

(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
2021 年 7 月 8 日 (08.07.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/134512 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/435 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 31/10* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/130620
- (22) 国际申请日: 2019 年 12 月 31 日 (31.12.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361000 (CN)。
- (72) 发明人: 王克坚 (WANG, Kejian); 中国福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学翔安校区, Fujian 361102 (CN)。 杨盈 (YANG, Ying); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学海洋与

- 地球学院, Fujian 361000 (CN)。 陈芳奕 (CHEN, Fangyi); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学海洋与地球学院, Fujian 361000 (CN)。 陈慧芸 (CHEN, Huiyun); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学海洋与地球学院, Fujian 361000 (CN)。 彭会 (PENG, Hui); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学海洋与地球学院, Fujian 361000 (CN)。
- (74) 代理人: 厦门市首创君合专利事务所有限有限公司 (SHOUCHUANG JUNHE PATENT AGENT CO., LTD. XIAMEN); 中国福建省厦门市思明区软件园二期望海路 23 号之三 606 室, Fujian 361012 (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,

(54) Title: NEW FUNCTION AND USE OF CRYPTOID CRAB ANTIMICROBIAL PEPTIDE SCYREPROCIN

(54) 发明名称: 一种拟穴青蟹抗菌肽Scyreprocin新功能及其应用

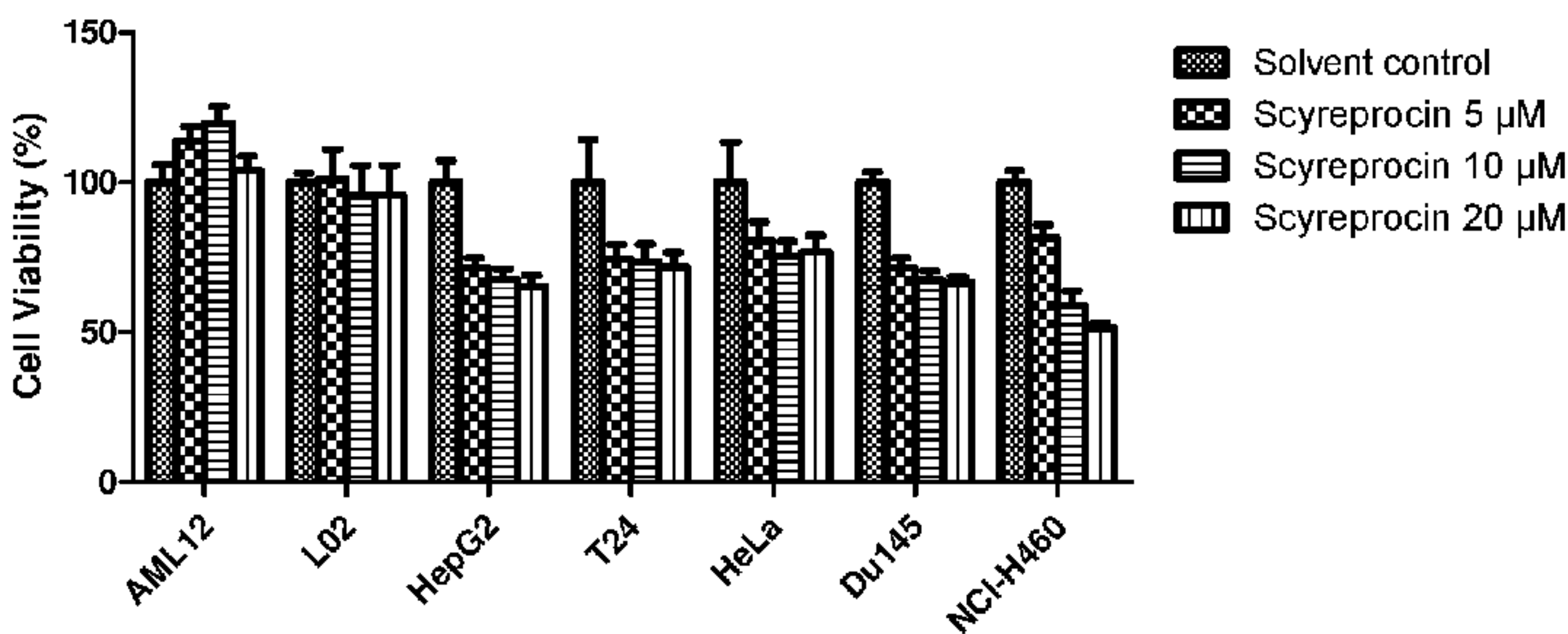


图 1

(57) Abstract: New use of a cryptoid crab antimicrobial peptide Scyreprocin. The antibacterial protein is derived from a cryptoid crab, and is expressed and purified by using a genetic engineered technology. It is first disclosed that the antimicrobial peptide Scyreprocin not only has good antimicrobial activity, but also has a membrane-penetrating function, has an inhibitory and killing activity against various cancer cells, and at the same time has no cytotoxicity against human non-cancer cells. It has demonstrated that the antibacterial polypeptide has a high efficiency and specific anti-cancer activity, shows great application value, and has a good application prospect in research, development and application as an anti-tumor pharmaceutical ingredient. Provided is new use of the cryptoid crab antibacterial peptide Scyreprocin, which broadens the application range of Scyreprocin, and provides more possibilities for the application of Scyreprocin.

