

(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  
2014 年 11 月 13 日 ( 13.11.2014 ) W I P O | P C T

(10) 国际公布号  
W O 2014/180288 A 1

- (51) 国际分类号 :  
C07K 19/00 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)
- (21) 国际申请号 : PCT/CN20 14/076768
- (22) 国际申请日 : 2014 年 5 月 5 日 (05.05.2014)
- (25) 申请语言 : 中文
- (26) 公布语言 : 中文
- (30) 优先权 :  
2013 10162738.3 2013 年 5 月 6 日 (06.05.2013) CN  
2013 10163407.1 2013 年 5 月 6 日 (06.05.2013) CN
- (71) 申请人 : 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。
- (72) 发明人 : 王淑珍 (WANG, Shuzhen); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。陈依军 (CHEN, Yijun); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。何东洋 (HE, Dongyang); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。刘楠 (LIU, Nan); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。马超 (MA, Chao); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。高振月 (GAO, Zhenyue); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。
- (74) 代理人 : 南京知识律师事务所 (ZHISHI LAW FIRM OF INTELLECTUAL PROPERTY); 中国江苏省南京市新模范马路 5 号南京科技广场 B 座 9 楼, Jiangsu 210009 (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, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, ML, 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, 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)。
- 根据细则 4.17 的声明 :  
- 发明人资格 (细则 4.17(iv))
- 本国际公布 :  
- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。  
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: FUSION PROTEIN HAVING DUAL-FUNCTIONS FOR INHIBITING ANGIOGENESIS IN TUMOUR MICROENVIRONMENT AND ACTIVATING ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE AND GENE AND USE THEREOF

(54) 发明名称 : 具有抑制肿瘤微环境血管再生和激活适应性免疫应答双功能的融合蛋白及其基因和应用

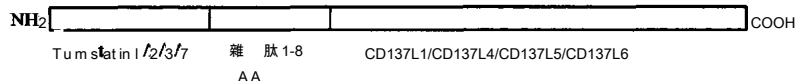


图 1 / FIG.1

AA Connecting peptide

(57) Abstract: Disclosed is a difunctional fusion protein having Tumstatin active fragments and CD137L extracellular regions. The protein has activities for inhibiting the proliferation of human umbilical vein endothelial cells and co-stimulating the proliferation of T cells, and can be used for preparing angiogenesis inhibitors, drugs for treating various tumour-related diseases and regulating immunity etc.

(57) 摘要 : 公开了具有 Tumstatin 活性片段和 CD137L 胞外区的多功能融合蛋白。该蛋白兼有抑制人脐静脉内皮细胞增殖和协同刺激 T 细胞增殖的活性, 可用于制备血管生成抑制剂、各种肿瘤相关疾病和机体免疫调节药物等。



W 2014/180288 A1

# 具有抑制肿瘤微环境血管再生和激活适应性免疫应答双功能的融合蛋白及其基因和应用

## 技术领域

本发明属于生物工程技术领域。本发明涉及一种具有抑制肿瘤微环境血管再生和激活适应性免疫应答双功能的融合蛋白 CD137L-Tumstatin 及其基因，以及含有该基因的表达载体与由该载体转化得到的菌株，还涉及该融合蛋白的制备方法，同时涉及具有 CD137L 和 Tumstatin 双功能的蛋白在制备抑制肿瘤微血管再生以及相关肿瘤学疾病（如，黑色素瘤、直肠癌、肺癌等）和激活适应性免疫应答功效药物方面的应用，另外涉及给药途径方面的应用（如，口服给药、喷雾给药途径等）。

## 背景技术

癌症发生是一个多基因合作、不同信号途径参与的过程。就其本质而言，癌症是一种分子病症。当前，靶点单一的分子治疗策略逐渐显示出诸多弊端，而多靶点、多机制联合用药的治疗方法显示出更好的治疗效果。

1971 年哈佛大学 Folkman 教授提出“肿瘤的生长和转移依赖于微环境血管再生”学说。该理论认为，通过抑制肿瘤微环境血管再生，切断肿瘤的营养和氧气供应能够抑制肿瘤细胞的生长和转移。自发表至今，该学说在世界范围内已得到了大量实验室和临床上的数据支持，因而成为了近来肿瘤治疗领域内的新策略。人肿瘤抑制素（Tumstatin）是一个源于血管基底膜 IV 型胶原  $\alpha 3$  链羧基 C 末端的肿瘤血管再生抑制因子，由 244 个氨基酸组成。

在所有血管基底膜中，IV 型胶原蛋白形成的三维网状骨架结构是起支架作用的主要成分，可促进细胞的黏附、迁移、分化和生长。它由 6 个独特的基因分别编码产生 6 条链  $\alpha 1 \sim \alpha 6$ ，并以不同或相同的  $\alpha$  链形成三聚体，进一步形成网状结构。IV 型胶原蛋白的每条  $\alpha 3$  链都由 3 部分功能区组成（7S 结构域、三螺旋区、非胶原肽 NC1 结构域），分布于肾小球、肺泡毛细血管、耳蜗、晶状体囊、卵巢和睾丸的基底膜。

新生血管的形成是肿瘤生长和转移的关键性步骤，包含了一系列复杂的过程。肿瘤组织内由于低氧，使血管形成刺激因子合成增加，从而刺激肿瘤组织微环境新生血管的生成。近来研究表明，Tumstatin 可特异性地抑制肿瘤血管内皮细胞蛋白的合成，导致内皮细胞凋亡，使血管生成受到抑制，从而抑制肿瘤生长和转移。另外，Tumstatin 还具有直接作用于肿瘤细胞并抑制其增殖的特性。其作用机制为通过与整合素受体  $\alpha v \beta 3$  结合，特异地抑制肿瘤微环境血管内皮细胞蛋白的合成，进而阻断血管再生，抑制肿瘤的生长和转移。

目前学术界就抗肿瘤免疫已达成共识,即在人和动物体内对恶性肿瘤存在着某种程度的免疫反应。肿瘤患者免疫系统的细胞能够识别肿瘤细胞表达的抗原,如组织分化抗原、癌胚抗原以及突变基因的产物等等。随着对肿瘤抗原识别及免疫应答机制的了解,研究已经表明通过辅助分子提供免疫共刺激信号可以提高抗肿瘤免疫应答。由于肿瘤抗原特异性 T 细胞需要协同刺激来辅助第一抗原信号激发效应细胞的功能,因而,协同刺激分子的辅助治疗可用于调节针对恶性肿瘤的免疫反应。

共刺激分子在免疫应答中起了极其重要的作用。一般而言,激活 T 淋巴细胞需要两个信号的参与,分别是 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 接受抗原递呈细胞 (Antigen Presenting Cells, APC) 传导的主要组织相容复合体-抗原肽信号 (第一信号),和细胞膜表面黏附分子提供的协同刺激信号 (亦即第二信号)。增强 T 细胞介导的抗肿瘤免疫的重要方法之一即是提供 T 淋巴细胞活化所需要的协同刺激信号。CD137 与其配体 CD137L 是继 CD28/B7 之外新发现的另一对重要的 T 细胞协同刺激信号分子。

根据结构可将共刺激分子分为两类:肿瘤坏死因子受体超家族 (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR) 和免疫球蛋白超家族。CD137 是肿瘤坏死因子受体家族的成员。它在调节细胞增殖、分化、凋亡中发挥着重要作用。其配体 CD137L 也是 TNF 家族的成员,系细胞表面 II 型跨膜蛋白,与其他 TNF 家族有相似的 C-端氨基酸。编码人 CD137L 的基因位于 19p3.3,其产物为 254 个氨基酸,其中胞浆区 28 个氨基酸,跨膜区 21 个氨基酸,胞外区 205 个氨基酸。CD137L 首先由 Goodwin 等人利用表达筛选技术在小鼠胸腺瘤细胞中分离提出,随后又在人 CD4+T 细胞克隆中分离得到。

CD137 与其配体 CD137L 之间的相互作用 (CD137/CD137L) 对 T 细胞活化的重要作用已得到充分认可。在鼠和人 T 细胞中均可观察到,在 CD3 抗体 (第一信号) 存在下,CD137 便可诱导 T 细胞增殖、合成细胞因子 (如 IFN- $\alpha$ ), 以及延长活化细胞的生存期。协同刺激信号可通过提高抗原特异性和效应 CD8+T 细胞的数量来增强效应功能;但在缺乏 CD3 抗体信号时,CD137 分子的刺激并不能改变 T 细胞的功能,表明 CD137 与 CD137L 相互作用所提供的只是一种协同刺激信号。

Kim 等对 T 细胞及细胞因子的研究显示,CD137 单克隆抗体介导的抗肿瘤免疫依赖于 CD4+T、CD8+T 细胞的共同参与。CD137 介导 NF- $\kappa$ B 的活化,进而上调 bcl-xL 和 bfl-1 分子的表达,延长 CD8+T、CD4+T 细胞的生存并促进其增殖。Melero 等人利用激活型鼠源 CD137 单克隆抗体来开展 CD137 靶向免疫治疗。结果表明 CD137 单抗能够消除小鼠体内已接种的 P815 实体瘤。与激活型 CD137 单克隆抗体的抗肿瘤效果一致,CD137L 可协同激发细胞毒

T 淋巴细胞效应 (Cytotoxic lymphocyte, CTL) 和抗肿瘤效应。CD137L<sup>-/-</sup> 小鼠很好地说明了 CD137/CD137L 系统在 T 细胞介导的对病毒和肿瘤免疫应答中所起的重要作用。对 CD137 或 CD137L 缺陷型小鼠的研究表明 CD137/CD137L 的协同刺激作用对移植物抗宿主病、T 细胞的抗病毒细胞性应答很重要。

综上所述, CD137/CD137L 提供的刺激信号能协同 CD28/B7 分子对进一步活化 T 细胞, 维持 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖和生存。而 Tumstatin 可以有效抑制肿瘤血管的生成, 对肿瘤细胞的存活、转移起阻滞作用。所以本发明中的融合蛋白 Tumstatin-CD137L 可以从抑制血管生成与增强抗肿瘤免疫应答两个方面共同抑制肿瘤的生长和转移, 从而避免单一治疗引起的药物耐受, 为治疗肿瘤患者提供新的策略。

