(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
2015 年 12 月 17 日 (17.12.2015)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2015/188334 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 31/18* (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/079675

(22) 国际申请日: 2014 年 6 月 11 日 (11.06.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中山大学 (SUN-YATSEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 张辉 (ZHANG, Hui); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。 耿冠男 (GENG, Guannan); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。

(74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司 (YOGO PATENT & TRADE MARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路 191 号中石化大厦 B 塔 3912 室, Guangdong 510620 (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, 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, 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,

[见续页]

(54) Title: TAT PROTEIN AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称 : 一种 Tat 蛋白及其制备方法和应用

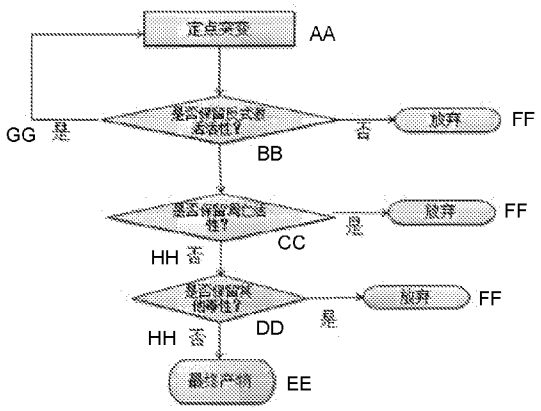


图 1 / FIG. 1

AA SITE-DIRECTED MUTAGENESIS
BB WHETHER TO RETAIN TRANS-ACTIVATION ACTIVITY OR NOT
CC WHETHER TO RETAIN APOPTOTIC ACTIVITY OR NOT
DD WHETHER TO RETAIN OTHER TOXICITY OR NOT
EE FINAL PRODUCT
FF GIVE UP
GG YES
HH NO

(57) Abstract: Disclosed is a Tat protein, the amino acid sequence of which is shown as SEQ NO:1, SEQ NO:2, SEQ NO:3 and SEQ NO:4. The Tat protein of the present invention has been studied and developed and can be a HIV-1 latent infection activating potential drug.

(57) 摘要: 一种 Tat 蛋白，所述的 Tat 蛋白的氨基酸序列如 SEQ NO:1、SEQ NO:2、SEQ NO:3、SEQ NO:4 所示。本发明的 Tat 蛋白能够作为 HIV-1 潜伏感染激活的潜在药物进行研究和开发。

WO 2015/188334 A1

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))。

一种 Tat 蛋白及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及一种抗病毒化合物，更具体地，涉及一种改良的 Tat 蛋白及其制备方法和应用。

背景技术

高效抗逆转录病毒治疗（Highly Active Antiretroviral Therapy，HAART）治疗可以有效地将病人体内的病毒数量控制到检测不到的程度，但是潜伏感染的 HIV-1（人类免疫缺陷病毒一型）前病毒整合进宿主的基因组中形成储存库以后很难去除。病人必须长期用药以抑制病毒复制，一旦撤药就会造成病毒复制的回弹。怎样清除 HIV-1 的潜伏感染已经成为彻底治愈艾滋病的瓶颈问题。

白介素 2（Interleukin 2 IL-2)和 anti-CD3 等细胞因子曾被用于激活 HIV-1 的潜伏感染，这些细胞因子使细胞在整体水平上发生了激活，对机体造成了极大的毒副作用。多种组蛋白乙酰化酶抑制剂（Histone Deacetylase inhibitor，HDACi）也是目前研究比较多的潜伏激活剂，一方面由于 HDACi 对基因的激活也是广谱效应，容易引起其他基因的异常表达，另一方面在体外效果比较好的 HDACi，如 valproc acid (VPA)和 Vorinostat (即 suberanilohydroxamic acid, SAHA)等，在临床上的表现都不佳，不能够投入实际应用。因此，寻找新的特异性强、高效而安全的潜伏激活剂是当务之急。

