

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年6月29日 (29.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/107728 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/42 (2017.01)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 47/14 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/106732
- (22) 国际申请日: 2016年11月22日 (22.11.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510974956.6 2015年12月23日 (23.12.2015) CN
- (71) 申请人: 中国科学院生物物理研究所 (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所, Beijing 100101 (CN)。
- (72) 发明人: 刘平生 (LIU, Pingsheng); 中国北京朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所, 北京100101 (CN)。 汪洋 (WANG, Yang); 中国北京朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所, 北京100101 (CN)。 周晓明 (ZHOU, Xiaoming); 中国北京朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所, 北京100101 (CN)。 马学婧 (MA, Xuejing); 中国北京朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所, 北京100101 (CN)。 周畅 (ZHOU, Chang); 中国北京朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所, 北京100101 (CN)。
- (74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: PREPARATION METHOD OF LIPID BODIES, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种脂肪体的制备方法及其应用

(57) Abstract: A preparation method of lipid bodies, and use thereof. Particularly, provided is a method of preparing lipid bodies consisting of neutral lipids and a phospholipid monolayer, comprising the following steps: a1) placing phospholipids and neutral lipids in a buffer solution, forming a vortex to react the same, then performing centrifugation, and collecting an upper layer having a liquid phase; a2) performing purification of the liquid phased upper layer for twice or more, wherein each purification is performed by mixing the liquid-phased upper layer with the buffer solution, then layering the mixture, and collecting an upper layer having a liquid phase; and a3) mixing the liquid-phased upper layer obtained in step a2) with the buffer solution, layering the mixture, and collecting a lower layer having a liquid phase and containing lipid bodies therein. For the lipid bodies prepared with the method, one or more intrinsic proteins and/or functional proteins can be recruited to obtain artificial lipid droplets, and one or more apolipoproteins can be recruited to obtain artificial lipoproteins; both play an important role in preparing drugs and/or drug carriers.

(57) 摘要: 一种脂肪体的制备方法及其应用。具体提供一种制备由中性脂质和单层磷脂膜组成的脂肪体的方法, 包括下述步骤: a1)将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应, 然后进行离心, 收集上层液相; a2)将步骤a1)得到的上层液相进行两次以上的纯化; 每次纯化的方法为: 将上层液相与上述缓冲液混匀, 然后使其分层, 收集上层液相; a3)将步骤a2)得到的上层液相与上述缓冲液混合, 然后使其分层, 收集下层液相, 其中含有脂肪体。所述方法制备的脂肪体, 可招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白、获得人工脂滴, 可招募一种或几种载脂蛋白、获得人工脂蛋白, 均在制备药物和/或药物载体中具有重要作用。



WO 2017/107728 A1

一种脂肪体的制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种脂肪体的制备方法及其应用。

5 背景技术

脂滴 (lipid droplet, LD) 是一种细胞器，它由中性脂质核心，单层磷脂膜与相关蛋白组成，这一细胞器的功能包括：1) 脂质的合成，存储，代谢和运输；2) 蛋白质的存储和降解；3) 脂质信号分子和激素的生产和修饰；4) 与其他细胞器的相互作用。由于脂滴具有上述的多种功能，许多人类的疾病，特别是代谢性疾病，与脂滴的形成和动态变化息息相关，然而，脂滴的形成机制和动态变化研究依然困难重重。目前仍然缺乏对脂滴如何形成、脂滴的功能及调控机制的全面了解。脂滴的组成的复杂性及其与其它细胞器的相互作用干扰了我们解构这些机制的能力。

在过去的十年中，人们致力于脂滴的分离纯化，并通过蛋白质组和脂质组研究阐明脂滴的蛋白质和脂质组成。可是蛋白质组和其他的组分研究发现，分离得到的脂滴几乎总是含有内质网、线粒体和其它细胞器的碎片。可见，制备结构和组成上都接近天然脂滴的人工脂滴 (Artificial Lipid Droplets, ALDs) 是非常必要的。

除脂滴以外，人体内还有一类由单层磷脂膜包裹中性脂，表面覆有蛋白的结构，称为脂蛋白 (lipoprotein)。虽然脂蛋白与脂滴的结构非常类似，但二者定位不同，表面蛋白不同：脂滴存在于细胞中，而脂蛋白存在于血液中；脂滴上的主要蛋白为脂滴固有/结构蛋白 (lipid droplet resident/structural protein)，而脂蛋白上的主要蛋白为载脂蛋白 (apolipoprotein)。不同的脂蛋白表面有不同的载脂蛋白。脂蛋白的种类和比例对人体健康有着非常重要的影响。高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 是胆固醇逆向运输 (cholesterol reverse transport) 的关键组分，可防止胆固醇在血管壁上的沉积，对动脉粥样硬化等心脑血管疾病有非常重要的预防作用。人工脂蛋白或可用于高密度脂蛋白的补充制剂或其他药物载体。

发明公开

30 本发明所要解决的问题是提供药物载体及一种体外研究脂滴的体系。

为解决上述问题，本发明首先提供了一种脂肪体的制备方法，所述脂肪体由中性脂质和单层磷脂膜组成。

本发明所提供的制备脂肪体的方法，包括下述步骤：a1) 将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应，然后进行离心，收集上层液相，从上层液相中分离得到脂肪体。

35 所述“从上层液相中分离得到脂肪体”可包括如下步骤：a2) 将所述上层液相进行两次以上的纯化；每次纯化的方法可为：将上层液相与所述缓冲液混

匀，然后使其分层，收集上层液相；a3) 将步骤 a2) 得到的上层液相与所述缓冲液混合，然后使其分层，收集下层液相，其中含有脂肪体。

所述缓冲液可为缓冲液 B。

所述缓冲液 B 的溶质及其在缓冲液中浓度可为：15mM~25mM HEPES，80mM~
5 120mM KCl，1.5~2.5mM 的 MgCl₂；溶剂可为去离子水；pH 可为 7.2~7.6。

所述缓冲液 B 的溶质及其在缓冲液中浓度具体可为：20mM HEPES，100mM KCl，
2mM 的 MgCl₂；溶剂具体可为去离子水；pH 具体可为 7.4。

所述步骤 a1) 中，所述涡旋的参数可为：总时长为 3~5min。所述步骤 a1)
中，所述离心的参数可为：18000~22000g、3~7min。所述步骤 a1) 中，所述
10 涡旋的参数具体可为：总时长 4min。所述步骤 a1) 中，所述离心的参数具体可
为：20000g、5min。

所述步骤 a2) 中，所述“上层液相进行两次以上的纯化”中的次数以上层
液相与所述缓冲液混匀，分层后无沉淀为准。所述步骤 a2) 中，所述“使其分
15 层”是通过离心实现的，所述离心的参数可为：18000~22000g、3~7min。所
述步骤 a2) 中，所述“使其分层”是通过离心实现的，所述离心的参数具体可
为：20000g、5min。

所述步骤 a3) 中，所述“使其分层”是通过离心实现的，所述离心的参数
可为：800~1200g、3~7min。所述步骤 a3) 中，所述“使其分层”是通过离心
实现的，所述离心的参数具体可为：1000g、5min。

所述磷脂为 b1)、b2) 或 b3)：b1) 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-
甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)；b2) 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷
酸胆碱(DOPC)和 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)；
b3) 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和 1, 2-二-
十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

所述中性脂质为 c1) 或 c2)：c1) 甘油三酯；c2) 胆固醇油酸酯(cholesteryl
25 oleate, CO) 和甘油三酯。

所述 b2) 中，1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和 1, 2-
二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的质量比可为 1:0.01~2；

所述 b3) 中，1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和 1, 2-
二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比可为 1:0.01~2；所述 c2) 中，
甘油三酯和胆固醇油酸酯的质量比可为 1~5: 1。所述 b2) 中，1, 2-二-(9Z-
十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘
油-3-磷酸乙醇胺的质量比具体可为 2:1、1:1 或 1:2；所述 b3) 中，1, 2-二-
30 (9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和 1, 2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油
-3-磷酸胆碱的质量比具体可为 2:1、1:1 或 1:2；所述 c2) 中，甘油三酯和胆固
醇油酸酯的质量比具体可为 5:1、4:1、3:1 或 2:1。

所述甘油三酯(triacylglycerol, TAG) 的制备方法可如下：(1) 取死亡

的 SD 大鼠 1 只，取皮下脂肪与大网膜脂肪，剪碎；（2）将步骤（1）得到的碎组织置于离心管中，加入萃脂液甲（氯仿：去离子水=1：1，v/v），剧烈涡旋 1 分钟，然后 8000g 离心 10 分钟；（3）取步骤（2）得到的下层有机相，置于新的离心管中，如果发现其浑浊的话按照步骤（2）中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清；（4）取步骤（3）得到的下层有机相，在高纯氮下吹干（若吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤（2）中的萃取方法进行重复萃取）；（5）取步骤（4）得到的下层有机相，在高纯氮下吹干（连续 3 次称重质量不变），产物即为甘油三酯。

所述甘油三酯可为甘油三油酸酯（triolein, T0）。所述甘油三油酸酯（triolein, T0）具体可为 Sigma 公司的产品，产品目录号为 92860。

所述磷脂和所述中性脂质的质量比可为（d1）至（d6）中的任一种：（d1）0.25~3:5；（d2）3:5；（d3）2:5；（d4）1:5；（d5）1:10；（d6）1:20。

利用上述脂肪体的制备方法制备的脂肪体也属于本发明的保护范围。

本发明还提供了一种制备人工脂滴的方法。

本发明所提供的制备人工脂滴的方法，包括在通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白，获得人工脂滴。

所述固有蛋白可为 MLDS 蛋白、MDT-28 蛋白或 Perilipin-2 蛋白。所述功能蛋白可为 ATGL。所述 MLDS 蛋白可为如下 e1) 或 e2)：e1) 氨基酸序列如序列表中序列 2 所示的蛋白质；e2) 将 e1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 MLDS 蛋白具有相同功能的蛋白质。所述 MDT-28 蛋白可为如下 f1) 或 f2)：f1) 氨基酸序列如序列表中序列 4 所示的蛋白质；f2) 将 f1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 MDT-28 蛋白具有相同功能的蛋白质。所述 Perilipin-2 蛋白可为如下 g1) 或 g2)：g1) 氨基酸序列如序列表中序列 6 所示的蛋白质；g2) 将 g1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 Perilipin-2 蛋白具有相同功能的蛋白质。所述 ATGL 可为如下 h1) 或 h2)：h1) 氨基酸序列如序列表中序列 8 所示的蛋白质；h2) 将 h1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 ATGL 具有相同功能的蛋白质。

利用上述制备人工脂滴的方法制备的人工脂滴也属于本发明的保护范围。

本发明还提供了一种制备人工脂蛋白的方法。

本发明所提供的制备人工脂蛋白的方法，包括在通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白，获得人工脂蛋白。

所述载脂蛋白可为 Apo A-I。

所述 Apo A-I 具体可通过参考文献 Peitsch, M. C. *et al.* A purification method for apolipoprotein A-I and A-II. *Anal Biochem* 178, 301-305 (1989).

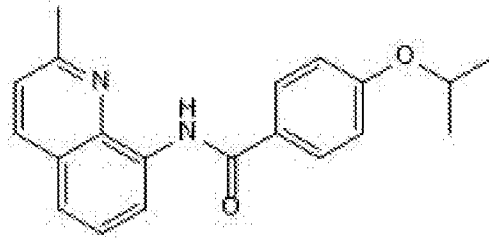
中记载的方法获得。

利用上述制备人工脂蛋白的方法制备的人工脂蛋白也属于本发明的保护范围。

(j1) 至 (j6) 中的任一种也属于本发明的保护范围：(j1) 通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用；(j2) 通过上述任一所述人工脂滴的制备方法制备的人工脂滴在制备药物载体中的应用；(j3) 通过上述任一所述人工脂滴的制备方法制备的人工脂滴在制备药物中的应用；(j4) 通过上述任一所述人工脂蛋白的制备方法制备的人工脂蛋白在制备药物载体中的应用；(j5) 通过上述任一所述人工脂蛋白的制备方法制备的人工脂蛋白在制备药物中的应用；(j6) 通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体作为药物载体的应用。

为解决上述技术问题，本发明还提供了一种药物。

本发明所提供的药物，其活性成分为负载有具有药用功能的化合物的脂肪体；所述脂肪体为通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体。所述药物可为脂溶性药物。所述脂溶性药物可为能与中性脂质互溶的药物。所述中性脂质具体可为甘油三酯。所述药物具体可为治疗 II 型糖尿病和/或代谢紊乱的药物或候选药物。上述药物中，所述具有药用功能的化合物可为式 a 所示的化合物；



式 a。

上述药物中，所述具有药用功能的化合物具体可为 TOCRIS 公司生产的 CDN 1163，其产品目录号为 5869。所述“负载有具有药用功能的化合物的脂肪体”即为实施例 3 中的载药脂肪体。

所述载药脂肪体的制备方法具体可如下：(1) 取 10mg TAG 加入到微量离心管中，加入 100 μ l 氯仿，充分溶解，得到 TAG 溶液；(2) 取 2mg CDN 1163，置于另一微量离心管中，加入 200 μ l 氯仿，充分溶解，得到浓度为 10 μ g/ μ l 的药物溶液；(3) 完成步骤 (1) 和步骤 (2) 后，将 TAG 溶液和药物溶液混合均匀，然后用高纯氮气吹干溶剂，得到混合物；(4) 取 80 μ l DOPC 溶液（其中含有 2mg DOPC）加入到新的微量离心管中，用高纯氮气吹干溶剂；(5) 向完成步骤 (4) 的微量离心管中加入 100 μ l 缓冲液 B 和 6mg 步骤 (3) 得到的混合物，涡旋 4min（涡旋 10s，停止 10s），得到乳白色的脂质混合物甲，将该脂质混合物甲以 20000g 离心 5min；离心后，微量离心管中底部为沉淀组分甲，液相体系呈现两层分层（上层为白色带甲，白色带甲以下的部分为溶液甲）；(6) 完成步骤 (5) 后，通过抽取的方式去除溶液甲与沉淀组分甲，保留白色带甲，

加入 100 μ l 缓冲液 B, 涡旋, 得到乳白色的脂质混合物乙, 将该脂质混合物乙以 20000g 离心 5min; 离心后, 如果微量离心管中底部有沉淀, 即为沉淀组分乙, 液相体系呈现两层分层 (上层为白色带乙, 白色带乙以下的部分为溶液乙);

(7) 完成步骤 (6) 后, 通过抽取的方式弃除溶液乙与沉淀组分乙, 保留白色带乙, 加入 100 μ l 缓冲液 B, 涡旋, 得到乳白色的脂质混合物丙, 将该脂质混合物丙以 20000g 离心 5min; 离心后, 液相体系呈现两层分层 (上层为白色带丙, 白色带丙以下的部分为溶液丙)。步骤 (7) 即步骤 (6) 的重复, 实际应用中的步骤 (6) 的重复次数以白色带下层无沉淀为准。(8) 完成步骤 (7) 后, 取白色带丙, 加入 100 μ l 缓冲液 B, 涡旋混匀, 1000g 离心 5min, 离心后, 液相体系呈现两层分层 (上层为白色带丁, 白色带丁以下的部分为溶液丁)。收集溶液丁, 即为载药脂肪体。

