

(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



(10) 国际公布号

WO 2020/259673 A1

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 30 日 (30.12.2020)

(51) 国际专利分类号:

C40B 30/04 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

亚俊(SHUAL, Yajun); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/098424

(22) 国际申请日: 2020 年 6 月 28 日 (28.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910572278.9 2019年6月28日 (28.06.2019) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 杨明英(YANG, Mingying); 中国浙江省
杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058
(CN)。 雷芳(LEI, Fang); 中国浙江省杭州市西
湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 帅

(74) 代理人: 杭州中成专利事务所有
限公司(HANGZHOU ZHONGCHENG PATENT
AGENCY CO., LTD.); 中国浙江省杭州市西湖
区天目山路46号宁波大厦1301室(联系人:
朱莹莹), Zhejiang 310007 (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,
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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: METHOD FOR EFFICIENTLY SCREENING FIBRINOGEN BY USING PHAGE ANTIBODY LIBRARY

(54) 发明名称: 一种利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法

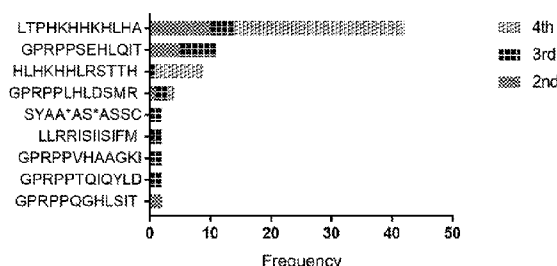


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a method for efficiently screening fibrinogen by using a phage antibody library, comprising the steps of: coating a protein, sealing a flat plate, removing a background from a phage library, combining phage and the like. Compared with other phage, the phage screened by the present invention may be specifically combined with human fibrinogen, has a strong binding force and is easy to process. The phage may be added into various coagulation materials, the enrichment of fibrinogen is promoted by means of targeted combination of the human fibrinogen, and the blood coagulation effect is enhanced. The method has the characteristics of simple and easy to use reagents, a high success rate and the like.

(57) 摘要: 本发明公开了一种利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法, 包括包被蛋白、封闭平板、噬菌体库去背景、噬菌体结合等步骤, 本发明筛选出的噬菌体对比其余噬菌体, 能够特异性结合人纤维蛋白原, 且结合力强, 易于加工, 可以加入各种凝血材料中, 通过靶向结合人纤维蛋白原, 促使纤维蛋白原的富集, 增强凝血效果, 具有所用试剂简单易得, 成功率高等特点。

(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))。

一种利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法

技术领域

本发明涉及凝血材料领域，具体地说，是一种利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法。

背景技术

皮肤创伤是生活中最常见的损伤之一，小到日常擦破皮，大到手术甚至战争中受到的大面积创伤导致出血，都需要及时止血，因而凝血功能对于人来说是非常重要的。凝血的过程本质上就是血浆中的可溶性纤维蛋白原变成不可溶的纤维蛋白的过程。当外界材料与血液接触之后，血浆中的蛋白会吸附在材料表面，凝血酶原通过级联反应被激活生成凝血酶，进一步催化纤维蛋白原转化为纤维蛋白，纤维蛋白自发形成纤维网，促进伤口凝血。纤维蛋白原即凝血因子 I，是血液中含有最高的凝血因子，也是一种急性反应蛋白。在凝血过程中，纤维蛋白原的富集能够有利于伤口处纤维蛋白网络的形成，而能够靶向结合人纤维蛋白原的噬菌体可以通过特异性结合人纤维蛋白原，实现血液中纤维蛋白原的富集。

噬菌体展示技术是通过将肽库与靶蛋白孵育一段时间，洗去未结合的噬菌体，将结合能力强的噬菌体洗脱并扩增后，再进行下一轮的洗脱，得到与靶蛋白结合能力最强的噬菌体的过程。通过该技术筛选得到的噬菌体特异性好，结合能力强，适合用于筛选靶向人纤维蛋白原的噬菌体的筛选。

发明内容

本发明针对靶向人纤维蛋白原噬菌体领域的空缺，发明利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，得到能特异性结合人纤维蛋白原的噬菌体。本发明涉及的噬菌体主要用于促凝血领域，能够特异性结合人纤维蛋白原，促进凝血。