(57) 摘要: 一种拟穴青蟹抗菌肽Scyreprocin的新用途。抗菌蛋白来源于拟穴青蟹, 采用基因工程技术表达、纯化获得。首次公开了所述抗菌肽Scyreprocin除具备良好的抗菌活性外, 还具备穿膜功能, 对多种癌细胞具有抑杀活性, 同时对非癌细胞无细胞毒性, 证明该抗菌多肽具备高效特异性抗癌活性, 显示出极大的应用价值, 在作为抗肿瘤药物成分的研发及应用方面有良好的应用前景。提供了拟穴青蟹抗菌肽Scyreprocin的新用途, 拓宽了Scyreprocin的应用范围, 为Scyreprocin的应用提供了更多的可能性。



GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, 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))。

一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 新功能及其应用

技术领域

本发明涉及一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的新用途。

背景技术

癌症是全球发病率及死亡率最高的疾病之一，是全球范围内导致人口死亡的第二大因素。除了最近兴起的免疫疗法外，有效但更加便宜的药物治疗仍是患者作为一线治疗的最佳选择。尽管局部癌症能够通过手术直接移除或通过放射性疗法成功治疗，化疗依然是晚期或转移性癌症的常用治疗方式。传统的化疗药物往往缺乏选择性，通常针对快速分裂的癌细胞发挥作用，往往不可避免地健康的细胞及组织造成伤害，严重的将会导致患者出现一系列排斥反应（如骨髓抑制、肠粘膜炎、脱发等等）。因此，开发不具备传统化疗药物的细胞毒性、不受常见癌细胞耐药机制限制影响的新型抗癌药物具有重要的科学、临床意义。大量研究表明，部分阳离子抗菌肽在具备杀菌能力的同时对正常哺乳动物细胞无明显毒性，此外，其对癌细胞具有广谱细胞毒性，作为小分子肽，阳离子抗菌肽能够较为高效地进入肿瘤组织从而增强其作用活性或与化疗药物联用达到增强化疗药物药效的作用。目前已有许多研究表明天然抗菌肽或其相应的人工合成衍生物具有抗癌活性，一部分具有较强活性的抗菌肽的抗癌机制逐步被揭示，并投入临床实验阶段，为将来抗菌肽作为抗癌活性物质在治疗人类癌症的相关应用提供相关数据。拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 是拟穴青蟹体内存在的天然活性肽，具有良好的抗菌活性。目前，尚无 Scyreprocin 对癌细胞的作用相关报道。

本发明通过以拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对多株癌细胞进行体外抗癌活性试验，探讨 Scyreprocin 抑菌癌活性的强弱，为确定拟穴青蟹体抗菌肽 Scyreprocin

是否具有抗癌活性提供依据，同时为研发天然肽类抗癌药物奠定基础。

发明内容

本发明目的在于提供一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的新用途。

本发明的另一目的在于提供上述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 新用途的应用。

本发明的技术方案之一：

一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的新用途。所述多肽氨基酸序列具备抗癌细胞生长活性及自主穿膜活性。采用现有的基因工程重组蛋白表达技术即可获得纯度达 85%以上的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

本发明的技术方案之二：

一种抗癌药物，其有效成分包括上述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

本发明的技术方案之三：

一种抗癌组合物，其有效成分包括上述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

本发明的技术方案之四：

一种抗临床肿瘤治疗方案，其有效成分包括上述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

本发明的技术方案之五：

上述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 在制备抗癌药物中的应用。

本发明的技术方案之六：

上述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 在制备抗癌组合物中的应用。

本发明的技术方案之七：

上述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 在临床肿瘤治疗方案中的应用。

本发明所述的抗菌蛋白来源于拟穴青蟹，其氨基酸序列为：

MKEDSNILDKTAKMTKQNKALLFTAGGAAAFMAGYYYYHCNYRNPAPKKSG

STTSQDKTDAQAVQSIPSPSGNKGKESKDPKVK (SEQ ID NO 01)

Scyreprocin 的分子式为 $C_{396}H_{636}N_{106}O_{127}S_4$ ，分子量为 9107.258 道尔顿。经 SignalP4.1 软件预测，Scyreprocin 无信号肽序列，全长 84 个氨基酸中包含 15 个带正电荷的氨基酸残基和 7 个带负电荷的氨基酸残基，根据氨基酸残基电荷预测该抗菌肽等电点为 9.61。该抗菌肽的亲水性平均系数为 -0.968，具有较强的水溶性，是一种带有正电荷的阳离子抗菌肽。

采用基因工程表达技术方法即可获得纯度达 85% 以上的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

本发明的有益效果是：

- 1、 本发明所述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的新用途包括：对多株人类癌细胞具有显著的生长抑制活性。
- 2、 本发明所述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的新用途包括：所述多肽具有自主穿膜能力，能够穿透细胞膜进入癌细胞与非癌细胞内。
- 3、 本发明所述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对非癌细胞无细胞毒性，具有特异抗癌细胞活性。

本发明所述拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对人血红细胞无溶血活性，具有良好的生物友好性，可安全用于静脉注射给药方案中。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 中拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对不同细胞增殖活性的影响。

图 2 为本发明实施例 2 中拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 作用后引起不同细胞凋亡效应的检测。在图 2 中，细胞核呈蓝色（DAPI 染色），细胞凋亡阳性信号呈绿色（TUNEL 法检测）。

图 3 为本发明实施例 3 中拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 作用对细胞成克隆能力的影响。

图 4 为本发明实施例 4 中拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 穿膜自主能力的检测。在图 4 中，细胞核呈蓝色（DAPI 染色），Scyreprocin 蛋白阳性信号呈红色（细胞免疫荧光法检测）。

图 5 为本发明实施例 5 中拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对人血红细胞溶血率的检测。溶血率小于 5% 为可接受的安全溶血率范围。

具体实施方式

以下通过具体实施方式对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。

下述实施例中所用拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 均为基因工程技术表达纯化获得的产物。

下述实施例涉及的细胞系有：人宫颈癌细胞（HeLa）、人移行性膀胱癌细胞（T24）、小鼠肝细胞（AML12）、人肝细胞（L02）、人非小细胞肺癌细胞（NCI-H460）、人膀胱癌细胞（Du145）、人肝癌细胞（HepG2）、人肺成纤维细胞（HFL1）等，均购自中国科学院上海细胞库。