本发明提供了一种脂肪体的制备方法及其应用。本发明所提供的一种脂肪体的制备方法通过涡旋混合中性脂质和磷脂, 使用两步法纯化, 制备出了由中性脂质核心和单层磷脂膜构成的脂肪体。在脂肪体上招募固有蛋白和/或功能蛋白, 如细菌的蛋白 MLDS, 线虫的蛋白 MDT-28、哺乳动物的蛋白 Perilipin-2、脂肪甘油三酯脂酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL), 获得人工脂滴; 在脂肪体上招募载脂蛋白, 如 Apo A-I (apolipoprotein A-I), 获得人工脂蛋白。利用本发明提供的方法制备的脂肪体、人工脂滴和人工脂蛋白, 可作为药物载体, 进而完成各种生物学和医学的目标。

20 附图说明

图 1 为使用涡旋及两步法离心制备纯化脂肪体。A 为脂肪体制备流程图: a 为制备脂肪体的组分; b 为制备脂肪体的流程图, 蓝色箭头代表涡旋, 红色箭头显示被移除的组分。B 为脂肪体制备过程中各组分的形态: a 为光学显微镜的观察结果 (比例尺=10 微米): 箭头表示非球形结构, 左图为初始制备组分, 中图 25 为沉淀组分, 右图为上层组分; b 为荧光显微镜的观察结果 (比例尺=10 微米): 箭头表示非球形结构, 左图为初始制备组分, 中图为沉淀组分, 右图为上层组分; c 为显微镜进行透射电镜正染的结果 (比例尺=1 微米): 左图为初始制备组分, 中图为沉淀组分, 右图为上层组分。C 为光学显微镜观察脂肪体的形态 (比例尺=10 微米): 左图为微分干涉相衬光学显微镜, 右图为荧光显微镜。D 为透射电镜正染脂肪体和脂质体的结果 (比例尺=500 纳米): 左图 30 为脂肪体, 右图为脂质体。

图 2 为脂肪体的特征。其中 A 为脂肪体和线粒体的形态 (比例尺=500 纳米): a 为透射电镜的观察结果: 左图为脂肪体, 右图为线粒体; b 为冷冻电镜的观察结果: 左图为脂肪体, 右图为线粒体。B 通过动态光散射 (DLS) 测定脂肪体的尺寸, 多分散性指数=0.085。C 为薄层层析色谱分析脂肪体制备的过程中每个组 35 分的 DOPC/总脂质的比例: a 为碘蒸气对样品染色结果 (泳道 1 为脂质 Marker, 泳道 2 为初始制备组分, 泳道 3 为混合组分, 泳道 4 为脂肪体 a); b 为各组分

DOPC 与总脂质的比例，N=3，平均值±方差。D 为脂肪体与脂滴的形态：a 为脂肪体的形态，左图为肉眼观察结果，中图为光学显微镜的观察结果，右图为荧光显微镜的观察结果；b 为小鼠肝脏组织-脂滴的形态，左图为肉眼观察结果，中图为光学显微镜的观察结果，右图为荧光显微镜的观察结果；c 为小鼠棕色脂肪组织-脂滴的形态，左图为肉眼观察结果，中图为光学显微镜的观察结果，右图为荧光显微镜的观察结果；d 为浊红球菌 RHA1-脂滴的形态，左图为肉眼观察结果，中图为光学显微镜的观察结果，右图为荧光显微镜的观察结果。

图 3 制备脂肪体的影响因素。A 为不同涡旋时间（1 为脂肪体 b，2 为脂肪体 c，3 为脂肪体 d，4 为脂肪体 a）对脂肪体的影响：a 为脂肪体的形态，b 为脂肪体的光密度，c 为脂肪体的尺寸；B 为不同比例的 DOPC 和 TAG 制备的脂肪体的光密度（a）和尺寸（b）；C 为不同比例的 DOPC 和 DSPC 制备的脂肪体的光密度（a）和尺寸（b）；D 为不同比例的 DOPC 和 DOPE 制备的脂肪体的光密度（a）和尺寸（b）；E 为不同比例的 TAG 和 CO 制备的脂肪体的光密度（a）和尺寸（b）；F 为 4℃或室温下孵育 7 天脂肪体的光密度（a）和尺寸（b）。

图 4 为室温或 4℃下储存 7 天的脂肪体的显微镜照片（比例尺=10 微米）。A 和 C 为光学显微镜；B 和 D 为荧光显微镜。

图 5 为 SMT3-Perilipin-2 蛋白的分离与纯化。A 为用 SDS-PAGE 分离并通过银染（上图）和 Western 印迹（下图）分析 IPTG 诱导前后的全细胞裂解液。黑色箭头指向 SMT3-Perilipin-2 蛋白对应的条带；B 为经镍离子金属亲和层析柱纯化的各组分进行 SDS-PAGE 和胶体蓝染色的分析结果。C 为从镍柱洗脱的 SMT3-Perilipin-2 蛋白通过分子筛进一步纯化。四个组分（1，2，3 和 4）根据其保留体积分别收集，图中用蓝色短线分开表示；D 为通过 SDS-PAGE 分析镍柱纯化的 SMT3-Perilipin-2 蛋白（咪唑洗脱）和分子筛得到的组分。

图 6 为人工重组的不同物种来源的脂滴固有/结构蛋白被招募到脂肪体上。

图 7 为通过募集脂滴的固有/结构蛋白构建人工脂滴。A 为人工脂滴构建示意图；B 为脂肪体可以招募脂滴固有/结构蛋白 GFP 融合蛋白；C 为 SMT3-Perilipin-2 蛋白饱和度测定。

图 8 为脂肪体招募脂滴固有/结构蛋白 GFP 融合蛋白（比例尺=5 微米）。

图 9 为 SMT3-ATGL 蛋白在室温或 4℃下与脂肪体孵育后的银染分析结果。

图 10 为脂肪体上募集 ATGL 与 Apo A-I。A 为 SMT3-ATGL 蛋白饱和度测定，其中泳道 1 至 7 对应加入的 SMT3-ATGL 蛋白浓度分别为：0.091，0.132，0.171，0.209，0.244，0.278，0.310 微克/微升；B 为通过募集高密度脂蛋白的载脂蛋白 Apo A-I 构建人工脂蛋白。

图 11 为使用涡旋及两步法离心制备载药脂肪体。A 为载药脂肪体制备流程图：a 为制备载药脂肪体的组分；b 为制备载药脂肪体的流程图；B 为制备的载药脂肪体；C 通过动态光散射（DLS）测定载药脂肪体的尺寸；D 为高效液相色谱检测结果。

实施发明的最佳方式

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

5 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

本发明中所述脂肪体 (adiposome) 定义为一类以天然或人工合成的中性脂质为核心，天然或人工合成的极性脂质单层膜包裹的，人工合成的结构。脂肪体的脂质组成及形态结构与脂滴近似，因此可以作为制备人工脂滴的主要原材料。

10 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC) 为 Avanti 公司的产品，产品状态为 DOPC 溶液，即 DOPC 溶解于氯仿中。1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE) 为 Avanti 公司的产品，产品状态为 DOPE 溶液，即 DOPE 溶解于氯仿中。1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC) 为 Avanti 公司的产品，产品状态为 DSPC 溶液，即 DSPC 溶解于氯仿中。胆固醇
15 油酸酯 (cholesteryl oleate, CO) 为 Alfa Aesar 公司的产品。尼罗红为 Sigma-Aldrich 公司的产品。LipidTOX red 为 Invitrogen 公司的产品，产品目录号为 H34476。抗 Perilipin-2 为 Abcam 公司的产品，产品目录号为 ab108323。Percoll 为 GE Healthcare 公司产品。醋酸铀、25%戊二醛和 EMBED 812 包埋试剂盒均为 Electron Microscopy Sciences 公司 (哈特菲尔德, 美国) 产品。四氧化
20 化钨 (电镜级) 为 NAKALAI Tesque 公司 (京都, 日本) 产品。丹宁酸为 Sigma 公司的产品。C57BL/6 小鼠为北京维通利华实验动物技术有限公司产品。动态光散射仪 (DLS, Delsa Nano C 颗粒分析仪) 为 Beckman 公司产品。

下述实施例中的“涡旋”均使用 Vortex-Genie 1 涡旋仪 (Scientific Industries, Inc. 公司, 美国) 进行, “胶体蓝染色”均使用胶体蓝染色试剂盒
25 (Invitrogen 公司的产品, 产品目录号为 LC6025) 进行。

线粒体从 C57BL/6 小鼠的棕色脂肪组织分离得到, 具体分离方法参考 Yu, J. *et al.* Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochim Biophys Acta* 1853, 918-928, doi:10.1016/j.bbamer.2015.01.020 (2015).

30 2.5%戊二醛溶液的制备方法: 将 25%戊二醛溶解于 pH7.4、0.1M PB 缓冲液, 使戊二醛在体系中质量浓度为 2.5%。

实施例 1 中的甘油三酯 (triacylglycerol, TAG) 的制备方法如下: (1) 取死亡的 SD 大鼠 1 只, 取皮下脂肪与大网膜脂肪, 剪碎; (2) 将步骤 (1) 得到的碎组织置于离心管中, 加入萃脂液甲 (氯仿: 去离子水=1: 1, v/v), 剧烈
35 涡旋 1 分钟, 然后 8000g 离心 10 分钟; (3) 取步骤 (2) 得到的下层有机相, 置于新的离心管中, 如果发现其浑浊的话按照步骤 (2) 中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清; (4) 取步骤 (3) 得到的下层有机相, 在高纯氮下吹干, (若

吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤（2）中的萃取方法进行重复萃取）；
（5）取步骤（4）得到的下层有机相，在高纯氮下吹干（连续 3 次称重质量不变），产物即为甘油三酯。

5 缓冲液 B 的溶质及其在缓冲液中浓度为：20mM HEPES（实际应用中 15mM-25mM HEPES 均可），100mM KCl（实际应用中 80mM-120mM KCl 均可），2mM MgCl₂（实际应用中 1.5-2.5mM MgCl₂ 均可）；溶剂为去离子水；pH 为 7.4（实际应用中 7.2-7.6 均可）。

10 脂质体为磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺按质量比 3:7 混合，然后用带有 100nm 孔径的聚碳酸酯滤器微型挤出机（Avanti 公司产品）制备的单层脂质体，具体制备方法参考 Nakatogawa, H., Ichimura, Y. & Ohsumi, Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165-178, doi:10.1016/j.cell.2007.05.021 (2007).

15 用荧光显微镜对脂肪体或脂滴进行观察，具体步骤如下：将脂肪体或脂滴用尼罗红（浓度为 1μg/ml）或 LipidTOX red 稀释液（LipidTOX red 用缓冲液 B 以 1:1000 倍稀释，得到 LipidTOX red 稀释液）染色，室温孵育 30min，取孵育后的脂肪体或脂滴 6μl，滴加在载玻片上，然后加 2μl 抗荧光淬灭剂（碧云天公司产品，产品目录号为 P0126）混合、盖盖玻片。用 Zeiss M2 荧光显微镜、奥林巴斯 FV1000 荧光共聚焦显微镜或 DeltaVision OMX V3 超分辨率显微镜获得荧光图像。

20 透视电镜正染具体步骤如下：取脂肪体或脂质体 8μl 滴在辉光放电处理后的覆有碳膜的铜网上，静置 1min，用滤纸吸干多余的样品，然后将样品用 1% 四氧化钨固定 10min、去离子水漂洗，再将样品分别用 0.1% 单宁酸和 2% 乙酸双氧铀依次染色 5min、用去离子水漂洗。用 Tecnai Spirit (FEI) 透射型电子显微镜在 100 千伏下获得显微照片。

25 用透视电镜对脂肪体或线粒体进行观察，具体步骤如下：取脂肪体或线粒体迅速与融化的 3% 低熔点琼脂糖混合，并在冰上凝固，然后切成约 1mm³ 的小块。将小块在 2.5% 戊二醛溶液中固定 30min，然后继续用溶于 pH7.4、0.1M PB 缓冲液的 1% 四氧化钨在室温下固定 1h，得到固定块。将该固定块用去离子水洗涤，用乙醇脱水，然后用 EMbed 812 包埋试剂盒进行渗透和包埋，并在 60℃ 下聚合
30 24h，用 Leica EM UC6 超微切片机制备 70nm 超薄切片。用 Tecnai Spirit (FEI) 透射型电子显微镜在 100 千伏下获得显微照片。

用冷冻电镜对脂肪体或线粒体进行观察，具体步骤如下：取脂肪体或线粒体 4μl，滴加在铜网上。使用 Vitrobot Mark IV (FEI 公司产品) 在 100% 湿度下吸干 3 秒，然后快速浸入预先用液氮冷却的液态乙烷中使其玻璃化。使用装有 Gatan
35 UltraScan4000 相机（产品型号 895）的 Titan Krios 冷冻电子显微镜（FEI 公司产品）在 300 千伏下拍摄显微照片。

缓冲液 T 为 pH7.4、含 50mM Tris-HCl 和 150mM NaCl 的缓冲液。

载体 pET28a 为 Novagen 公司产品。载体 pGEX-6p-1 购自 Novagen 公司。镍离子金属亲和层析柱填料为螯合有镍离子的 Chelating Sepharose Fast Flow, 为 Amersham Biosciences 公司产品。GST 亲和层析柱填料为生工生物工程(上海)有限公司产品。

5 “改造后的 pET28a 质粒” 记载于如下文献中: Hu, W., Wu, H., Zhang, H., Gong, W. & Perrett, S. Resonance assignments for the substrate binding domain of Hsp70 chaperone Ssa1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomol NMR Assign* 9, 329-332, doi:10.1007/s12104-015-9603-5 (2015)。“改造后的 pET28a 质粒” 在下文中命名为载体 pET28a-SMT3。

10 实施例 1、脂肪体的制备

一、制备脂肪体 a

1、利用运用涡旋和两步法离心制备脂肪体 a, 具体步骤如下:

(1) 取 80 μ L DOPC 溶液 (其中含有 2mg DOPC) 加入到微量离心管中, 用高纯氮气吹干溶剂。

15 (2) 完成步骤 (1) 后, 向微量离心管中加入 100 μ L 缓冲液 B 和 5mg TAG, 涡旋 4min (涡旋 10s, 停止 10s), 得到乳白色的脂质混合物 1 (即初始制备组分), 将该脂质混合物 1 以 20000g 离心 5min (实际应用中 18000-22000g 离心 3-7min 均可)。离心后, 微量离心管中底部为沉淀组分 1, 液相体系呈现两层分层 (上层为白色带 1, 白色带 1 以下的部分为溶液 1)。