本发明公开了一种利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，所采用的步骤如下：

1) 包被蛋白: 将人纤维蛋白原用包被液稀释, 取该人纤维蛋白原溶液于细胞培养板中, 将板置于湿盒中, 在 2-8℃ 温度下孵育过夜, 该温度范围保证蛋白活力;

2) 封闭平板: 将步骤 1) 中的板取出, 加入封闭液, 在 2-8℃ 温度下孵育;

3) 噬菌体库去背景: 将噬菌体十二肽库加入新的细胞培养板中, 并在摇床平缓摇动;

4) 噬菌体结合: 吸走步骤 2) 中培养板的封闭液, 反复洗涤 3-15 次, 洗涤次数太少, 洗涤不够完全, 次数过多, 会洗掉结合力强的噬菌体, 导致后续步骤的噬菌体过少。然后将步骤 3) 中培养板的液体加入该洗涤后的培养板, 在摇床平缓摇动 1-4 h, 时间太短噬菌体结合不够牢固, 时间太长非特异性结合会增多;

5) 洗涤: 将步骤 4) 中培养板的液体吸走, 反复洗涤 3-15 次, 得到步骤 5) 的培养板;

6) 洗脱: 在步骤 5) 的培养板中加入洗脱液, 室温静置 10-30 min, 时间太短洗脱不完全, 时间太长噬菌体活力明显下降。然后将液体转移至新的离心管中, 加入中和液, 得到噬菌体;

7) 噬菌体扩增及计数: 将步骤 6) 所得噬菌体进行扩增并计数, 稀释至 10^3 - 10^{13} pfu/mL, 浓度太低, 筛选得到噬菌体太少无法进行, 浓度过高, 噬菌体富集度不够, 无法得到较好的序列, 得到步骤 7) 的噬菌体;

8) 再重复步骤 1) 至步骤 7) 二-五次, 次数过少, 噬菌体富集度不够, 筛选效果不佳, 次数过多, 成本人力增加, 不经济。在进行重复的过程中, 所述的步骤 3) 中噬菌体十二肽库改为上一轮步骤 7) 所得的噬菌体;

9) 对最后三轮步骤 6) 所得噬菌体进行测序, 统计不同噬菌体出现的频数, 出现频数最高的四组噬菌体为筛选得到的前四组噬菌体;

10) 对步骤 9) 所得到的的前四组噬菌体进行进一步优选, 得到最佳结合噬菌体, 该噬菌体展示的多肽为最佳结合多肽。

作为进一步地改进, 本发明所述的步骤 1) 所包被的蛋白为人纤维蛋白原, 由此获得的噬菌体为特异性靶向结合人纤维蛋白原的噬菌体。

作为进一步地改就, 本发明筛选所得的噬菌体频数最高的四组展示的多肽为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1), LTPHKHHKHLHA (SED ID NO: 2), GPRPPLHDSMR

(SED ID NO: 3), HLHKHHLRSTTH (SED ID NO: 4)。

作为进一步地改进, 本发明筛选所得的噬菌体最优序列为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1)。

作为进一步地改进, 本发明筛选所得的噬菌体可以加入凝血材料中, 靶向结合人纤维蛋白原, 使纤维蛋白原富集, 进而促进凝血效果。

作为进一步地改进, 本发明所述的步骤 9) 中, 对所得频数最高的四种噬菌体分别进行扩增纯化稀释, 得到 10^3 - 10^{13} pfu/mL 的四种噬菌体溶液, 对四种噬菌体进行 ELISA 实验, 得到吸光度最高的噬菌体展示序列为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1), 证明该噬菌体为靶向结合人纤维蛋白原的最佳噬菌体, 多肽序列 GPRPPSEHLQIT 为最佳结合多肽。

作为进一步地改进, 本发明所述的步骤 4) 步骤 5) 所述的洗涤液皆为 PBST, 步骤 6) 所述的洗脱液为 0.2 M Glycine 水溶液由 HCl 调节 PH 至 2.2 而成, 中和液为 50 mM Tris 水溶液通过 HCl 调节 PH 为 9.1 而成。

与现有技术相比, 本发明具有以下突出特点:

