

(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
2019 年 1 月 10 日 (10.01.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/007033 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/88 (2006.01) *C12P 19/04* (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61K 47/42* (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/073401

(22) 国际申请日: 2018 年 1 月 19 日 (19.01.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710544077.9 2017 年 7 月 5 日 (05.07.2017) CN

(71) 申请人: 山东大学 (SHANDONG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

(72) 发明人: 李福川 (LI, Fuchuan); 中国山东省济南 shi 历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。彭春娥 (PENG, Chune); 中国山东省济南 shi 历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。王庆彬 (WANG, Qingbin); 中国山东省济南 shi 历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。王淑敏 (WANG, Shumin); 中国山东省济南 shi 历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。王文爽 (WANG, Wenshuang); 中国山东省济南 shi 历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。王凌天 (WANG, Lingtian); 中国山东省济南 shi 历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

(74) 代理人: 济南金迪知识产权代理有限公司 (JINAN JINDI INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO.,

LTD.); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于发明人身份 (细则 4.17(i))

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: GLYCOSAMINOGLYCAN LYASE HAVING DIFFICULTY DEGRADING CS-E AND ENCODING GENE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶及其编码基因与应用

(57) Abstract: Disclosed are a glycosaminoglycan lyase having difficulty degrading CS-E and an encoding gene and the use thereof. The amino acid sequence of the glycosaminoglycan lyase is as shown in SEQ ID NO. 2, and the nucleotide sequence of the encoding gene of the glycosaminoglycan lyase is as shown in SEQ ID NO. 1. The specific activities of the glycosaminoglycan lyase on HA and CS-A, CS-C, CS-D and CS-E are 13.8, 7.2, 6.7, 5.9 and 5.3 U/mg, respectively, and lowly sulphated CS-E polysaccharides are used as substrates to prepare highly sulphated oligosaccharides with different degrees of polymerisation, and the prepared highly sulphated oligosaccharides can be used for combating tumour metastasis. The enzyme can also be applied to fields such as medicine and cosmetics and has broad application prospects.

(57) 摘要: 一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶及其编码基因与应用。糖胺聚糖裂解酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示, 糖胺聚糖裂解酶的编码基因和核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示, 该糖胺聚糖裂解酶对 HA 和 CS-A、CS-C、CS-D、CS-E 的比活分别是 13.8、7.2、6.7、5.9、5.3U/mg, 并以低硫酸化的 CS-E 多糖为底物制备高硫酸化的不同聚合度的寡糖, 制备的高硫酸化的寡糖可用于抗肿瘤转移。该酶也可应用于医药及化妆品等领域, 具有广阔的应用前景。

WO 2019/007033 A1

一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶及其编码基因与应用

技术领域

本发明涉及一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶及其编码基因与应用，属于基因工程技术领域。

背景技术

糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 是重复二糖单位组成的直链线性多糖。二糖单位由己糖胺 (N-乙酰氨基葡萄糖胺/N-乙酰半乳糖胺) 和己糖醛酸 (D-葡萄糖醛酸/L-艾杜糖醛酸) 或 D-半乳糖通过糖苷键连接组成。GAG 早期又称粘多糖，结构中含有硫酸基和 (或) 羧基，带负电荷，具有聚阴离子特性。

根据是否发生硫酸化，糖胺聚糖可分为硫酸化和非硫酸化两大类。非硫酸化 GAG，主要指透明质酸 (Hyaluronic Acid, HA)；硫酸化 GAG，包括硫酸软骨素/硫酸皮肤素 (Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate, CS/DS)，肝素/硫酸乙酰肝素 (Heparin/Heparan Sulfate, Hep/HS)，硫酸角质素 (Keratan Sulfate, KS) 三大类。其中硫酸角质素不含己糖醛酸，重复二糖单位由 D-半乳糖和己糖胺组成，而其它 GAG 的重复二糖单位均由己糖醛酸和己糖胺组成。透明质酸结构相对简单，由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖胺组成的二糖单位经 β -1,4-糖苷键连接而成；其它糖胺聚糖则由于各种修饰酶的作用使糖链变得异常复杂，主要表现在糖链中不同部位羟基 (-OH) 和氨基 (-NH₂) 的硫酸化，D-葡萄糖醛酸在 C5-差向异构酶的作用下转变为 L-艾杜糖醛酸以及己糖胺二位氨基的乙酰化等。糖胺聚糖糖链结构的高度复杂性不是随机发生的，而是具有高度的时空特异性，是各种糖链合成相关酶在不同细胞组织和器官的不同发育阶段表达调控水平所致，不同的结构使其具有不同的功能，结构的复杂性赋予其功能的多样性。

GAG 是蛋白聚糖 (proteoglycan, PG) 的多糖侧链，广泛分布于动物组织的细胞外基质和细胞表面，通过与一系列蛋白相互作用参与了中枢神经系统发育，伤口修复，病毒侵染，组织形态发生，信号传导，细胞分裂等多种生理和病理过程[1-3]。糖胺聚糖所具有的一系列重要的生物学功能使其成为重要的生物活性分子，在医药及功能食品中得到广泛应用，如肝素、硫酸软骨素、透明质酸等[4, 5]。但由于糖胺聚糖结构的不均一性，特别是硫酸化糖胺聚糖结构的高度复杂性，使不同来源和不同批次的同一种糖胺聚糖在活性上存在很大差异[6]。近年来的大量研究表明，糖胺聚糖的生物功能是通过多糖链中具有特殊结构的功能区与特定蛋白的特异相互作用来实现的，同一多糖链中存在不同结构的功能区，与不同的蛋白相互作用可以行使不同的功能，因此可以通过选择性部分降解糖胺聚糖多糖链，制备结构均一或相对均一的特定功能区寡糖用于医药及功能食品，该类产品不但结构和活性确定，而且还由于分子量小利于吸收而大

大提高了利用率。

糖胺聚糖降解酶是研究糖胺聚糖构效关系和制备生物活性寡糖的重要工具酶，主要包括微生物来源的裂解酶系和动物来源的水解酶系。根据底物的不同可分为透明质酸酶、硫酸软骨素/硫酸皮肤素降解酶、肝素/硫酸乙酰肝素降解酶、硫酸角质素降解酶四大类。在动物体内一直未发现专一的硫酸软骨素/硫酸皮肤素降解酶家族，越来越多的研究显示哺乳动物体内硫酸软骨素/硫酸皮素的降解主要是由透明质酸酶家族的一些酶来完成的，最近透明质酸酶家族成员HYAL4被鉴定为一个硫酸软骨素水解酶[7]。微生物来源的糖胺聚糖降解酶，由于活力高，性质稳定，易于重组表达，适合大规模制备等特点，具有重要的应用价值。