20 (3) 完成步骤 (2) 后, 通过抽取的方式弃除溶液 1 与沉淀组分 1, 保留白色带 1, 加入 100 μ L 缓冲液 B, 涡旋, 得到乳白色的脂质混合物 2, 将该脂质混合物 2 以 20000g 离心 5min (实际应用中 18000-22000g 离心 3-7min 均可)。离心后, 如果微量离心管中底部有沉淀, 即为沉淀组分 2, 液相体系呈现两层分层 (上层为白色带 2, 白色带 2 以下的部分为溶液 2)。

25 (4) 完成步骤 (3) 后, 通过抽取的方式弃除溶液 2 与沉淀组分 2, 保留白色带 2, 加入 100 μ L 缓冲液 B, 涡旋, 得到乳白色的脂质混合物 3, 将该脂质混合物 3 以 20000g 离心 5min (实际应用中 18000-22000g 离心 3-7min 均可)。离心后, 液相体系呈现两层分层 (上层为白色带 3, 白色带 3 以下的部分为溶液 3)。

步骤 (4) 即步骤 (3) 的重复, 实际应用中的步骤 (3) 的重复次数以白色带下层无沉淀为准。

30 (5) 完成步骤 (4) 后, 取白色带 3, 加入 100 μ L 缓冲液 B, 涡旋混匀, 1000g 离心 5min (实际应用中 800-1200g 离心 3-7min), 离心后, 液相体系呈现两层分层 (上层为白色带 4, 白色带 4 以下的部分为溶液 4)。收集溶液 4, 即为脂肪体 a。

35 将上述步骤中的白色带 4 命名为上层组分。将上述步骤中的沉淀组分 1 和沉淀组分 2 混合, 命名为沉淀组分。将上述步骤中的沉淀组分和上层组分混合, 命名为混合组分。

利用上述方法制备脂肪体 a 的具体流程见图 1 中 A (其中 a 为制备脂肪体 a

的组分，b 为制备脂肪体 a 的流程图）。对制备脂肪体 a 过程中的组分形态用光学显微镜和荧光显微镜进行观察、用显微镜进行透射电镜正染，结果如下：初始制备组分、沉淀组分和上层组分中除含中性脂质的球状结构，还存在许多其它类型的结构（图 1 中 B）；溶液 4 几乎所有结构均为球形，且均为尼罗红阳性，而且尼罗红标记的结构尺寸与光学显微镜图像中的球状结构的尺寸一致，这表明这些球状结构都含有 TAG 核心（图 1 中 C）；将脂肪体 a 和脂质体用显微镜进行透射电镜正染，结果表明两者具有明显的差异（图 1 中 D）。

2、脂肪体 a 的特征

（1）用透射电镜分别对脂肪体 a 和线粒体进行观察，用冷冻电镜分别对脂肪体 a 和线粒体进行观察，结果表明（图 2 中 A），脂肪体 a 由单层磷脂膜包裹，线粒体由双层磷脂膜包裹。

（2）用动态光散射仪测定脂肪体 a 的平均尺寸约为 189 纳米（图 2 中 B），然后使用文献（Ding Y, Zhang S, et al. Isolating lipid droplets from multiple species. Nat Protoc. 2013 Jan; 8(1): 43-51. doi:10.1038/nprot.2012.142. Epub 2012 Dec 6.）中的公式，计算得到脂肪体 a 中 DOPC 与总脂质（总脂质即 TAG 和 DOPC）的体积比约为 6.6%。

（3）使用薄层色谱法分析脂质，具体步骤如下：

a、取待提取物（待提取物体积和下述萃脂液乙中缓冲液 B 的体积之和为 300 μ l），用萃脂液乙（由 300 μ l 氯仿、300 μ l 甲醇和缓冲液 B 组成）进行萃取以获取脂质（收集有机相，命名为有机相甲），剩余的部分再加入 300 μ l 氯仿进行萃取以进一步获取脂质（收集有机相，命名为有机相乙）；将有机相甲和有机相乙混合，用氮气吹干，得到待提取物的总脂质；待提取物为脂肪体 a、脂质混合物 1（即初始制备组分）或混合组分。

b、将步骤 a 得到的总脂质溶解在 100 μ l 氯仿中，上样 10 μ l 至硅胶板；

c、完成步骤 b 后，样品在正己烷：乙醚：冰乙酸（体积比为 80:20:1）的展开剂中展开，以分离 TAG；

d、完成步骤 c 后，在空气中挥干有机溶剂（即步骤 c 中的正己烷、乙醚和冰乙酸），将硅胶板再次在氯仿：甲醇：冰乙酸：水（体积比为 75:13:9:3）的溶剂系统中展开，以分离 DOPC；

e、完成步骤 d 后，用饱和碘蒸气进行染色，用 ImageJ 软件对脂质斑点的灰度进行量化。

结果表明（图 2 中 C），样品中 DOPC 与脂质的比例为 $7.1 \pm 1.2\%$ ，与步骤（2）中的计算值相似，表明脂肪体 a 具有单层磷脂膜的结构。

（4）根据 Ding Y, Zhang S, et al. Isolating lipid droplets from multiple species. Nat Protoc. 2013 Jan; 8(1): 43-51. doi: 10.1038/nprot.2012.142. Epub 2012 Dec 6.）和 Yu, J. et al. Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold

treatment. *Biochim Biophys Acta* 1853, 918-928, doi : 10.1016/j.bbamcr.2015.01.020 (2015)中记载的方法分别从 C57BL/6 小鼠肝脏组织、C57BL/6 小鼠棕色脂肪组织和产油菌 RHA1 中分离脂滴,依次命名为肝脏组织-脂滴 (Liver LD)、棕色脂肪组织-脂滴 (BAT LD) 和 RHA1-脂滴 (RHA1 LD)。

5 脂肪体 a、RHA1 LD、Liver LD 和 BAT LD 均呈牛奶状溶液。用动态光散射仪测量脂肪体 a、RHA1 LD、Liver LD 和 BAT LD 的平均尺寸,结果 BAT LD 的粒径最大,平均直径为 1848nm; RHA1 LD 的粒径最小,平均直径为 493nm; 脂肪体 a 的平均直径为 189nm (图 2 中 B)。上述结果与光学显微镜得到的结果基本一致 (图 2 中 D)。用荧光显微镜对脂肪体或脂滴进行观察,脂肪体 a、RHA1 LD、Liver
10 LD 和 BAT LD 都呈现球状结构 (图 2 中 D),表明它们都含有 TAG 核心。

3、影响脂肪体形成的因素

为优化制备脂肪体的条件,我们系统地改变了步骤 1 中所述涡旋和两步法中两个主要因素,即步骤 (2) 中的涡旋时间和两种原料 (磷脂与中性脂质) 的比例,并通过测量在 600nm 波长处的光密度 (OD_{600}) 来反映脂肪体的产量,通过动
15 态光散射仪测量脂肪体的尺寸。

(1) 涡旋时间的优化

按照上述步骤 1 的方法,将步骤 1 中(1)的涡旋 4min 分别替换为涡旋 1min、涡旋 2min 和涡旋 3min,其它步骤均不变,得到脂肪体 b、脂肪体 c 和脂肪体 d,然后分别测量脂肪体 a、脂肪体 b、脂肪体 c 或脂肪体 d 的尺寸和光密度。

20 实验结果见图 3 中 A。结果表明,脂肪体的产量随涡旋时间的延长而上升,而脂肪体尺寸随涡旋时间的延长而降低,在大约 2min 达到最小值并进入平台。综合脂肪体的光密度较高 (即产量较高) 且脂肪体的尺寸较大两个因素,确定涡旋和两步法中步骤 (2) 的最佳涡旋时间为 4min。

(2) 磷脂与中性脂质的比例优化

25 制备脂肪体 a 中的磷脂具体为 DOPC,中性脂质具体为 TAG,DOPC:TAG 的比例为 2:5。

①按照上述步骤 1 的方法,将步骤 1 中 (1) 的 2mg DOPC 分别替换为 0.25mg DOPC、0.5mg DOPC、1mg DOPC 和 3mg DOPC,其它步骤均不变,得到脂肪体 a1 (DOPC:TAG 的比例为 1:20)、脂肪体 a2 (DOPC:TAG 的比例为 1:10)、脂肪体 a3 (DOPC:TAG 的比例为 1:5) 和脂肪体 a4 (DOPC:TAG 的比例为 3:5),然后分
30 别测量脂肪体 a1、脂肪体 a2、脂肪体 a3 和脂肪体 a4 的尺寸和光密度。

实验结果见图 3 中 B。结果表明,当 DOPC 与 TAG 的比例为 2:5 时,脂肪体的产量最高;脂肪体的尺寸随着 DOPC 与 TAG 的比例上升而减小,至 DOPC:TAG 为 1:5 时达到最小并进入平台。综合脂肪体的即产量较高且脂肪体的尺寸较大两个因素,确定制备脂肪体中 DOPC 与 TAG 的最佳比例为 2:5。

35 ②按照上述步骤 1 的方法,将步骤 1 中 (1) 的 2mg DOPC 分别替换为 1.33mg DOPC 和 0.67mg DSPC、1mg DOPC 和 1mg DSPC、0.67mg DOPC 和 1.33mg DSPC、以及 2mg DSPC,其它步骤均不变,得到脂肪体 A1 (DOPC: DSPC 的比例为 2:1)、脂

肪体 A2 (DOPC: DSPC 的比例为 1:1)、脂肪体 A3 (DOPC: DSPC 的比例为 1:2) 和脂肪体 A4 (磷脂仅为 DSPC), 然后分别测量脂肪体 A1、脂肪体 A2、脂肪体 A3 和脂肪体 A4 的尺寸和光密度。

5 结果表明, 当 DOPC 与 DSPC 的比例降低时, 即 DSPC 的相对含量升高时, 脂肪体的产量明显下降 (图 3 中 C 的 a), 而脂肪体的尺寸随着 DOPC 与 DSPC 的比例降低而急剧增大 (图 3 中 C 的 b)。

③按照上述步骤 1 的方法, 将步骤 1 中 (1) 的 2mg DOPC 分别替换为 1.33mg DOPC 和 0.67mgDOPE、1mg DOPC 和 1mgDOPE、0.67mg DOPC 和 1.33mgDOPE、和、2mgDOPE, 其它步骤均不变, 得到脂肪体 B1 (DOPC: DOPE 的比例为 2:1)、脂肪体 B2 (DOPC: DOPE 的比例为 1:1)、脂肪体 B3 (DOPC: DOPE 的比例为 1:2) 和脂肪体 B4 (磷脂仅为 DOPE), 然后分别测量脂肪体 B1、脂肪体 B2、脂肪体 B3 和脂肪体 B4 的尺寸和光密度。

15 结果表明, DOPE 的掺入不影响脂肪体的产量, 直至 DOPC 与 DOPE 的比例达到 1:2 时, 脂肪体的产量才急剧下降 (图 3 中 D 的 a), 而脂肪体的尺寸随着 DOPC 与 DOPE 的比例降低而急剧增大, 直至 DOPC 与 DOPE 的比例达到 1:2 时, 脂肪体的尺寸无法检出 (图 3 中 D 的 b)。

④按照上述步骤 1 的方法, 将步骤 1 中 (1) 的 5mg TAG 分别替换为 4.17mg TAG 和 0.83mgCO、4mg TAG 和 1mgCO、3.75mg TAG 和 1.25mgCO、和、3.33mg TAG 和 1.67mgCO, 其它步骤均不变, 得到脂肪体 C1 (TAG: CO 的比例为 5:1)、脂肪体 C2 (TAG: CO 的比例为 4:1)、脂肪体 C3 (TAG: CO 的比例为 3:1) 和脂肪体 C4 (TAG: CO 的比例为 2:1), 然后分别测量脂肪体 C1、脂肪体 C2、脂肪体 C3 和脂肪体 C4 的尺寸和光密度。

25 结果表明, CO 的掺入不影响脂肪体的产量, 直至 TAG 与 CO 的比例达到 3:1 时, 脂肪体的产量才显著下降 (图 3 中 E 的 a), 脂肪体的尺寸也略有下降 (图 3 中 E 的 b), 表明中性脂质组成可以极大地影响脂肪体产量和大小。

4、脂肪体的稳定性

在室温或 4℃ 条件下孵育脂肪体 a, 孵育 7 天。整个孵育过程中, 每天测定脂肪体 a 的尺寸、在 OD₆₀₀ 处的光密度, 并用光学显微镜和荧光显微镜对脂肪体进行观察。

30 结果表明 (图 3 中 F 和图 4), 整个孵育过程中, 脂肪体 a 的光密度和尺寸均无显著变化, 可见脂肪体 a 是相对稳定的。

实施例 2、通过招募固有蛋白和/或功能蛋白的重组人工脂滴和通过招募载脂蛋白重组人工脂蛋白

下述实施例中的 Ulp1 记载在如下文献中: Hu, W., Wu, H., Zhang, H., Gong, W. & Perrett, S. Resonance assignments for the substrate binding domain of Hsp70 chaperone Ssa1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomol NMR Assign* 9, 329-332, doi:10.1007/s12104-015-9603-5 (2015)。在下述实验孵育过程中 Ulp1 可剪切蛋白上的 SMT3 标签。

脂滴是高度动态的,并通过多种脂滴蛋白的介导参与数目繁多的生理功能和相互作用。脂滴上的蛋白可大致分为两类:固有蛋白和动态蛋白。固有蛋白被认为选择性的定位于脂滴上,参与脂滴大小的控制,并介导动态蛋白的定位。例如,磷酸化的 PLIN1 促使激素敏感性脂肪酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 定位于脂滴上。因此,使用脂肪体来解构脂滴的功能,就必须在脂肪体上装载脂滴固有蛋白,然后在成功招募固有蛋白生成人工脂滴的基础上,进一步招募功能蛋白。对于脂蛋白而言,不同的载脂蛋白不仅是不同脂蛋白的特异性标记,同时也是脂蛋白的骨架之一。本发明中,脂滴固有蛋白具体为来自于从细菌到哺乳动物的不同生物体的脂滴固有蛋白,包括从产油菌 RHA1 中分离的 RHA1-脂滴(RHA1 LD)上的 MLDS 蛋白,线虫脂滴上的 MDT-28 蛋白和哺乳动物非脂肪细胞中的 Perilipin-2 蛋白,功能蛋白为 ATGL。载脂蛋白具体为来自于人的载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A-I, Apo A-I)。

一、蛋白的表达和纯化

人工合成序列表中序列 1 所示的 DNA 分子(即 MLDS 基因),序列 1 所示的 DNA 分子编码序列 2 所示的蛋白质(即 MLDS 蛋白,NCBI 编号为 WP_005261062.1)。人工合成序列表中序列 3 所示的 DNA 分子(即 MDT-28 基因,NCBI 编号为 NM_001129054.2),序列 3 所示的 DNA 分子编码序列 4 所示的蛋白质(即 MDT-28 蛋白,NCBI 编号为 NP_001122526.1)。人工合成序列表中序列 5 所示的 DNA 分子(即 Perilipin-2 基因),序列 5 所示的 DNA 分子编码序列 6 所示的蛋白质(即 Perilipin-2 蛋白,NCBI 编号为 NP_001113.2)。人工合成序列表中序列 7 所示的 DNA 分子(即 ATGL 基因),序列 7 所示的 DNA 分子编码序列 8 所示的蛋白质(即 ATGL,NCBI 编号为 NP_065109.1)。人工合成序列表中序列 9 所示的 DNA 分子(即 MLDS-GFP 融合基因),序列 9 所示的 DNA 分子编码序列 10 所示的蛋白质(即 MLDS-GFP 融合蛋白)。人工合成序列表中序列 11 所示的 DNA 分子(即 MDT-28-GFP 融合基因),序列 11 所示的 DNA 分子编码序列 12 所示的蛋白质(即 MDT-28-GFP 融合蛋白)。人工合成序列表中序列 13 所示的 DNA 分子(即 Perilipin-2-GFP 融合基因),序列 13 所示的 DNA 分子编码序列 14 所示的蛋白质(即 Perilipin-2-GFP 融合蛋白)。牛血清白蛋白购自 Sigma 公司,产品目录号为 A4612。