#### 发明内容

本发明通过短的柔性连接肽将 Tumstatin 抗血管生成活性片段与 CD137L 胞外区蛋白合成一个同时具有增强 T 细胞免疫与抗血管生成的双功能、双靶点的分子; 并且在本发明中选取了 Tumstatin 不同的相关活性位点 (Tumstatin1 第 45 位至第 98 位氨基酸片段, Tumstatin2 第 60 位至第 132 位氨基酸片段, Tumstatin3 第 60 位至第 98 位氨基酸片段, Tumstatin7 第 74 位至第 98 位氨基酸片段) 与 CD137L 胞外区蛋白氨基酸序列 (CD137L1 第 46 位至第 254 位氨基酸片段, CD137L4 第 50 位至第 240 位氨基酸片段, CD137L5 第 83 位至第 254 位氨基酸片段, CD137L6 第 46 位至第 85 位氨基酸和第 167 位至第 254 位氨基酸的接合片段, 示意图如图 2 所示) 通过连接肽相连接, 利用原核或真核表达系统制备, 此方法具有制备简单及避免了全长 Tumstatin 和全长 CD137L 的副作用问题, 本发明将在制备血管生成抑制剂、各种肿瘤相关疾病 (如黑色素瘤、前列腺癌、肺癌、大肠癌、肾癌、膀胱癌等)、视网膜病变、细胞增殖、机体细胞因子合成与分泌、调节机体免疫力等药物, 以及在制备以口服或注射等相关剂型药物中有很好的应用前景与市场价值。

本发明的目的是提供一个兼有 Tumstatin 和 CD137L 功能的蛋白。

本发明的另一个目的是提供编码上述具有 Tumstatin 和 CD137L 功能的蛋白的基因。

本发明的另一个目的是提供上述具有 Tumstatin 和 CD137L 功能的蛋白的制备方法。

本发明的另一个目的是提供上述具有 Tumstatin 和 CD137L 功能的蛋白及其基因在治疗肿瘤学相关疾病 (如, 黑色素瘤、直肠癌、肺癌等) 和给药途径方面 (如, 口服给药、喷雾给药途径等) 的应用。

本发明技术方案具体如下:

一种具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能重组蛋白, 具有 Tumstatin 活性片段氨基酸序列

10

CD137L 胞外区蛋白片段氨基酸序列,所述 CD137L 胞外区蛋白片段氨基酸序列和 Tumstatin 活性片段氨基酸序列通过柔性连接肽融合而成,所述 Tumstatin 活性片段氨基酸序列选自 SEQ ID NO.65 至 SEQ ID NO.68 所示氨基酸序列中的一种,所述 CD137L 胞外区蛋白片段氨基酸序列选自 SEQ ID NO.77 至 SEQ ID NO.80 所示氨基酸序列中的一种。

上述连接肽氨基酸序列可采用本领域常规技术手段进行设计,优选 SEQ ID NO.69 至 SEQ ID NO.76 中的一种。

本发明所述双功能重组蛋白氨基酸序列优选 SEQ ID NO.25 至 SEQ ID NO.48 所述中的一种,所述重组蛋白结构示意图如图 1 所示。

本发明还提供了编码上述具有 Tumstatin 和 CD 137L 双功能重组蛋白基因,包括编码 CD 137L 胞外区蛋白片段的基因、编码连接肽的基因和编码 Tumstatin 活性片段的基因,其中所述编码 CD137L 胞外区蛋白片段的基因选自 SEQ ID NO.61- SEQ ID NO.64 中的一种,所述编码 Tumstatin 活性片段的基因选自 SEQ ID NO.49- SEQ ID NO.52 中的一种。

上述编码连接肽的基因优选 SEQ ID NO.53- SEQ ID NO.60 中的一种。

上述重组蛋白基因,其优选具有 SEQ ID NO.1 至 SEQ ID NO.24 之一的核苷酸序列。

本发明还提供了一种编码上述重组蛋白 Tumstatin-CD137L 的基因,与上述的核苷酸序列相比具有 70% 及以下的同源性,能编码本发明所述重组蛋白或其保守性变异多肽或其活性片段或其活性衍生物。

本发明还提供了上述具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能重组蛋白的制备方法,包括如下步骤:

- (1) 设计得到本发明所述编码具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白基因序列;
- (2) 构建含上述基因序列表达系统,包括构建表达载体再将表达载体转化入宿主细胞,形成可表达本发明所述具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白的重组细胞;
- (3) 培养步骤 (2) 重组细胞;
- (4) 分离纯化得到本发明所述具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白。

上述表达系统可选用原核表达系统或真核表达系统,原核表达系统优选大肠杆菌表达系统或枯草芽孢杆菌表达系统,这两个表达系统普遍适应于本发明所述重组蛋白的表达,其中大肠杆菌系统中表达载体优选 pET-11a、pET-22b,枯草芽孢杆菌表达系统表达载体优选 pP43;真核表达系统优选酵母表达系统,表达载体优选 pPIC9K、pPICZaA,酵母宿主细胞优选 GS115 或 SMD1168。

上述制备方法的一种优选方案为:将编码上述具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白 Tumstatin-CD137L 的基因通过 NdeI 及 NheI 双酶切,然后连接至表达载体 pET-11a 的相

酶切位点，再转化大肠杆菌 BL21(DE3)，经液体培养工程菌获得包涵体形式的目的蛋白。通过将包涵体进行稀释复性的方法，即用含低浓度尿素的溶液多次洗涤包涵体蛋白，然后用含 8M 尿素的变性液在 50℃ 溶解包涵体，最后用含 0.4M L-Arg 的复性液稀释复性包涵体（目的产物纯度达 80% 以上），得到本发明所述重组蛋白。

上述制备方法的一种优选方案为：将编码上述具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白 Tumstatin-CD137L 的基因通过 PstI 及 HindIII 双酶切，然后连接至表达载体 pP43 的相应酶切位点，再电转枯草杆菌 WB800，经液体培养工程菌获得分泌至胞外可溶形式的目的蛋白。利用 DEAE 阴离子交换的方法进行纯化，纯度达 80% 以上，得到本发明所述重组蛋白。

上述制备方法的一种优选方案为：将编码上述具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白 Tumstatin-CD137L 的基因通过 EcoRI 及 NotI 双酶切，然后连接至表达载体 pPICZaA 的相应酶切位点，再电转毕赤酵母 GS115，经液体培养工程菌获得分泌至胞外可溶形式的目的蛋白。通过 DEAE 阴离子交换的方法进行纯化，纯度达 90% 以上，得到本发明所述重组蛋白。

本发明还提供了上述具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能重组蛋白在制备抑制肿瘤微环境血管再生以及相关肿瘤学疾病（如，黑色素瘤、直肠癌、肺癌等）、调节机体免疫力、T 细胞增殖和机体细胞因子的合成与分泌的药物中的应用。

本发明还提供了上述具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能重组蛋白基因在制备抑制肿瘤微环境血管再生以及相关肿瘤学疾病（如，黑色素瘤、直肠癌、肺癌等）、调节机体免疫力、T 细胞增殖和机体细胞因子的合成与分泌的药物中的应用。

上述应用中，本发明所述的重组蛋白可以单独使用或以药物组合物的形式使用。药物组合物包括作为活性成分的本发明所述的重组蛋白和可药用载体。较佳的，药物组合物有 0.1-99.9% 重量百分比的作为活性成分本发明所述的重组蛋白。"可药用载体"不会破坏本发明重组蛋白的药学活性，同时其有效用量，即能够起药物载体作用时的用量对人体无毒。

"可药用载体"包括但不限于：离子交换材料、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、自乳化药物传递系统 (SEDDS) 如 d-维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯、吐温或其他类似聚合介质等药物制剂用的表面活性剂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、氨基乙酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸部分甘油酯混合、水、盐、电解质如硫酸盐精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅胶、硅酸镁等。聚乙烯吡咯酮、纤维素物质、聚乙烯醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、乙烯-聚氧乙烯-嵌段聚合物和羊毛脂、环糊精如  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -环糊精或其经化学修饰的衍生物如 2-和 3-羟丙基- $\beta$ -环糊精等羟烷基环糊精或其他可溶性衍生物等均可用于促进本发明所述重组蛋白的药物传递。

其他可药用辅料如填充剂 (如无水乳糖、淀粉、乳糖珠粒和葡萄糖)、粘合剂 (如微晶纤维素)、崩解剂 (如交联羧甲基淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠、低取代羟丙基纤维素和交联 PVP)、润滑剂 (如硬脂酸镁)、吸收促进剂、香味剂、甜味剂、稀释剂、赋形剂、润湿剂、溶剂、增溶剂和着色剂等也可加入本发明的药物组合物中。

在上述的药物组合物中,没有限制可以任选使用的任何剂型。例如,可举例说明的有口服给药形式如片剂、胶囊剂、颗粒剂、粉剂或液体制剂,或胃肠外给药形式如注射、局部产品或栓剂,他们可以以常规方法配制或非常规方法如脂质体等。

当使用本发明所述重组蛋白作为治疗剂时,其使用量对于成人大致每天 0.01mg 至 1g 的范围内,这取决于各患者的年龄、性别、体重和症状程度,并且日剂量可分为几个剂量。

本发明所述的重组蛋白还包括采用现有技术领域常规方法对本发明所述重组蛋白进行修饰的修饰蛋白。

对于蛋白质和肽类药物,在多数情况下,机体内的氨肽酶及羧肽酶很容易从常见的直链肽的两端进行逐步的切割分解,使直链肽被降解。多肽修饰是改变肽链主链结构和侧链基团的重要手段,已有大量文献表明经过修饰后的多肽药物可以显著降低免疫原性、减少毒副作用、增加水溶性、延长体内作用时间、改变其生物分布状况等等,明显改善药物的疗效。

本发明所述重组蛋白常用修饰方法包括中间残基的修饰、氨基酸替换、糖基化修饰及 PEG 修饰等,基本原理都是增加多肽分子的相对分子量和空间位阻,提高其对多肽水解酶的稳定性,减少肾小球的滤过作用。替换肽链中的某几个氨基酸是另一种推迟酶降解使多肽药物的半衰期延长的方式,替换对象通常为肽链中的易酶解的氨基酸。具体的说,可对重组蛋白中间残基进行糖基化、磷酸化、甲基化、乙酰化、硝基化、磺酸化或者连接 PEG 修饰或者偶联蛋白质,其中:

糖基化修饰最常用的为 N-糖基化和 O-糖基化。糖基化修饰肽优选在本发明所述重组蛋白氨基酸序列中的一个或多个 Tyr、Ser 或 Thr 残基上的氧与糖相连或本发明所述重组蛋白的氨基酸序列中的一个或多个天冬酰胺侧链的酰胺氮与糖相连。

磷酸化修饰肽优选在本发明所述重组蛋白氨基酸序列中的一个或多个 Tyr、Ser 或 Thr 位点进行磷酸化。

甲基化修饰肽包括侧链甲基化修饰肽和 N 端甲基化修饰肽,侧链甲基化优选在本发明所述重组蛋白氨基酸序列中的一个或多个 Lys、Tyr 或 Arg 侧链上进行甲基化,如 Lys(For),Lys(Me), Lys(Me)<sub>2</sub>, Lys(Me)<sub>3</sub>, Arg(Me)<sub>2</sub> symmetrical, D-Tyr(Me),D-Tyr(Et) ;