(1) 本发明筛选出的噬菌体对比其余噬菌体, 能够特异性结合人纤维蛋白原, 且结合力强;

(2) 本发明筛选所得噬菌体易于加工, 可以加入各种凝血材料中, 通过靶向结合人纤维蛋白原, 促使纤维蛋白原的富集, 增强凝血效果;

(3) 本发明具有所用试剂简单易得, 成功率高等特点。

附图说明

图 1 是筛选噬菌体频数图;

图 2 是 ELISA 优选实验结果图;

图 3 是噬菌体加入丝素凝胶的凝血指数结果图。

具体实施方式

下面通过具体实施例对本发明的技术方案作进一步的详细说明, 以下实施例是对本发明的解释而本发明并不局限于以下实施例。

实施例 1

- 1) 包被蛋白：将人纤维蛋白原用包被液稀释，取该人纤维蛋白原溶液于细胞培养板中，将板置于湿盒中，4℃孵育过夜；
- 2) 封闭平板：将步骤 1) 中的板取出，加入封闭液 4℃孵育；
- 3) 噬菌体库去背景：将噬菌体十二肽库加入新的细胞培养板中，并在摇床平缓摇动；
- 4) 噬菌体结合：吸走步骤 2) 中培养板的封闭液，反复洗涤 6 次，然后将步骤 3) 中培养板的液体加入该洗涤后的培养板，在摇床平缓摇动 2.5 h；
- 5) 洗涤：将步骤 4) 中培养板的液体吸走，反复洗涤 10 次，得到步骤 5) 的培养板；
- 6) 洗脱：在步骤 5) 的培养板中加入洗脱液，室温静置 20 min，然后将液体转移至新的离心管中，加入中和液，得到噬菌体；
- 7) 噬菌体扩增及计数：将步骤 6) 所得噬菌体进行涂板计数，得到图 1。将步骤 6) 所得噬菌体进行扩增并计数，稀释至 10^{10} pfu/mL，得到步骤 7) 的噬菌体；
- 8) 再重复步骤 1) 至步骤 7) 三次，在进行重复的过程中，所述的步骤 3) 中噬菌体十二肽库改为上一轮步骤 7) 所得的噬菌体；
- 9) 对最后三轮步骤 6) 所得噬菌体进行测序，统计不同噬菌体出现的频数，得到图 2。出现频数最高的四组噬菌体为筛选得到的前四组噬菌体，对它们进行进一步优选，得到最佳结合噬菌体，该噬菌体展示的多肽为最佳结合多肽。

实施例 2

- 1) 包被蛋白：将人纤维蛋白原用包被液稀释，取该人纤维蛋白原溶液于细胞培养板中，将板置于湿盒中，2℃孵育过夜；
- 2) 封闭平板：将步骤 1) 中的板取出，加入封闭液 2℃孵育；
- 3) 噬菌体库去背景：将噬菌体十二肽库加入新的细胞培养板中，并在摇床平缓摇动；
- 4) 噬菌体结合：吸走步骤 2) 中培养板的封闭液，反复洗涤 3 次，然后将步骤 3) 中培养板的液体加入该洗涤后的培养板，在摇床平缓摇动 1 h；
- 5) 洗涤：将步骤 4) 中培养板的液体吸走，反复洗涤 15 次，得到步骤 5)

的培养板；

6) 洗脱：在步骤 5) 的培养板中加入洗脱液，室温静置 10 min，然后将液体转移至新的离心管中，加入中和液，得到噬菌体；

7) 噬菌体扩增及计数：将步骤 6) 所得噬菌体进行扩增并计数，稀释至 10^3 pfu/mL，得到步骤 7) 的噬菌体；

8) 再重复步骤 1) 至步骤 7) 二次，在进行重复的过程中，所述的步骤 3) 中噬菌体十二肽库改为上一轮步骤 7) 所得的噬菌体；

9) 对最后三轮步骤 6) 所得噬菌体进行测序，统计不同噬菌体出现的频数，出现频数最高的四组噬菌体为筛选得到的前四组噬菌体，他们所展示的多肽序列分别为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1)，LTPHKHHKHLHA (SED ID NO: 2)，GPRPPLHLDMSR (SED ID NO: 3)，HLHKHHLRSTTH (SED ID NO: 4)。对它们进行进一步优选，得到最佳结合噬菌体，该噬菌体展示的多肽为最佳结合多肽。