1、SMT3-Perilipin-2 蛋白的表达与纯化

(1) 用序列表中序列 5 所示的 DNA 分子替换载体 pET28a-SMT3 的限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 识别序列间的片段(载体 pET28a-SMT3 被限制性核酸内切酶 EcoRI 和 XhoI 切成一个大片段和一个小片段,将大片段与序列 5 中所示的 DNA 分子连接),得到重组质粒。该重组质粒可表达 N-末端融合有 6×His 标签和 SMT3 结构域的可溶性蛋白。

(2) 将步骤(1)构建的重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3),得到含有重组质粒的重组大肠杆菌。

(3) 将步骤(2)获得的重组大肠杆菌接种于 2×YT 培养基(将 16g 蛋白胨、

10g 酵母提取物和 4g 氯化钠溶解于 1000mL 蒸馏水), 37°C 培养, 当重组大肠杆菌的培养菌液的 OD₆₀₀ 达到 0.6 (将该培养菌液命名为诱导前菌液), 加入异丙基 β-D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG), 使 IPTG 在体系中浓度为 0.4mM, 16°C 诱导 24h (IPTG 诱导后的培养菌液命名为诱导后菌液)。

5 分别收集 (4000rpm、离心 20min) 诱导前菌液或诱导后菌液的菌体, 重悬于缓冲液 T 中, 然后用高压细胞破碎仪 (型号为 JNBIO JN-3000 PLUS) 裂解, 得到全细胞裂解液。将全细胞裂解液进行 SDS-PAGE, 然后通过银染和 Western 印迹法进行分析。结果表明 (图 5 中 A, 其中 a 为银染分析结果, b 为 Western 印迹法分析结果, 箭头指向 SMT3-Perilipin-2 蛋白对应的条带), 诱导后菌液中
10 SMT3-Perilipin-2 蛋白大量表达。

(4) 取步骤 (3) 的诱导后菌液的菌体的全细胞裂解液, 30000g 离心 50min, 得到的上清和沉淀, 将上清上样至镍离子金属亲和层析柱 (填料为螯合有镍离子的 Chelating Sepharose Fast Flow, 柱体购自 Thermo, 产品目录号为 29924, 柱体积 4mL, 内径 1.2cm), 然后先用含 20mM 咪唑的缓冲液 T 洗脱 12 个柱体积
15 以去除非目的蛋白一次, 再用含 500mM 咪唑的缓冲液 T 洗脱 3 个柱体积以收集目的蛋白 (过柱后全部缓冲液 T 均含目的蛋白) 两次, 然后用离心超滤管 (Amicon 公司产品) 进行缓冲液交换去除咪唑, 通过尺寸排阻色谱法 (Size Exclusive Chromatography, SEC) 再次纯化 (HiLoad 16/600 Superdex 200 柱, GE 公司产品), 洗脱流速为 0.8mL/min, 根据其保留体积分别收集四个组分, 分别命名为
20 组分 1 (保留体积为 45mL-57mL)、组分 2 (保留体积为 57mL-67mL)、组分 3 (保留体积为 67mL-79mL) 和组分 4 (保留体积为 79mL-94mL)。

将镍离子金属亲和层析柱纯化的各组分的进行 SDS-PAGE, 然后用胶体蓝染色, 结果见图 5 中 B (泳道依次为全细胞裂解液、上清、沉淀、流穿、咪唑洗脱液-1 (20mM 咪唑洗脱液)、咪唑洗脱液-2 (500mM 咪唑洗脱液第一部分)、咪唑
25 洗脱液-3 (500mM 咪唑洗脱液第二部分)。尺寸排阻色谱法分子筛纯化结果见图 5 中 C (峰 1 为组分 1, 峰 2 为组分 2, 峰 3 为组分 3, 峰 4 为组分 4)。对全部 500mM 咪唑二次洗脱液 (即咪唑洗脱液-2 合并咪唑洗脱液-3) (图 5 中 D 的左图) 和尺寸排阻色谱法纯化得到的四个组分 (组分 1、组分 2、组分 3 和组分 4) (图 5 中 D 的右图) 进行 SDS-PAGE 和胶体蓝染色, 结果表明, 组分 1 包含了纯化后的
30 SMT3-Perilipin-2 蛋白。

2、MLDS 蛋白的表达与纯化

按照上述方法, 将步骤 1 中 (1) 的序列表中序列 5 所示的 DNA 分子替换为序列表中序列 1 所示的 DNA 分子、载体 pET28a-SMT3 替换为载体 pGEX-6p-1、限制性内切酶 XhoI 替换为 BamHI, 步骤 1 中 (4) 的镍离子金属亲和层析柱替换为
35 GST 亲和层析柱、咪唑替换为还原性谷胱甘肽, 其它步骤均不变, 获得纯化 MLDS 蛋白。

3、MDT-28 蛋白的表达与纯化

按照上述方法, 将步骤 1 中 (1) 的序列表中序列 5 所示的 DNA 分子替换为

序列表中序列 3 所示的 DNA 分子、载体 pET28a-SMT3 替换为载体 pGEX-6p-1、限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 替换为限制性内切酶 BamHI 和 NotI，步骤 1 中（4）的镍离子金属亲和层析柱替换为 GST 亲和层析柱、咪唑替换为还原性谷胱甘肽，其它步骤均不变，获得纯化 MDT-28 蛋白。

5 4、MLDS-GFP 融合蛋白的表达与纯化

按照上述方法，将步骤 1 中（1）的序列表中序列 5 所示的 DNA 分子替换为序列表中序列 9 所示的 DNA 分子、载体 pET28a-SMT3 替换为载体 pET28a，其它步骤均不变，获得纯化 MLDS-GFP 融合蛋白。

5、MDT-28-GFP 融合蛋白的表达与纯化

10 按照上述方法，将步骤 1 中（1）的序列表中序列 5 所示的 DNA 分子替换为序列表中序列 11 所示的 DNA 分子、载体 pET28a-SMT3 替换为载体 pET28a、限制性内切酶 EcoRI 替换为限制性内切酶 BamHI，其它步骤均不变，获得纯化 MDT-28-GFP 融合蛋白。

6、Perilipin-2-GFP 融合蛋白的表达与纯化

15 按照上述方法，将步骤 1 中（1）的序列表中序列 5 所示的 DNA 分子替换为序列表中序列 13 所示的 DNA 分子、载体 pET28a-SMT3 替换为载体 pET28a，其它步骤均不变，获得纯化 Perilipin-2-GFP 融合蛋白。

7、SMT3-ATGL 蛋白的表达与纯化

20 按照上述方法，将步骤 1 中（1）的序列表中序列 5 所示的 DNA 分子替换为序列表中序列 7 所示的 DNA 分子，步骤 1 中（2）的大肠杆菌 BL21 (DE3) 替换为大肠杆菌 Rosetta，其它步骤均不变，获得纯化 SMT3-ATGL 蛋白。

8、Apo A-I 的表达与纯化

25 参考文献 Peitsch, M. C. et al. A purification method for apolipoprotein A-I and A-II. Anal Biochem 178, 301-305 (1989). 中记载的方法，获得纯化 Apo A-I。

二、脂肪体对固有蛋白和/或功能蛋白和/或载脂蛋白的招募

1、固有蛋白的招募与分布

(1) Perilipin-2 蛋白的招募

30 a1、5 μ g SMT3-Perilipin-2 蛋白、25ng Ulp1 和实施例 1 制备的 50 μ l 脂肪体 a 混合，得到 100 μ l 的混合体系。

a2、完成步骤 a1 后，室温下（实际操作中在冰上也可）孵育 1h，得到混合体系。

a3、完成步骤 a2 后，取混合体系，20000g、离心 5min，液相体系呈现两层分层（上层为脂肪体），抽去下层溶液，保留上层。

35 a4、取完成步骤 a3 的上层，重悬于 100 μ l 缓冲液 B 中，20000g、离心 5min，液相体系呈现两层分层（上层为脂肪体），抽去下层溶液，保留上层。

a5、取完成步骤 a4 的上层，重悬于 100 μ l 缓冲液 B 中，20000g、离心 5min，液相体系呈现两层分层，抽去下层溶液，保留上层（即脂肪体）。

将 5 μ g SMT3-Perilipin-2 蛋白、步骤 a5 得到脂肪体和步骤 a3 抽去的下层溶液均进行 SDS-PAGE 后银染检测。

结果见图 6 中的泳道 7、8 和 9 (泳道 7 为总蛋白 (SMT3-Perilipin-2 蛋白), 泳道 8 为脂质体募集蛋白 (步骤 a5 得到脂肪体), 泳道 9 为溶液蛋白 (步骤 a3 抽去的下层溶液))。结果表明, Perilipin-2 蛋白有约 50% 被招募到脂肪体 a 上。将招募有 Perilipin-2 蛋白的脂肪体命名为人工脂滴 Perilipin-2。

蛋白饱和度测定: 将 SMT3-Perilipin-2 蛋白、25ng Ulp1 和实施例 1 中制备的 30 μ l 脂肪体 a 混合, 得到 50 μ l 的混合体系, 混合体系中 SMT3-Perilipin-2 蛋白的浓度为 0.015 μ g/ μ l、0.030 μ g/ μ l、0.056 μ g/ μ l、0.080 μ g/ μ l、0.101 μ g/ μ l、0.137 μ g/ μ l、0.166 μ g/ μ l 或 0.191 μ g/ μ l。然后按照上述步骤 a2 至 a5, 获得人工脂滴, 进行 SDS-PAGE, 然后用胶体蓝染色, 或以 Perilipin-2 抗体为一抗进行 Western blot 检测。结果见图 7 中 C (其中 a 为胶体蓝染色结果, b 为 Western blot 检测结果)。结果表明, Perilipin-2 蛋白在脂肪体上的募集是可以饱和的。

(2) MLDS 蛋白的招募

b1、5 μ g MLDS 蛋白和实施例 1 制备的 50 μ l 脂肪体 a 混合, 得到 100 μ l 的混合体系。

b2、完成步骤 b1 后, 室温下 (实际操作中在冰上也可) 孵育 1h, 得到混合体系。

b3、完成步骤 b2 后, 取混合体系, 20000g、离心 5min, 液相体系呈现两层分层 (上层为脂肪体), 抽去下层溶液, 保留上层。

b4、取完成步骤 b3 的上层, 重悬于 100 μ l 缓冲液 B 中, 20000g、离心 5min, 液相体系呈现两层分层 (上层为脂肪体), 抽去下层溶液, 保留上层。

b5、取完成步骤 b4 的上层, 重悬于 100 μ l 缓冲液 B 中, 20000g、离心 5min, 液相体系呈现两层分层, 抽去下层溶液, 保留上层 (即脂肪体)。

将 5 μ g MLDS 蛋白、步骤 b5 得到脂肪体和步骤 b3 抽去的下层溶液均进行 SDS-PAGE 后银染检测。

结果见图 6 中的泳道 1、2 和 3 (泳道 1 为总蛋白 (MLDS 蛋白), 泳道 2 为脂质体募集蛋白 (步骤 b5 得到脂肪体), 泳道 3 为溶液蛋白 (步骤 b3 抽去的下层溶液))。结果表明, MLDS 蛋白有约 80% 被招募到脂肪体 a 上。将招募有 MLDS 蛋白的脂肪体命名为人工脂滴 MLDS。

(3) MDT-28 蛋白的招募

将步骤 (2) 中的 MLDS 蛋白替换为 MDT-28 蛋白, 其他步骤均不变。结果见图 6 中的泳道 4、5 和 6 (泳道 4 为总蛋白 (MDT-28 蛋白), 泳道 5 为脂质体募集蛋白, 泳道 6 为溶液蛋白)。结果表明, MDT-28 蛋白有约 90% 被招募到脂肪体 a 上。将招募有 MDT-28 蛋白的脂肪体命名为人工脂滴 MDT-28。

(4) 牛血清白蛋白的招募

将步骤 (2) 中的 MLDS 蛋白替换为牛血清白蛋白, 其他步骤均不变。结果见图 6 中的泳道 11、12 和 13 (泳道 11 为总蛋白 (牛血清白蛋白), 泳道 12 为脂质体募集蛋白, 泳道 13 为溶液蛋白)。结果表明, 牛血清白蛋白没有被招募到脂肪体 a 上。

将招募有蛋白质的脂肪体命名为人工脂滴。

(5) 固有蛋白在人工脂滴上的分布

将步骤 1 中 (1) 5 μ g SMT3-Perilipin-2 蛋白替换为 10 μ g 纯化 Perilipin-2-GFP 融合蛋白, 其他步骤均不变, 获得人工脂滴 Perilipin-2-GFP。

5 将步骤 1 中 (2) 5 μ g MLDS 蛋白替换为 10 μ g 纯化 MLDS-GFP 融合蛋白, 获得人工脂滴 MLDS-GFP。将步骤 1 中 (3) 5 μ g MDT-28 蛋白替换为 10 μ g MDT-28-GFP 融合蛋白, 获得人工脂滴 MDT-28-GFP。

然后用共聚焦显微镜对人工脂滴进行观察。结果表明 (图 7 中 B 和图 8), 人工脂滴上的荧光蛋白质呈环形结构, Perilipin-2-GFP 融合蛋白、MLDS-GFP 融合蛋白和 MDT-28-GFP 融合蛋白均匀分布在人工脂滴的表面上, 偶尔可观察到大的荧光蛋白的聚集体, 未检测到游离的 GFP; 使用 OMX DeltaVision (SIM) 超分辨率显微镜观察人工脂滴, 人工脂滴上的蛋白仍然呈现均匀分布的状态。

2、功能蛋白 ATGL 的招募

将步骤 1 中 (1) SMT3-Perilipin-2 蛋白替换为 SMT3-ATGL 蛋白, 50 μ l 脂肪体 a 替换为 30 μ l 脂肪体 a, 其他步骤均不变, 获得招募有 ATGL 的脂肪体。

结果见图 9 (左图为常温孵育的实验结果, 右图为 4 $^{\circ}$ C 孵育的实验结果, 其中泳道 1 和 5 为 Marker, 泳道 2 和 6 为总蛋白 (SMT3-ATGL 蛋白), 泳道 3 和 7 为脂质体募集蛋白, 泳道 4 和 8 为溶液蛋白)。结果表明, ATGL 有约 1/3 被招募到脂肪体 a 上。将招募有 ATGL 的脂肪体命名为人工脂滴 ATGL。

