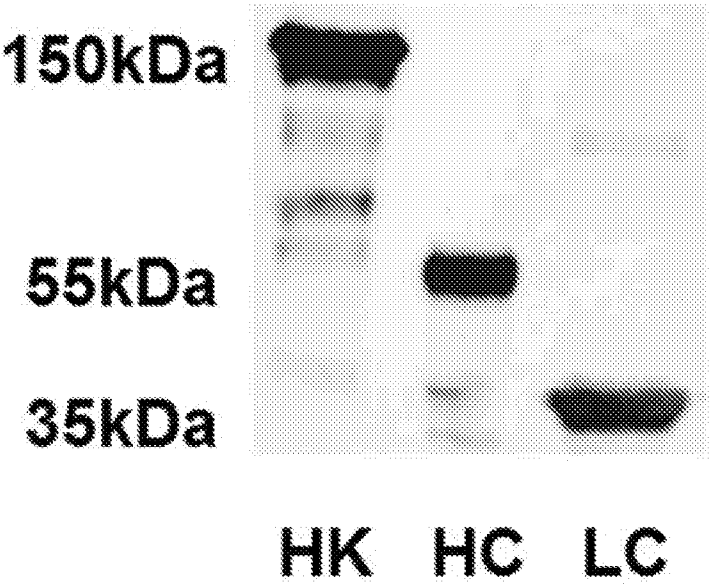


图 1

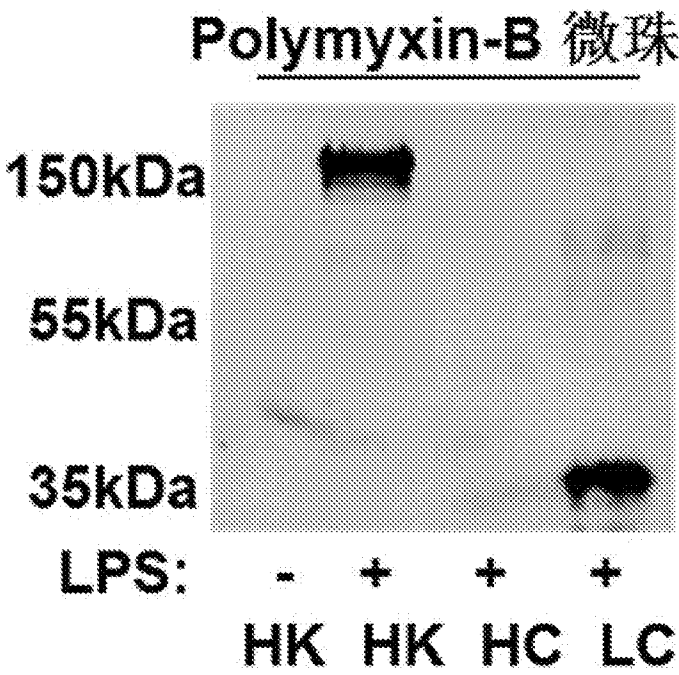


图 2

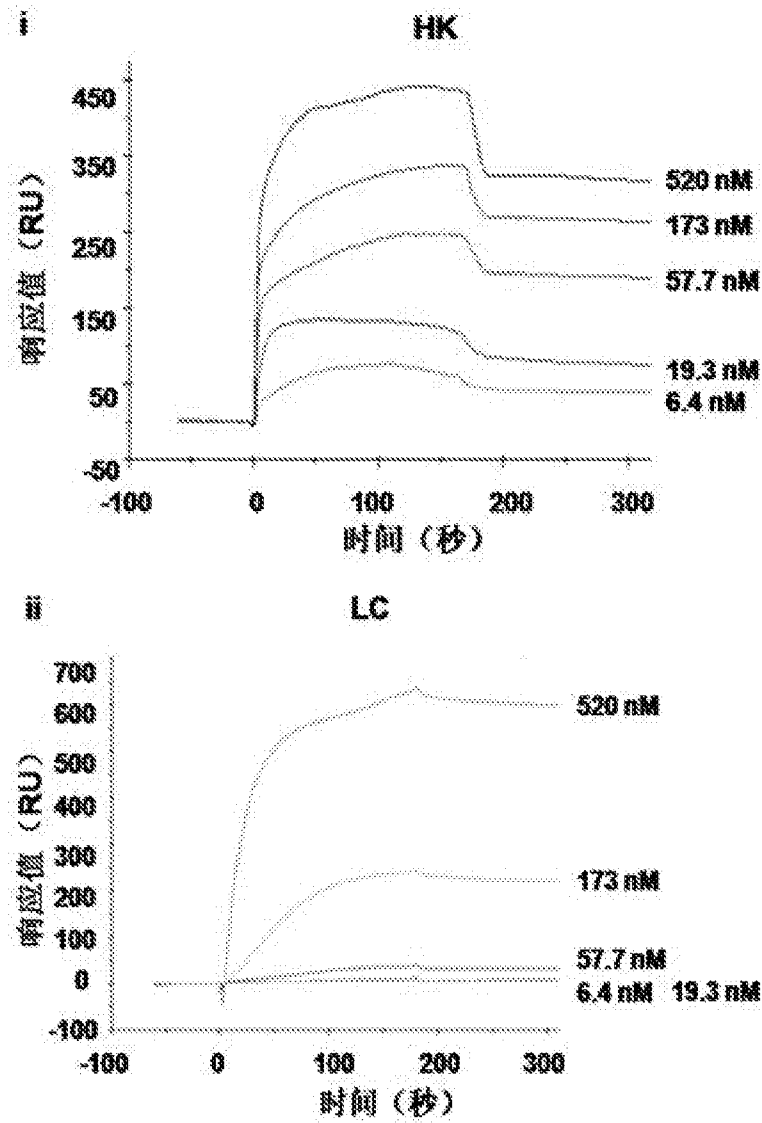


图 3

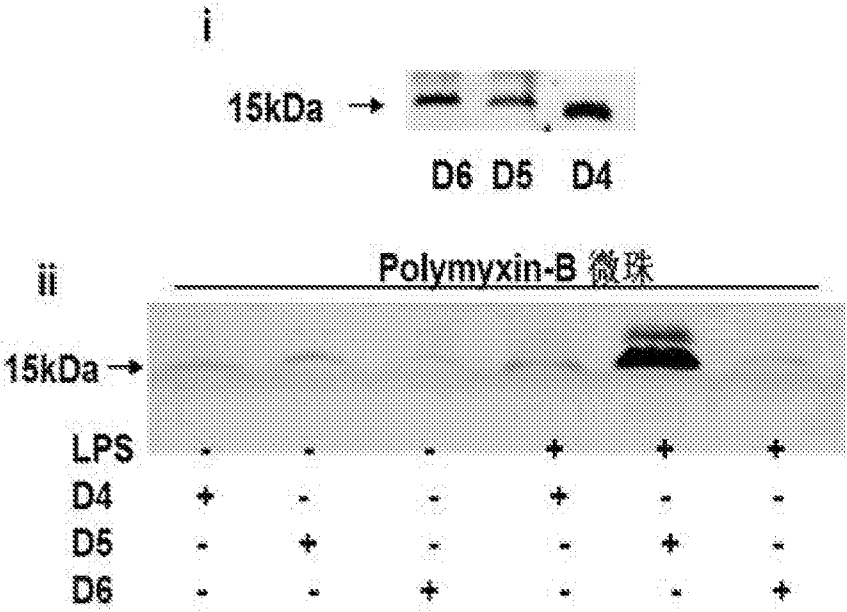


图 4

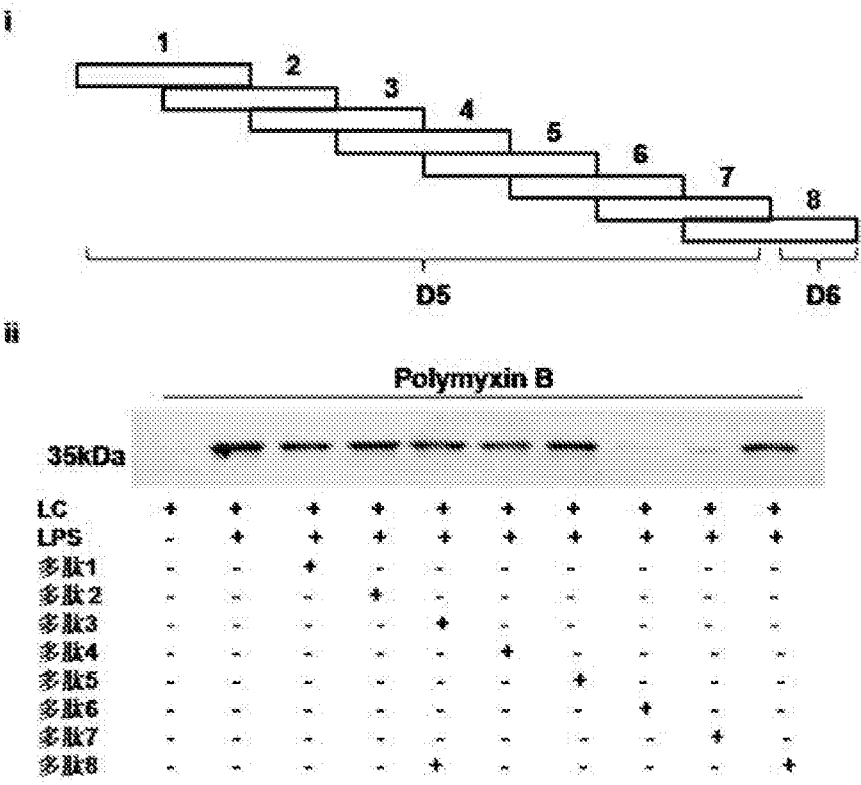


图 5

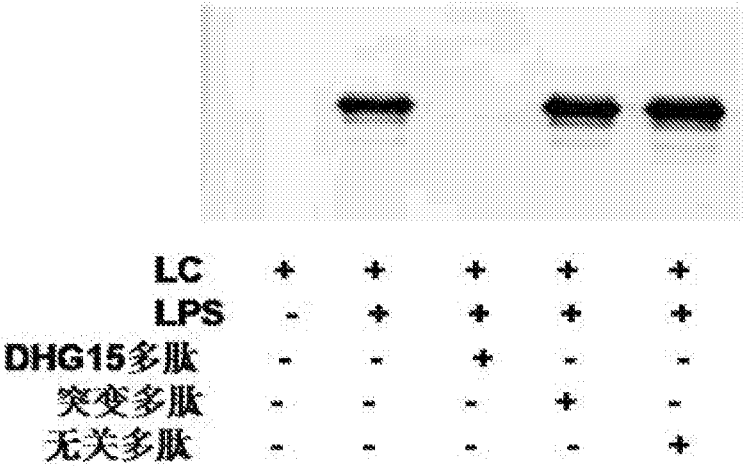


图 6

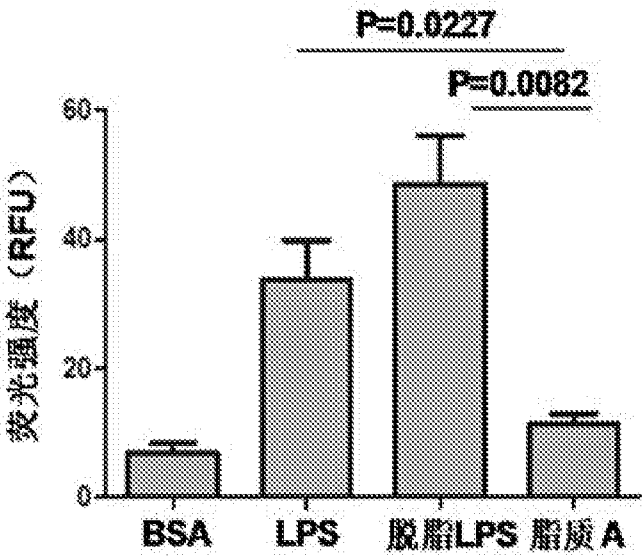


图 7

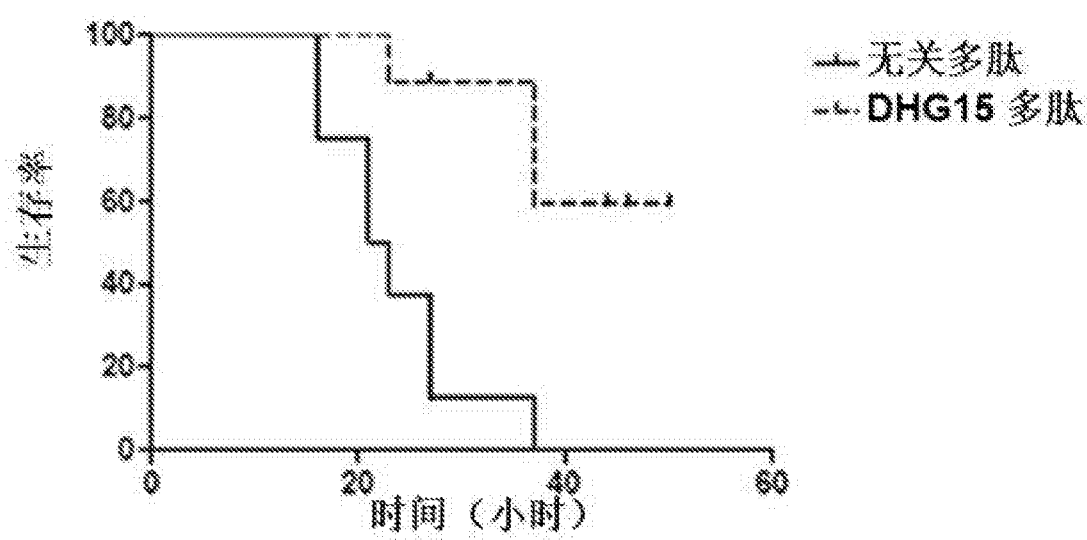


图 8

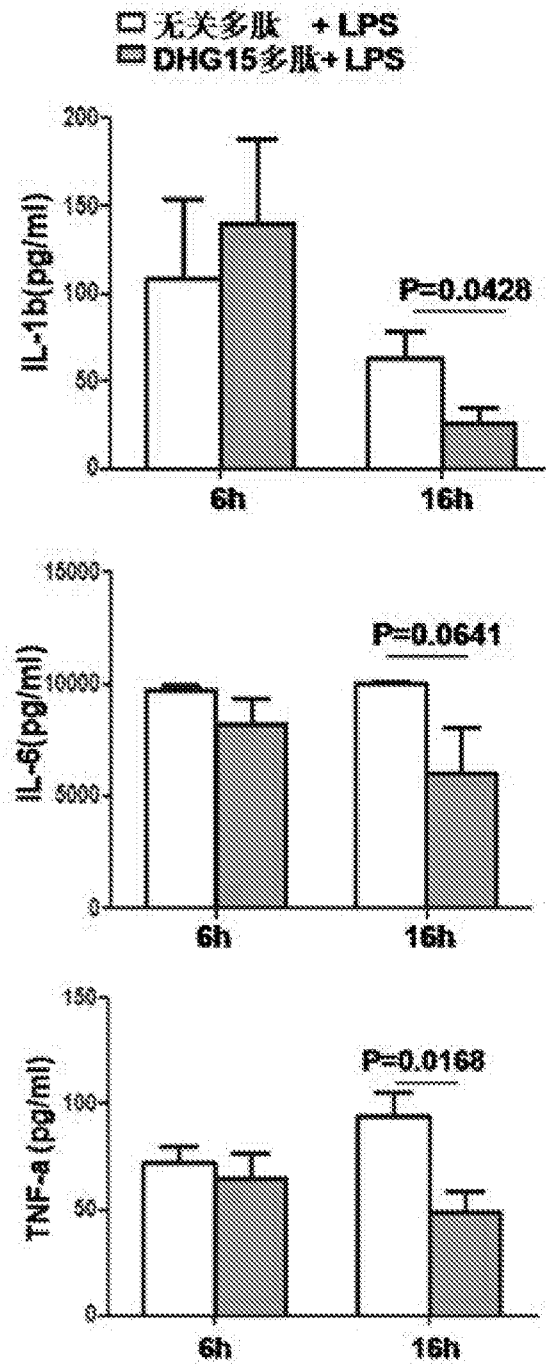