目前，可以利用的商品化糖胺聚糖降解酶极为有限，就硫酸软骨素降解酶（CSase）而言，主要包括 *Proteus vulgaris* 来源的 CsaseABC，其具有广泛的底物降解活性，既可以降解 HA 又可以降解 CS 和 DS[8]，进一步研究表明商品化 CSase ABC 包含两种酶，内切型 CSaseABC I 和外切型 CSaseABC II；CSaseAC 对 GAG 链中 GlcUA 残基 C5位的差向异构化非常敏感，故只能降解 HA 和 CS，目前商品化的 CSaseAC 主要包括 *Flavobacterium heparinum* 来源的内切型 CSaseAC I[9]和 *Arthrobacter aureus* 来源的外切型 CSase AC II[10]；而 *Flavobacterium heparinum* 来源的 CsaseB 是高度专一性硫酸皮肤素降解酶，对硫酸软骨素和透明质酸均无降解活性[11]。利用各种糖胺聚糖降解酶所具有的不同底物选择性和降解产物多样性，可以对结构复杂的糖胺聚糖进行组成结构和功能研究，结合各种分离分析手段对多糖链中与靶蛋白结合的特定功能区进行鉴定，并最终用于高活性药用及功能寡糖的酶法制备，但是目前所鉴定的为数不多的糖胺聚糖降解酶还远远不能满足复杂糖胺聚糖构效关系研究和结构特异活性寡糖制备的需要。

来自鲑鱼软骨的 CS-E 是富含 E unit(4GlcUA β 1-3GalNAc(4S,6S))的硫酸软骨素，其多糖链中 E unit 的含量达到40-60%，E unit 的 N-乙酰-D-氨基半乳糖的4位和6位发生硫酸化，带有高负电荷，使其具有特定的分子结构。这种富含高硫酸化二糖的 CS 可以与生长因子结合促进神经突生长[12, 13]；同时这种特性更利于与细胞因子、趋化因子等特异性结合，以调节各种生理和病理过程[14]。硫酸软骨素 E 多糖，拥有其它种类硫酸软骨素所不具备的独特药理活性。当用于抗单疱疹病毒时，其引起过敏的可能性比激素类药物低[15]；高硫酸化的 CS-E 可抑制神经元细胞死亡[16]、促进神经突增生、抑制癌细胞的转移、抑制雌激素缺乏诱发的骨质疏松[17, 18]；这些研究表明 CS-E 可以作为新型糖胺聚糖类药物研发的前体。通过选择性酶解作用，去除 CS-E 中的非硫酸化和低硫酸化片段，制备富含 E unit 的寡糖，更有利于增强 CS 对癌症、病毒感染、神经痛等相关疾病的预防、治疗效果。因此制备结构均一或相对均一，活性确定，富含 E unit 的 CS-E 寡糖对于医药研发尤为重要。可是，长期以来始终缺乏在降解过程中可以选择性保留富含 E unit 寡糖片段的糖胺聚糖降解酶。

中国专利文献 CN103923857A（申请号201410159983.3）公开了一株弧菌 FC509菌株及其培养方法与应用。该菌株于2014年03月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号 CGMCC NO. 8913，地址：北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所。该发明首次分离得到的弧菌(*Vibrio* sp.)FC509菌株，可以制备糖胺聚糖裂解酶，该酶对

透明质酸的比活为110,000U/mg、对硫酸软骨素的比活为45,000U/mg；酶活力是已知商品化糖胺聚糖裂解酶的几十到上百倍，可应用于医药及化妆品等领域，具有广阔的应用前景。

发明内容

本发明针对现有技术的不足，提供一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶及其编码基因与应用。

一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶，氨基酸序列如 (a) 或 (b) 所示：

(a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；

(b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或一个以上氨基酸且具有糖胺聚糖裂解酶活性的由 (a) 衍生的蛋白质。

根据本发明优选的，所述氨基酸序列 (b) 如 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示。

一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶的编码基因，核苷酸序列如 (i) 或 (ii) 所示：

(i) 核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；

(ii) 在严格条件下与 (i) 限定的 DNA 序列杂交且编码具有糖胺聚糖裂解酶活性的蛋白质的 DNA 分子。

根据本发明优选的，所述核苷酸序列 (ii) 中所述严格条件下，是指：

在含质量浓度 0.5% SDS 的 6×SSC 缓冲液中，在 65℃ 下杂交，然后用含质量浓度 0.1 % SDS 的 2×SSC 缓冲液和含质量浓度 0.1 % SDS 的 1×SSC 缓冲液各洗膜一次。

根据本发明进一步优选的，所述核苷酸序列 (ii) 如 SEQ ID NO.5 或 SEQ ID NO.6 所示。

一种重组表达载体，在表达载体中插入了上述难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶的编码基因。

上述表达载体选自大肠杆菌表达载体、酵母表达载体、枯草杆菌表达载体、乳酸菌表达载体、链霉菌表达载体、噬菌体载体、丝状真菌表达载体、植物表达载体、昆虫表达载体或哺乳动物细胞表达载体。

一种重组细胞，在细胞中插入了上述难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶的编码基因。

上述细胞选自大肠杆菌宿主细胞、酵母菌宿主细胞、枯草杆菌宿主细胞、乳酸菌宿主细胞、放线菌宿主细胞、丝状真菌宿主细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

用于重组表达糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的重组细胞，选自大肠杆菌宿主细胞（如 *Escherichia coli* BL21、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* DH5 α 等）、酵母菌宿主细胞（如 *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Kluyveromyces lactis* 等）、枯草杆菌宿主细胞（如 *Bacillus subtilis* R25、*Bacillus subtilis* 9920 等）、乳酸菌宿主细胞（如 *Lactic acid bacteria* C0CC101 等）、放线菌宿主细胞（如 *Streptomyces spp.*等）、丝状真菌宿主细胞（如 *Trichoderma viride*、*Trichoderma reesei*、*Aspergillus niger*、*Aspergillus nidulans* 等）、昆虫细胞（如 *Bombyxmori*、*Antharaea eucalypti* 等）或哺乳动物细胞（如中国仓鼠卵巢细胞 CHO，幼小仓鼠肾脏细胞 BHK、中国仓鼠肺细胞 CHL 等）。

上述难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶做为增强药物的吸收或递送成分在制备药物中的应用。

一种利用难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 降解鱿鱼来源的硫酸软骨素 CS-E 制备结构相对均一的不同聚合度寡糖中的应用。

上述结构相对均一的不同聚合度寡糖在制备抑制肿瘤细胞转移药物中的应用。

有益效果

1、本发明从海洋微生物基因组中发现和鉴定了一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 (HCLase Ei)，该酶可以降解 HA、牛软骨来源的 CS-A、鲨鱼软骨来源的 CS-C 和 CS-D 产生二糖终产物，但只能部分降解 CS-E 产生大量富含 E unit 的高分子量寡糖；经检测，该酶对透明质酸的比活为 13.8 U/mg、对 CS-A、CS-C、CS-D、CS-E 的比活分别是 7.2、6.7、5.9、5.3 U/mg。

2、本发明首次利用难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 (HCLase Ei) 以低硫酸化的 CS-E 多糖为底物制备出系列结构相对均一的不同聚合度寡糖，其 E unit 含量远远高于 CS-E 多糖，且其中的高聚合度寡糖可以显著抑制肿瘤细胞的转移，可应用于医药及化妆品等领域，具有广阔的应用前景；且为酶解制备富含 E unit 的 CS-E 活性寡糖提供了重要工具酶。