乙酰化修饰肽优选在本发明所述重组蛋白氨基酸序列中的一个或多个 Lys 或 Ser 侧链进行<sub>2</sub>

酰化，如 Ser(Ac) 或 Lys(Ac)。

硝基化或磺酸化修饰肽优选在本发明所述重组蛋白氨基酸序列中的一个或多个 Tyr 侧链上进行硝基化或磺酸化，Tyr(3-NO<sub>2</sub>)，Tyr(SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)。

中间残基的 PEG 修饰优选在本发明所述重组蛋白氨基酸序列中的一个或多个 Lys 侧链的氨基进行 PEG 修饰，PEG 分子量优选为 2000-10000。

或者，将本发明所述重组蛋白或其上述修饰蛋白的氨基酸序列中的一种或多种氨基酸替换成相应的氨基酸衍生物或特殊氨基酸，如将丙氨酸替换成 β-丙氨酸、高苯丙氨酸或萘基丙氨酸，将脯氨酸替换成羟脯氨酸，亮氨酸替换成正亮氨酸，缬氨酸替换成正缬氨酸，苏氨酸替换成别苏氨酸，异亮氨酸替换成别异亮氨酸，天冬酰胺替换成 2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基天冬酰胺 (Asn (GlcNac(Ac)<sub>3</sub>-β-D))，赖氨酸替换成 Lys (palmitoyl)。

或者，将本发明所述重组蛋白或其上述修饰蛋白的氨基酸序列中的一种或多种氨基酸替换成相应的 D 型氨基酸。

本发明中编码上述具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的双功能重组蛋白的基因 (GenBank: AAF72632.1 与 NP\_003802.1) 使用常规策略通过全基因合成、PCR 方法或其两者结合的方法获得，其中 CD137L 全长序列载体模板可参考文献 (Wang shuzhen. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012 Mar;39(3):471-6. doi: 10.1007/s10295-011-1045-1) 中公开的方法制备得到。

本发明构建了含有上述编码具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能的蛋白基因的表达载体，即通过常规 PCR 技术及酶切、连接将 Tumstatin-连接肽-CD137L 胞外区基因片段经 NdeI 和 NheI 双酶切后，连接入原核表达载体 pET11a 的相应酶切位点之间，经过测序验证得到正确的表达载体。

本发明构建了含上述表达载体的基因工程菌，即通过将目的基因转化 BL21，通过液体培养基小量培养筛选表达目的蛋白的阳性工程菌。

本发明提供了获得具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能的蛋白的方法，该方法是将阳性工程菌种进行培养发酵并经常温诱导使其高效表达具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能的蛋白，再收集菌体，高压破碎细胞、离心得到的菌体沉淀经变性溶解和稀释复性获得具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能的重组蛋白。

本发明对具有 Tumstatin 和 CD 137L 双功能的重组蛋白的活性测定是通过开展人脐静脉内皮细胞活性试验 (HUVEC assay) 和小鼠 T 细胞激活试验来进行的。其中，人脐静脉内皮细胞活性试验结果显示，对内皮细胞的增殖有显著的抑制作用。小鼠 T 细胞激活试验表明，所述重组蛋白能保持 CD137L 的生物活性，可协同抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体刺激 T 细胞的增



殖。

本发明的有益效果：

本发明表明，采用原核表达系统表达由 Tumstatin 和 CD 137L 胞外区活性片段重组蛋白，可以产生兼具 Tumstatin 和 CD 137L 双活性的蛋白。利用本发明生产的 Tumstatin- 连接肽-CD 137L 重组蛋白（兼具 Tumstatin 和 CD 137L 功能的蛋白），具有表达效率高、表达量大、表达周期短，易于纯化等优点。同时，本发明提供的融合蛋白对人脐静脉内皮细胞的增殖有显著的抑制作用，并且具有剂量依赖性，同时也可协同抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体刺激小鼠 T 细胞的增殖。因此，本发明为大规模生产 Tumstatin 和 CD 137L 重组蛋白提供了新的、安全的途径，为进一步研究和开发成为新一代抗肿瘤药物奠定了扎实的基础，在制药行业具有广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为本发明所述具有 Tumstatin 和 CD 137L 双功能的重组蛋白结构示意图。柔性连接肽氨基酸序列选自 SEQ ID NO.69- SEQ ID NO.76 中的一种。

图 2 为 CD 137L1（SEQ ID NO.77）、CD 137L5（SEQ ID NO.78）、CD 137L6（SEQ ID NO.79）和 CD 137L4（SEQ ID NO.80）在 CD 137L 氨基酸全长序列中的区域示意图。

图 3 为氨基酸序列如 SEQ ID NO.25- SEQ ID NO.48 所示的重组蛋白 Tumstatin- 连接肽-CD 137L 在大肠杆菌中的表达。泳道 1-24 分别对应 SEQ ID NO.25-48。

图 4 为代表性 Tumstatin- 连接肽-CD 137L 蛋白氨基酸序列（SEQ ID NO.29-SEQ ID NO.38）在枯草芽孢杆菌中的表达。泳道 1-8 分别对应 SEQ ID NO. 29、30、31、32、33、34、35、36、37、38。

图 5 为代表性 Tumstatin- 连接肽-CD 137L 蛋白氨基酸序列（SEQ ID NO. 29-SEQ ID NO. 36）在酵母菌中的表达。泳道 1-16 分别对应蛋白氨基酸序列 SEQ ID NO. 29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42。

图 6 为代表性 Tumstatin- 连接肽-CD 137L 蛋白样品经稀释复性后进行的 SDS-PAGE 电泳结果图。其中，第 1 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.25；第 2 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.26；第 3 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.27；第 4 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.37；第 5 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.38；第 6 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.41；第 7 与第 10 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.43；第 8 与第 11 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.44；第 9 与第 12 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.48；第 13 与第 15 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.45；第 14 与第 16 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.46；第

17 与第 18 泳道样品氨基酸序列为 SEQ ID NO.47 。

图 7 为代表性 Tumstatin- 连接肽-CD137L 蛋白样品对人脐静脉内皮细胞增殖的影响。

图 8 为代表性 Tumstatin- 连接肽-CD137L 蛋白样品对小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响。

#### 具体实施方式

下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述：

本发明共设计 24 种具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的双功能重组蛋白，其核苷酸序列为 SEQ ID NO.1 至 SEQ ID NO.24 所示序列，翻译编码氨基酸序列为 SEQ ID NO.25 至 SEQ ID NO.48 所示序列。该组蛋白具有 Tumstatin1 第 45 位至第 98 位氨基酸片段、Tumstatin2 第 60 位至第 132 位氨基酸片段、Tumstatin3 第 60 位至第 98 位氨基酸片段或 Tumstatin7 第 74 位至第 98 位氨基酸片段与 CD137L 胞外区蛋白氨基酸序列（CD137L1 第 46 位至第 254 位氨基酸片段，CD137L5 第 83 位至第 254 位氨基酸片段，CD137L6 第 46 位至第 85 位氨基酸和第 167 位至第 254 位氨基酸的接合片段中的一种，两者通过柔性连接肽连接融合而成，其中连接肽氨基酸序列如 SEQ ID NO.69 至 SEQ ID NO.76 所示。本发明在连接有上述 Tumstatin 活性片段基因和连接肽基因的核苷酸序列的（如 SEQ ID NO.81-SEQ ID NO.94 所示）的 5' 端和 3' 设计 EcoRI 和 BamHI 酶切位点，交由上海捷瑞生物工程有限公司进行全合成，并连入具有相应酶切位点 pBluescriptII SK(+) 载体，重组载体由上海捷瑞生物工程有限公司提供。

各类表达载体由 Novagen 公司购得，Top10 和 BL21 (DE3) 菌株由 Invitrogen 公司购得。pMD18-T 载体、溶液 I（货号：D103A）、逆转录酶、T4DNA 连接酶和 NdeI、NheI 等限制性内切酶均购自 TAKARA 公司。引物的合成和核苷酸序列测序由上海英骏生物技术有限公司完成。变性溶解和稀释复性所采用的尿素（分析纯）购自南京试剂化学制品有限公司。人脐静脉内皮细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。小鼠 T 细胞增殖试验所使用的 EasySep™ Negative Selection Kit 购自 Stem Cell 公司。抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。其他试剂均为国产分析纯。

实施例 1: 具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白 Tumstatin-CD137L 在大肠杆菌表达系统中的表达

##### 1. 表达系统的构建

共设计了 24 种具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的双功能重组蛋白，该蛋白为 Tumstatin1/Tumstatin2/Tumstatin3/Tumstatin7 和 CD137L1/CD137L4/CD137L5/CD137L6 与连接肽融合而成（图 1）。其中，CD137L1、CD137L4、CD137L5、CD137L6 分别来自 CD137L 全长氨基酸序列的 46-254 位氨基酸、50-240 位氨基酸、83-254 位氨基酸，以及 46-85 位氨基酸和 167-254

位氨基酸 (图 2)。该蛋白核苷酸序列为 SEQ ID NO.1 至 SEQ ID NO.24 所示序列, 翻译编码氨基酸序列为 SEQ ID NO.25 至 SEQ ID NO.48 所示序列, 连接肽选自 SEQ ID NO.69 至 SEQ ID NO.76 所示序列中的一种。

编码 CD137L 胞外区蛋白 (CD137L1 第 46 位至 254 位氨基酸片段, CD137L4 第 50 位至第 240 位氨基酸片段, CD137L5 第 83 位至第 254 位氨基酸片段, CD137L6 第 46 位至第 85 位氨基酸和第 167 位至第 254 位)氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO.61- SEQ ID NO.64 所示, 采用 PCR 方法扩增得到, 其中, CD137L 全长序列模板参考文献 (Wang shuzhen. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012 Mar;39(3):471-6. doi: 10.1007/s10295-011-1045-1. ) 中公开的方法制备得到。

以上述文献中提及方法制备本专利所用的 CD137L 模板。以 SEQ ID NO. 61 的上游引物 (SEQ ID NO.95) 和 SEQ ID NO. 61 的下游引物 (SEQ ID NO.96) 为引物, rTaqDNA 聚合酶催化扩增得到 CD137L1 (SEQ ID NO. 61) 基因片段 (此时该基因两端酶切位点分别为 5' BamHI 和 3' NotI), 并将该产物连至 pMD18-T 载体。随后通过酶切连接等常规分子生物学手段, 将 CD137L1 基因片段从 pMD18-T 载体上切下连接至由捷瑞公司全合成的已含有 Tumstatin 和连接肽 (SEQ ID NO. 87- SEQ ID NO.94) 的 pBluescriptII SK(+) 载体上。到这一步, 已将完整的融合蛋白基因 (SEQ ID NO.5- SEQ ID NO.12) 整合在 pBluescriptII SK(+) 载体上。之后选用上游引物 SEQ ID NO.97, 下游引物 SEQ ID NO.98, 通过 PCR 的方法扩增该融合蛋白基因, 产物 5' 酶切位点为 NheI, 产物 3' 酶切位点为 NdeI, 最终连接至表达载体 pET11a。