HIV-1 Tat 是 HIV-1 特异性的反式激活因子，该蛋白特异地结合到 HIV-1 5’ LTR 的 TAR 上，将 HIV-1 mRNA 的转录抬高数百倍。Tat 蛋白在 HIV-1 的潜伏感染中也是关键的因子。该蛋白带有穿膜肽，被证明具有高效穿过细胞膜的功能；曾被设计作为 HIV-1 的疫苗进入临床实验使用，对人体相对安全。但 Tat 蛋白被证明具有诱导凋亡的功能，可能对免疫细胞功能造成影响。

发明内容

本发明的目的之一就是寻找一种新的抗 HIV 途径，

首先提供一种 Tat 蛋白在制备抗 HIV 药物中的应用，本发明采用的是 TAT-86 来证明效果。

更进一步提供一种减毒 Tat 蛋白在制备抗 HIV 药物中的应用，所述的减毒 Tat 蛋白氨基酸序列 SEQ NO:1、SEQ NO:2、SEQ NO:3、SEQ NO:4 所示。

更进一步提供一种减毒 Tat 蛋白，所述的减毒 Tat 蛋白氨基酸序列 SEQ NO:1（R4M4）、SEQ NO:2（R4M5）、SEQ NO:3（R4M7）、SEQ NO:4（R5M4）所示。

进一步提供一种上述的减毒 Tat 蛋白的制备方法，其特征在于，首先选择定点突变的位点，对这些位点在 Tat 的基因上进行定点突变，最终得到大量保留 Tat 的反式激活功能，并去除其中凋亡和其他活性的减毒蛋白。

本发明具有以下优点：

1. 本发明的目的在于提供若干减毒的 HIV-1 Tat 蛋白用于激活 HIV-1 潜伏感染。

2. 本发明提供了一种利用 HIV-1 自身的反式激活蛋白 Tat 作为激活潜伏感染工具的思路，并且通过累计突变对 Tat 蛋白进行改造，使其在安全性上更加可靠。

3. 本发明提供四种减毒的 Tat 蛋白，能够在细胞水平上特异性激活 HIV-1 潜伏感染。

4. 本发明提供了一种改良的 HIV-1 体外潜伏感染模型的构建方式。

5. 本发明提供一种减毒 Tat 蛋白跟 SAHA 联用激活 HIV-1 潜伏感染的新方法。

6. 本发明提供的减毒 Tat 蛋白对免疫细胞的功能不造成影响。

7. 本发明发现 Tat 蛋白的具备较好的反式激活活性，能够有效抬高 HIV-1 mRNA 的转录。

8. Tat 蛋白具备良好的穿膜活性，能够有效进入细胞和各个组织发挥功能

附图说明

图 1：HIV1 Tat 蛋白改造及筛选原理。

图 2：四种减毒 Tat 的模式图。

图 3：四种减毒 Tat 能够在 Tzm-b1 中激活 HIV-1 的启动子。

图 4：Tat-R5M4 的改造降低了细胞毒性和凋亡活性。

图 5：Tat-R5M4 能有效地穿膜进入细胞以及各个组织。

图 6：HIV-1 体外潜伏感染模型的构建。

图 7：Tat-R5M4 能有效激活 HIV-1 体外潜伏模型。

图 8：Tat-R5M4 能有效激活来自临床病人外周血的潜伏感染状态的 $CD4^+$T 细胞。

图 9：急性毒性实验和免疫原性检测。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。除非特别说明，本发明采用的试剂、设备和方法为本技术领域常规市购的试剂、设备和常规使用的方法。

实施例一：对 Tat 蛋白的改造和活性检测

在过去的几十年中，HIV-1 Tat 的结构和功能已经有很详细的研究。在本发明中，我们通过积累突变改造出去除凋亡活性，同时保留大部分反式激活活性的 Tat 蛋白。由于 Tat 蛋白前三个结构域（氨基酸 1-59）的研究已经非常详尽，所以我们首先选择研究较少的氨基酸 60-72 进行点突变，将突变的基因连接到真核表达载体上转染 Tzm-bl 细胞后检测荧光素酶活性，其中只有 M36, M39, M51, M66, M67, M68, M69, M77 保留了≥80%的反式激活活性。接着我们把这些突变进行组合叠加，进行了一共六轮突变，最后得到 4 个候选蛋白：R4M4，R4M5，R4M7，R5M4，其中 R5M4 积累了最多 5 个点突变。