附图说明

图 1、糖胺聚糖裂解酶的蛋白质三维结构模型；

图 2、难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 表达及纯化情况的聚丙烯酰胺凝胶电泳图 (SDS-PAGE)；

其中：M、蛋白质分子量标准，条带自上至下大小为 116 kD，66.2 kD，45 kD，35 kD，25 kD，18.4 kD，14.4 kD；泳道 1、对照菌株破壁前菌体，上样量 6 μ L，泳道 2、重组菌破壁后菌液，上样量 6 μ L，泳道 3、重组菌破壁后上清，上样量 6 μ L，泳道 4、经镍柱纯化的 HCLase Ei，上样量 6 μ L。

图 3、pH 值对难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的活性影响曲线；

图 4、温度对难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的活性影响曲线；

图 5、温度对难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的稳定性影响曲线；

图 6、金属离子对难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 活性的影响柱形图；

图 7、难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 降解商品化 HA (A) 和 CS-A (B)、CS-C (C)、CS-D (D)、CS-E (E) 终产物的 HPLC 分析图；

图中：1：二硫酸化二糖，2：单硫酸化二糖，3：非硫酸化二糖；

图 8、难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 不同时间降解 CS-A 所得产物的 HPLC 分析图；

图中：1：四糖，2：单硫酸化二糖，3：非硫酸化二糖；

图 9、难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 降解低硫酸化 CS-E 所得终产物的 HPLC 分析图；

图 10、难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 降解 CS-E 制备的寡糖抗肿瘤效果分析；

图 11、三个酶降解商品化 CS-E 的比较曲线图；

图中：1：二硫酸化二糖，2：单硫酸化二糖。

具体实施方式

以下实施例的阐述，是为了全面公开本发明如何实施的一些常用技术，而不是为了限制本发明的应用范围。发明人已经尽最大努力确保实施例中个参数的准确性（例如量，温度，等等），但是一些实验误差和偏差也应该予以考虑。除非另有说明，本发明中分子量是指重均分子量，温度是摄氏度。

生物材料来源

弧菌 (*Vibrio* sp.) FC509 为现有已知菌株，购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号 CGMCC NO. 8913。

实施例 1、弧菌 (*Vibrio* sp.) FC509 菌株基因组 DNA 的提取

将弧菌 (*Vibrio* sp.) FC509 菌株接种至液体培养基中，在 30 °C、200 rpm 的条件下，振荡培养至 OD₆₀₀=0.8；取培养菌液 40 mL，在 12,000 rpm 条件下离心 25 min，收集菌体沉淀，用 20 mL 的溶菌酶缓冲液（10 mM Tris-HCl pH 8.0）洗涤，在 12,000 rpm 条件下离心 25 min，收集菌体沉淀。

上述菌体沉淀中，每管加入溶菌酶缓冲液 12.0 mL，得到约 14.0 mL 的菌液，分别加入浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶各 560 μL，其终浓度约 800 μg/mL；冰浴 1.0 h 后，37°C 温浴 2 h，至溶液粘稠；加入 10wt % 的 SDS 0.82 mL，100 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液 60 μL，52°C 水浴 1.0 h；加入 Tris-平衡过的酚/氯仿/异戊醇（体积比 25: 24: 1）15 mL，轻轻颠倒混匀，至充分乳化；10,000g、4°C 条件下离心 10 min，转移上清，加入 2.0 mL 的 NaAc-HAc（pH 5.2，3.0 M）缓冲液，以及 17.0 mL 的无水乙醇，混匀；用 1.0 mL 的枪头挑出丝状 DNA，转移至 1.5 mL 的 EP 离心管中，以体积百分比 70% 乙醇溶液（贮于 -20°C），洗涤 2 次，微离心后弃上清；10,000g、4°C 条件下离心 3 min，彻底弃掉上清；样品于无菌工作台中，酒精灯下风吹干燥；用无菌去离子水重悬溶解 DNA 样品，4°C 过夜，得到大分子量基因组 DNA。

上述液体培养基每升组分如下：

胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 30 g、KH₂PO₄ 3 g、K₂HPO₄ 7 g、(NH₄)₂SO₄ 2g、MgSO₄·7H₂O 5mg、FeSO₄·7H₂O 2mg，pH 值为 7.2。

实施例 2、弧菌 (*Vibrio* sp.) FC509 菌株基因组扫描及其序列分析。

将实施例 1 制得的大分子量基因组 DNA 进行测序（美吉生物公司）。用 NCBI（National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）上的软件对测序结果进行分析。所用到的 NCBI 分析软件是 Open Reading Frame Finder（ORF Finder, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>）和 Basic Local Alignment Search Tool（BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）。

NCBI 分析结果显示 *Vibrio* sp. FC509 菌株基因组上携带一个糖胺聚糖裂解酶基因 *hclase ei*，该基因编码区长 2973 bp，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。与 *Vibrio vulnificus* 的全基因组序列中 chondroitinase 基因（NCBI 序列号：WP039547743.1）的 238 个氨基酸有 36% 的同源性。

HCLase Ei 由 990 个氨基酸组成，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，蛋白质的理论分子量约为 107 kD。用 Simple Modular Architecture Research Tool（SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>）分析糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的结构信息，结果显示 N 端第

1 至第 21 个氨基酸是信号肽序列, 第 23-702 位氨基酸序列属于糖胺聚糖裂解酶超家族。用 SWISS-MODEL 同源建模服务器 (<http://swissmodel.expasy.org>) 对糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的蛋白质三维结构进行同源建模, 最终得到的 HCLase Ei 蛋白质三维结构模型, 如图 1 所示。

实施例 3、rHCLase Ei 的基因在大肠杆菌中的重组表达

以实施例 1 制得的大分子量基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。

引物如下:

正向引物 HCLase Ei-F: GGGAAATTCCATATGATAATCAAAGAAGTCGAAAATC;

反向引物 HCLase Ei-R: CCGCTCGAGTTTCACCGGCTCTTGCAAC;

正向引物下划线标注的是限制性内切酶 *Nde*I, 反向引物下划线标注的是限制性内切酶 *Xho*I 位点。Primerstar HS DNA 聚合酶购自宝生物公司, PCR 反应体系按照公司提供的产品说明操作。

PCR 反应条件: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 10 s, 68℃退火 2.5 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。

将 PCR 产物用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收酶切的 PCR 产物。将购于美国 Novagen 公司的产物 pET-30a 载体用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收酶切载体大片段。*Nde*I 和 *Xho*I 均购于宝生物公司, 酶与底物反应的体系、温度和时间均按照公司提供的产品说明操作。

将经过双酶切的 PCR 产物与同样经过双酶切 pET-30a 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株后涂布于含有 50 μ g/mL 卡那青霉素的 Luria-Bertani 培养基固体平板 (按常规技术配制) 上, 37℃培养 14 h, 挑取单克隆; 将单克隆接入含有 50 μ g/mL 卡那青霉素的液体 Luria-Bertani 培养基 (按常规技术配制) 中培养, 提取质粒; 将质粒用正向引物 HCLase Ei-F 和反向引物 HCLase Ei-R 进行菌液 PCR 验证, 结果得到大小正确的扩增产物, 初步证明构建的重组质粒正确; 重组质粒测序结果表明, 在 pET-30a 的 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点之间插入 SEQ ID NO.1 所示的 HCLase Ei 基因, 且插入方向正确, 所以进一步证明构建的重组质粒正确, 将该重组质粒命名为 pET30a-HCLase Ei。