以上述文献中提及方法制备本专利所用的 CD137L 模板。以 SEQ ID NO. 62 的上游引物 (SEQ ID NO.99) 和 SEQ ID NO. 62 的下游引物 (SEQ ID NO. 100) 为引物, rTaqDNA 聚合酶催化扩增得到 CD137L5 (SEQ ID NO. 62) 基因片段 (此时该基因两端酶切位点分别为 5' BamHI 和 3' NotI), 并将该产物连至 pMD18-T 载体。随后通过酶切连接等常规分子生物学手段, 将 CD137L5 基因片段从 pMD18-T 载体上切下连接至由捷瑞公司全合成的已含有 Tumstatin 和连接肽 (SEQ ID NO.81- SEQ ID NO. 86) 的 pBluescriptII SK(+) 载体上。到这一步, 已将完整的融合蛋白基因 (SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3, SEQ ID NO. 13- SEQ ID NO. 16) 整合在 pBluescriptII SK(+) 载体上。之后选用 SEQ ID NO.1 上游引物 SEQ ID NO. 101、SEQ ID NO.3 上游引物 SEQ ID NO. 102、SEQ ID NO. 13- SEQ ID NO. 14 上游引物 SEQ ID NO. 103、SEQ ID NO.15- SEQ ID NO.16 上游引物 104, SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO.3, SEQ ID NO. 13- SEQ ID NO.16 下游引物 SEQ ID NO.105, 通过 PCR 的方法扩增该融合蛋白基因, 产物 5' 酶切位点为 NheI, 产物 3' 酶切位点为 NdeI, 最终连接至表达载体 pET11a。

以上述文献中提及方法制备本专利所用的 CD137L 模板。以 SEQ ID NO.63 的上游引物 1 (SEQ ID NO.106)^P SEQ ID NO. 63 的下游引物 1(SEQ ID NO.107) 为引物 ,以 SEQ ID NO. 63 的上游引物 2 (SEQ ID NO. 108) 和 SEQ ID NO.63 的下游引物 2 (SEQ ID NO. 109) 为引物 , rTaqDNA 聚合酶催化扩增得到 CD137L6 (SEQ ID NO.63 ) 的两个基因片段 ,琼脂糖电泳切胶回收该两段基因。随即使用分子生物学 OverlapPCR 技术 ,将回收得到的两段基因用做模板 ,以 CD137L6 的上游引物 1 (SEQ ID NO. 107) 和 CD137L6 的下游引物 2 (SEQ ID NO. 109) 为引物 ,扩增出最终的 CD137L6 (SEQ ID NO.63 ) 片段 (两端酶切位点 5' BamHI 和 3' NotI) 并连接至 pMD18-T 载体。随后将 CD137L6 (SEQ ID NO.63 ) 基因片段从 pMD18-T 载体上切下连接至由上海捷瑞公司合成的已含有 Tumstatin 和连接肽 (SEQ ID NO.8U SEQ ID NO. 82、SEQ ID NO. 84、SEQ ID NO. 86) 的 pBluescriptII SK(+) 载体上。到这一步 ,已把完整的融合蛋白基因 (SEQ ID NO.2 、SEQ ID NO.4, SEQ ID NO. 17-18) 整合在 pBluescriptII SK(+) 载体上。之后分别选用 SEQ ID NO.2 、SEQ ID NO.4 上游引物 SEQ ID NO. 110 、SEQ ID NO. 17 上游引物 SEQ ID NO.111 、SEQ ID NO.18 上游引物 SEQ ID NO.112, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4 、SEQ ID NO.17 、SEQ ID NO.18 下游引物 SEQ ID NO.113, 通过 PCR 的方法扩增该融合蛋白基因 (SEQ ID NO.2 、SEQ ID NO.4, SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO.18), 并连接至最终表达载体 pETIIa 。

上述实验操作过程中涉及到的引物有 :

SEQ ID NO. 61 的上游引物

5' -GGATCCGCGTCTTCCTCGCCTGCC-3' , (下划线部分为 BamHI 酶切位点 )

SEQ ID NO. 61 的下游引物

5' -GCGGCCGC TTCCGACCTCGGTGAAGGGAGT-3' (下划线部分为 NotI 酶切位点 )

融合蛋白基因 (SEQ ID NO.5- SEQ ID NO. 12) 的上游引物

5' -GCTAGC ACAATGCCATTCTTATTCTGCAATG-3' (下划线部分为 NheI 酶切位点 )

融合蛋白基因 (SEQ ID NO.5- SEQ ID NO. 12) 的下游引物

5' -CATATG TTCCGACCTCGGTGAAGGGAGTCCG-3' (下划线部分为 NdeI 酶切位点 )

SEQ ID NO. 62 的上游引物

5' -CGGGATCC GCCTCTTGACCTGCGGCAG-3' (下划线部分为 BamHI 酶切位点 )

SEQ ID NO. 62 的下游引物

5' -GCGGCCGC TTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3' (下划线部分为 NotI 酶切位点 )

SEQ ID NO.1 上游引物

5' -GCTAGC GGTTCCTTTCTTATTTGTTCAAG-3 ' (下划线部分为 NheI 酶切位点)

SEQ ID NO.3 上游引物

5' -GCTAGC GGTTCCTTTCTTATTTGTTCAAG-3 ' (下划线部分为 NheI 酶切位点)

SEQ ID NO. 13- SEQ ID NO. 14 上游引物

5' -GCTAGCC AAGATTAGGTACTTTGGGCTCTT-3 ' (下划线部分为 NheI 酶切位点)

SEQ ID NO. 15- SEQ ID NO. 16 上游引物

5' -GCTAGC AAGAGCCCAAAGTACCTAAATCTTG-3 ' (下划线部分为 NheI 酶切位点)

SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO.3, SEQ ID NO. 13- SEQ ID NO. 16 下游引物

5, -CATATGTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3, (下划线部分为 NdeI 酶切位点)

SEQ ID NO.63 的上游引物 1

5' -CGGGATCCGCCGCTTCCTCGCCTGC-3, (下划线部分为 BamHI 酶切位点)

SEQ ID NO.63 的下游引物 1

5, -CGCAAACATGCCCTGCCCTG-3 '

SEQ ID NO.63 的上游引物 2

5, -CAGGGCAGGGCATGTTTGCGGGTTTCCAGGGCCGCTTGC -V

SEQ ID NO.63 的下游引物 2

5, -GCGGCCGCTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG -3, (下划线部分为 NotI 酶切位点)

SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4 上游引物

5' -GCTAGC GGTTCCTTTCTTATTTGTTCAAG-3 ' (下划线部分为 NheI 酶切位点)

SEQ ID NO. 17 上游引物

5' -GCTAGCCAAGATTAGGTACTTTG-3, (下划线部分为 NheI 酶切位点)

SEQ ID NO.18 上游引物

5, -GCTAGCCAAGATTAGGTACTTTGGGCTCTT-3, (下划线部分为 NheI 酶切位点)

SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO. 18 下游引物

5' -CATATGTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3, (下划线部分为 NdeI 酶切位点)

上述 PCR 扩增条件均为：

94 V 5min

94 V 1min, 60 °C 30s, 72 °C 30s, 30 cycles

72 °C 5min,

4 °C ∞, Hold

将 PCR 产物回收后,与 pMD-18T 载体连接,体系为 pMD-18T 1 $\mu$ L,目的片段 4 $\mu$ L,溶液 I 5 $\mu$ L,连接反应条件为 16 $^{\circ}$ C,反应时间为 16h。化学氯化钙法转化大肠杆菌 Top10 菌株。在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养 12h 后挑取单克隆,提取质粒后用限制性内切酶 NdeI 和 NheI 进行双酶切鉴定。经酶切验证正确的菌落送交上海英骏生物技术有限公司测序,以确定基因序列的正确性。将测序正确的目的片段与原核表达载体 pET11a 连接,反应体系为 T4 连接酶 10X 缓冲液 1 $\mu$ L, pET11a 1 $\mu$ L,目的基因 7 $\mu$ L, T4 连接酶 1 $\mu$ L,反应条件为 16 $^{\circ}$ C, 16h。双酶切验证后,转化入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3)。

### 重组蛋白的表达

在超净台中,向含 100 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中分别加入 1mL 上述保存的含有目的基因质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌种至 100mL 菌液中,置于摇床上,37 $^{\circ}$ C, 250rpm 条件下过夜培养。将活化后的种子培养基转接到无菌 LB 培养基中,于 OD<sub>600</sub> 值为 0.9 时加入 IPTG,诱导剂浓度为 100 $\mu$ M, 37 $^{\circ}$ C 培养 8h 后室温离心收菌,转速 12000rpm, 30min。菌体湿重 1g 加入 10mL PBS 吹悬,加入高压破细胞仪中裂解细胞,收集流出液,4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 30min 离心,弃上清,留沉淀做 SDS-PAGE 分析。

SDS-PAGE 实验操作流程如下所示:

- 1) 每管各取适量裂解菌体沉淀于 EP 管中,用 1mL ddH<sub>2</sub>O 洗涤,离心 12000rpm, 1min, 弃上清,再用 100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 重悬。
- 2) 取 20  $\mu$ L 重悬菌液加 5  $\mu$ L 5X SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水浴 5min。
- 3) 参照《分子克隆手册》灌制 SDS-PAGE 胶,5%浓缩胶,12%分离胶,1X Tris-Gly 蛋白电泳缓冲液。
- 4) 各取 20  $\mu$ L 上清液上样,进行电泳,参数为恒压 90V, 30min 而后 130V, 1h。电泳结束后取下 SDS-PAGE 胶,考马斯亮蓝染色 1-2h。取出后用去离子水冲洗三次,置脱色液中浸泡过夜。
- 5) 蛋白电泳结果详见附图。与阴性对照相比,经过诱导之后,阳性菌种得到了显著表达。具体表达情况见图 3 所示。由图可见以上所述蛋白均已在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达。

### 3. 重组蛋白的纯化

#### 包涵体复性研究

采用上述方法收集高压破碎后所得的菌体沉淀,经过洗涤液 A 和 B 反复洗涤 2 次,12000rpm, 10min, 离心弃上清,收集备用。洗涤液 A 的配方为 20mM Tris-HCL, pH8.5, 2M 尿素, 2% TritonX-100; 洗涤液 B 配方为 20mM Tris-HCL, pH8.5, 2M 尿素, 5mM EDTA。洗涤完毕后

用溶解液 (20mM Tris, pH8.5, 8M 尿素) 于 50°C 过夜变性。经过完全变性后, 在 4°C 层析柜中将变性液通过恒流装置加入复性溶液中, 整个过程在缓慢搅动中持续 12h。复性溶液配方为, 20mM Tris-HCL pH8.5, 2M 尿素, 0.4-0.6M L-Arg, 1mM EDTA。将所得含有样品的复性溶液进行浓缩、置换。浓缩使用的装置为 Millipore 公司的 Amicon Ultra-15 浓缩管, 4500rpm, 30min, 4°C。同时将浓缩液置换至 pH7.4, 100mM PBS 缓冲液中, 最终体积为 1mL。4°C 保藏备用 (图 6)。经测算, 复性后目的产物的纯度达 80% 以上, 由图可见以上所述变性包涵体蛋白复性情况良好。