其中 R4M4 在定点突变中，将第 36 位的缬氨酸用丙氨酸取代，第 66 位的谷氨酰胺用丙氨酸取代，第 67 位的缬氨酸用丙氨酸取代，第 68 位的丝氨酸用丙氨酸取代。

其中 R4M5 在定点突变中，将第 39 位的异亮氨酸用丙氨酸取代，第 66 位的谷氨酰胺用丙氨酸取代，第 67 位的缬氨酸用丙氨酸取代，第 68 位的丝氨酸用丙氨酸取代。

其中 R4M7 在定点突变中，第 66 位的谷氨酰胺用丙氨酸取代，第 67 位的缬氨酸用丙氨酸取代，第 68 位的丝氨酸用丙氨酸取代，第 77 位的丝氨酸用丙氨酸取代。

其中 R5M4 在定点突变中，将第 36 位的缬氨酸用丙氨酸取代，第 66 位的谷氨酰胺用丙氨酸取代，第 67 位的缬氨酸用丙氨酸取代，第 68 位的丝氨酸用丙氨酸取代，第 77 位的丝氨酸用丙氨酸取代。

将 R4M4，R4M5，R4M7，R5M4 克隆到原核表达载体中进行表达及纯化，获得的蛋白对 Tzm-bl 细胞进行处理，48 小时后检测 Firefly Luciferase 的活性。

该实验证明改造的 R4M4，R4M5，R4M7，R5M4 在 Tzm-bl 中具有良好的反式激活活性。

实施例二：细胞毒性和凋亡活性检测

分别将 10nM, 50nM, 100nM, 500nM,1uM, 2uM, 3uM, 4uM 的 Tat-86 或 Tat-R5M4 与 Tzm-bl 细胞共同孵育，48 小时后用 MTS 法检测细胞活力。分别用 0.1ug, 0.5ug, 1ug, 2ug 的 Tat-86（根据常规的技术进行原核表达，引用文献：Expression of full length Tat in E.coli and its purification）和 Tat-R5M4 和 Jurkat 细胞共孵育，48 小时后用 Annexin-V-FITC 和 PE 双染色，通过流式细胞术检测凋亡比例。

本实验证明 Tat-R5M4 明显降低了细胞毒性和诱导凋亡的能力。

实施例三：检测 Tat-R5M4 的穿膜活性

为了验证 Tat-R5M4 在突变后是否影响穿膜活性，纯化的 Tat-R5M4 蛋白用 NHS-罗丹明（NHS-Rhodanmine）进行了标记，标记过的蛋白分别处理 PBMC 和 Jurkat 细胞 6 小时后用流式检测 Tat 进入细胞的状态。Tat-R5M4 具有良好的穿膜活性。为了检测 Tat-R5M4 进入细胞以后在胞质跟胞质的分布情况，Tzm-bl 细

胞用纯化的 Tat-R5M4 蛋白处理后用 Tat-R5M4 的抗体进行免疫荧光检测，我们发现 Tat-R5M4 进入细胞后大部分分布在胞质，仅有少量蛋白进入胞核。为了检测 Tat-R5M4 蛋白在小鼠体内的分布情况，罗丹明标记的 Tat-R5M4 蛋白通过尾静脉注射进入小鼠体内，6 小时后脾脏、胸腺、大脑和小肠等组织制作切片后检测，发现 Tat-R5M4 明显分布在这些组织中。

本实验证明了改造后的蛋白完整保留了其穿膜特性，能够高效进入细胞和组织发挥功能。

实施例四：HIV-1 体外潜伏感染模型的构建

用带有 *bcl-2*基因的假病毒感染激活的原代 $CD4^+$T 细胞，通常阳性率在 5%-10%之间。感染 3 天后，我们通过流式分选把 GFP 阳性的细胞分选出来，用添加了 IL-2 的 PRM1640 培养基继续培养，同时添加 CD3 和 CD28 抗体进行再次激活，一周后换成不添加任何细胞因子 PRM1640 培养基，培养 3-4 周后撤除 IL-2 使细胞逐步进入静息状态。这些静息状态的细胞即可用于潜伏激活剂的检测。