将 pET30a-HCLase Ei 转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3) (购自美国 Novagen 公司), 然后按照该公司提供的操作步骤进行重组糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 诱导表达。并用 Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE) 凝胶对 HCLase Ei 进行纯化, 纯化条件按照 GE 公司的产品手册操作。用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测重组糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的纯化情况, 结果如图 2 所示, 纯化后的重组糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 在电泳胶上呈单一条带, 且位置与预测的分子量相吻合。

实施例 4、重组糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的酶学性质分析

pH 和温度对酶活性的影响

将质量浓度为 1%透明质酸或硫酸软骨素底物、HCLase Ei 酶液、不同 pH 值的 150 mM HAc-NaAc、NaH₂PO₄-Na₂HPO₄、Tris-HCl 缓冲液以及水 (pH 范围为 5.0~10.0), 按 2: 1: 3: 4 (体积比) 的比例混合后, 在 30℃反应 60 min, 按前述的紫外法测酶活力。结果显示 HCLase Ei 在 pH 8.0 时达到最大活力, 表明 HCLase Ei 的最适反应 pH 为 8.0 (如图 3)。

在最适 pH 下,将质量浓度为 1%透明质酸或硫酸软骨素底物、HCLase Ei 酶液、150mM Tris-HCl 缓冲液和水 (pH8.0) 按 2: 1: 3: 4 (体积比) 的比例混合,分别在不同温度 (0℃~90℃) 反应 10 min,按前述的紫外法测酶活力。结果显示 HCLase Ei 在 30℃时达到最大活力,表明 HCLase Ei 的最适反应温度为 30℃ (如图 4)。

温度对酶稳定性的影响

将在 30℃下热处理不同时间后的 HCLase Ei 酶液与质量浓度为 1%透明质酸或硫酸软骨素底物溶液按 2: 3 (体积比) 的比例混合,然后在最适温度和最适 pH 下测定剩余酶活,以不经过热处理的酶液酶活定义为 100%相对活力 (relative activity),结果显示 HCLase Ei 在 30℃的温度下,12 h 后仍具有大于 60%活性 (如图 5)。

金属离子对 HCLase Ei 活性的影响

将质量浓度为 1%透明质酸或硫酸软骨素底物、HCLase Ei 酶液、150 mM Tris-HCl 缓冲液以及水按 2: 1: 3: 4 (体积比) 的比例混合后,接着向反应体系中添加不同的金属离子,添加的离子终浓度为 5 mM,然后在 30℃反应 60 min,按前述的紫外法测酶活力。对照组为不加任何金属离子时 HCLase Ei 的活性 (设定为 100%),结果图 7 所示。实验结果显示, Li⁺、EDTA, Na⁺ K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺对 HCLase Ei 活性基本无影响, Ag⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cr³⁺、Fe³⁺、Fe²⁺、Hg²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺等其他离子对酶活呈现抑制作用 (图 6)。

实施例 5、HCLase Ei 的酶活测定

将质量浓度为 1%透明质酸或硫酸软骨素底物、HCLase Ei 酶液、150 mM Tris-HCl 缓冲液以及水按 2: 1: 3: 4 (体积比) 的比例混合后,在最适温度和最适 pH 下反应 1~10 min,按前述的紫外法测酶活力,同时用购于康为世纪公司的蛋白质定量试剂盒测定 HCLase Ei 酶液的蛋白含量,结果表明重组 HCLase Ei 对透明质酸的比活为 13.8 U/mg、对 CS-A、CS-C、CS-D、CS-E 的比活分别是 7.2、6.7、5.9、5.3 U/mg。其中底物 HA 和牛软骨来源 CS-A 来自 Sigma-Aldrich、鲨鱼软骨来源 CS-C 和 CS-D 购自 Seikagaku 公司,鱿鱼软骨来源低硫酸化 CS-E 根据中国专利文献 CN105924544A (申请号 201610323540.2) 说明书实施例 1 的方法制备 CS-E (E unit 含量为 39.3%)。

按上述方法检测 SEQ ID NO.3 所示的蛋白和 SEQ ID NO.4 所示的蛋白:

SEQ ID NO.3 所示的蛋白对透明质酸的比活为 0.09 U/mg、对硫酸软骨素 A 的比活为 0.1 U/mg;

SEQ ID NO.4 所示的蛋白对透明质酸的比活为 0.07 U/mg、对硫酸软骨素 A 的比活为 0.09 U/mg;

酶活力单位定义:每分钟催化糖胺聚糖产生 1 μmol 不饱和双键所需要的酶量。根据紫外法测糖胺聚糖裂酶酶活的方法[8]。

实施例 6、HCLase Ei 降解糖胺聚糖降解产物的高效液相 (HPLC) 分析

将质量浓度为 1%透明质酸或硫酸软骨素底物、HCLase Ei 酶液、150mM Tris-HCl 缓冲液以及水按 2: 1: 3: 4 (体积比) 的比例混合后,在 pH8.0, 30℃条件下反应,选取不同酶解时间

(0、1、2、8、12、24、72h)的产物进行 HPLC 分析。HPLC 分析条件为凝胶柱: superdex peptide 10/300 GL (GE); 流动相: 0.2 M 碳酸氢铵; 流速: 0.4 mL/min; 检测条件: UV232nm。

结果如图 7 和图 8 所示, 图 7 结果表明 HCLase Ei 可以将 HA, CS-A, CS-C 和 CS-D 彻底降解为不同硫酸化度二糖, 但难于降解鱿鱼软骨来源富含 Eunit 的 CS-E, 预示着 Eunit 的存在抑制了该酶的活性。对 CS-A 的时间梯度降解试验表明, 随着降解时间的延长, 产物聚合度逐渐降低, 最终转变成二糖 (图 8)。该结果表明 HCLase Ei 属于内切糖胺聚糖裂解酶且难于降解富含 Eunit 的 CS-E, 因此, 可被用于糖胺聚糖寡糖特别是富含 E unit 寡糖的制备以及糖胺聚糖构效关系研究。

实施例 7、HCLase Ei 降解 CS-E 多糖后的高效液相 (HPLC) 及各个组分的二糖分析

将质量浓度为 1%粗品 CS-E、HCLase Ei 酶液、150 mM Tris-HCl 缓冲液以及水按 2: 1: 3: 4 (体积比) 的比例混合后, 在 pH8.0, 30℃ 条件下反应, 选取不同酶解时间 (0、4、8、12、24、72 h) 的产物进行 HPLC 分析。HPLC 分析条件为凝胶柱: superdex peptide 10/300 GL (GE); 流动相: 0.2 M 碳酸氢铵; 流速: 0.4 mL/min; 检测条件: UV232nm。