实施例 3

1) 包被蛋白：将人纤维蛋白原用包被液稀释，取该人纤维蛋白原溶液于细胞培养板中，将板置于湿盒中，8℃孵育过夜；

2) 封闭平板：将步骤 1) 中的板取出，加入封闭液 8℃孵育；

3) 噬菌体库去背景：将噬菌体十二肽库加入新的细胞培养板中，并在摇床平缓摇动；

4) 噬菌体结合：吸走步骤 2) 中培养板的封闭液，反复洗涤 15 次，然后将步骤 3) 中培养板的液体加入该洗涤后的培养板，在摇床平缓摇动 4 h；

5) 洗涤：将步骤 4) 中培养板的液体吸走，反复洗涤 3 次，得到步骤 5) 的培养板；

6) 洗脱：在步骤 5) 的培养板中加入洗脱液，室温静置 30 min，然后将液体转移至新的离心管中，加入中和液，得到噬菌体；

7) 噬菌体扩增及计数：将步骤 6) 所得噬菌体进行扩增并计数，稀释至 10^{13} pfu/mL，得到步骤 7) 的噬菌体；

8) 再重复步骤 1) 至步骤 7) 五次，在进行重复的过程中，所述的步骤 3) 中噬菌体十二肽库改为上一轮步骤 7) 所得的噬菌体；

9) 对最后三轮步骤 6) 所得噬菌体进行测序, 统计不同噬菌体出现的频数, 出现频数最高的四组噬菌体为筛选得到的前四组噬菌体, 对它们分别进行扩增纯化稀释, 得到 10^{13} pfu/mL 的四种噬菌体溶液, 对四种噬菌体进行 ELISA 实验, 得到吸光度最高的噬菌体展示序列为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1)。证明该噬菌体为靶向结合人纤维蛋白原的最佳噬菌体, 多肽序列 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1) 为最佳结合多肽。

实施例 4

1) 包被蛋白: 将人纤维蛋白原用包被液稀释, 取该人纤维蛋白原溶液于细胞培养板中, 将板置于湿盒中, 8°C 孵育过夜;

2) 封闭平板: 将步骤 1) 中的板取出, 加入封闭液 8°C 孵育;

3) 噬菌体库去背景: 将噬菌体十二肽库加入新的细胞培养板中, 并在摇床平缓摇动;

4) 噬菌体结合: 吸走步骤 2) 中培养板的封闭液, 反复洗涤 15 次, 然后将步骤 3) 中培养板的液体加入该洗涤后的培养板, 在摇床平缓摇动 4 h;

5) 洗涤: 将步骤 4) 中培养板的液体吸走, 反复洗涤 3 次, 得到步骤 5) 的培养板;

6) 洗脱: 在步骤 5) 的培养板中加入洗脱液, 室温静置 30 min, 然后将液体转移至新的离心管中, 加入中和液, 得到噬菌体;

7) 噬菌体扩增及计数: 将步骤 6) 所得噬菌体进行扩增并计数, 稀释至 10^{13} pfu/mL, 得到步骤 7) 的噬菌体;

8) 再重复步骤 1) 至步骤 7) 五次, 在进行重复的过程中, 所述的步骤 3) 中噬菌体十二肽库改为上一轮步骤 7) 所得的噬菌体;

9) 对最后三轮步骤 6) 所得噬菌体进行测序, 统计不同噬菌体出现的频数, 出现频数最高的四组噬菌体为筛选得到的前四组噬菌体, 对它们分别进行扩增纯化稀释, 得到 10^3 pfu/mL 的四种噬菌体溶液, 对四种噬菌体进行 ELISA 实验, 得到吸光度最高的噬菌体展示序列为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1);

10) 将步骤 9) 得到的最佳结合噬菌体混合进凝血材料丝素凝胶当中, 与新鲜血液孵育 3 min, 检测未凝血液中血红蛋白含量, 占凝血前总血红蛋白含量的

比例，即凝血指数 BCI，得到图 3，BCI 指数越低表示凝血效果越好。图示表明加入筛选所得最佳噬菌体的凝胶，比加入野生型噬菌体的凝胶以及单纯的凝胶，凝血效果更好。