实施例五： Tat-R5M4 在 HIV-1 体外潜伏感染模型和临床病人来源的 $CD4^+$T 细胞中的激活作用

用体外构建的潜伏感染系统对 Tat-R5M4 激活潜伏感染的能力进行检测，同时用 CD3/CD28 和 SAHA 处理作为阳性对照，三天后通过荧光显微镜观察 GFP 阳性细胞的比例。

用 CD3/CD28 抗体和 SAHA 作为阳性对照，同时用 Tat-R5M4 或者 Tat-R5M4 和 SAHA 联用处理分离的临床样本 $CD4^+$T 细胞，18 小时后取上清，提取 RNA 检测上

清中的 HIV-1 RNA 含量。

以上实验证明 Tat-R5M4 能有效地激活 HIV-1 体外潜伏感染模型和临床病人样本来源的潜伏状态的 $CD4^+T$ 细胞，同时与 SAHA 联用能增强其反式激活效应。

实验六：急性毒性实验和免疫原性检测

为了给后续的动物实验提供了一定的理论支持，Tat-R5M4 蛋白的毒性被进行进一步的检测。首先，用 Babl/c 小鼠进行的急性毒性实验表明，当尾静脉注射剂量达到 40mg/ml 时小鼠依然生存良好。小鼠的丙氨酸氨基转移酶或谷丙（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶或谷草（AST）、尿素氮（BREA）和 CR（肌酐）等指标经检测都处于正常水平，病理切片也显示，除了野生型 Tat-86 蛋白引起了肝部局部炎症细胞的浸润，小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺部和肾都未显示明显损伤，表明 Tat-R5M4 对小鼠实验而言是安全的。同时，我们发现尾静脉注射 Tat-86 一周后，小鼠的脾脏有明显的肿大，说明 Tat-86 会引起明显的免疫反应，但 Tat-R5M4 不会引起类似的现象。 继而我们分别用 Tat-86 和 Tat-R5M4 皮下注射免疫小鼠，在 7 天，14 天，21 天时分别断尾取血检测 Tat 抗体的浓度，发现 Tat-R5M4 刺激产生的抗体量明显要低于 Tat-86。

本实验证明改造后的 Tat-R5M4 对小鼠相对安全，且免疫原性显著降低，比野生型 Tat-86 更适于进行体内实验。

SEQUENCE LISTING

<110> 中山大学

<120> 一种 Tat 蛋白及其制备方法和应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 86

<212> PRT

<213> Tat 蛋白

<400> 1

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser

1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Ala Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60

His Ala Ala Ala Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu

85

<210> 2

<211> 86

<212> PRT

<213> Tat 蛋白

<400> 2

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ala Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60

His Ala Ala Ala Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu
85

<210> 3

<211> 86

<212> PRT

<213> Tat 蛋白

<400> 3

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60

His Ala Ala Ala Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ala Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu
85

<210> 4

<211> 86

<212> PRT

<213> Tat 蛋白

<400> 4

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Ala Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60

His Ala Ala Ala Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ala Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu
85

权 利 要 求 书

1. 一种 Tat 蛋白在制备抗 HIV 药物中的应用。

2. 一种减毒 Tat 蛋白在制备抗 HIV 药物中的应用，其特征在于，所述的减毒 Tat 蛋白氨基酸序列 SEQ NO:1、SEQ NO:2、SEQ NO:3、SEQ NO:4 所示。

3. 一种减毒 Tat 蛋白，其特征在于，所述的减毒 Tat 蛋白氨基酸序列 SEQ NO:1、SEQ NO:2、SEQ NO:3、SEQ NO:4 所示。

4. 一种根据权利要求 3 所述的减毒 Tat 蛋白的制备方法，其特征在于，首先选择定点突变的位点，对这些位点在 Tat 的基因上进行定点突变，最终得到大量保留 Tat 的反式激活功能，并去除其中凋亡和其他活性的减毒蛋白。