收集组分 1~6, 脱盐后用商品化 CSaseABC 降解, 降解条件参照说明书, 产物进行 HPLC 分析。HPLC 分析条件为: HPLC 条件: 色谱柱: YMC-Pack PA-G column, 流动相: NaH_2PO_4 线性洗脱, NaH_2PO_4 浓度在 60 min 内从 16 mM 升到 460 mM。流速: 1 mL/min, 检测条件: Ex 330nm, Em 420nm。结果如图 9 和表 1 所示, 表 1 为糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 降解 CS-E 制备的大于等于四糖的大分子量组分的二糖组成分析:

表 1

	O unit(%)	C unit(%)	A unit(%)	E unit(%)
组分 1		6.94	9.18	83.88
组分 2		8.97	13.44	77.59
组分 3		10.40	13.29	76.31
组分 4		5.72	19.42	74.86
组分 5	5.37	6.52	12.04	76.07
组分 6		4.94	4.17	90.86
低硫酸化 CSE 多糖	6.62	7.22	46.83	39.33

由表 1 可以看出 HCLase Ei 通过降解 CS-E 制备的各个组分的寡糖其 E unit 含量明显提高, 远远高于 CS-E 多糖。

实施例 8、不同聚合度寡糖的抗肿瘤转移的效果

(1) 培养肿瘤细胞: 乳腺癌细胞株 4T1 在含 10%胎牛血清, 100 U/ml 青霉素、链霉素双抗的 DMEM 培养液中, 于 37℃, 5% CO_2 培养箱传代培养;

(2) 收集细胞: 离心收集肿瘤细胞用 PBS 稀释到 2×10^6 个/ml 待用;

(3) 对 BALB/c 小鼠 (8 周左右) 分别注射 PBS、20 μg CS-E 8 糖、20 μg CS-E 10 糖、20 μg CS-E 12 糖, 30 min 后注入 200 μl 肿瘤细胞, 3 周后解剖小鼠病变部位, 统计小鼠体内肿瘤个

数，检验抗肿瘤效果。结果如图 10 所示，CS-E 10 糖及更高分子量寡糖具有显著的抗肿瘤转移效果，并且 CS-E10 糖效果优于 CS-E12 糖。

实施例 9、糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 在药物中的应用

糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 可以用于增强药物的吸收或/和递送，包括但不限于经过皮肤途径辅助药物渗透。示例性的药物包括皮质类固醇如氢化可的松、泼尼松龙、倍氯米松丙酸酯、氟米松、去炎松、氯倍他索丙酸酯等；镇痛药和/或抗炎剂如对乙酰氨基酚、甲灭酸、氟芬那酸、双氯芬酸、双氯芬酸钠、阿氯芬酸、羟布宗、保泰松、布洛芬、氟比洛芬、水杨酸、薄荷醇、樟脑、萘普生等；抗高血压药如吲哚洛尔、茚诺洛尔、心痛定等；抗生素如青霉素、四环素、土霉素、新霉素、红霉素、氯霉素等；麻醉剂如利多卡因、苯佐卡因等以及其他药物。

通过敷布，纱布，或其它皮肤涂抹途径施用糖胺聚糖裂解酶。糖胺聚糖裂解酶溶液可以涂敷到合适的敷贴上（如 5-6 层纱布）。敷贴应覆盖受损区域，且敷贴本身用蜡纸或绷带固定。应用的制剂的量取决于损伤的面积，通常为 $5\sim 100\text{ IU}/\text{cm}^2$ 。敷贴应每天使用 12~24 小时，连续使用 10~100 天。

对于局部使用，溶液，悬浮液，凝胶剂，糊剂，软膏，乳膏或糖胺聚糖裂解酶的其他配方（有或没有另外的活性剂，都可以使用）。溶液等配方中包含制药和化妆品领域用于局部使用可接受的稀释剂，辅助剂和赋形剂的，这些其它配方主要包括缓冲剂如磷酸盐，柠檬酸盐，醋酸盐和其它有机酸盐、抗氧化剂如抗坏血酸、肽、蛋白质如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮，天然的或合成的油；氨基酸如甘氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，或精氨酸；单糖，二糖和其它碳水化合物，包括纤维素或其衍生物，葡萄糖，乳糖，甘露糖或糊精；螯合剂如 EDTA；糖醇如甘露糖醇或山梨糖醇；无机盐，如氯化钠，和非离子表面活性剂如吐温、聚乙二醇。

一种优选的，糖胺聚糖裂解酶制剂是糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 的冻干粉末悬浮或溶解在含有 0.1%~10%蔗糖、1%~20%甘油的溶剂中，溶液的 pH 保持在 6.5~8.5 范围内。

糖胺聚糖裂解酶组合物可以通过口服给药或肠胃外给药，并且糖胺聚糖裂解酶组合物可以与合适的递送载体结合后给药。

可通过活性化合物与固体赋形剂的组合获得用于口服使用的糖胺聚糖裂解酶药物制剂。选择上述的混合物加入合适的辅助剂混合使用。如果需要的话，合适的赋形剂是碳水化合物或蛋白质，例如糖、纤维素、牛血清白蛋白等。

糖胺聚糖裂解酶与药物（如氢化可的松，抗生素，维生素）组合。以口服凝胶剂，膏剂，或悬浮液的形式通过静脉内，皮下或肌肉注射给药；或以软膏剂，乳膏剂，面罩局部给药；以及用作化妆品辅助剂，用于增强皮肤的吸收。

实验例 10

利用中国专利文献 CN103923857A（申请号 201410159983.3）中制备的糖胺聚糖裂解酶 -HCLase 及商品化购买的 CSaseABC，以及本发明实施例制备的 HCLase Ei 在各自最优的条件下充分降解商品化 CS-E（E unit 含量为 61%），利用 HPLC 根据紫外吸收检测反应产物。结果

如图 11 所示, 通过结果可以看出, HCLase 和商品化 CSaseABC 均可以完全降解 CS-E 产生二糖。

由上可以看出, 本申请中所述 HCLase Ei 难以降解商品化 CS-E, 却可以一定程度地降解低硫酸化的 CS-E (图 9), 说明 E unit 可能抑制 HCLase Ei 活力, 难以降解 CS-E, 尤其富含 E unit 的 CS-E。因此在降解低硫酸化 CS-E 时聚集了富含 E unit 的寡糖, 这与表 1 的结果相符。HCLase 和商品化 CSaseABC 可完全降解 CS-E, 虽然可以制备不同分子量的寡糖, 却不能制备富含 E unit 的寡糖。

说明书中涉及的参考文献

- [1]. Bradbury, E.J., et al., Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 2002. 416(6881): p. 636-40.
- [2]. Kamhi, E., et al., Glycosaminoglycans in infectious disease. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2013. 88(4): p. 928-43.
- [3]. Linhardt, R.J., et al., CS lyases: structure, activity, and applications in analysis and the treatment of diseases. *Adv Pharmacol*, 2006. 53: p. 187-215.
- [4]. Jiang, D., J. Liang and P.W. Noble, Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. 23: p. 435-61.
- [5]. Noble, P.W., Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol*, 2002. 21(1): p. 25-9.
- [6]. Sugahara, K., et al., Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*, 2003. 13(5): p. 612-20.
- [7]. Yamada, S., K. Sugahara and S. Ozbek, Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. *Commun Integr Biol*, 2011. 4(2): p. 150-8.
- [8]. Yamagata, T., et al., Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J Biol Chem*, 1968. 243(7): p. 1523-35.
- [9]. Hiyama, K. and S. Okada, Crystallization and some properties of chondroitinase from *Arthrobacter aureus*. *J Biol Chem*, 1975. 250(5): p. 1824-8.
- [10]. Yin, F.X., F.S. Wang and J.Z. Sheng, Uncovering the Catalytic Direction of Chondroitin AC Exolyase: FROM THE REDUCING END TOWARDS THE NON-REDUCING END. *J Biol Chem*, 2016. 291(9): p. 4399-406.
- [11]. Gu, K., et al., Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glucuronidase from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem J*, 1995. 312 (Pt 2): p. 569-77.
- [12]. Deepa, S.S., et al., Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J Biol Chem*, 2002. 277(46): p. 43707-16.