20 蛋白饱和度测定: 将 SMT3-ATGL 蛋白和实施例 1 中制备的 50 μ l 脂肪体 a 混合, 得到 100 μ l 的混合体系, 混合体系中 SMT3-ATGL 蛋白的浓度为 0.091 μ g/ μ l, 0.132 μ g/ μ l, 0.171 μ g/ μ l, 0.209 μ g/ μ l, 0.244 μ g/ μ l, 0.278 μ g/ μ l 或 0.310 μ g/ μ l。然后按照步骤 1 中的 a2 至 a5, 获得人工脂滴, 进行 SDS-PAGE, 然后银染, 或以 ATGL 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 产品目录号为 2138) 为一抗进行 Western blot 检测。结果见图 10 中 A (其中 a 为银染结果, b 为 Western blot 检测结果)。结果表明, 当 ATGL 在反应体系中的浓度为 0.209 μ g/ μ l 时, 脂肪体 a 对 ATGL 的招募达到了饱和。

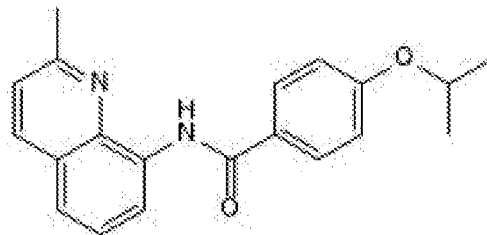
3、载脂蛋白的招募

30 将步骤 1 中 (2) 5 μ g MLDS 蛋白替换为 9 μ g Apo A-I, 其他步骤均不变, 获得招募有 Apo A-I 的脂肪体。结果见图 10 中 B (泳道 1 为脂质体募集蛋白, 泳道 2 为溶液蛋白, 泳道 3 为总蛋白 (Apo A-I))。结果表明, Apo A-I 有约 50% 被招募到脂肪体 a 上。将招募有 Apo A-I 的脂肪体命名为人工脂蛋白 Apo A-I。

制备脂肪体 a', 方法基本同实施例 1 的步骤一, 差别仅在于用商购的甘油三油酸酯代替实施例 1 中的甘油三脂, 在步骤 (5) 中得到脂肪体 a'。将脂肪体 a' 进行实施例 2 的各项试验, 其结果与脂肪体 a 基本一致, 均无显著差异。

商购的甘油三油酸酯为甘油三油酸酯 (triolein, T0), 购自 Sigma 公司, 产品目录号为 92860。

实施例 3、脂肪体在作为药物载体中的应用
本实施例中的药物为式 a 所示的化合物；



式 a。

5 该药物为脂溶性药物，能与甘油三酯互溶，为用于治疗 II 型糖尿病和/或代谢紊乱的候选药物，具体为 TOCRIS 公司的产品目录号为 5869 的产品，商品名称为 CDN 1163。ZORBAX SB-C18 色谱柱为 Agilent 公司的产品。

一、制备载药脂肪体

1、利用运用涡旋和两步法离心制备载药脂肪体，具体步骤如下：

10 (1) 取 10mg TAG 加入到微量离心管中，加入 100 μ l 氯仿，充分溶解，得到 TAG 溶液。

(2) 取 2mg CDN 1163，置于另一微量离心管中，加入 200 μ l 氯仿，充分溶解，得到浓度为 10 μ g/ μ l 的药物溶液。

15 (3) 完成步骤 (1) 和步骤 (2) 后，将 TAG 溶液和药物溶液混合均匀，然后用高纯氮气吹干溶剂，得到混合物物质(混合物物质中含 10mg TAG 和 2mg CDN1163)。

(4) 取 80 μ l DOPC 溶液（其中含有 2mg DOPC）加入到微量离心管中，用高纯氮气吹干溶剂。

20 (5) 向完成步骤 (4) 的微量离心管中加入 100 μ l 缓冲液 B 和 6mg 步骤 (3) 得到的混合物物质，涡旋 4min（涡旋 10s，停止 10s），得到乳白色的脂质混合物甲，将该脂质混合物甲以 20000g 离心 5min（实际应用中 18000-22000g 离心 3-7min 均可）。离心后，微量离心管中底部为沉淀组分甲，液相体系呈现两层分层（上层为白色带甲，白色带甲以下的部分为溶液甲）。

25 (6) 完成步骤 (5) 后，通过抽取的方式弃除溶液甲与沉淀组分甲，保留白色带甲，加入 100 μ l 缓冲液 B，涡旋，得到乳白色的脂质混合物乙，将该脂质混合物乙以 20000g 离心 5min（实际应用中 18000-22000g 离心 3-7min 均可）。离心后，如果微量离心管中底部有沉淀，即为沉淀组分乙，液相体系呈现两层分层（上层为白色带乙，白色带乙以下的部分为溶液乙）。

30 (7) 完成步骤 (6) 后，通过抽取的方式弃除溶液乙与沉淀组分乙，保留白色带乙，加入 100 μ l 缓冲液 B，涡旋，得到乳白色的脂质混合物丙，将该脂质混合物丙以 20000g 离心 5min（实际应用中 18000-22000g 离心 3-7min 均可）。离心后，液相体系呈现两层分层（上层为白色带丙，白色带丙以下的部分为溶液丙）。

步骤 (7) 即步骤 (6) 的重复，实际应用中的步骤 (6) 的重复次数以白色

带下层无沉淀为准。

5 (8) 完成步骤(7)后,取白色带丙,加入 100 μ l 缓冲液 B,涡旋混匀,1000g 离心 5min(实际应用中 800-1200g 离心 3-7min),离心后,液相体系呈现两层分层(上层为白色带丁,白色带丁以下的部分为溶液丁)。收集溶液丁,即为载药脂肪体。

利用上述方法制备载药脂肪体的具体流程见图 11 中 A(其中 a 为制备载药脂肪体的组分,b 为制备载药脂肪体的流程图)。利用上述方法制备的载药脂肪体见图 11 中 B(左为实施例 1 步骤一中 1 制备的脂肪体 a,右为载药脂肪体)。

二、载药脂肪体的特征

10 1、用动态光散射仪测定脂肪体 a 的平均尺寸约为 166.1 纳米(图 11 中 C)。
2、测定载药脂肪体中 CDN1163 的浓度。具体步骤如下:

(1) 标准曲线的绘制

15 准确称取 CDN 1163 10mg 于 100ml 容量瓶中,用无水甲醇(色谱级)溶解并定容至 100ml,配成 100 μ g/ml CDN 1163 母液。然后继续用无水甲醇(色谱级)稀释获得浓度分别为 20、4 μ g/mL 的标准溶液。使用配有 ZORBAX SB-C18 色谱柱(5.0 μ m, 4.6mm \times 150mm)的 Agilent 1260 液相色谱仪测定不同浓度 CDN 1163 的峰面积,3 次重复。流动相由甲醇和水组成,甲醇和水的体积比为 85:15,流速为 1.0mL/min。检测波长为 245nm。

20 以 CDN1163 的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。标准曲线的线性方程为: $y=61.796x+18.2$ ($R^2=0.99999$),其中 y 为峰面积,x 为 CDN 1163 浓度(μ g/mL)。CDN 1163 浓度在 0-100 μ g/ml 线性关系良好。

(2) 测定载药脂肪体中 CDN 1163 的浓度

25 取载药脂肪体 10 μ l,加入 990 μ l 无水甲醇(色谱级),涡旋 10s(目的为充分混合),然后 20000g 离心 5min,弃沉淀,收集上清液。使用配有 ZORBAX SB-C18 色谱柱(5.0 μ m, 4.6mm \times 150mm)的 Agilent 1260 液相色谱仪测定上清液的峰面积,3 次重复。流动相由甲醇和水组成,甲醇和水的体积比为 85:15,流速为 1.0mL/min。检测波长为 245nm。

30 实验结果见图 11 中 D(保留时间为 6.366min)。根据所述上清液的峰面积和步骤(1)的标准曲线,计算得到上清液中 CDN1163 浓度为 9.604 μ g/ml,进一步得到载药脂肪体中 CDN 1163 浓度为 960.4 μ g/ml。

上述结果表明,实施例 1 制备的脂肪体可以作为药物载体。

工业应用

以本发明公开的方法制备的脂肪体、人工脂滴和人工脂蛋白,可作为药物载体,进而完成各种生物学和医学的目标,具有重要的应用价值。

权利要求

- 1、一种制备由中性脂质和单层磷脂膜组成的脂肪体的方法，包括下述步骤：
a1) 将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应，然后进行离心，收集上层液相，从上层液相中分离得到脂肪体。
- 5 2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述“从上层液相中分离得到脂肪体”包括如下步骤：
a2) 将所述上层液相进行两次以上的纯化；每次纯化的方法为：将上层液相与所述缓冲液混匀，然后使其分层，收集上层液相；
a3) 将步骤 a2) 得到的上层液相与所述缓冲液混合，然后使其分层，收集
10 下层液相，其中含有脂肪体。
- 3、如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述缓冲液为缓冲液 B 所述缓冲液 B 的溶质及其在缓冲液中浓度为：15mM~25mM HEPES, 80mM~120mM KCl, 1.5~2.5mM 的 MgCl₂；溶剂为去离子水；pH 为 7.2~7.6。
- 4、如权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述缓冲液 B 的溶质及其在缓
15 冲液中浓度为：20mM HEPES, 100mM KCl, 2mM 的 MgCl₂；溶剂为去离子水；pH 为 7.4。
- 5、如权利要求 1 至 4 任一所述的方法，其特征在于：所述步骤 a1) 中，所述涡旋的参数为：总时长为 3~5min；所述步骤 a1) 中，所述离心的参数为：
18000~22000g、3~7min。
- 20 6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述涡旋的参数为：总时长 4min；所述离心的参数为：20000g、5min。
- 7、如权利要求 1 至 6 中任一所述的方法，其特征在于：所述步骤 a2) 中，所述“上层液相进行两次以上的纯化”中的次数以上层液相与所述缓冲液混匀，分层后无沉淀为准。
- 25 8、如权利要求 1 至 7 中任一所述的方法，其特征在于：所述步骤 a2) 中，所述“使其分层”是通过离心实现的，所述离心的参数为：18000~22000g、3~7min。
- 9、如权利要求 8 所述的方法，其特征在于：所述离心的参数为：20000g、5min。
- 30 10、如权利要求 1 至 9 中任一所述的方法，其特征在于：所述步骤 a3) 中，所述“使其分层”是通过离心实现的，所述离心的参数为：800~1200g、3~7min。
- 11、如权利要求 10 所述的方法，其特征在于：所述离心的参数为：1000g、5min。
- 12、如权利要求 1 至 11 中任一所述的方法，其特征在于：所述磷脂为 b1)、
35 b2) 或 b3)：
b1) 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸胆碱；
b2) 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸胆碱和 1, 2-二-(9Z-

十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸乙醇胺;

b3) 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸胆碱和 1, 2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;

5 所述中性脂质为 c1) 或 c2) : c1) 甘油三酯; c2) 胆固醇油酸酯和甘油三酯。

13、如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于:

所述 b2) 中, 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸胆碱和 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸乙醇胺的质量比为 1:0.01~2;

10 所述 b3) 中, 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸胆碱和 1, 2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比为 1:0.01~2;

所述 c2) 中, 胆固醇油酸酯和甘油三酯的质量比为 1~5: 1。

14、如权利要求 13 所述的方法, 其特征在于:

所述 b2) 中, 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸胆碱和 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸乙醇胺的质量比为 2:1、1:1 或 1:2;

15 所述 b3) 中, 1, 2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3 磷酸胆碱和 1, 2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比为 2:1、1:1 或 1:2;

所述 c2) 中, 胆固醇油酸酯和甘油三酯的质量比为 5:1、4:1、3:1 或 2:1。

15、如权利要求 1 至 14 中任一所述的方法, 其特征在于: 所述磷脂和所述中性脂质的质量比为 (d1) 至 (d6) 中的任一种: (d1) 0.25~3:5; (d2) 3:5; 20 (d3) 2:5; (d4) 1:5; (d5) 1:10; (d6) 1:20。

16、用权利要求 1-15 任一所述方法制备的脂肪体。

17、一种制备人工脂滴的方法, 包括在权利要求 16 所述脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白, 获得人工脂滴。

18、如权利要求 17 所述的方法, 其特征在于: 所述固有蛋白为 MLDS 蛋白、25 MDT-28 蛋白或 Perilipin-2 蛋白; 所述功能蛋白为 ATGL;

所述 MLDS 蛋白为如下 e1) 或 e2) : e1) 氨基酸序列如序列表中序列 2 所示的蛋白质; e2) 将 e1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 MLDS 蛋白具有相同功能的蛋白质。

30 所述 MDT-28 蛋白为如下 f1) 或 f2) : f1) 氨基酸序列如序列表中序列 4 所示的蛋白质; f2) 将 f1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 MDT-28 蛋白具有相同功能的蛋白质。

所述 Perilipin-2 蛋白为如下 g1) 或 g2) : g1) 氨基酸序列如序列表中序列 6 所示的蛋白质; g2) 将 g1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 Perilipin-2 蛋白具有相同功能的蛋白质。

35 所述 ATGL 为如下 h1) 或 h2) : h1) 氨基酸序列如序列表中序列 8 所示的蛋白质; h2) 将 h1) 所示的蛋白质经过 1 至 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 ATGL 具有相同功能的蛋白质。

- 19、用权利要求 17 或 18 所述方法制备的人工脂滴。
- 20、一种制备人工脂蛋白的方法，包括在权利要求 16 所述脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白，获得人工脂蛋白。
- 21、如权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述载脂蛋白为 Apo A-I。
- 5 22、用权利要求 20 或 21 所述方法制备的人工脂蛋白。
- 23、(j1) 至 (j6) 中的任一种：
- (j1) 权利要求 16 所述脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用；
- (j2) 权利要求 19 所述人工脂滴在制备药物载体中的应用；
- 10 (j3) 权利要求 19 所述人工脂滴在制备药物中的应用；
- (j4) 权利要求 22 所述人工脂蛋白在制备药物载体中的应用；
- (j5) 权利要求 22 所述人工脂蛋白在制备药物中的应用；
- (j6) 权利要求 16 所述脂肪体作为药物载体的应用。
- 24、一种药物，其活性成分为负载有具有药用功能的化合物的脂肪体；所
- 15 述脂肪体为权利要求 16 所述的脂肪体。
- 25、如权利要求 24 所述的药物，其特征在于：所述药物为脂溶性药物。
- 26、如权利要求 24 或 25 所述的药物，其特征在于：所述药物为治疗 II 型糖尿病和/或代谢紊乱的药物或候选药物。