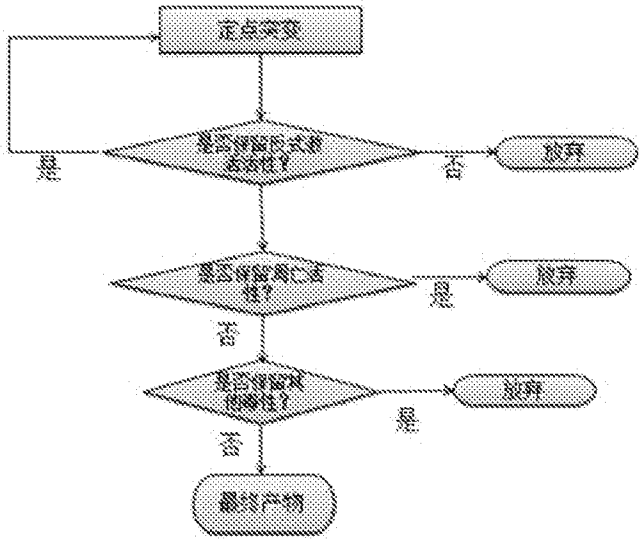


图 1

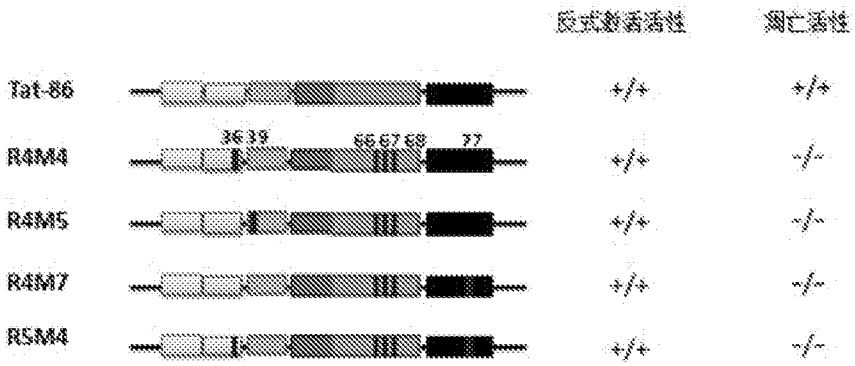


图 2

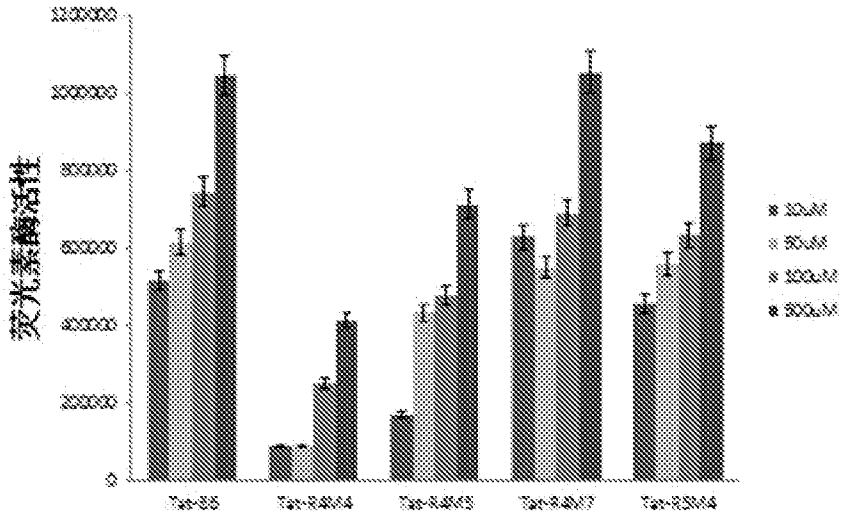


图 3

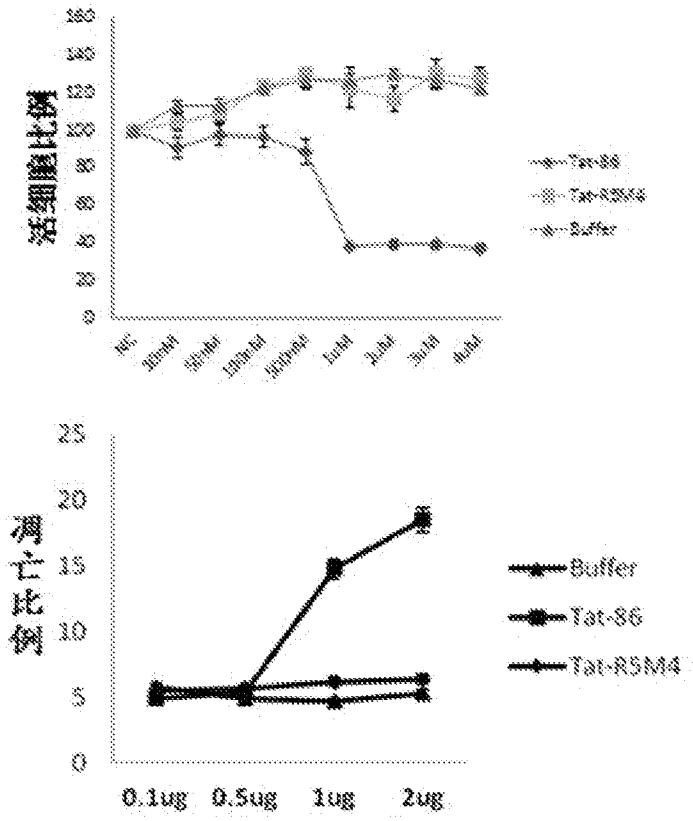

活细胞比例
Tat-86
Tat-R5M4
Buffer
凋亡百分比
25
20
15
10
5
0
0.1ug
0.5ug
1ug
2ug
Buffer
Tat-86
Tat-R5M4