最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的具体实施例子。显然，本发明不限于以上实施例子，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

权利要求书

1、一种利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，其特征在于，所采用的步骤如下：

1) 包被蛋白：将人纤维蛋白原用包被液稀释，取该人纤维蛋白原溶液于细胞培养板中，将板置于湿盒中，在 2-8℃ 温度下孵育过夜；

2) 封闭平板：将步骤 1) 中的板取出，加入封闭液，在 2-8℃ 温度下孵育；

3) 噬菌体库去背景：将噬菌体十二肽库加入新的细胞培养板中，并在摇床平缓摇动；

4) 噬菌体结合：吸走步骤 2) 中培养板的封闭液，反复洗涤 3-15 次，然后将步骤 3) 中培养板的液体加入该洗涤后的培养板，在摇床平缓摇动 1-4 h；

5) 洗涤：将步骤 4) 中培养板的液体吸走，反复洗涤 3-15 次，得到步骤 5) 的培养板；

6) 洗脱：在步骤 5) 的培养板中加入洗脱液，室温静置 10-30 min，然后将液体转移至新的离心管中，加入中和液，得到噬菌体；

7) 噬菌体扩增及计数：将步骤 6) 所得噬菌体进行扩增并计数，稀释至 10^3 - 10^{13} pfu/mL，得到步骤 7) 的噬菌体；

8) 再重复步骤 1) 至步骤 7) 二-五次，在进行重复的过程中，所述的步骤 3) 中噬菌体十二肽库改为上一轮步骤 7) 所得的噬菌体；

9) 对最后三轮步骤 6) 所得噬菌体进行测序，统计不同噬菌体出现的频数，出现频数最高的四组噬菌体为筛选得到的前四组噬菌体；

10) 对步骤 9) 所得到的前四组噬菌体进行进一步优选，得到最佳结合噬菌体，该噬菌体展示的多肽为最佳结合多肽。

2、根据权利要求 1 所述的利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，其特征在于，步骤 1) 所包被的蛋白为人纤维蛋白原，由此获得的噬菌体为特异性靶向结合人纤维蛋白原的噬菌体。

3、根据权利要求 1 所述的利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，其特征在于，筛选所得的噬菌体频数最高的四组展示的多肽为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1)，LTPHKHHKHLHA (SED ID NO: 2)，GPRPPLHLDSMR (SED ID NO: 3)，HLHKHHLRSTTH (SED ID NO: 4)。

- 4、根据权利要求 1 或 3 所述的利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，其特征在于，筛选所得的噬菌体最优序列为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1)。
- 5、根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，其特征在于，筛选所得的噬菌体可以加入凝血材料中，靶向结合人纤维蛋白原，使纤维蛋白原富集，进而促进凝血效果。
- 6、根据权利要求 1 所述的利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，其特征在于，所述的步骤 9) 中，对所得频数最高的四种噬菌体分别进行扩增纯化稀释，得到 10^3 - 10^{13} pfu/mL 的四种噬菌体溶液，对四种噬菌体进行 ELISA 实验，得到吸光度最高的噬菌体展示序列为 GPRPPSEHLQIT (SED ID NO: 1)。证明该噬菌体为靶向结合人纤维蛋白原的最佳噬菌体，多肽序列 GPRPPSEHLQIT 为最佳结合多肽。
- 7、根据权利要求 1 所述的利用噬菌体抗体库高效筛选纤维蛋白原的方法，其特征在于，步骤 4) 步骤 5) 所述的洗涤液皆为 PBST，步骤 6) 所述的洗脱液为 0.2 M Glycine 水溶液由 HCl 调节 PH 至 2.2 而成，中和液为 50 mM Tris 水溶液通过 HCl 调节 PH 为 9.1 而成。