实施例 2: 具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白 Tumstatin-CD137L 在枯草芽孢杆菌表达系统中的表达

### 1. 表达系统的构建

使用实施例 1 中构建好的包含完整重组蛋白基因序列 (SEQ ID NO.1-24) 的 pBluescriptII SK(+) 载体为模板, 通过设计不同引物 (5' PstI、3' HindIII) 并进行 PCR, 扩增连在 pBluescriptII SK(+) 载体上的不同融合蛋白基因并将该完整片段连接至表达载体 pP43 (连接实验前需 PstI、HindIII 双酶切该载体)。PCR 以及酶切连接等操作步骤同实施例 1 中融合蛋白基因的构建部分。待表达载体构建完毕, 即进行电转操作 (具体方法详见 Bio-Rad 电转仪使用说明), 完成枯草芽孢杆菌表达系统 WB800 重组菌株的构建。

### 2. 重组蛋白的表达

种子液的培养 在超净台中, 向含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中分别加入 10  $\mu$ L 上述保存的含有目的基因质粒的枯草芽孢杆菌 WB800 菌种至 5mL 试管培养基中, 置于摇床上, 37°C, 250rpm 条件下培养 12h。重组 WB800 发酵 将活化后的种子菌液按 10% 的转接量转接到含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素无菌 2XYT 培养基中, pH7.0, 37°C 培养 96h 后 4°C 低温离心收集上清同时取样做 SDS-PAGE 分析。

### 3. 重组蛋白的纯化

重组蛋白的纯化采用 GE 公司的 DEAE 阴离子交换法纯化该目的蛋白, 纯化缓冲液为 PBS 磷酸盐缓冲液, pH8.5。

实施例 3: 具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白 Tumstatin-CD137L 在酵母表达系统中的表达

### 1. 表达系统的构建

将整合在 pBluescriptII SK(+) 载体上的不同融合蛋白基因 (SEQ ID NO. 1-24) 用 EcoRI 和 NotI 双酶切并连接至 pPIC9K, 完成载体构建工作。随后进行电转操作 (具体方法详见 Bio-Rad

电转仪使用说明),完成毕赤酵母 GS115 重组菌株的构建。

## 2. 重组蛋白的表达

使用 BMGY 富集菌体, BMMY 诱导表达的策略来发酵获得目的产物。第一天将按上述方法构建完成的表达菌株接菌至 YPD 种子培养基, 37°C 过夜培养。第二天转移适量种子培养液至 BMGY 培养基中, 生长 48h, 待 OD600 为 10 时, 将培养基更换为 BMMY, 诱导表达 96h, 12,000rpm30min 离心收集上清同时取样做 SDS-PAGE 分析。

## 3. 重组蛋白的纯化

重组蛋白的纯化采用 GE 公司的 DEAE 阴离子柱进行离子交换纯化分析。磷酸盐缓冲液体系下 pH 为 8.5, 产物纯度可达 80% 以上。

实施例 4: 具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能的重组蛋白对人脐静脉内皮细胞增殖的影响。

1) 细胞培养: 人脐静脉内皮细胞系 (HUVEC) 用含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素及 100U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 在 37°C, 5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养, 2~3 天待细胞贴壁长满后传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2) MTT 比色法测定: 取对数生长期细胞, 以每孔 5000 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔加入细胞悬液 100 μL, 在细胞培养箱中培养 12h, 待细胞贴壁后加入 100 μL 不同浓度蛋白样品, 阳性对照为 TNP-470, 阴性对照组加入相同体积的 PBS, 每组设置 3 个复孔, 分别处理 48h。培养结束前 4h 于 96 孔培养板中每孔加入 5mg/mL 的 MTT 液 20 μL, 置细胞培养箱中继续培养 4h 后轻轻吸去培养基, 然后每孔加入 DMSO 150 μL, 震荡 10min 使蓝紫色沉淀充分溶解。用酶标仪测定吸光值 (A490)。

实验结果如图 7 所示, 其中, TNP-470 为阳性对照, "115" 为 TumstatinI- 连接肽 1-CD137L5 (SEQ ID NO.25), "155" 为 TumstatinI- 连接肽 5-CD137L5 (SEQ ID NO.27), "116" 为 TumstatinI- 连接肽 1-CD137L6 (SEQ ID NO.26), "215" 为 Tumstatin2- 连接肽 1-CD137L5 (SEQ ID NO.37), "255" 为 Tumstatin2- 连接肽 5-CD137L5 (SEQ ID NO.38), "256" 为 Tumstatin2- 连接肽 5-CD137L6 (SEQ ID NO.41), "711" 为 Tumstatin7- 连接肽 1-CD137L1 (SEQ ID NO.29), "721" 为 Tumstatin7- 连接肽 2-CD137L1 (SEQ ID NO.30), "731" 为 Tumstatin7- 连接肽 3-CD137L1 (SEQ ID NO.31), "741" 为 Tumstatin7- 连接肽 4-CD137L1 (SEQ ID NO.32), "751" 为 Tumstatin7- 连接肽 5-CD137L1 (SEQ ID NO.33), "761" 为 Tumstatin7- 连接肽 6-CD137L1 (SEQ ID NO.34), "771" 为 Tumstatin7- 连接肽 7-CD137L1 (SEQ ID NO.35), "781" 为 Tumstatin7- 连接肽 8-CD137L1 (SEQ ID NO.36), "114" 为 TumstatinI- 连接肽 1-CD137L4 (SEQ ID NO.43), "214" 为 Tumstatin2- 连接肽 1-CD137L4 (SEQ ID NO.44), "314" 为 Tumstatin3-



连接肽 1-CD137L4( SEQ ID N0.45) , " 154" 为 Tumstatin1- 连接肽 5-CD137L4( SEQ ID N0.46), "254" 为 Tumstatin2- 连接肽 5-CD137L4 ( SEQ ID N0.47), "354" 为 Tumstatin3- 连接肽 5-CD137L4 ( SEQ ID N0.48) 。上述结果表明所选的代表性具有 Tumstatin 和 CD137L 功能的重组蛋白对人脐静脉内皮细胞显示出抑制效应, 其中 SEQ ID N0.26 、SEQ ID N0.37, SEQ ID N0.4U SEQ ID NO.30, SEQ ID N0.31 显示出的抑制效应高于阳性对照。

实施例 5: 具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能的重组蛋白对小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖的影响。

按照 Stemcell 公司的 EasySep Negative Selection Mouse T cell Enrichment Kit 试剂盒说明书来操作。从小鼠脾脏中分离获得纯化的 T 细胞群体。人 CD3 单克隆抗体按 7.5  $\mu$ g/mL 包被 96 孔板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 第 2 天加入分离的小鼠脾脏 T 细胞 100ul/ 孔 ( $10^5$  个), 共分成 4 个实验组: 1) 未加任何抗体刺激的 T 细胞空白组 (Medium +T cell); 2) 抗 CD3 (7.5  $\mu$ g/mL) 和抗 CD28 单克隆抗体 (2.5  $\mu$ g/mL) 联合刺激组(CD3/CD28); 3) 抗 CD137 单抗联合抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体刺激组(CD3/CD28/anti-CD137mAb); 4) 融合蛋白样品分别联合抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体刺激组(CD3/CD28/Tumstatin1-CD137L) 每组置 3 个复孔。培养 92h 后, 每孔加 100  $\mu$ L alamar blue, 12h 后测吸光度 A570 值, 以 A600 为参照。实验结果如图 8 所示, 其中, " 115" 为 Tumstatin1- 连接肽 1-CD137L5 (SEQ ID N0.25), " 155" 为 Tumstatin1- 连接肽 5-CD137L5 (SEQ ID N0.27), " 116" 为 Tumstatin1- 连接肽 1-CD 137L6 (SEQ ID N0.26), "215 " 为 Tumstatin2- 连接肽 1-CD137L5 (SEQ ID N0.37), "255 " 为 Tumstatin2- 连接肽 5-CD137L5 (SEQ ID N0.38), "256" 为 Tumstatin2- 连接肽 5-CD137L6 (SEQ ID NO.41 ), "711 " 为 Tumstatin7- 连接肽 1-CD137L1 (SEQ ID N0.29), "721 " 为 Tumstatin7- 连接肽 2-CD137L1 (SEQ ID NO.30), "731 " 为 Tumstatin7- 连接肽 3-CD137L1 (SEQ ID NO.31 ), "741 " 为 Tumstatin7- 连接肽 4-CD137L1 (SEQ ID N0.32), "751 " 为 Tumstatin7- 连接肽 5-CD137L1 (SEQ ID N0.33 ), "761 " 为 Tumstatin7- 连接肽 6-CD137L1 (SEQ ID N0.34), "771 " 为 Tumstatin7- 连接肽 7-CD137LK SEQ ID N0.35) , "781 " 为 Tumstatin7- 连接肽 8-CD137LK SEQ ID N0.36), " 114" 为 Tumstatin1- 连接肽 1-CD137L4 (SEQ ID N0.43 ), "214" 为 Tumstatin2- 连接肽 1-CD137L4 (SEQ ID N0.44), " 314" 为 Tumstatin3- 连接肽 1-CD137L4 (SEQ ID N0.45), " 154" 为 Tumstatin1- 连接肽 5-CD137L4 (SEQ ID N0.46), "254" 为 Tumstatin2- 连接肽 5-CD137L4 (SEQ ID N0.47), "354" 为 Tumstatin3- 连接肽 5-CD137L4 (SEQ ID N0.48) 。结果表明所选的代表性具有 Tumstatin 和 CD137L 功能的重组蛋白在终浓度为 2  $\mu$ g/mL 时对 T 细胞的增殖作用显著高于 "CD3+CD28" 协同刺激组, 证明 CD137L 和 CD28 具有协同效应。由此表明, 本发明所获得的代表性具有 Tumstatin 和 CD137L 功能的重组蛋白具有良好的协同刺激 T 细。

增殖的生物学活性。

以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式，是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能因此理解为本发明的具体实施只局限于这些说明。除此之外，实施例仅选取了不同活性位点的 Tumstatin 基因与 CD137L 胞外区相连接，不能理解为本发明中的 Tumstatin 基因只与 CD137L 胞外区相连接，其也能够与其他蛋白或多肽相连接，或者不与其他蛋白基因相连接。对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，对实施例做出的若干简单推演或替换，都应视为属于本发明的保护范围。