实施例 1 拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 抑制癌细胞生长浓度的测定

本部分选取人宫颈癌细胞（HeLa）、人移行性膀胱癌细胞（T24）、小鼠肝细胞（AML12）、人肝细胞（L02）、人非小细胞肺癌细胞（NCI-H460）、人膀胱癌细

胞(Du145)、人肝癌细胞(HepG2)作为受试细胞,进行拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 抑制细胞增殖活性的测定。

(a) 将细胞在对应细胞培养液中培养至细胞接合度 80-90%后,用含 EDTA 的胰酶消化并用相应细胞培养液重悬,以相应细胞培养液调整细胞密度,在 96 孔细胞培养板中接种细胞,置于 37°C 细胞培养箱在 5% CO₂ 条件下过夜培养。

(b) 待每孔细胞生长到接合度约 70-80%时,吸去细胞培养液,用相应细胞培养液倍比稀释 Scyreprocin 蛋白至 5、10、20 μM,同时设置溶剂对照组为阴性对照,每组设置 3 个平行样。

(c) 蛋白与细胞孵育 24 小时后,以 CellTiter96® AQueous 试剂盒检测细胞增殖水平。

结果表明,拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 可显著抑制癌细胞系细胞的增殖活力,而对非癌细胞系细胞的增殖无显著影响。因此,拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 具有良好的特异性癌细胞生长抑制活性。

实施例 2 拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 诱导癌细胞凋亡的检测

本部分选取人非小细胞肺癌细胞(NCI-H460)、人移行性膀胱癌细胞(T24)、人肺成纤维细胞(HFL1)作为受试细胞,进行拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 诱导癌细胞凋亡的检测。

(a) 将细胞在对应细胞培养液中培养至细胞接合度 80-90%后,用含 EDTA 的胰酶消化并用相应细胞培养液重悬,以相应细胞培养液调整细胞密度,在 96 孔细胞培养板中接种细胞,置于 37°C 细胞培养箱在 5%CO₂ 条件下过夜培养。

(b) 待每孔细胞生长到接合度约 70-80%时,吸去细胞培养液,用相应细胞培

养液倍比稀释 Scyreprocin 蛋白至 1、5、10、20 μM ，如下设置阳性对照组、阴性对照组、待测实验组，每组设置 2 个平行样：

阳性对照组：加 100 μL 相应细胞培养液，检测前使用 DNase 处理样品。

阴性对照组：加 100 μL 相应细胞培养液，检测前不进行任何处理。

待测实验组：加 100 μL 相应细胞培养液稀释的待测蛋白样品。

(c) 将 96 孔细胞培养板置于 37°C 、5% CO_2 条件下继续培养 24 h 后，根据 Roche 试剂盒说明书用 TUNEL 法检测原位细胞凋亡情况。

结果表明：在 1 μM 浓度下，拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 可引起癌细胞 NCI-H460、T24 凋亡，而对非癌细胞系细胞 HFL1 无影响。

实施例 3 拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 抑制癌细胞克隆生长能力的测定

本部分选取人宫颈癌细胞 (HeLa)、人移行性膀胱癌细胞 (T24)、小鼠肝细胞 (AML12)、人肝细胞 (L02)、人非小细胞肺癌细胞 (NCI-H460)、人膀胱癌细胞 (Du145)、人肝癌细胞 (HepG2) 作为受试细胞，评价拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对不同细胞成克隆能力的影响。

(a) 将细胞在对应细胞培养液中培养至细胞接合度 80-90% 后，用含 EDTA 的胰酶消化并用相应细胞培养液重悬，以相应细胞培养液调整细胞密度，在 6 孔细胞培养板中每孔接种 500 个细胞，置于 37°C 细胞培养箱在 5% CO_2 条件下过夜培养至细胞贴壁生长；

(b) 吸去细胞培养液，如下设置阴性对照组及待测实验组，每组设置 3 个平行：

阴性对照组：即溶剂对照组；

待测实验组：以相应细胞培养液稀释的待测蛋白样品（含 Scyreprocin 终浓度为 5 μ M）；

（c）蛋白与细胞孵育 7 天后，吸去孔中培养液，以 HBSS 洗涤细胞 3 次，每次 5min 以充分去除残留培养液及漂浮的细胞，加入 4% (w/v)多聚甲醛，于室温下固定细胞 1 小时，以 HBSS 洗涤细胞 3 次，每次 3min 以去除残留的固定液；

（d）以结晶紫染液于室温下染色 10-30 分钟后，以 HBSS 充分洗涤去除多余的结晶紫，空气中晾干样品，以光学显微镜下观察，并计数总细胞数大于 60 个细胞的克隆，统计每个样品的合格克隆数进行分析。

结果表明，Scyreprocin 处理后，癌细胞系细胞的成克隆能力显著下降，而非癌细胞系细胞的成克隆能力无显著变化。

实施例 4 拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 穿膜能力的检测

本部分选取人人子宫颈癌细胞（HeLa）、人移行性膀胱癌细胞（T24）、小鼠肝细胞（AML12）、人肝细胞（L02）、人非小细胞肺癌细胞（NCI-H460）、人膀胱癌细胞（Du145）、人肝癌细胞（HepG2）作为受试细胞，进行拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的穿膜能力检测。

（a）将细胞在对应细胞培养液中培养至细胞接合度 80-90%后，用含 EDTA 的胰酶消化并用相应细胞培养液重悬，以相应细胞培养液调整细胞密度，在 96 孔细胞培养板中接种细胞，置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱在 5% CO₂ 条件下过夜培养；