- [13]. Clement, A.M., K. Sugahara and A. Faissner, Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 1999. 269(3): p. 125-8.
- [14]. Bishop, J.R., M. Schuksz and J.D. Esko, Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 2007. 446(7139): p. 1030-7.
- [15]. Bergefall, K., et al., Chondroitin sulfate characterized by the E-disaccharide unit is a potent inhibitor of herpes simplex virus infectivity and provides the virus binding sites on gro2C cells. *J Biol Chem*, 2005. 280(37): p. 32193-9.
- [16]. Sato, Y., et al., A highly sulfated chondroitin sulfate preparation, CS-E, prevents excitatory amino acid-induced neuronal cell death. *J Neurochem*, 2008. 104(6): p. 1565-76.
- [17]. Li, F., et al., Involvement of Highly Sulfated Chondroitin Sulfate in the Metastasis of the Lewis Lung Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283(49): p. 34294-34304.
- [18]. Koike, T., et al., Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 8994.

权利要求书

- 1、一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶，其特征在于，氨基酸序列如 (a) 或 (b) 所示：
 - (a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；
 - (b) 在 (a) 中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或一个以上氨基酸且具有糖胺聚糖裂解酶活性的由 (a) 衍生的蛋白质。
- 2、如权利要求 1 所述的糖胺聚糖裂解酶，其特征在于，所述氨基酸序列 (b) 如 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示。
- 3、一种难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶的编码基因，其特征在于，核苷酸序列如 (i) 或 (ii) 所示：
 - (i) 核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；
 - (ii) 在严格条件下与 (i) 限定的 DNA 序列杂交且编码具有糖胺聚糖裂解酶活性的蛋白质的 DNA 分子。
- 4、如权利要求 3 所述的编码基因，其特征在于，所述核苷酸序列 (ii) 中所述严格条件下，是指：

在含质量浓度 0.5% SDS 的 6×SSC 缓冲液中，在 65℃ 下杂交，然后用含质量浓度 0.1 % SDS 的 2×SSC 缓冲液和含质量浓度 0.1 % SDS 的 1×SSC 缓冲液各洗膜一次。
- 5、如权利要求 4 所述的编码基因，其特征在于，所述核苷酸序列 (ii) 如 SEQ ID NO.5 或 SEQ ID NO.6 所示。
- 6、一种重组表达载体，在表达载体中插入了权利要求 3 所述的难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶的编码基因；

优选的，上述表达载体选自大肠杆菌表达载体、酵母表达载体、枯草杆菌表达载体、乳酸菌表达载体、链霉菌表达载体、噬菌体载体、丝状真菌表达载体、植物表达载体、昆虫表达载体或哺乳动物细胞表达载体。
- 7、一种重组细胞，在细胞中插入了权利要求 3 所述的难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶的编码基因；

优选的，上述细胞选自大肠杆菌宿主细胞、酵母菌宿主细胞、枯草杆菌宿主细胞、乳酸菌宿主细胞、放线菌宿主细胞、丝状真菌宿主细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。
- 8、权利要求 1 所述难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶做为增强药物的吸收或递送成分在制备药物中的应用。
- 9、一种利用难以降解 CS-E 的糖胺聚糖裂解酶 HCLase Ei 在降解鱿鱼来源的硫酸软骨素 CS-E 制备结构相对均一的不同聚合度寡糖中的应用。
- 10、权利要求 9 制备的结构相对均一的不同聚合度寡糖在制备抑制肿瘤细胞转移药物中的应用。