1. 一种具有 Tumstatin 和 CD137L 活性的双功能重组蛋白,其特征在于该蛋白具有 Tumstatin 活性片段氨基酸序列和 CD137L 胞外区蛋白片段氨基酸序列,所述 Tumstatin 活性片段氨基酸序列和 CD137L 胞外区蛋白片段氨基酸序列通过柔性连接肽融合而成,所述 Tumstatin 活性片段氨基酸序列选自 SEQ ID NO.65 至 SEQ ID NO.68 中的一种,所述连接肽氨基酸序列选自 SEQ ID NO.69 至 SEQ ID NO.76 中的一种,所述 CD137L 蛋白胞外区片段氨基酸序列选自 SEQ ID NO.77 至 SEQ ID NO.80 所示的氨基酸序列中的一种。
2. 如权利要求 1 所述的双功能重组蛋白,其特征在于具有 SEQ ID NO.25 至 SEQ ID NO.48 之一的氨基酸序列。
3. 编码如权利要求 1 所述的双功能重组蛋白基因,其特征在于由编码 Tumstatin 活性片段的基因、编码连接肽的基因和编码 CD137L 蛋白胞外区片段的基因组成,所述编码 Tumstatin 活性片段的基因选自 SEQ ID NO.49 至 SEQ ID NO.52 中的一种、所述编码连接肽的基因选自 SEQ ID NO.53 至 SEQ ID NO.60 中的一种、所述编码 CD137L 蛋白胞外区片段的基因选自 SEQ ID NO.61 至 SEQ ID NO.64 中的一种。
4. 编码如权利要求 1 所述的双功能重组蛋白基因,其特征在于具有 SEQ ID NO.1 至 SEQ ID NO.24 之一的核苷酸序列。
5. 一种具有 Tumstatin 和 CD137L 活性的双功能重组蛋白的基因,其特征在于与权利要求 3-4 所述任一项的核苷酸序列相比具有 70% 及以上的同源性。
6. 一种如权利要求 1 所述的具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能重组蛋白的制备方法,其特征在于包括如下步骤:
  - (1) 设计得到如权利要求 3-5 任一项所述的核苷酸序列;
  - (2) 构建含如权利要求 3-5 任一项所述的核苷酸序列表达系统,包括构建表达载体并将表达载体转化入宿主细胞,形成可表达如权利要求 1 所述的具有 Tumstatin 活性与 CD137L 活性的重组蛋白的重组细胞;
  - (3) 培养步骤 (2) 重组细胞;
  - (4) 分离纯化得到如权利要求 1 所述的具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能重组蛋白。
7. 如权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于所述表达系统为原核表达系统或真核表达系统,所述原核表达系统选自大肠杆菌表达系统或芽孢杆菌表达系统;所述真核表达系统选自酵母表达系统。
8. 如权利要求 1 所述的具有 Tumstatin 和 CD137L 双功能重组蛋白在制备抑制肿瘤微环境血管再生、各种肿瘤相关疾病、调节机体免疫力、T 细胞增殖和机体细胞因子的合成与分泌