（b）待每孔细胞生长到接合度约 70-80%时，吸去细胞培养液，加入含终浓度为 4 μ M Scyreprocin 的细胞培养液，同时设置溶剂对照为阴性对照组；

（c）蛋白与细胞孵育 24 小时后，吸去孔中培养液，以 HBSS 洗涤细胞 3 次，

每次 5min 以充分去除含有 Scyreprocin 的原培养液，加入 4% (w/v)多聚甲醛，于室温下固定细胞 1 小时，再以 HBSS 洗涤细胞 3 次，每次 3min 以去除残留的固定液；

(d) 以含 0.1% Triton X-100 的 3%柠檬酸溶液于冰上透化细胞样品 3min，再以 HBSS 洗涤样品 3 次，每次 5min 以去除透化液；

(e) 以 5% (w/v)BSA 于室温封闭样品 2 小时后，以 Scyreprocin 特异性抗体及相应的荧光二抗标记胞内可能存在的 Scyreprocin 蛋白，上机前以 DAPI 染液对细胞核进行染色，利用荧光共聚焦显微镜观察。

结果表明，拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 可在孵育后无差别穿过癌细胞系及非癌细胞系细胞的细胞膜，进入胞质内部。因此，拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 具备穿膜特性。

实施例 5 拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对人类血红细胞溶血率的测定

本实施例采用人血红细胞作为受试对象，评价拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 对其的溶血比率。

(a) 静脉取血 5 mL 至含由抗凝的采血管中，离心并用生理盐水多次洗涤，除去表面白细胞，至上清液不成红色，弃上清后取 1 mL 再用生理盐水定容至 50 mL，制成 4%的红细胞溶液。

(b) 将拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 用生理盐水倍比稀释至 5、10、20 μ M。

(c) 在 96 孔细胞培养板中，如下设置阳性对照组、阴性对照组及待测实验组，每组设置三个平行孔：

阳性对照组：100 μ L MilliQ 水加 100 μ L 4%红细胞溶液；

阴性对照组：100 μ L 生理盐水加 100 μ L 4% 红细胞溶液；

待测实验组：100 μ L 待测蛋白样品加 100 μ L 4% 红细胞溶液。

(d) 96 孔细胞培养板于室温条件下静置 3 h ,之后用 11000 rpm 离心 3 min。
小心吸出 100 μ L 于新的 96 孔细胞培养板上 ,用酶标仪在 570 nm 波长检测吸光值。

溶血率 (%) = (待测样品吸收-阴性对照吸收) / (阳性对照吸收-阴性对照吸收) $\times$ 100%。溶血率超过 5 % 视为溶血。

结果表明，拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 在测试浓度下引起的人红细胞溶血率低于 5%，即不会引起溶血，具有良好的生物安全性。

工业实用性

本发明提供了一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的新用途。本发明所述的抗菌蛋白来源于拟穴青蟹，采用基因工程技术表达、纯化获得。本发明首次公开了所述抗菌肽 Scyreprocin 除具备良好的抗菌活性外，还具备穿膜功能，对多种癌细胞具有抑杀活性，同时对人非癌细胞无细胞毒性，证明该抗菌多肽具备高效特异性抗癌活性，显示出极大的应用价值，在作为抗肿瘤药物成分的研发及应用方面有良好的应用前景,具有良好的工业实用性。

权 利 要 求

1、一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin，其氨基酸序列为：

MKEDSNILDKTAKMTKQNKALLFTAGGAAAFMAGYYYYHCNYRNPAPKKSGSTT

SQDKTDAQAVQSIPSPSGNKGKESKDPKVK 其特征在于：所述多肽的氨基酸序列包括具有抗癌功能的氨基酸序列，所述多肽用于抑制癌细胞生长。

2、根据权利要求 1 所述一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin，其特征在于：所述多肽的氨基酸序列是人工合成的氨基酸序列或是以核苷酸为模板合成的氨基酸序列。

3、一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin，其氨基酸序列为：

MKEDSNILDKTAKMTKQNKALLFTAGGAAAFMAGYYYYHCNYRNPAPKKSGSTT

SQDKTDAQAVQSIPSPSGNKGKESKDPKVK，其特征在于：所述多肽的氨基酸序列包括具有穿膜功能的氨基酸序列，或在此基础上进行修饰所衍生的具有穿膜功能的氨基酸序列。

4、根据权利要求 3 所述的一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin，其特征在于：所述多肽的具备穿膜功能的氨基酸序列是人工合成的氨基酸序列或是以核苷酸为模板合成的氨基酸序列。

5、根据权利要求 3 及 4 所述的一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin，其特征在于：所述多肽的具备穿膜功能的氨基酸序列是具有自主穿膜功能的氨基酸序列。

6、一种抗肿瘤药物，其特征在于：其有效成分包括权利要求 1 至 5 中任一项权利要求所述的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

7、一种抗肿瘤组合物，其特征在于：其有效成分包括权利要求 1 至 5 中任一项权利要求所述的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

8、一种临床肿瘤治疗方案，其特征在于：其有效成分包括权利要求 1 至 5 中任一

权利要求所述的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin。

9、如权利要求 1 至 5 中任一项权利要求所述的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 在制备抗肿瘤组合物中的应用。

10、如权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 在制备抗肿瘤药物中的应用。

11、如权利要求 1 至 5 中任一项权利要求所述的拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 在临床肿瘤治疗方案中的应用。

12、如权利要求 1 至 5 中所述的一种拟穴青蟹抗菌肽 Scyreprocin 的用途，其特征在于，所述抑制肿瘤为非小细胞肺癌、子宫颈癌、乳腺癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌。