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/076969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08 (2006.01) i; A61K 38/10 (2006.01) i; A61P 31/04 (2006.01) i

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)

C07K; 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)

CNXTX; CNABS; CPRSABS; DWPI; SIPOABS; USTXT; WOTXT; KRTXT; JPTXT; CATXT; EPTXT; ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase); CNKI; PUBMED; BAIDU SCHOLAR: high molecular weight kininogen, kininogen, HMWK, HK, lipopolysaccharide, LPS, sepsis, endotoxemia, antibacterial, 474, 488, D474, H488, Asp474, His488, DHGHKHKHGHGHGKH;

GENBANK, EMBL, STN, GENOMEQUEST, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: sequence search on SEQ ID NO: 1.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010060636 A1 (HANSA MEDICAL AB et al.), 03 June 2010 (03.06.2010), see the whole document	1-10
A	WO 2016004281 A1 (LIU, Chunlei et al.), 07 January 2016 (07.01.2016), see claim 15, and description, paragraph [0027]	1
A	NORDAHL, E.A. et al., "Domain 5 of High Molecular Weight Kininogen is Antibacterial", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volume 280, number 41, 14 October 2005 (14.10.2005), ISSN: 0021-9258, pages 34832-34839, and see the whole document	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 02 June 2017 (02.06.2017)	Date of mailing of the international search report 19 June 2017 (19.06.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LIN, Junkai Telephone No.: (86-10) 62412317