物中的应用。



图 1

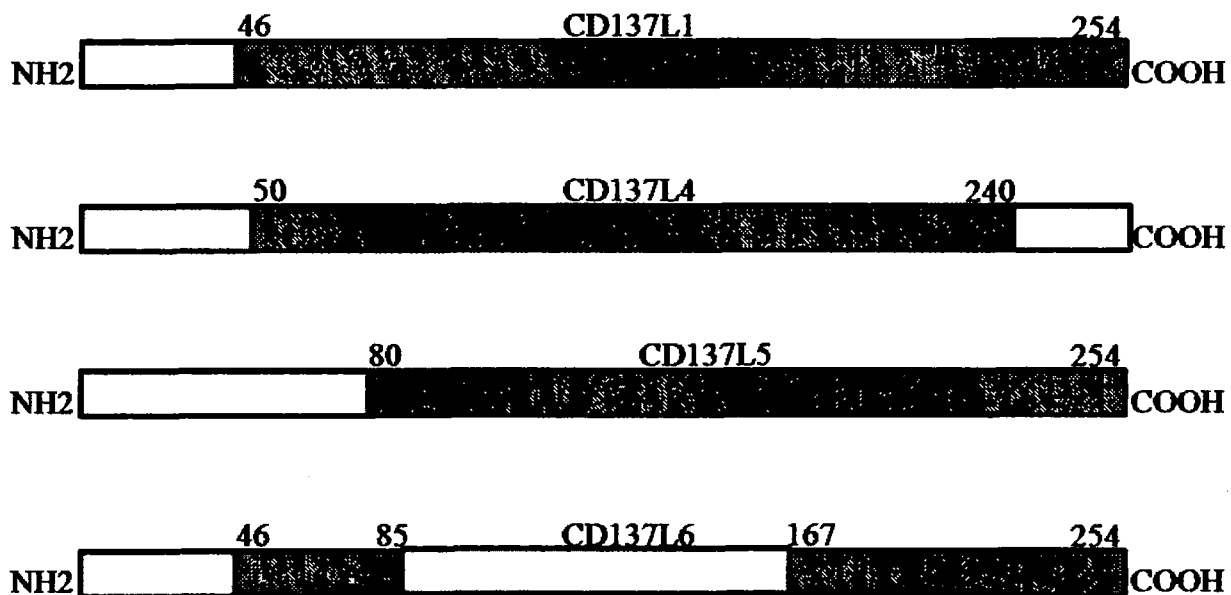


图 2

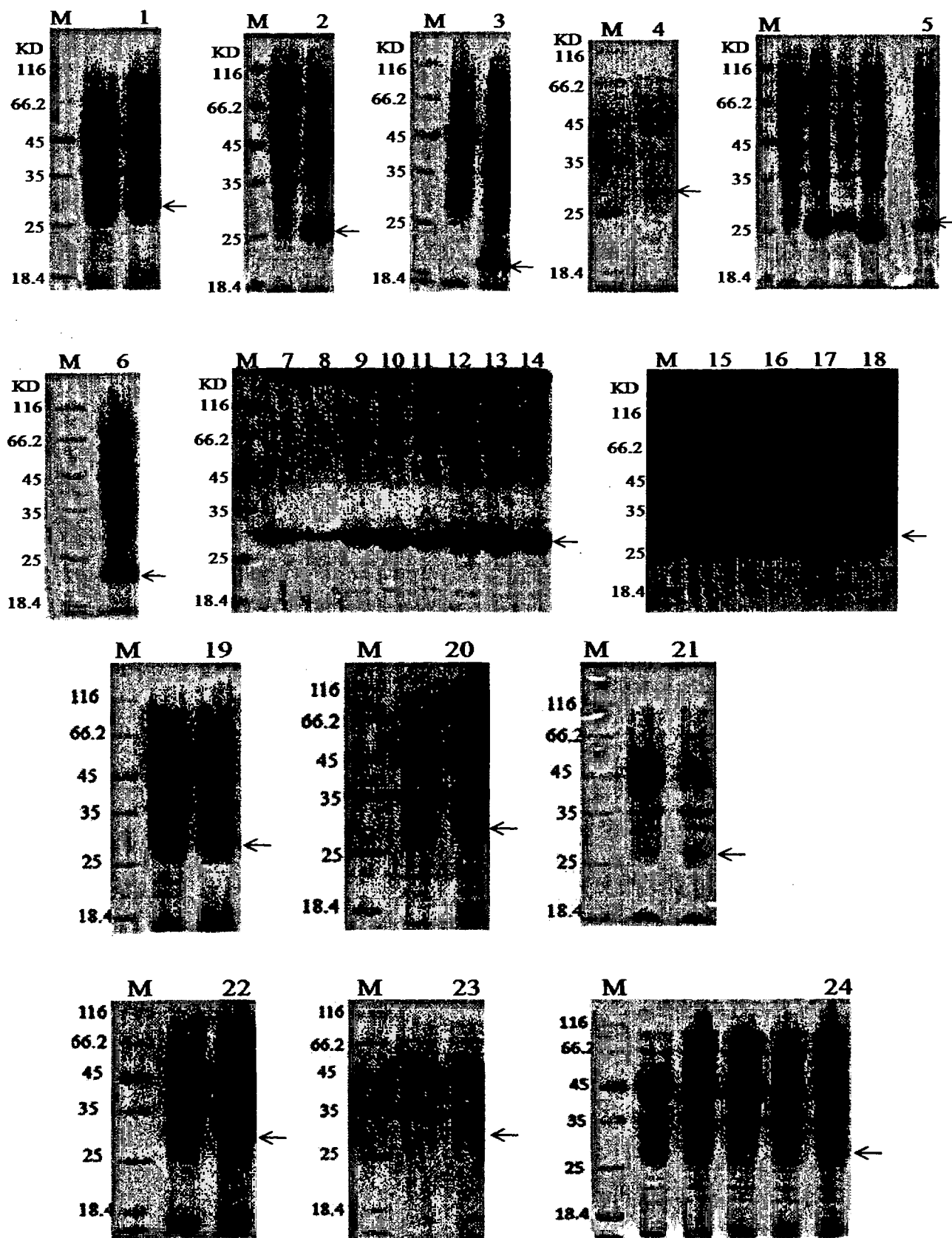


图 3

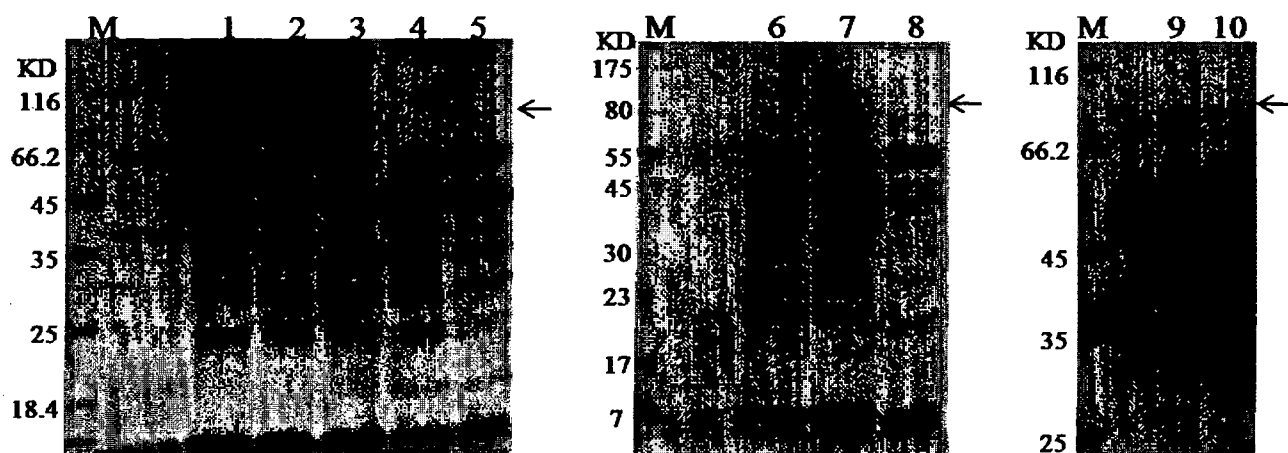


图 4

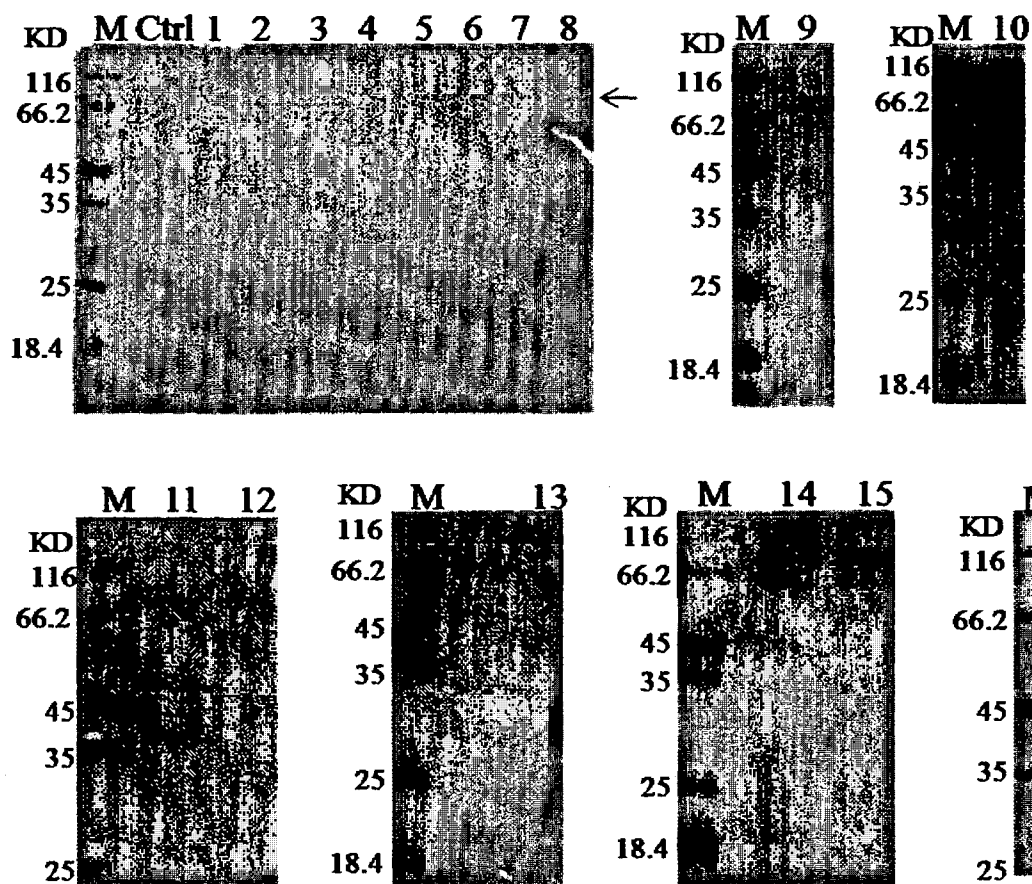


图 5

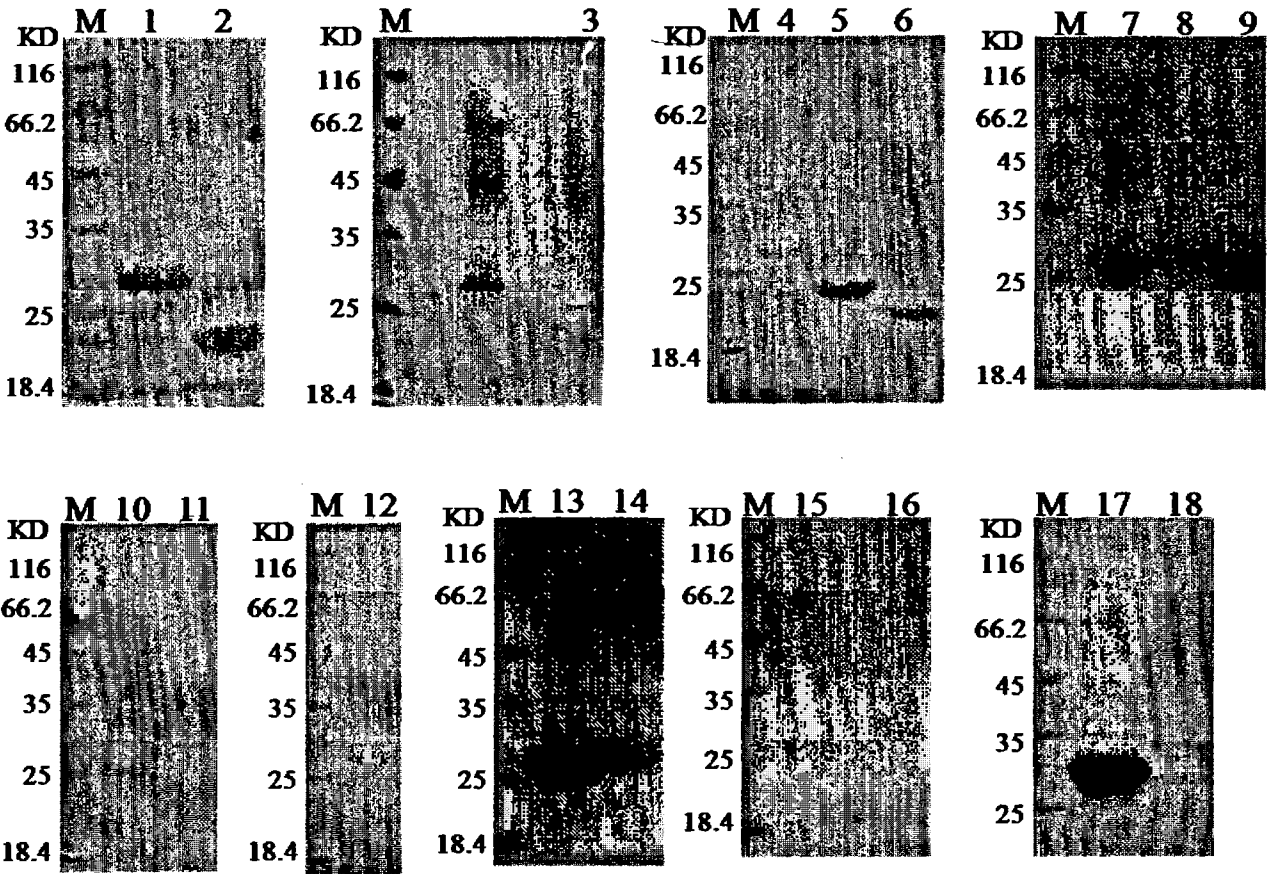


图 6



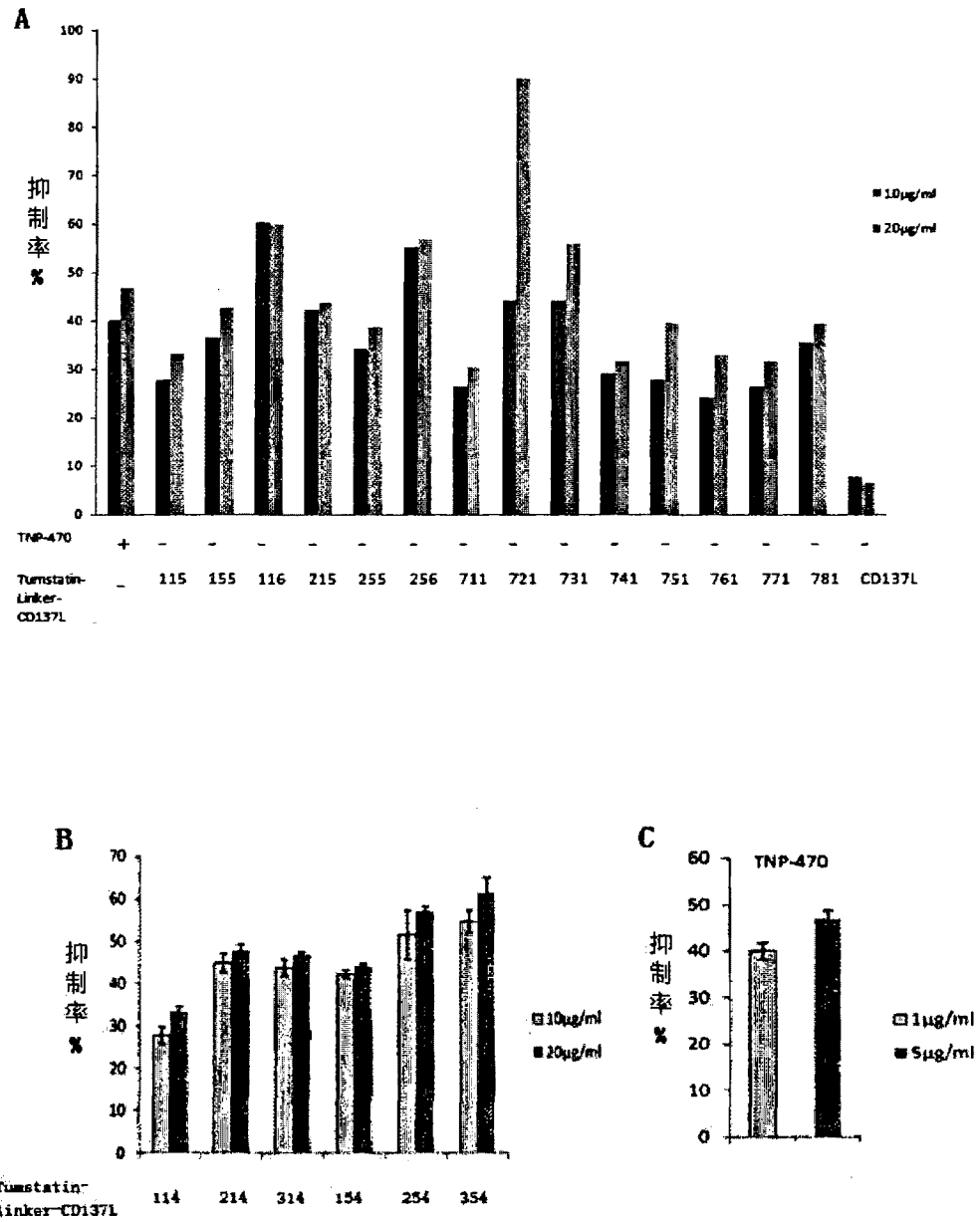


图 7

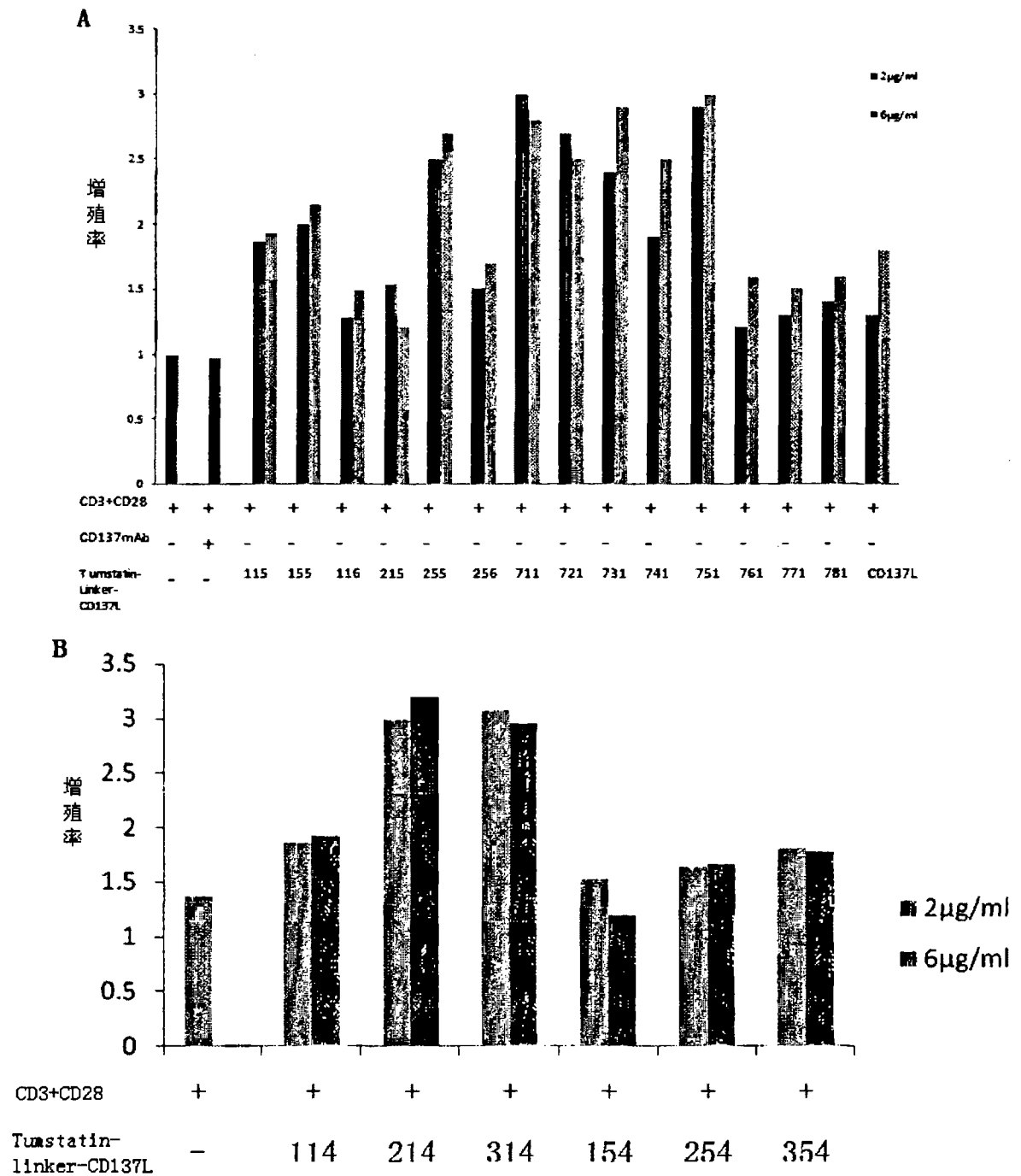


图 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/076768

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 38/17 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; A61P 37/02 (2006.01) i; A61P 35/00 (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

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)

CNKI, CNPAT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, CA, ELSEVIER, EMBASE and searched terms:

Tumstatin, CD137, CD137L, 4-1BB, 4-1BBL etc.;

GENBANK, EMBL, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched sequences: SEQ ID NOs: 65-80, 49-64

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101265482 A (YAO, Lijuan et al.) 17 September 2008 (17.09.2008) the abstract, claims 1-7, description, pages 6 to 20, embodiments	1-8
Y	CA 2814597 A I (ADAMED SP ZOO) 12 July 2012 (12.07.2012) the abstract, claims 1-6 and SEQ ID NO: 18	1-8
Y	CA 283 1820 A I (UNIV STUTTGART) 04 October 2012 (04.10.2012) the abstract, claims 1-4 and SEQ ID NO: 31	1-8

☒ 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

11 July 2014

Date of mailing of the international search report

06 August 2014

Name and mailing address of the ISA

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

YUE, Lixi

Telephone No. (86-10) 62411096

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/076768

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 103232543 A (UNIV CHINA PHARM) 07 August 2013 (07.08.2013) claims 1-11	1-8
PX	CN 103214584A (UNIV CHINA PHARM) 24 July 2013 (24.07.2013) claims 1-11	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2014/076768

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101265482 A	17 September 2008	None	
CA 2814597 A I	12 July 2012	IL 226205 DO	31 July 2013
		WO 2012093158 A I	12 July 2012
		PL 393578 A I	16 July 2012
		MX 2013007872 A	30 July 2013
		US 2013288963 A I	31 October 2013
		AU 2012204900 A I	02 May 2013
		JP 2014504868 A	27 February 2014
		KR 20140036143 A	25 March 2014
		CN 103228788 A	31 July 2013
		EP 2661496 A I	13 November 2013
		EA 201391005 A I	29 November 2013
		SG 190049 A I	28 June 2013
CA 2831820 A I	04 October 2012	JP 2014511679 A	19 May 2014
		EP 2694550 A I	12 February 2014
		WO 2012130471 A I	04 October 2012
		AU 2012237456 A I	24 October 2013
CN 103232543 A	07 August 2013	None	
CN 103214584 A	24 July 2013	CN 103214584 B	09 July 2014

<b>A. 主题的分类</b> C07K 19/00 (2006. 01) i ; C12N 15/62 (2006. 01) i ; C12N 15/63 (2006. 01) i ; A61K 38/17 (2006. 01) i ; A61P 9/00 (2006. 01) i ; A61P 37/02 (2006. 01) i ; A61P 35/00 (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>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) C07K ; C12N ; A61K 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)) CNKI, CNPAT 和检索词: Tumstatin, CD137, CD137L, 4- 1BB, 4- 1BBL, 肿瘤抑制素, 肿瘤抑制素 DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, CA, ELSEVIER, EMBASE 和检索词: Tumstatin, CD137, CD137L, 4- 1BB, 4- 1BBL 等 GENBANK, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统 SEQ ID NOs: 65-80, 49—64																				