20

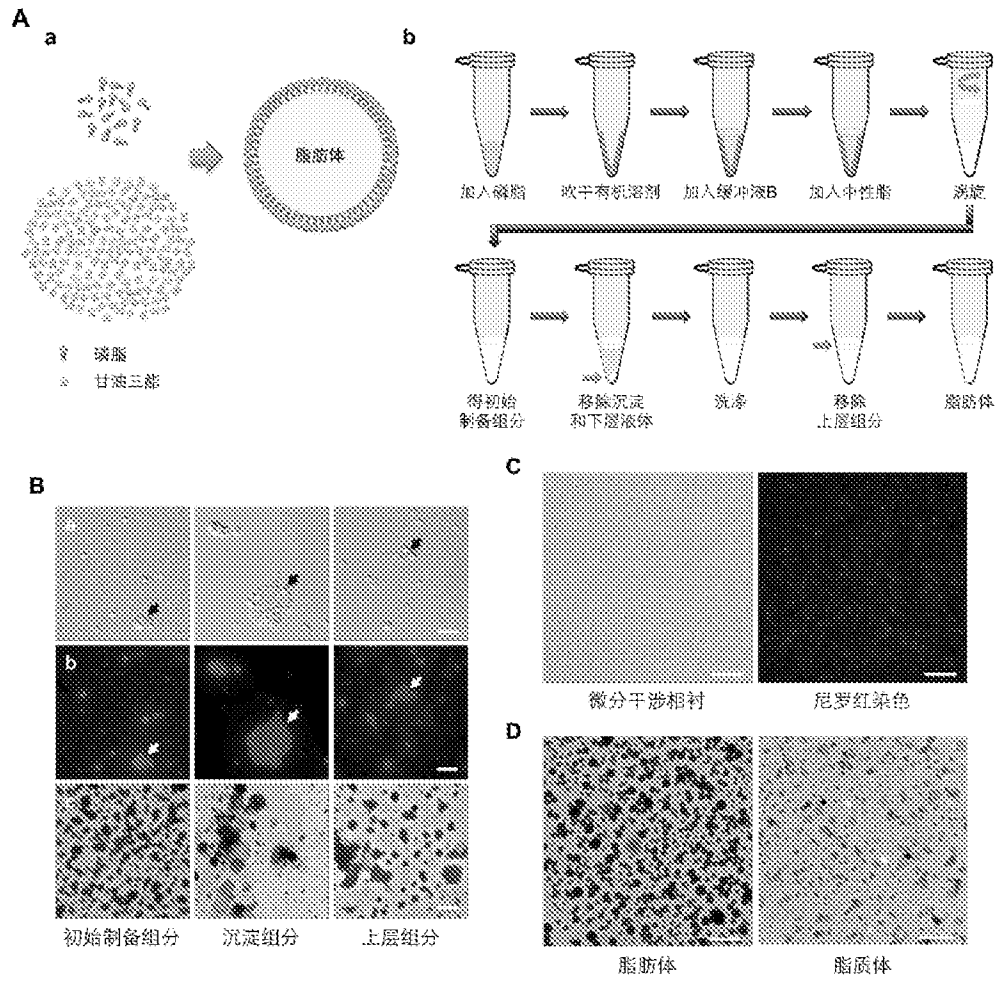
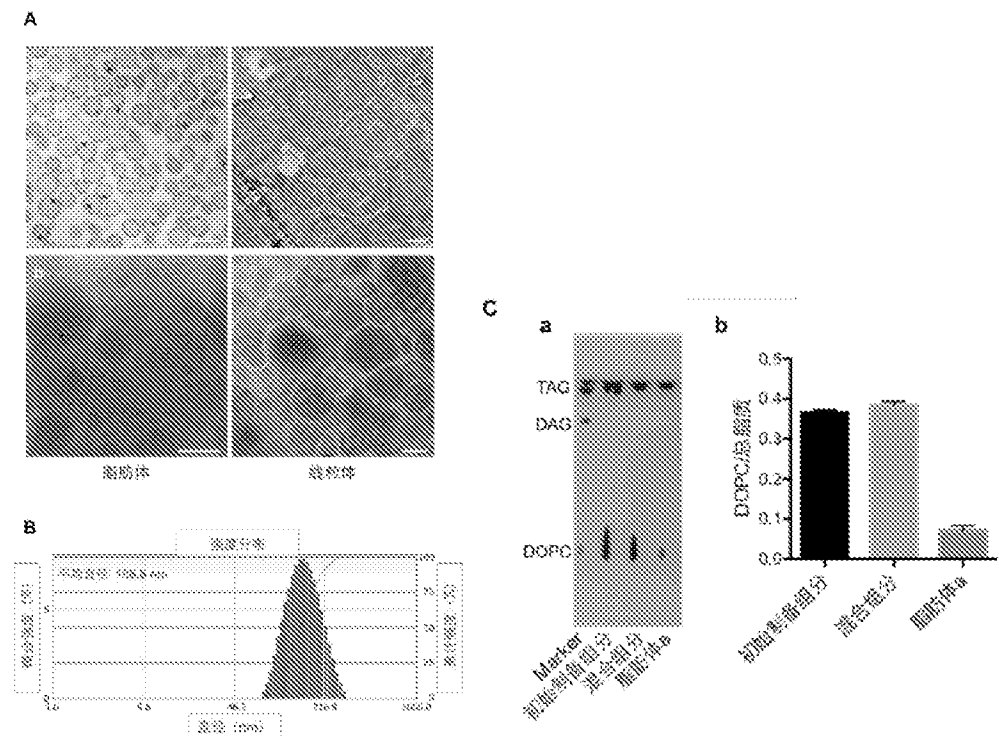


图 1



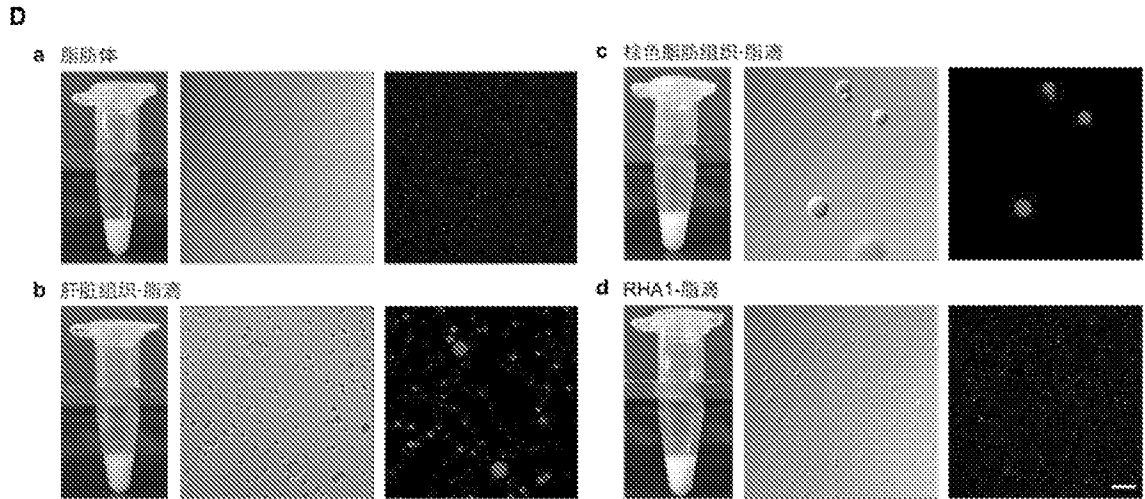
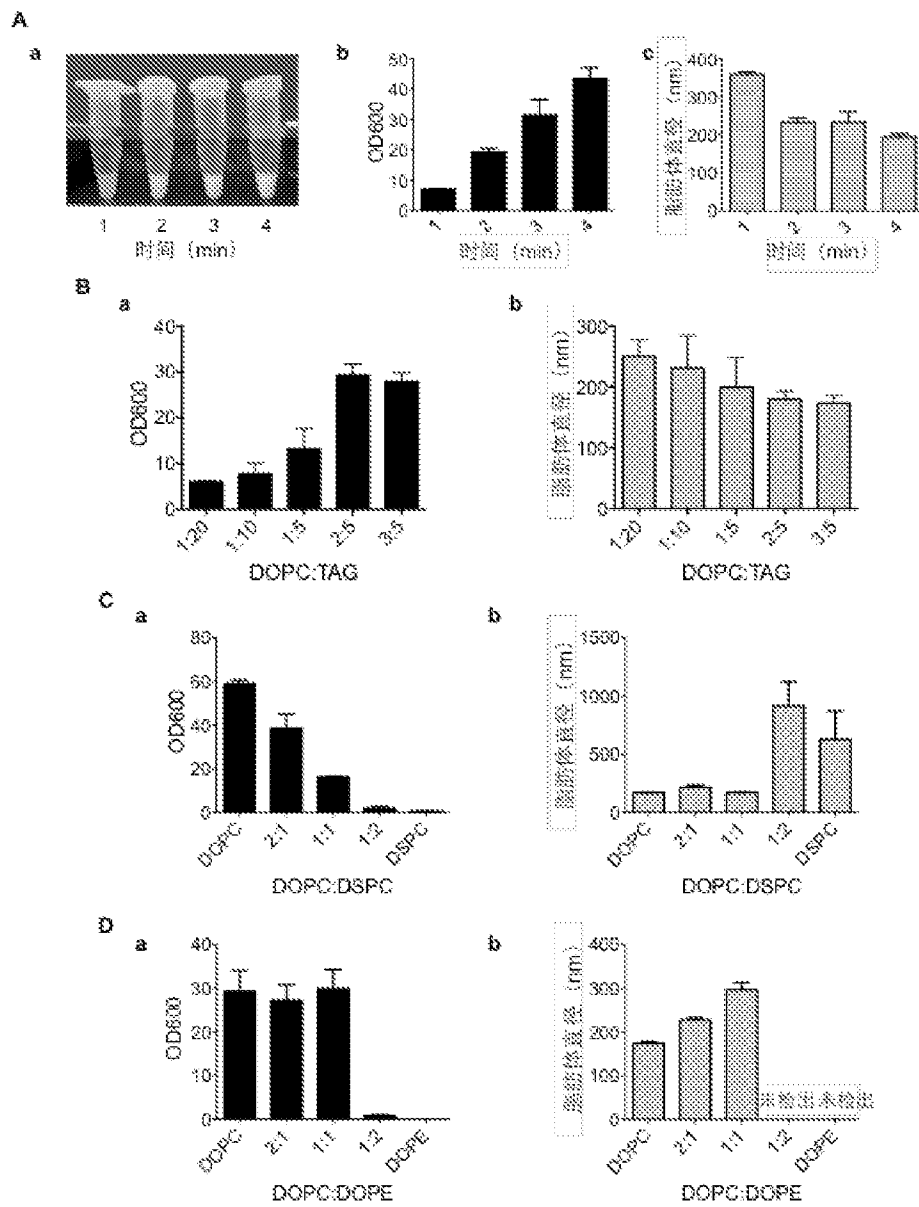


图 2



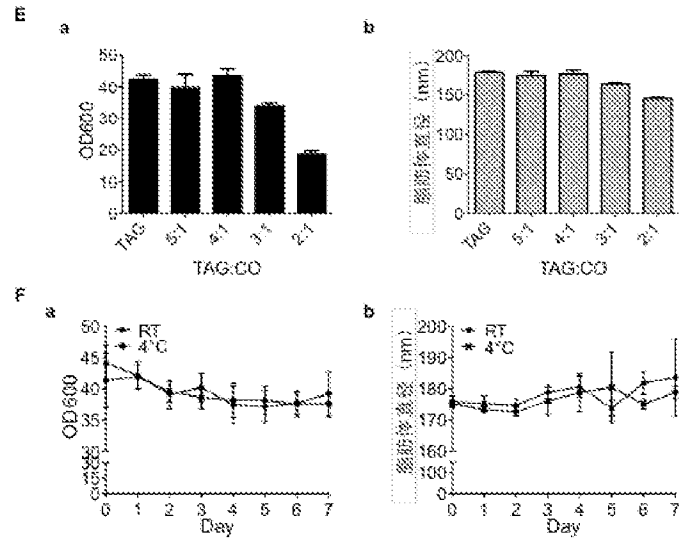


图 3

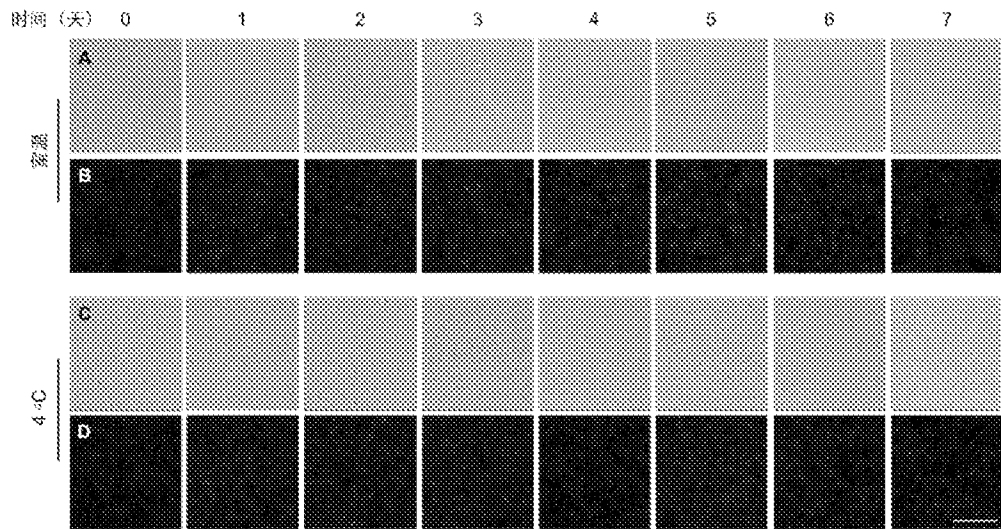
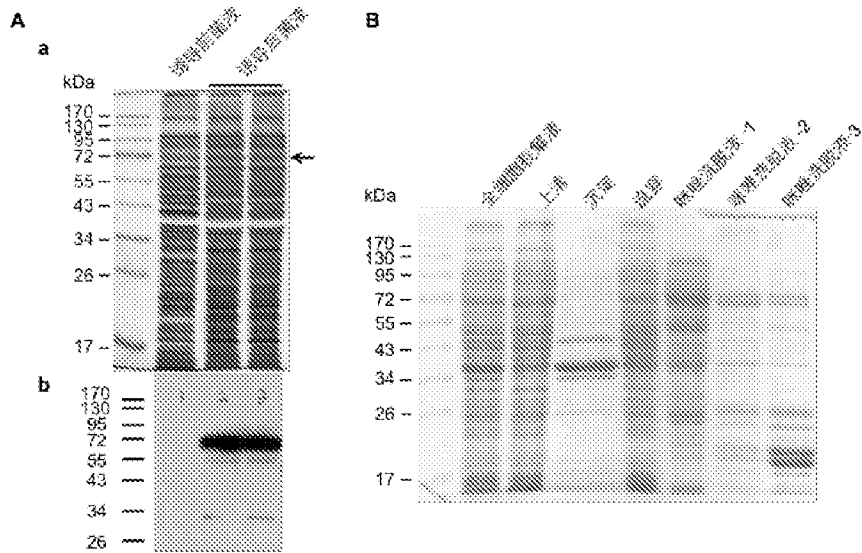