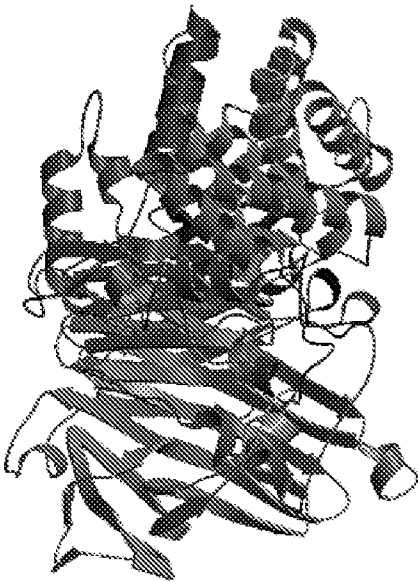


图 1

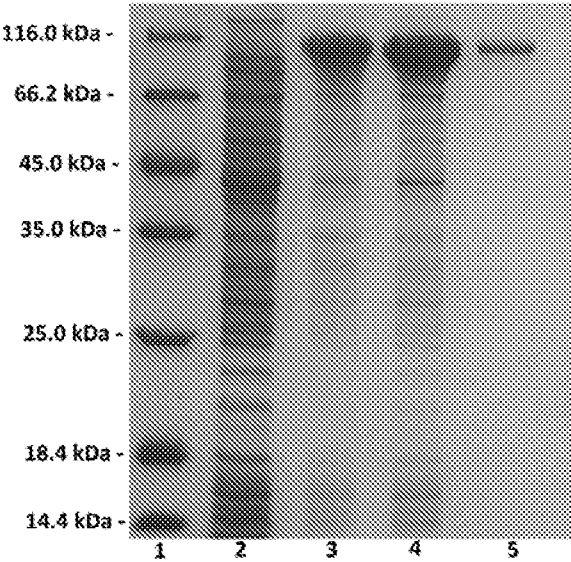


图 2

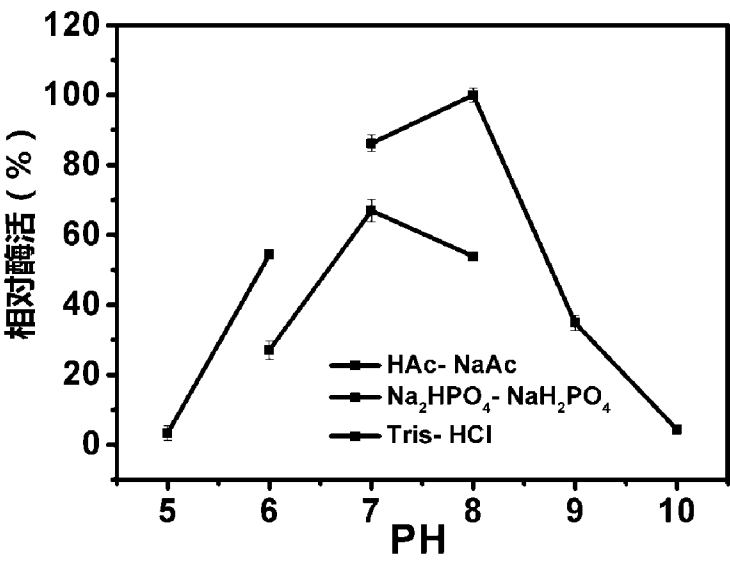


图 3

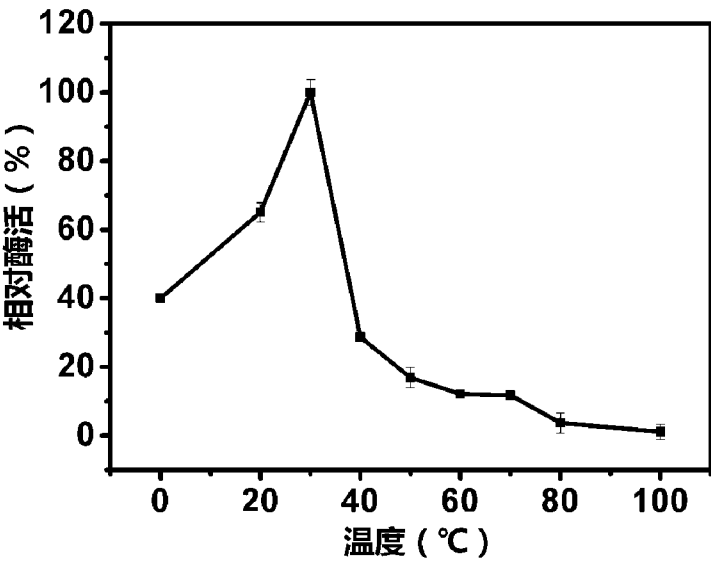


图 4

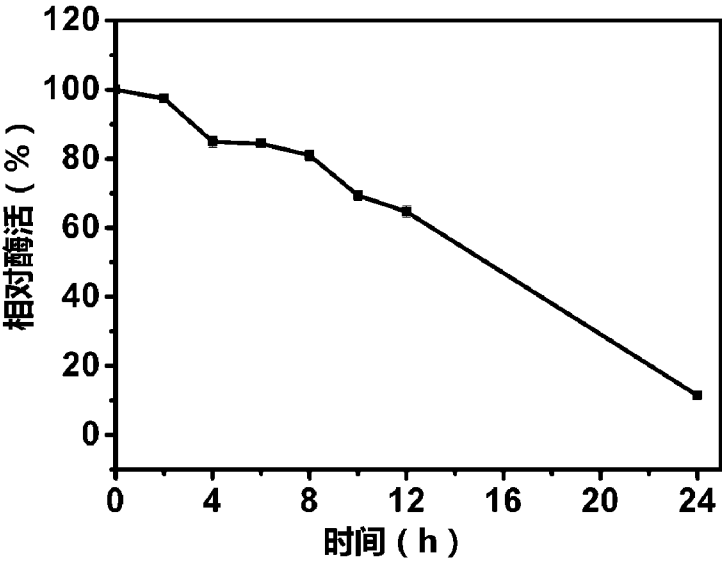


图 5