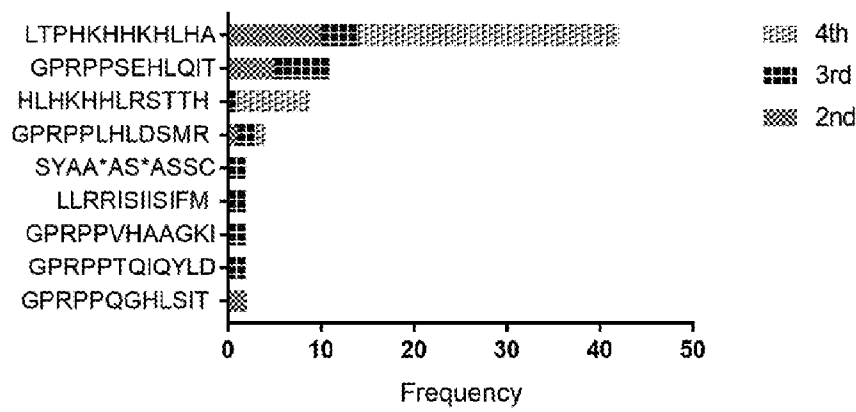


图 1

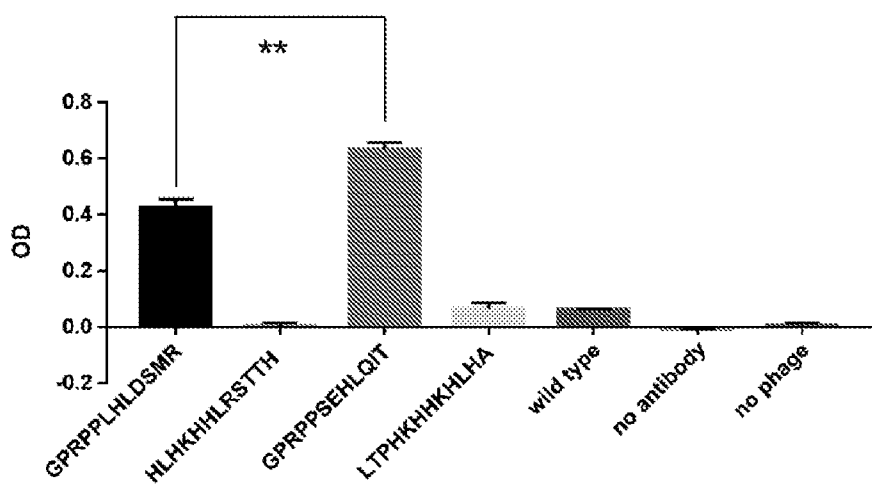


图 2

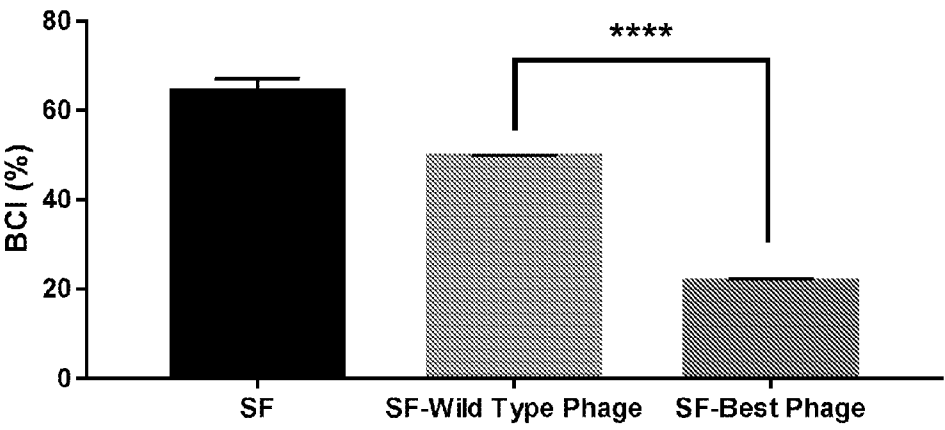


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/098424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C40B 30/04(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; A61P 7/04(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)

C40B; C07K; 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, CNTXT, CNKI: 纤维蛋白原, 噬菌体, 库, 等; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science: fibrinogen, phage, library et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110453292 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 15 November 2019 (2019-11-15) claims 1-7	1-7
Y	WO 03083436 A2 (DYAX CORP et al.) 09 October 2003 (2003-10-09) description, paragraphs 0056-0068	1-7
Y	吴国球, 等 (WU, Guoqiu et al.). "十二肽库中与结缔组织生长因子特异性结合噬菌体的筛选 (Screening of phages specifically combined with connective tissue growth factor from a random 12-peptide library)" <i>中国药科大学学报 (Journal of China Pharmaceutical University)</i> , Vol. 38, No. 1., 25 February 2007 (2007-02-25), sections 212-214	1-7
Y	毕仙民, 等 (BI, Xianmin et al.). "Endoglin特异性结合短肽筛选及功能分析 (Screening and function analysis of targeted short binding peptides of Endoglin)" <i>重庆医科大学学报 (Journal of Chongqing Medical University)</i> , Vol. 32, No. 3, 30 March 2007 (2007-03-30), section 1.2	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 September 2020