图 4



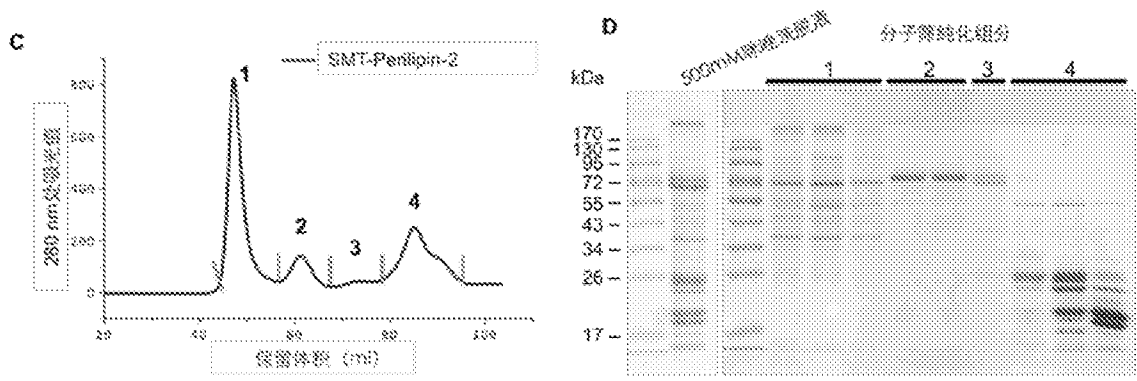


图 5

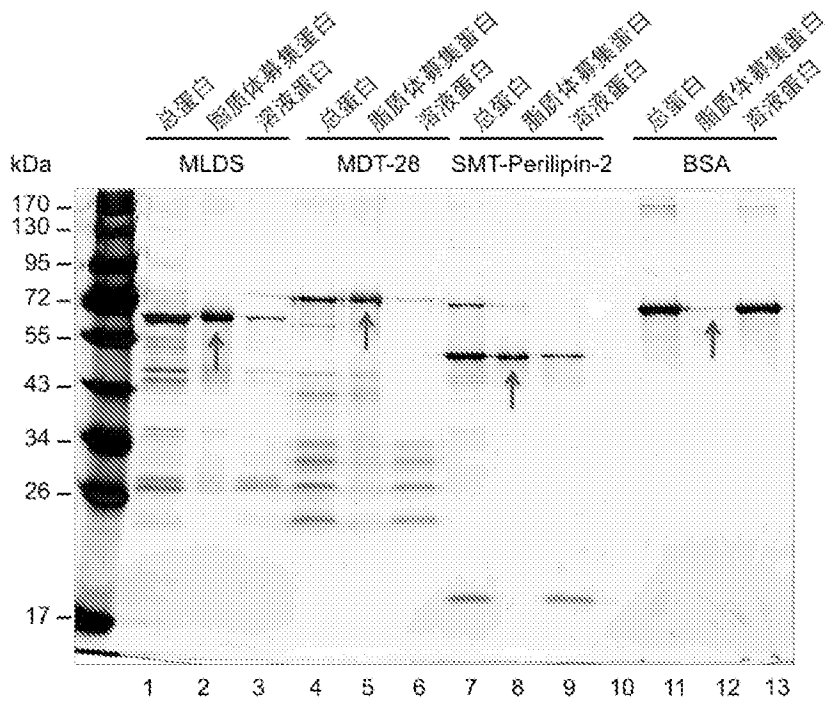
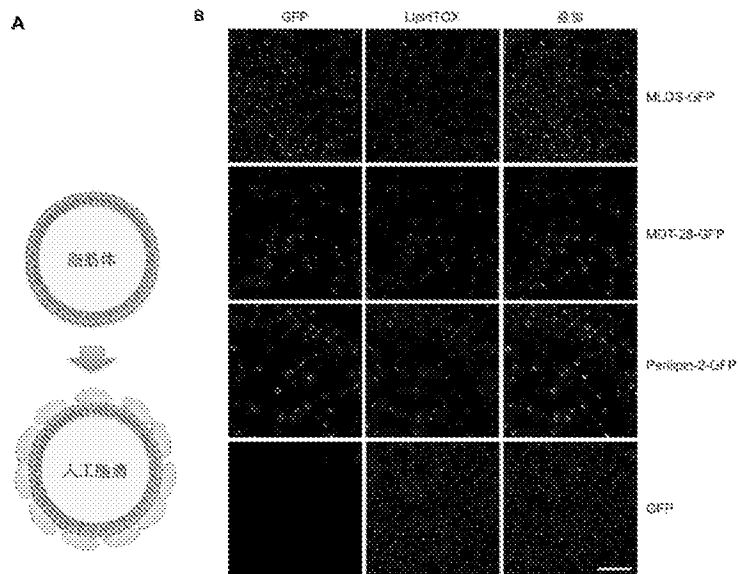


图 6



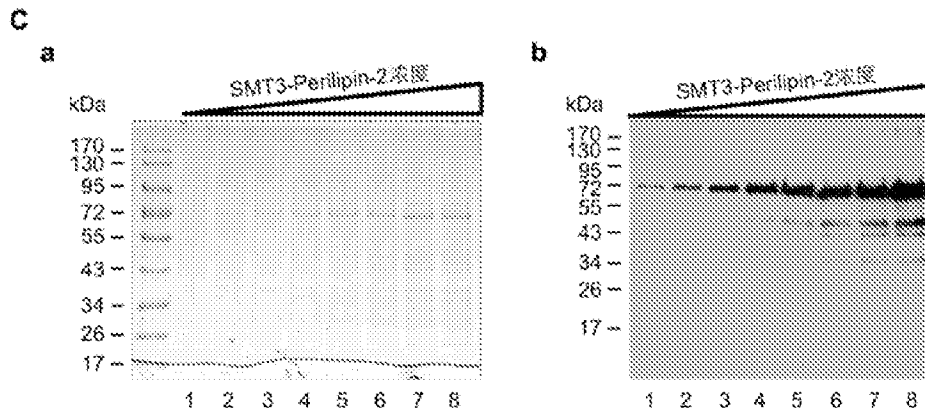


图 7

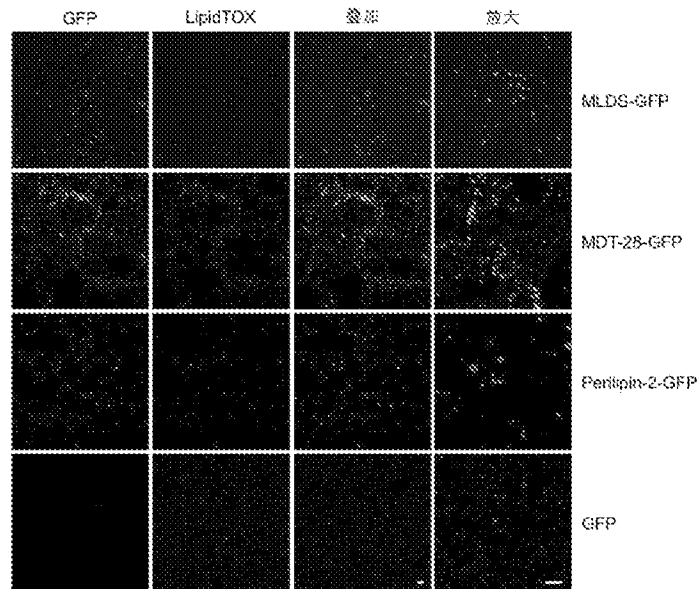


图 8

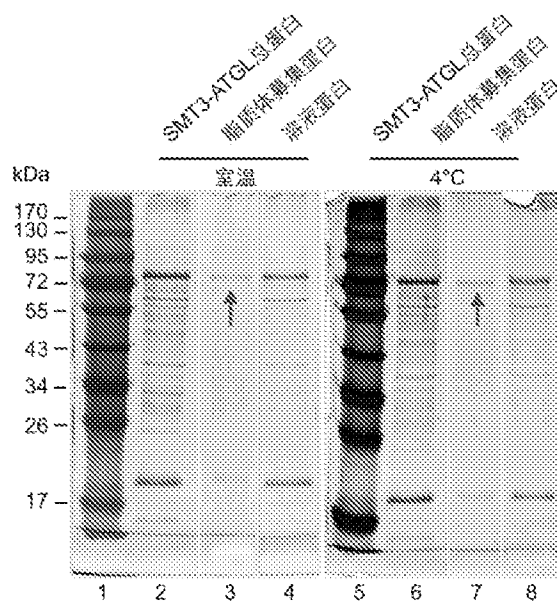


图 9

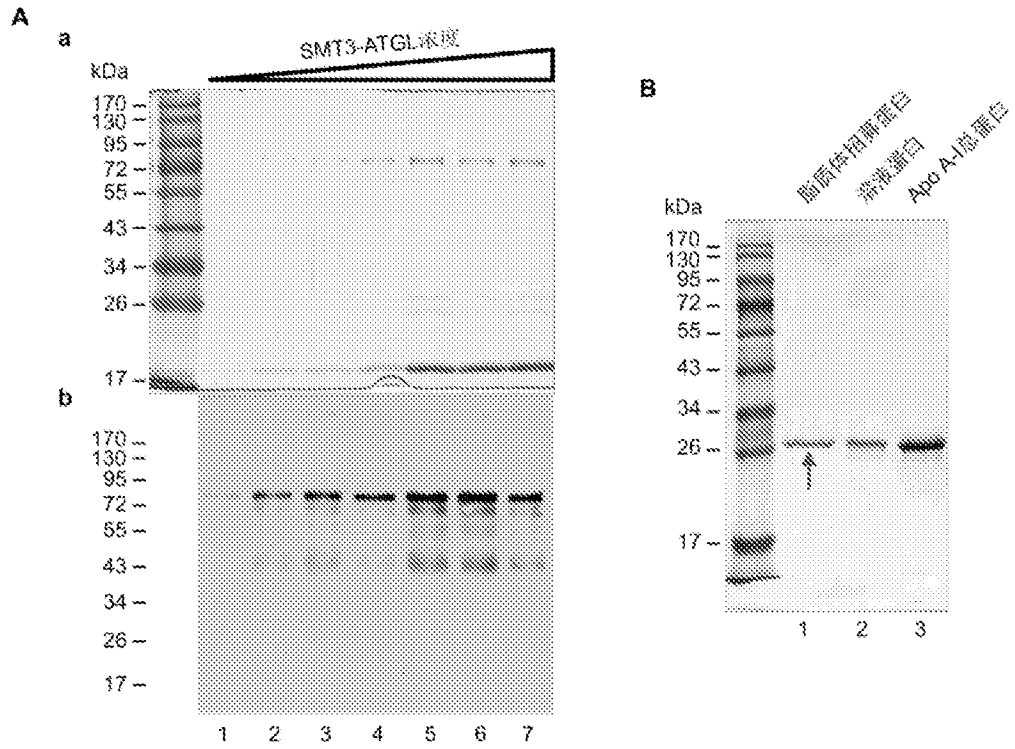
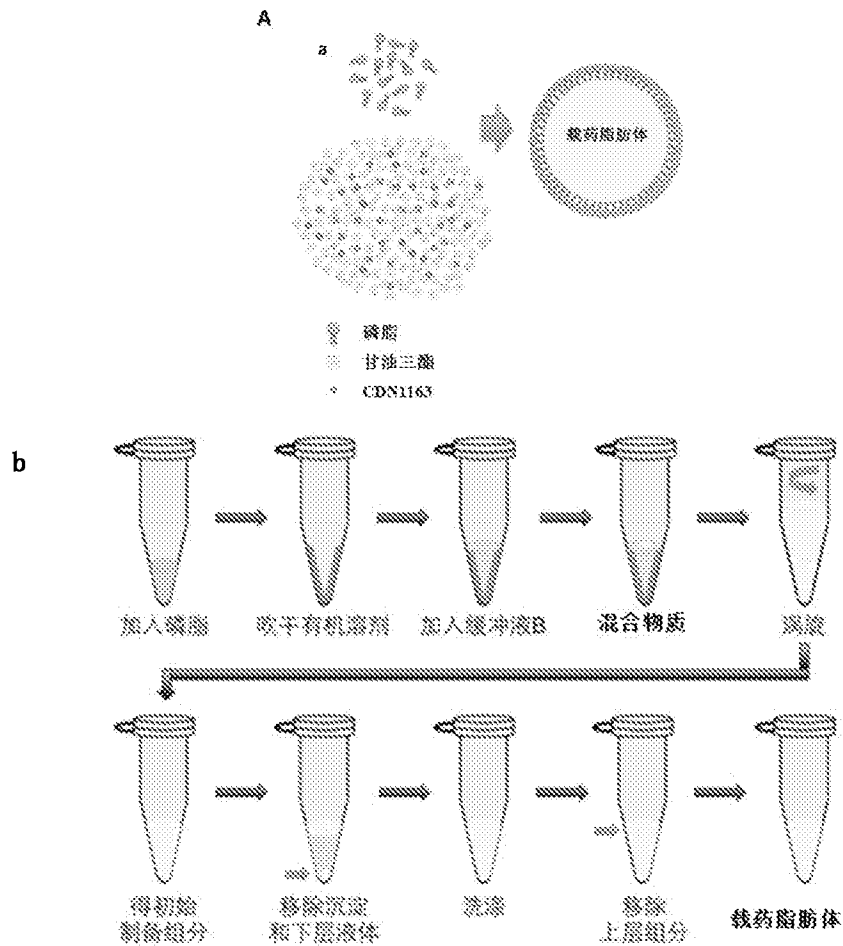
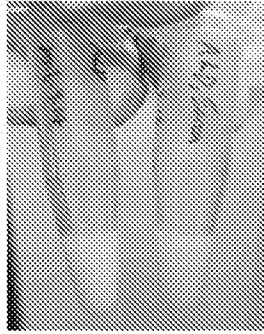