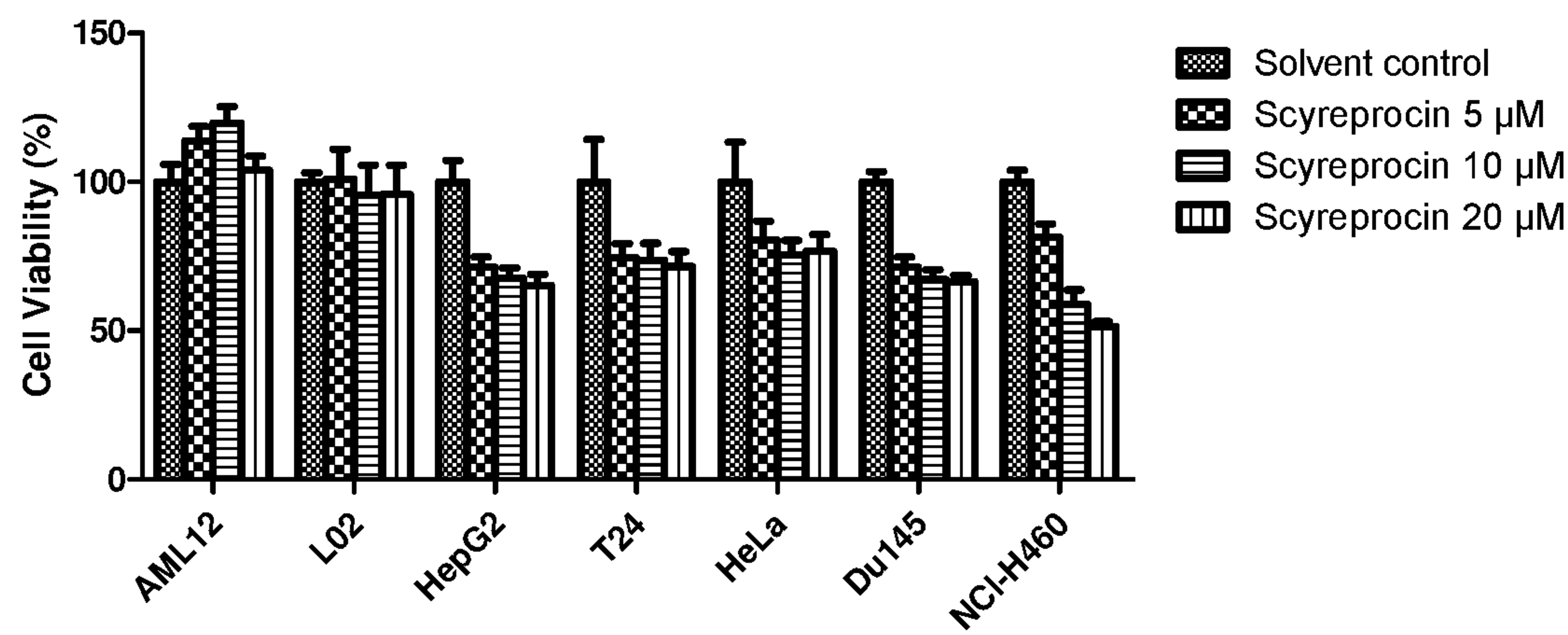


图 1

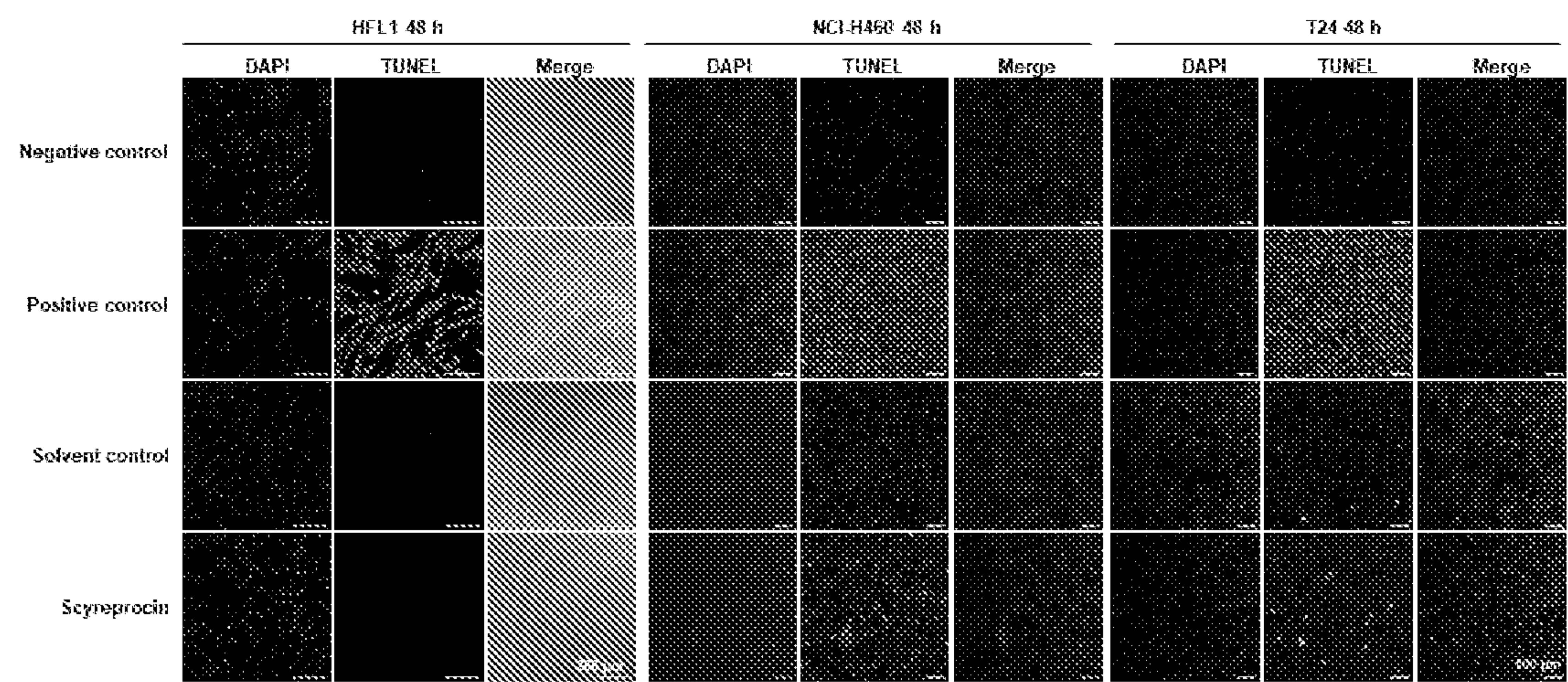


图 2

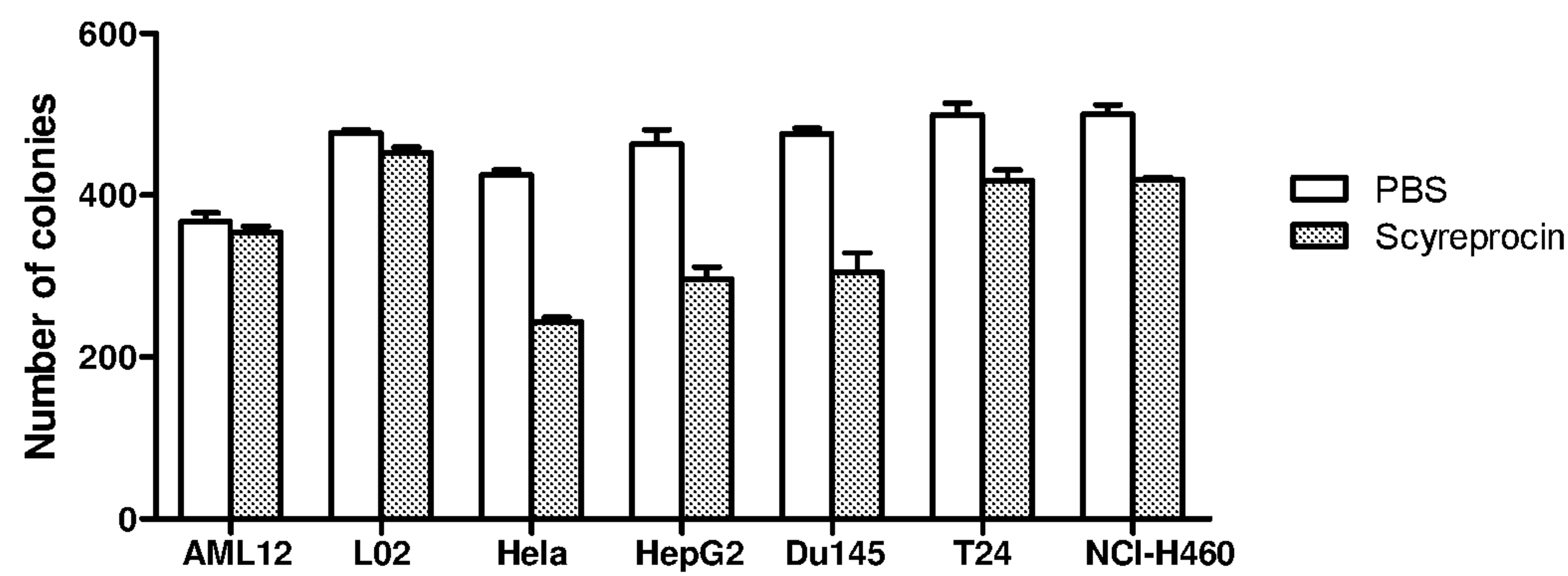


图 3

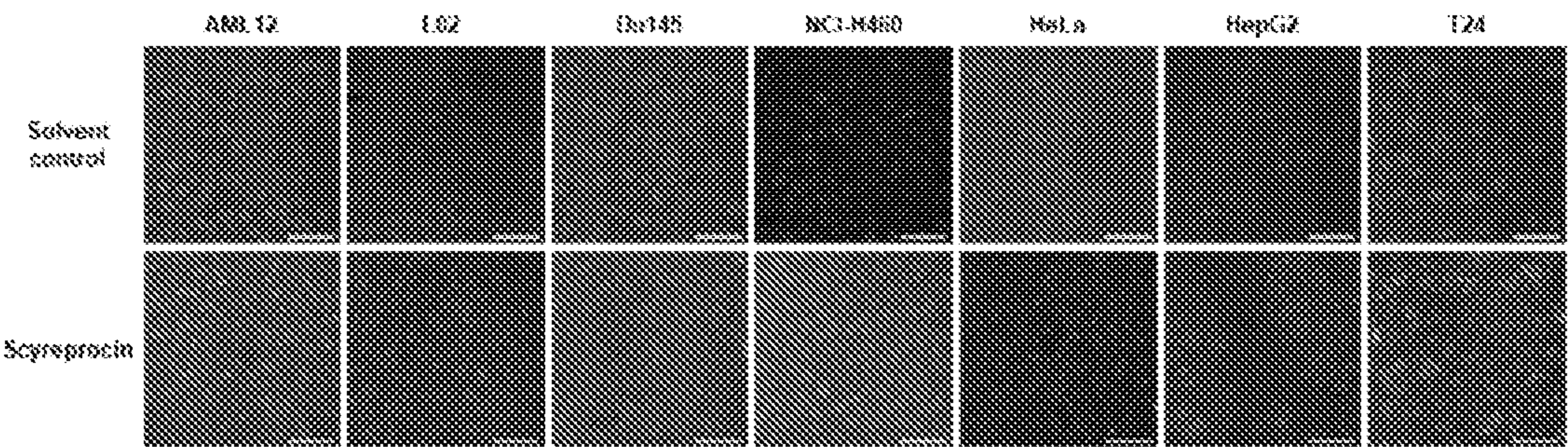


图 4

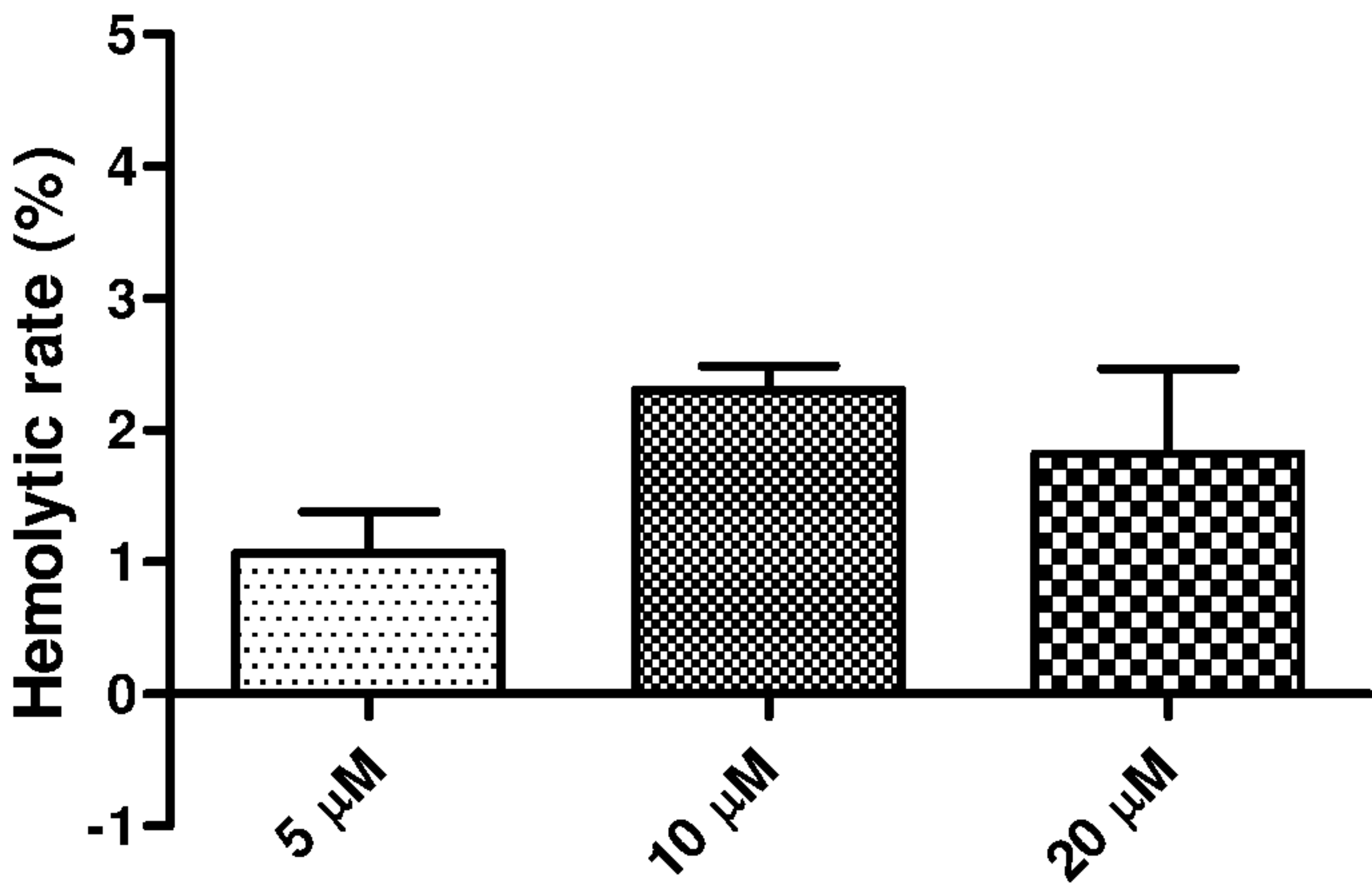


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2019/130620										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 14/435(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 31/10(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 C12N A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, USTXT, WOTXT, NCBI, baidu, CNKI, 万方, WANFANG, 读秀, DUXIU, patentics, incopat, 拟穴青蟹, 抗菌肽, 青蟹抗菌肽, 抗菌肽的多肽序列, Scyrepocin, scy-sphistin, MH488960.												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
E	CN 111205359 A (XIAMEN UNIVERSITY) 29 May 2020 (2020-05-29) claims 1-6	1-7										
A	王晓飞 (WANG, Xiaofei). "拟穴青蟹抗菌肽Crustin的表达特性及其抗菌机制的研究. (Investigation into the Expression and Antimicrobial Mechanisms of Crustins Fromscylla Paramamosain)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 农业科技辑, 集美农业大学硕士学位论文, 2019年第08期, D052-45. (D052-45, Issue S8, 2019, Master's Thesis of Jimei University, Agricultural Science and Technology Series, China Master's Theses Full-text Database.), 15 August 2019 (2019-08-15), the abstract	1-12										
A	JEONG, J.-H. et al. "Hypothetical Protein E2C01_023661, [Portunus Trituberculatus], GenBank: MPC30398.1, 62aa Linear." NCBI GenBank., 12 September 2019 (2019-09-12), p. 1	1-12										
A	HE, Y.B. et al. "Chlorella Sp. Transgenic with Scy-Hepc Enhancing the Survival of Sparus Macrocephalus and Hybrid Grouper Challenged with Aeromonas Hydrophila." Fish and Shellfish Immunology., Vol. 73, 29 November 2017 (2017-11-29), pp. 22-29	1-12										
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table><tr><td>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>“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</td></tr><tr><td>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>“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</td></tr><tr><td>“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)</td><td>“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</td></tr><tr><td>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td>“&” document member of the same patent family</td></tr><tr><td>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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	“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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	“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)	“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	“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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											
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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											
“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)	“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											
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family											
“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 01 July 2020		Date of mailing of the international search report 13 October 2020										
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/130620