Date of mailing of the international search report

24 September 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/CN2020/098424

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/CN2020/098424

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	110453292	A	15 November 2019	None		
WO	03083436	A2	09 October 2003	US	7041790 B2	09 May 2006
				CA	2479750 A1	09 October 2003
				AU	2003225922 A1	13 October 2003
				WO	03083436 A3	23 December 2004
				US	2003207330 A1	06 November 2003
				EP	1536818 A2	08 June 2005
				JP	2005521733 A	21 July 2005

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/098424

A. 主题的分类 C40B 30/04(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; A61P 7/04(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) C40B; C07K; 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, CNTXT, CNKI和关键词: 纤维蛋白原, 噬菌体, 库, 等; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science和关键词: fibrinogen, phage, library, 等																	
C. 相关文件 <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 110453292 A (浙江大学) 2019年 11月 15日 (2019 - 11 - 15) 权利要求1-7</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 03083436 A2 (DYAX CORP等) 2003年 10月 9日 (2003 - 10 - 09) 说明书第0056-0068段</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>吴国球, 等. "十二肽库中与结缔组织生长因子特异性结合噬菌体的筛选." 中国药科大学学报, 第38卷, 第1期, 2007年 2月 25日 (2007 - 02 - 25), 第212-214节</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>毕仙民, 等. "Endoglin特异性结合短肽筛选及功能分析." 重庆医科大学学报, 第32卷, 第3期, 2007年 3月 30日 (2007 - 03 - 30), 第1.2节</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 110453292 A (浙江大学) 2019年 11月 15日 (2019 - 11 - 15) 权利要求1-7	1-7	Y	WO 03083436 A2 (DYAX CORP等) 2003年 10月 9日 (2003 - 10 - 09) 说明书第0056-0068段	1-7	Y	吴国球, 等. "十二肽库中与结缔组织生长因子特异性结合噬菌体的筛选." 中国药科大学学报, 第38卷, 第1期, 2007年 2月 25日 (2007 - 02 - 25), 第212-214节	1-7	Y	毕仙民, 等. "Endoglin特异性结合短肽筛选及功能分析." 重庆医科大学学报, 第32卷, 第3期, 2007年 3月 30日 (2007 - 03 - 30), 第1.2节	1-7
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 110453292 A (浙江大学) 2019年 11月 15日 (2019 - 11 - 15) 权利要求1-7	1-7															
Y	WO 03083436 A2 (DYAX CORP等) 2003年 10月 9日 (2003 - 10 - 09) 说明书第0056-0068段	1-7															
Y	吴国球, 等. "十二肽库中与结缔组织生长因子特异性结合噬菌体的筛选." 中国药科大学学报, 第38卷, 第1期, 2007年 2月 25日 (2007 - 02 - 25), 第212-214节	1-7															
Y	毕仙民, 等. "Endoglin特异性结合短肽筛选及功能分析." 重庆医科大学学报, 第32卷, 第3期, 2007年 3月 30日 (2007 - 03 - 30), 第1.2节	1-7															
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			* 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													
* 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 2020年 9月 3日		国际检索报告邮寄日期 2020年 9月 24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 杨振宇 电话号码 86-(10)-62412204															

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/CN2020/098424

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)
CN	110453292	A	2019年 11月 15日	无		
WO	03083436	A2	2003年 10月 9日	US	7041790 B2	2006年 5月 9日
				CA	2479750 A1	2003年 10月 9日
				AU	2003225922 A1	2003年 10月 13日
				WO	03083436 A3	2004年 12月 23日
				US	2003207330 A1	2003年 11月 6日
				EP	1536818 A2	2005年 6月 8日
				JP	2005521733 A	2005年 7月 21日