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/076969

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OEHMCKE, S. et al., "Treatment of Invasive Streptococcal Infection with a Peptide Derived from Human High-Molecular-Weight Kininogen", BLOOD, volume 114, number 2, 09 July 2009 (09.07.2009), ISSN: 0006-4971, pages 444-451, and see the whole document	1-10
A	PERKINS, R. et al., "Identification of Lipopolysaccharide Binding Site on High Molecular Weight Kininogen", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, volume 366, number 4, 22 February 2008 (22.02.2008), ISSN: 0006-291X, pages 938-943, and see the whole document	1-10
A	COFFMAN, L.G. et al., "Regulatory Effects of Ferritin on Angiogenesis", PNAS, volume 106, number 2, 13 January 2009 (13.01.2009), ISSN: 0027-8424, pages 570-575, see figure 6A and page 573, right column, paragraph 2	1-4
A	HASAN, AA.K. et al., "Mapping the Cell Binding Site on High Molecular Weight Kininogen Domain 5", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volume 270, number 33, 18 August 1995 (18.08.1995), ISSN: 0021-9258, pages 19256-19261, and see the whole document	1-4
A	XIE, Zhanli et al., "Role of Plasma-High-Molecular-Weight Kininogen in Endotoxemia", CHINESE JOURNAL OF THROMBOSIS AND HEMOSTASIS, volume 19, number 6, 31 December 2013 (31.12.2013), ISSN: 1009-6213, pages 241-244, and see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/076969

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 filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

International application No.
PCT/CN2017/076969

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

A. 主题的分类 C07K 7/08(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i 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) C07K; 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)) CNTXT; CNABS; CPRSABS; DWPI; SIPOABS; USTXT; WOTXT; KRTXT; JPTXT; CATXT; EPTXT; ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase); CNKI; PUBMED; 百度学术: 高分子量激肽原, 脂多糖, 败血症, 内毒素血症, 抗菌, high molecular weight kininogen, kininogen, HMWK, HK, lipopolysaccharide, LPS, sepsis, endotoxemia, antibacterial, 474, 488, D474, H488, Asp474, His488, DHGHKHKHGHGHGKH; GENBANK, EMBL, STN, GENOMEQUEST, 中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NO: 1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	WO 2010060636 A1 (HANSA MEDICAL AB等) 2010年 6月 3日 (2010 - 06 - 03) 参见全文	1-10
A	WO 2016004281 A1 (LIU CHUNLEI等) 2016年 1月 7日 (2016 - 01 - 07) 参见权利要求15, 说明书第[0027]段	1
A	Nordahl, E. A. 等. "Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第280卷, 第41期, 2005年 10月 14日 (2005 - 10 - 14), ISSN: 0021-9258, 第34832-34839页, 参见全文	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		国际检索报告邮寄日期
2017年 6月 2日		2017年 6月 19日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
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		林峻凯 电话号码 (86-10)62412317

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	Oehmcke, S. 等. "Treatment of invasive streptococcal infection with a peptide derived from human high-molecular-weight kininogen" BLOOD, 第114卷, 第2期, 2009年 7月 9日 (2009 - 07 - 09), ISSN: 0006-4971, 第444-451页, 参见全文	1-10
A	Perkins, R. 等. "Identification of lipopolysaccharide binding site on high molecular weight kininogen" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 第366卷, 第4期, 2008年 2月 22日 (2008 - 02 - 22), ISSN: 0006-291X, 第938-943页, 参见全文	1-10
A	Coffman, L. G. 等. "Regulatory effects of ferritin on angiogenesis" PNAS, 第106卷, 第2期, 2009年 1月 13日 (2009 - 01 - 13), ISSN: 0027-8424, 第570-575页, 参见图6A, 第573页右栏第2段	1-4
A	Hasan, AA.K. 等. "Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第270卷, 第33期, 1995年 8月 18日 (1995 - 08 - 18), ISSN: 0021-9258, 第19256-19261页, 参见全文	1-4
A	谢展利等. "血浆高分子量激肽原在内毒素血症中的作用" 血栓与止血学, 第19卷, 第6期, 2013年 12月 31日 (2013 - 12 - 31), ISSN: 1009-6213, 第241-244页, 参见全文	1-10

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐

纸件形式

☒

电子形式

b. (提交时间)

☐

含在申请提交时的国际申请中

☒

以电子形式与国际申请一起提交

☐

为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/076969

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
WO	2010060636	A1	2010年 6月 3日	GB	0821721 D0	2008年 12月 31日
WO	2016004281	A1	2016年 1月 7日	无		