图 4

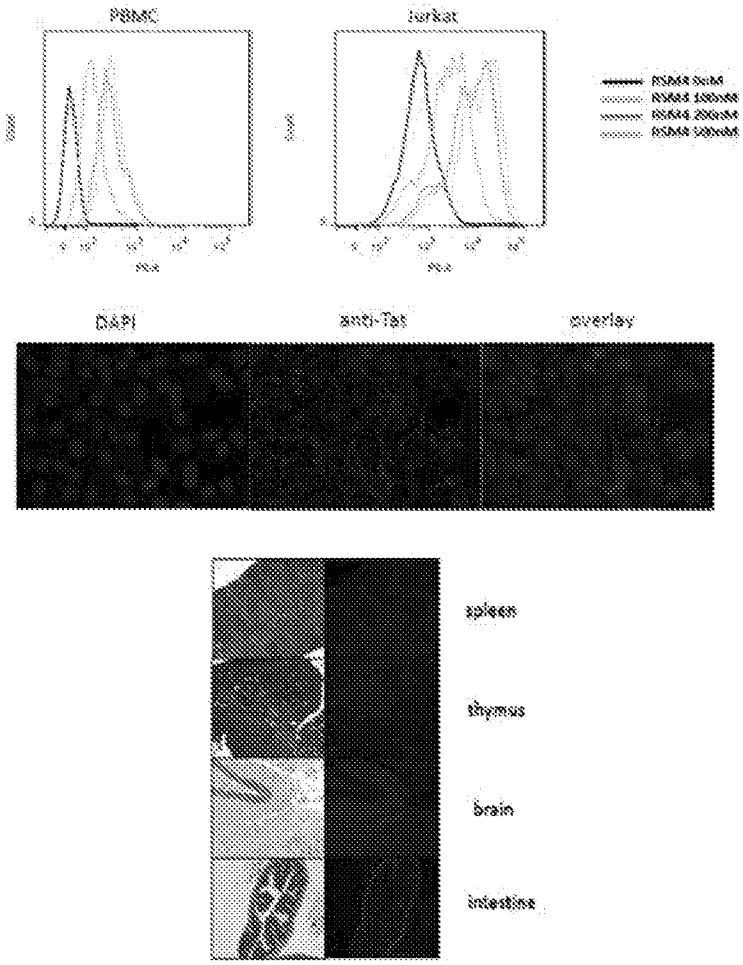

PBMC
Jurkat
DAPI
anti-Tat
overlay
spleen
thymus
brain
intestine

图 5

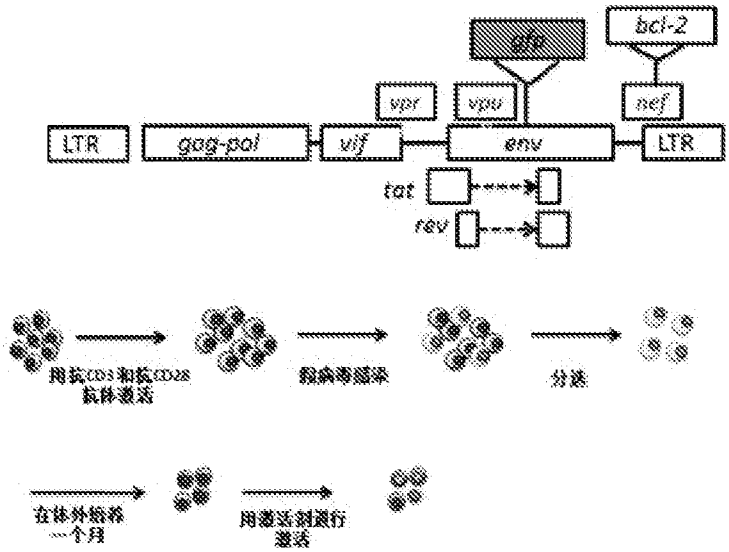

gfp
bcl-2
vpr
vpu
nef
LTR
gag-pol
vif
env
LTR
tat
rev
分选

图 6

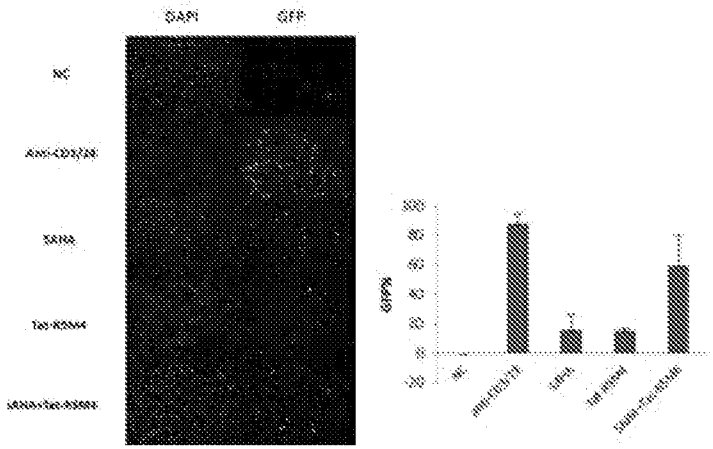

DAPI
GFP
NC
Anti-CD133/2R
Tat-Nanog
Tat-Nanog+Anti-CD133/2R

图 7

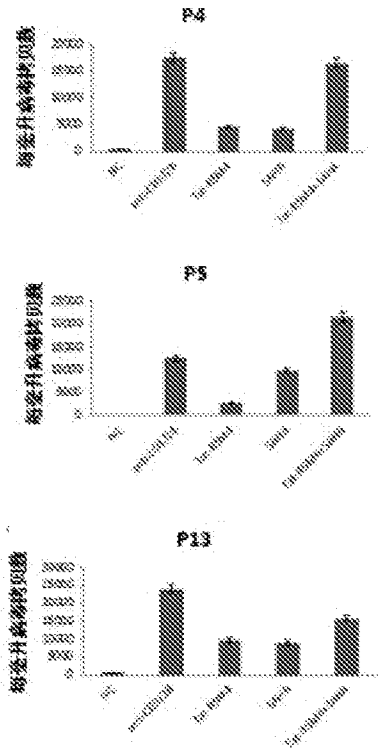

P4
P5
P13

图 8

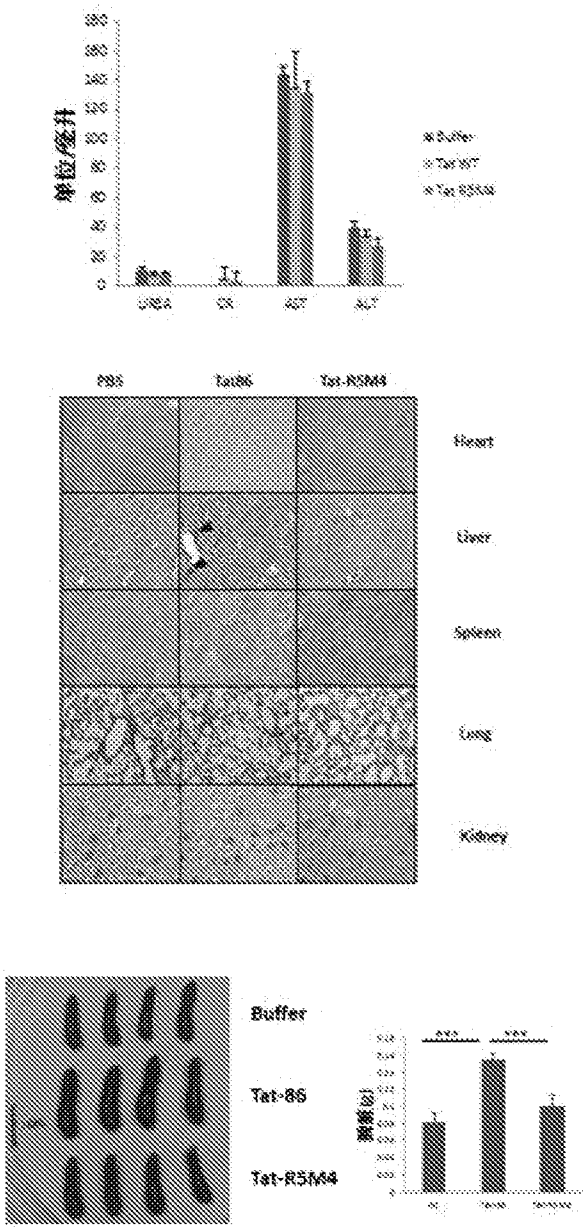

PBS
Tat86
Tat-R5M4
Heart
Liver
Spleen
Lung
Kidney
Buffer
Tat-86
Tat-R5M4

图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/079675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16 (2006.01) i; C07K 14/16 (2006.01) i; A61P 31/18 (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)

A61K, 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, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed: HIV, TAT, PREPARATION, medicine, pharmaceutical

GenBank; EMBL: sequence search based on SEQ ID NOs: 1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102206255 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY), 05 October 2011 (05.10.2011), see claims 1-3	1