图 10



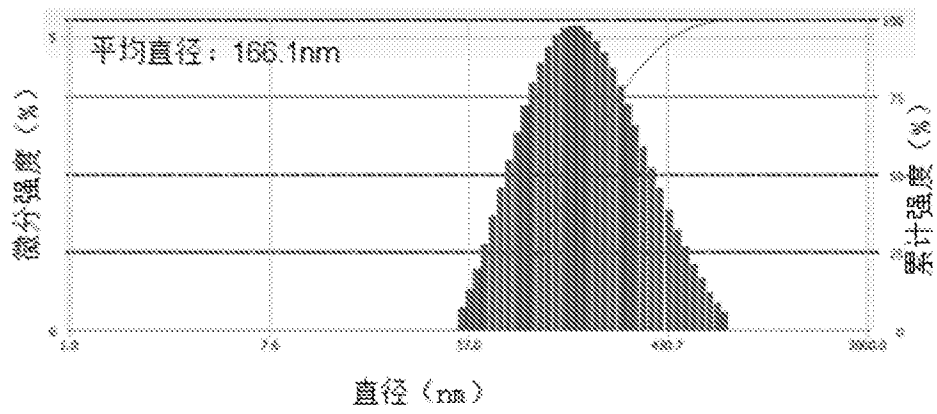
B

脂肪体a 载药脂肪体



C

强度分布



D

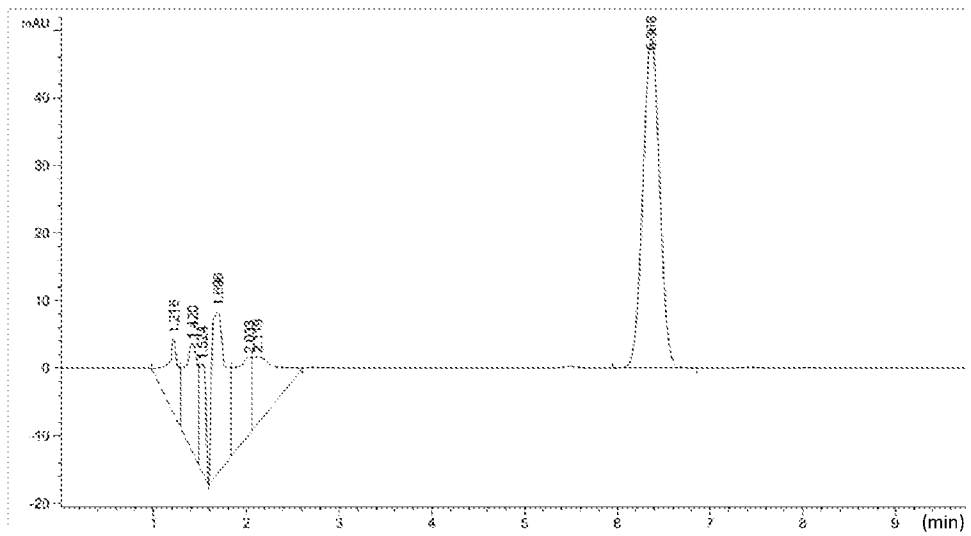


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/106732

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127 (2006.01) i; C07K 14/47 (2006.01) i; A61K 47/24 (2006.01) i; A61K 47/42 (2017.01) i; A61K 47/14 (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

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)

DWPI, SIPOABS, CPEA, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNTXT, TWTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, VEN, PUBMED, GOOGLE SCHOLAR, ELESVIER, CNKI: centrifugation, carrier, ATGL, MLDS, MDT-28, Perilipin, Apo, liposome, adiposome, artificial, lipid droplet, lipoprotein, organelle, phospholipid +, neutral lipid+, vector, monolayer+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105483076 A (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 13 April 2016 (13.04.2016) claims 1-23, and description, paragraph [0076]	1-26
PX	WANG Y. et al. "Construction of Nanodroplet/Adiposome and Artificial Lipid Droplets" ACS NANO, no. 10, 24 February 2016 (24.02.2016), pages 3312-3322	1-26
X	CN 1717223 A (BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES INSTITUTE) 04 January 2006 (04.01.2006) claims 1-9, 34;, and description, page 7, line 9 to page 9, line 4, page 10, lines 6-26, and embodiment 2	1-26
X	LIU P.S. et al. "Reconstitution of Adiposome and Artificial Lipid Droplets" The FASEB Journal, vol. 29, no. 1 (supplement), 30 April 2015 (30.04.2015) the abstract	1-26

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">10 January 2017</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">03 February 2017</p>
<p>Name and mailing address of the ISA</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China</p> <p>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao</p> <p>Haidian District, Beijing 100088, China</p> <p>Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">ZHONG, Hui</p> <p>Telephone No. (86-10) 62413728</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/106732

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1870894 A (ESPERION THERAPEUTICS INCORPORATED) 29 November 2006 (29.11.2006) the whole document	1-26
A	WO 2011127456 A2 (PACIRA PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 13 October 2011 (13.10.2011) the whole document	1-26
A	KRAHMER N. et al. "Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion is Mediated by Localized Activation of CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase" CELL METABOLISM, no. 14, 05 October 2011 (05.10.2011), pages 504-515	1-26
A	WANG, Xiaomei et al. "Research Overviews Of Multivesicular Liposome" Chinese Journal Of New Drugs 2006, vol. 15, no. 15, 31 December 2006 (31.12.2006), pages 1243-1246 and 1234	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/106732

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/106732

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105483076 A	13 April 2016	None	
CN 1717223 A	04 January 2006	US 2004204354 A1	14 October 2004
		US 7682627 B2	23 March 2010
		AU 2003302676 A8	23 June 2004
		CA 2507762 C	05 February 2013
		KR 101111477 B1	23 February 2012
		CA 2791165 C	24 February 2015
		JP 4995423 B2	08 August 2012
		US 7576055 B2	18 August 2009
		JP 2012131799 A	12 July 2012
		TW I347196 B	21 August 2011
		EP 1581186 A2	05 October 2005
		KR 101186210 B1	08 October 2012
		CN 101284136 A	15 October 2008
		JP 5587352 B2	10 September 2014
		AU 2003302676 A1	23 June 2004
		US 7220833 B2	22 May 2007
		KR 20110086775 A	29 July 2011
		US 2007264351 A1	15 November 2007
		WO 2004050062 A2	17 June 2004
		CN 100386068 C	07 May 2008
		WO 2004050062 A3	29 December 2004
		CA 2791165 A1	17 June 2004
		KR 20050084163 A	26 August 2005
CA 2507762 A1	17 June 2004		
US 2007292413 A1	20 December 2007		
US 2007134313 A1	14 June 2007		
JP 2006516539 A	06 July 2006		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/106732

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1870894 A	29 November 2006	US 7514402 B2	07 April 2009
		IS 8356 A	16 March 2006
		CN 1870894 B	10 August 2011
		ZA 200602248 B	26 September 2007
WO 2011127456 A2	13 October 2011	ZA 200602248 A	26 September 2007
		AP 200603578 D0	30 April 2006
		JP 2013531549 A	08 August 2013
		US 2013306759 A1	21 November 2013
		US 2013177634 A1	11 July 2013
		HK 1215554 A1	02 September 2016
		US 2013195965 A1	01 August 2013
		US 2013183375 A1	18 July 2013
		HK 1215553 A1	02 September 2016
		US 2013177633 A1	11 July 2013
		EP 2555752 A4	03 June 2015
		WO 2011127456 A3	29 December 2011
		US 2013183373 A1	18 July 2013
		US 2011250264 A1	13 October 2011
		IL 222275 D0	31 December 2012
		HK 1183230 A1	19 February 2016
CN 104959052 A	07 October 2015		
US 2013183372 A1	18 July 2013		
CN 104971672 A	14 October 2015		
CN 104959087 A	07 October 2015		
EP 2813220 A3	17 June 2015		
CN 103002878 B	01 July 2015		
CN 104922071 A	23 September 2015		
EP 2813220 A2	17 December 2014		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/106732

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		HK 1204963 A1	11 December 2015
		CN 103002878 A	27 March 2013
		HK 1216386 A1	11 November 2016
		HK 1215381 A1	26 August 2016
		US 2013177638 A1	11 July 2013
		US 2013177637 A1	11 July 2013
		US 2013177636 A1	11 July 2013
		JP 2016000398 A	07 January 2016
		EP 2555752 A2	13 February 2013
		US 2013177635 A1	11 July 2013
		HK 1215555 A1	02 September 2016
		CN 104997634 A	28 October 2015

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 9/127(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61K 47/14(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; C07K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>DWPI, SIPOABS, CPEA, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNTXT, TWXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, VEN, PUBMED, GOOGLE SCHOLAR, ELESVIER, CNKI: 脂肪体, 脂滴, 细胞器, 脂蛋白, 人工, 磷脂, 中性脂, 离心, 载体, 单层, ATGL, MLDS, MDT-28, Perilipin, Apo, liposome, adiposome, artificial, lipid droplet, lipoprotein, organelle, phospholipid+, neutral lipid+, vector, monolayer+.</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <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 105483076 A (中国科学院生物物理研究所) 2016年 4月 13日 (2016 - 04 - 13) 权利要求1-23, 说明书第76段</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>WANG Y. 等. "Construction of Nanodroplet/Adiposome and Artificial Lipid Droplets" ACS NANO, 第10期, 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24), 第3312-3322页</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1717223 A (布朗歌特洛克菲勒神经科学研究所) 2006年 1月 4日 (2006 - 01 - 04) 权利要求1-9, 34; 说明书第7页第9行-第9页第4行, 第10页第6-26行, 实施例2</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>LIU P.S. 等. "Resconstitution of Adiposome and Artificial Lipid Droplets" THE FASEB JOURNAL, 第29卷, 第1(增刊)期, 2015年 4月 30日 (2015 - 04 - 30), 摘要</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1870894 A (埃斯普里昂治疗公司) 2006年 11月 29日 (2006 - 11 - 29) 全文</td> <td>1-26</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 105483076 A (中国科学院生物物理研究所) 2016年 4月 13日 (2016 - 04 - 13) 权利要求1-23, 说明书第76段	1-26	PX	WANG Y. 等. "Construction of Nanodroplet/Adiposome and Artificial Lipid Droplets" ACS NANO, 第10期, 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24), 第3312-3322页	1-26	X	CN 1717223 A (布朗歌特洛克菲勒神经科学研究所) 2006年 1月 4日 (2006 - 01 - 04) 权利要求1-9, 34; 说明书第7页第9行-第9页第4行, 第10页第6-26行, 实施例2	1-26	X	LIU P.S. 等. "Resconstitution of Adiposome and Artificial Lipid Droplets" THE FASEB JOURNAL, 第29卷, 第1(增刊)期, 2015年 4月 30日 (2015 - 04 - 30), 摘要	1-26	A	CN 1870894 A (埃斯普里昂治疗公司) 2006年 11月 29日 (2006 - 11 - 29) 全文	1-26
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 105483076 A (中国科学院生物物理研究所) 2016年 4月 13日 (2016 - 04 - 13) 权利要求1-23, 说明书第76段	1-26																		
PX	WANG Y. 等. "Construction of Nanodroplet/Adiposome and Artificial Lipid Droplets" ACS NANO, 第10期, 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24), 第3312-3322页	1-26																		
X	CN 1717223 A (布朗歌特洛克菲勒神经科学研究所) 2006年 1月 4日 (2006 - 01 - 04) 权利要求1-9, 34; 说明书第7页第9行-第9页第4行, 第10页第6-26行, 实施例2	1-26																		
X	LIU P.S. 等. "Resconstitution of Adiposome and Artificial Lipid Droplets" THE FASEB JOURNAL, 第29卷, 第1(增刊)期, 2015年 4月 30日 (2015 - 04 - 30), 摘要	1-26																		
A	CN 1870894 A (埃斯普里昂治疗公司) 2006年 11月 29日 (2006 - 11 - 29) 全文	1-26																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 1月 10日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 2月 3日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>钟辉</p> <p>电话号码 (86-10)62413728</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2011127456 A2 (PACIRA PHARMACEUTICALS INC.) 2011年 10月 13日 (2011 - 10 - 13) 全文	1-26
A	KRAHMER N. 等. "Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase" CELL METABOLISM, 第14期, 2011年 10月 5日 (2011 - 10 - 05), 第504-515页	1-26
A	王晓梅等. "多囊脂质体的研究进展" 中国新药杂志, 第15卷, 第15期, 2006年 12月 31日 (2006 - 12 - 31), 第1243-1246, 1234页	1-26

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- 纸件形式
- 电子形式
- b. (提交时间)
- 含在申请提交时的国际申请中
- 以电子形式与国际申请一起提交
- 为检索之用随后提交本单位
2. 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/106732

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	105483076	A	2016年 4月 13日	无			
CN	1717223	A	2006年 1月 4日	US	2004204354	A1	2004年 10月 14日
				US	7682627	B2	2010年 3月 23日
				AU	2003302676	A8	2004年 6月 23日
				CA	2507762	C	2013年 2月 5日
				KR	101111477	B1	2012年 2月 23日
				CA	2791165	C	2015年 2月 24日
				JP	4995423	B2	2012年 8月 8日
				US	7576055	B2	2009年 8月 18日
				JP	2012131799	A	2012年 7月 12日
				TW	1347196	B	2011年 8月 21日
				EP	1581186	A2	2005年 10月 5日
				KR	101186210	B1	2012年 10月 8日
				CN	101284136	A	2008年 10月 15日
				JP	5587352	B2	2014年 9月 10日
				AU	2003302676	A1	2004年 6月 23日
				US	7220833	B2	2007年 5月 22日
				KR	20110086775	A	2011年 7月 29日
				US	2007264351	A1	2007年 11月 15日
				WO	2004050062	A2	2004年 6月 17日
				CN	100386068	C	2008年 5月 7日
				WO	2004050062	A3	2004年 12月 29日
				CA	2791165	A1	2004年 6月 17日
				KR	20050084163	A	2005年 8月 26日
				CA	2507762	A1	2004年 6月 17日
				US	2007292413	A1	2007年 12月 20日
				US	2007134313	A1	2007年 6月 14日
				JP	2006516539	A	2006年 7月 6日
				US	7514402	B2	2009年 4月 7日
CN	1870894	A	2006年 11月 29日	IS	8356	A	2006年 3月 16日
				CN	1870894	B	2011年 8月 10日
				ZA	200602248	B	2007年 9月 26日
				ZA	200602248	A	2007年 9月 26日
				AP	200603578	D0	2006年 4月 30日
WO	2011127456	A2	2011年 10月 13日	JP	2013531549	A	2013年 8月 8日
				US	2013306759	A1	2013年 11月 21日
				US	2013177634	A1	2013年 7月 11日
				HK	1215554	A1	2016年 9月 2日
				US	2013195965	A1	2013年 8月 1日
				US	2013183375	A1	2013年 7月 18日
				HK	1215553	A1	2016年 9月 2日
				US	2013177633	A1	2013年 7月 11日
				EP	2555752	A4	2015年 6月 3日
				WO	2011127456	A3	2011年 12月 29日
				US	2013183373	A1	2013年 7月 18日
				US	2011250264	A1	2011年 10月 13日
				IL	222275	D0	2012年 12月 31日
				HK	1183230	A1	2016年 2月 19日
				CN	104959052	A	2015年 10月 7日
				US	2013183372	A1	2013年 7月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/106732

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 104971672 A	2015年 10月 14日
		CN 104959087 A	2015年 10月 7日
		EP 2813220 A3	2015年 6月 17日
		CN 103002878 B	2015年 7月 1日
		CN 104922071 A	2015年 9月 23日
		EP 2813220 A2	2014年 12月 17日
		HK 1204963 A1	2015年 12月 11日
		CN 103002878 A	2013年 3月 27日
		HK 1216386 A1	2016年 11月 11日
		HK 1215381 A1	2016年 8月 26日
		US 2013177638 A1	2013年 7月 11日
		US 2013177637 A1	2013年 7月 11日
		US 2013177636 A1	2013年 7月 11日
		JP 2016000398 A	2016年 1月 7日
		EP 2555752 A2	2013年 2月 13日
		US 2013177635 A1	2013年 7月 11日
		HK 1215555 A1	2016年 9月 2日
		CN 104997634 A	2015年 10月 28日