<b>C. 相关文件</b> <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>Y</td> <td>CN 101265482 A (姚丽娟等) 2008 年 9 月 17 日 (2008 - 09 - 17) 摘要、权利要求 1-7、说明书第 6-20 页实施例</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CA 2814597 A1 (ADAMED SP ZOO) 2012 年 7 月 12 日 (2012 - 07 - 12) 摘要、权利要求 1-6、SEQ ID NO: 18</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CA 2831820 A1 (UNIV STUTTGART) 2012 年 10 月 04 日 (2012 - 10 - 04) 摘要、权利要求 1-4、SEQ ID NO: 31</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 103232543 A (中国药科大学) 2013 年 8 月 07 日 (2013 - 08 - 07) 权利要求 1-11</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 103214584 A (中国药科大学) 2013 年 7 月 24 日 (2013 - 07 - 24) 权利要求 1-11</td> <td>1-8</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	Y	CN 101265482 A (姚丽娟等) 2008 年 9 月 17 日 (2008 - 09 - 17) 摘要、权利要求 1-7、说明书第 6-20 页实施例	1-8	Y	CA 2814597 A1 (ADAMED SP ZOO) 2012 年 7 月 12 日 (2012 - 07 - 12) 摘要、权利要求 1-6、SEQ ID NO: 18	1-8	Y	CA 2831820 A1 (UNIV STUTTGART) 2012 年 10 月 04 日 (2012 - 10 - 04) 摘要、权利要求 1-4、SEQ ID NO: 31	1-8	PX	CN 103232543 A (中国药科大学) 2013 年 8 月 07 日 (2013 - 08 - 07) 权利要求 1-11	1-8	PX	CN 103214584 A (中国药科大学) 2013 年 7 月 24 日 (2013 - 07 - 24) 权利要求 1-11	1-8
类 型 *	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
Y	CN 101265482 A (姚丽娟等) 2008 年 9 月 17 日 (2008 - 09 - 17) 摘要、权利要求 1-7、说明书第 6-20 页实施例	1-8																		
Y	CA 2814597 A1 (ADAMED SP ZOO) 2012 年 7 月 12 日 (2012 - 07 - 12) 摘要、权利要求 1-6、SEQ ID NO: 18	1-8																		
Y	CA 2831820 A1 (UNIV STUTTGART) 2012 年 10 月 04 日 (2012 - 10 - 04) 摘要、权利要求 1-4、SEQ ID NO: 31	1-8																		
PX	CN 103232543 A (中国药科大学) 2013 年 8 月 07 日 (2013 - 08 - 07) 权利要求 1-11	1-8																		
PX	CN 103214584 A (中国药科大学) 2013 年 7 月 24 日 (2013 - 07 - 24) 权利要求 1-11	1-8																		
<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。																				
* 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 “V” 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 “?” 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 2014 年 7 月 11 日	国际检索报告邮寄日期 2014 年 8 月 06 日																			
ISA/CN 的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 中国 传真号 (86-10) 62019451	受权官员 岳礼溪 电话号码 (86-10) 6241 1096																			

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/076768

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	101265482	A	2008 年 9 月 17 日	无			
CA	2814597	A 1	2012 年 7 月 12 0	IL	226205	DO	2013 年 7 月 31 0
				WO	2012093158	AI	2012 年 7 月 12 0
				PL	393578	AI	2012 年 7 月 16 0
				MX	2013007872	A	2013 年 7 月 30 0
				US	2013288963	AI	2013 年 10 月 31 日
				AU	2012204900	AI	2013 年 5 月 02 0
				JP	2014504868	A	2014 年 2 月 27 0
				KR	20140036143	A	2014 年 3 月 25 0
				CN	103228788	A	2013 年 7 月 31 0
				EP	2661496	AI	2013 年 11 月 13 日
				EA	201391005	AI	2013 年 11 月 29 0
				SG	190049	AI	2013 年 6 月 28 0
CA	2831820	A 1	2012 年 10 月 04 日	JP	201451 1679	A	2014 年 5 月 19 0
				EP	2694550	AI	2014 年 2 月 12 0
				WO	2012130471	AI	2012 年 10 月 04 日
				AU	2012237456	AI	2013 年 10 月 24 日
CN	103232543	A	2013 年 8 月 07 日	无			
CN	103214584	A	2013 年 7 月 24 0	CN	103214584	B	2014 年 7 月 09 0