A	CN 102206255 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY), 05 October 2011 (05.10.2011), see the whole document	2-4
X	CN 103073625 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY), 01 May 2013 (01.05.2013), see claims 1-3	1
A	CN 103073625 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY), 01 May 2013 (01.05.2013), see the whole document	2-4

☐ 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	Date of mailing of the international search report
12 December 2014 (12.12.2014)	**24 December 2014 (24.12.2014)**
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 **ZHAO, Yanhao** Telephone No.: (86-10) **62411043**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/079675

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102206255 A	05 October 2011	CN 102206255 B	12 June 2013
CN 103073625 A	01 May 2013	None	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2014/079675

A. 主题的分类

A61K 38/16(2006.01)i; C07K 14/16(2006.01)i; A61P 31/18(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)

A61K, 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,CPRSABS,SIPOABS,DWPI,CNTXT,WOTXT,EPTXT,USTXT,CNKI,GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed：制备，HIV，TAT，药物，PREPARATION, medicine，pharmaceutical GenBank; EMBL：基于SEQ ID NOs: 1-4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
X	CN 102206255 A (中国人民解放军第二军医大学) 2011年 10月 05日 (2011-10-05) 参见权利要求1-3	1
A	CN 102206255 A (中国人民解放军第二军医大学) 2011年 10月 05日 (2011-10-05) 参见全文	2-4
X	CN 103073625 A (中国人民解放军第二军医大学) 2013年 5月 01日 (2013-05-01) 参见权利要求1-3	1
A	CN 103073625 A (中国人民解放军第二军医大学) 2013年 5月 01日 (2013-05-01) 参见全文	2-4

☐ 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
2014年 12月 12日	2014年 12月 24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) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	赵彦豪 电话号码 (86-10)62411043

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/079675

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 102206255 A	2011年 10月 05日	CN 102206255 B	2013年 6月 12日
CN 103073625 A	2013年 5月 01日	无	