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIAMEN UNIVERSITY. "厦门大学海洋动物抗菌肽研究取得新突破. (Non-official translation: Xiamen University Has Made a New Breakthrough in the Study of Antimicrobial Peptides from Marine Animals)" 厦门大学网页, https://std.xmu.edu.cn/_t353/2017/0317/c4739a269190/page.htm . (XIAMEN UNIVERSITY Official Website, https://std.xmu.edu.cn/_t353/2017/0317/c4739a269190/page.htm), 17 March 2017 (2017-03-17), p. 1	1-12
A	彭会 (PENG, Hui). "海洋动物抗菌肽的毕赤酵母表达技术及抗菌肽饲料添加剂的研发 (The Optimized Expression Technology of Marine Animal-Sourced Antimicrobial Peptides in Pichia Pastoris and the Development of Antimicrobial Peptide as Feedstuff Additive)" 厦门大学博士后研究报告. (Non-official translation: Postdoctoral Research Report of Xiamen University), 31 July 2015 (2015-07-31), the abstract	1-12
A	QIAO, K. et al. "A New Antimicrobial Peptide SCY2 Identified in Scylla Paramamosain Exerting a Potential Role of Reproductive Immunity." <i>Fish & Shellfish Immunology</i> , Vol. 51, 31 December 2016 (2016-12-31), pp. 251-262	1-12
A	SHAN, Z. G. et al. "In Vivo Activity and the Transcriptional Regulatory Mechanism of the Antimicrobial Peptide SpHyastatin in Scylla Paramamosain." <i>Fish & Shellfish Immunology</i> , Vol. 59, 15 October 2016 (2016-10-15), pp. 155-165	1-12
A	SHAN, Z. G. et al. "The New Antimicrobial Peptide SpHyastatin from the Mud Crab Scylla Paramamosain with Multiple Antimicrobial Mechanisms and High Effect on Bacterial Infection" <i>Frontiers in Microbiology</i> , Vol. 7, 21 July 2016 (2016-07-21), Dissertation No. 1140, pp. 1-14	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/130620

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:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
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 forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/130620

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 111205359 A	29 May 2020	None	

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2019/130620
A. 主题的分类 C07K 14/435(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 31/10(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 C12N A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, VEN, USTXT, WOTXT, NCBI, baidu, CNKI, 万方, 读秀, patentics, incopat, 拟穴青蟹, 抗菌肽, 青蟹抗菌肽, 抗菌肽的多肽序列, Scyrepocin, scy-sphistin, MH488960.		
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
E	CN 111205359 A (厦门大学) 2020年 5月 29日 (2020 - 05 - 29) 权利要求1-6	1-7
A	王晓飞. "拟穴青蟹抗菌肽Crustin的表达特性及其抗菌机制的研究." 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 农业科技辑, 集美大学硕士学位论文, 2019年第08期, D052-45., 2019年 8月 15日 (2019 - 08 - 15), 摘要	1-12
A	JEONG, J.-H. 等. "hypothetical protein E2C01_023661, [Portunus trituberculatus], GenBank: MPC30398.1, 62aa linear." NCBI genbank., 2019年 9月 12日 (2019 - 09 - 12), 第1页	1-12
A	HE, Y.B. 等. "Chlorella sp. transgenic with Scy-hepc enhancing the survival of Sparus macrocephalus and hybrid grouper challenged with Aeromonas hydrophila." Fish and Shellfish Immunology., 第73卷, 2017年 11月 29日 (2017 - 11 - 29), 第22-29页	1-12
☒ 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 2020年 7月 1日		国际检索报告邮寄日期 2020年 10月 13日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(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		受权官员 朱宁 电话号码 86-(10)-53961956

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	厦门大学. “厦门大学海洋动物抗菌肽研究取得新突破.” 厦门大学网页, https://std.xmu.edu.cn/_t353/2017/0317/c4739a269190/page.htm , 2017年 3月 17日 (2017 - 03 - 17), 第1页	1-12
A	彭会. “海洋动物抗菌肽的毕赤酵母表达技术及抗菌肽饲料添加剂的研发.” 厦门大学博士后研究工作报告., 2015年 7月 31日 (2015 - 07 - 31), 摘要	1-12
A	QIAO, K. 等. “A new antimicrobial peptide SCY2 identified in Scylla Paramamosain exerting a potential role of reproductive immunity.” Fish & Shellfish Immunology., 第51卷, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), 第251-262页	1-12
A	SHAN, Z.G. 等. “In vivo activity and the transcriptional regulatory mechanism of the antimicrobial peptide SpHyastatin in Scylla paramamosain.” Fish & Shellfish Immunology., 第59卷, 2016年 10月 15日 (2016 - 10 - 15), 第155-165页	1-12
A	SHAN, Z.G. 等. “The New Antimicrobial Peptide SpHyastatin from the Mud Crab Scylla paramamosain with Multiple Antimicrobial Mechanisms and High Effect on Bacteria Infection.” Frontiers in Microbiology., 第7卷, 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21), 第1140篇论文, 第1-14页	1-12

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表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
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作为申请一部分的序列表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/CN2019/130620	
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)
CN111205359A2020年 5月 29日无			