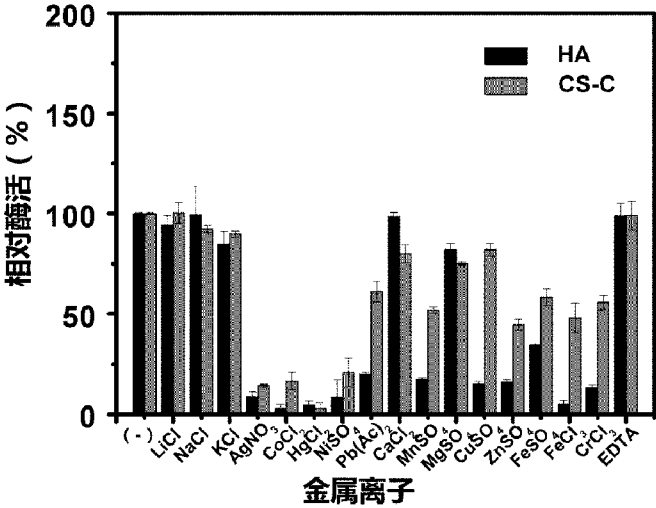


图 6

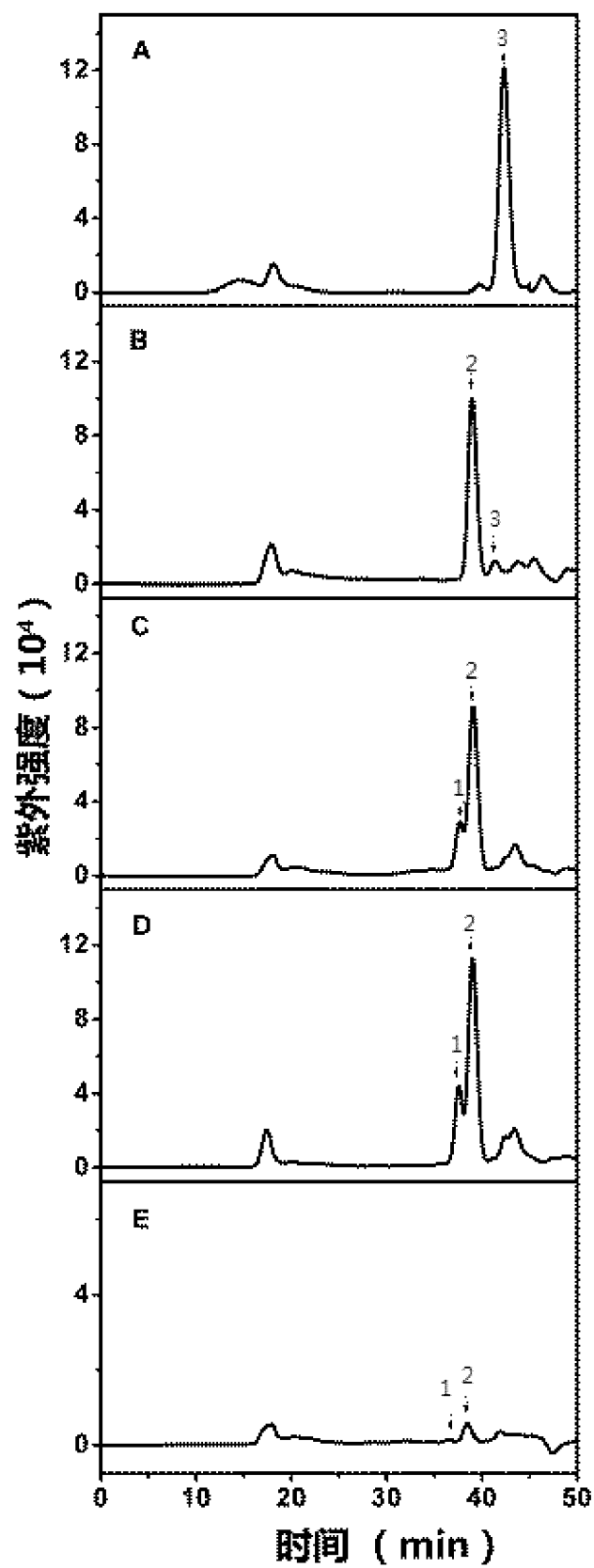


图 7

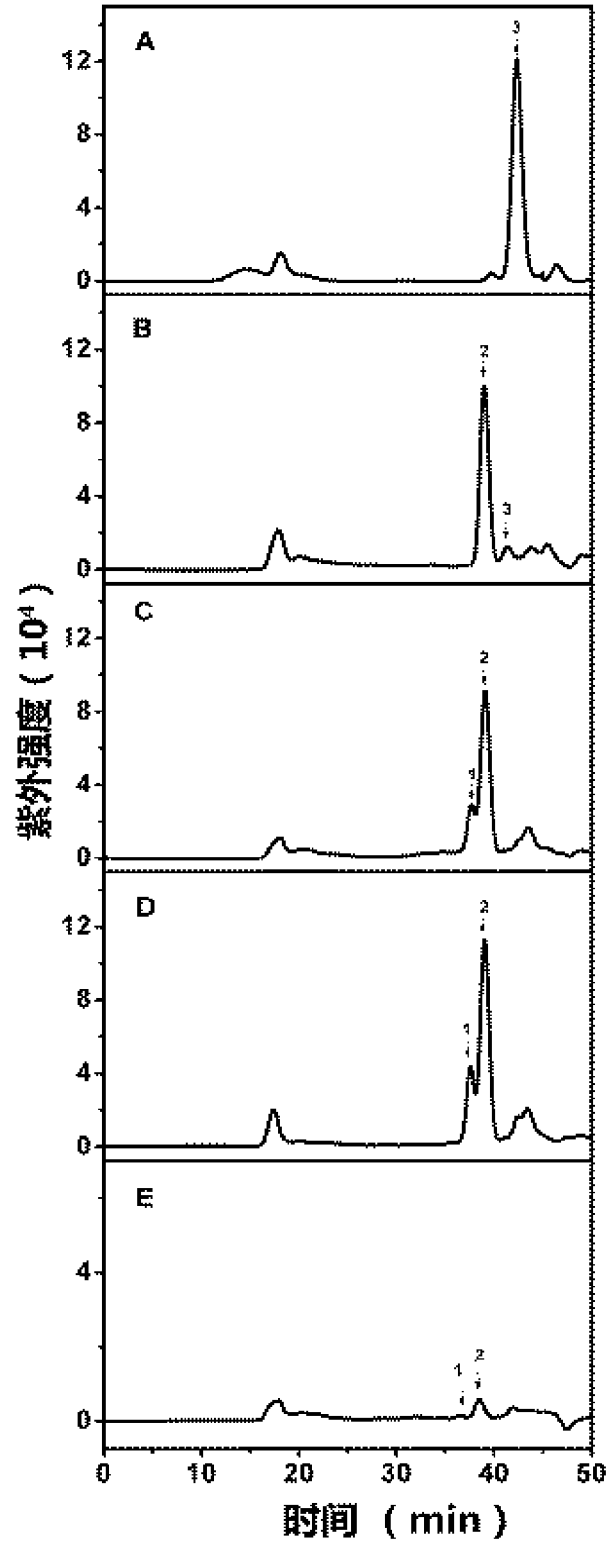


图 7

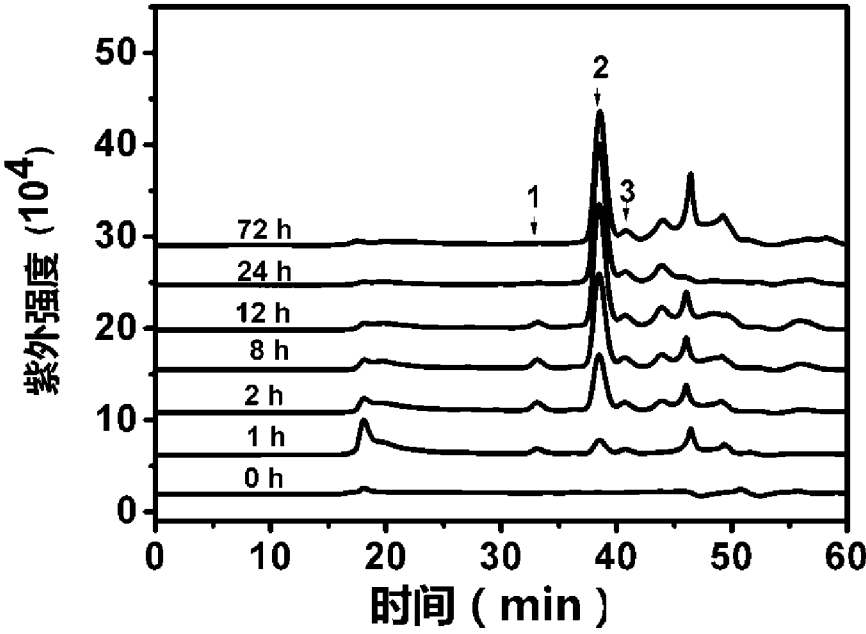


图 8

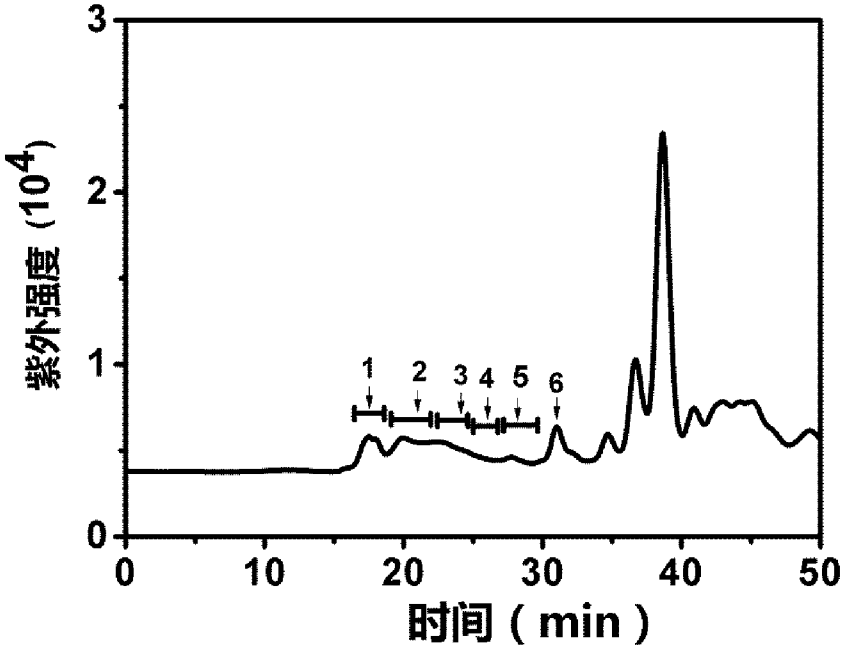


图 9

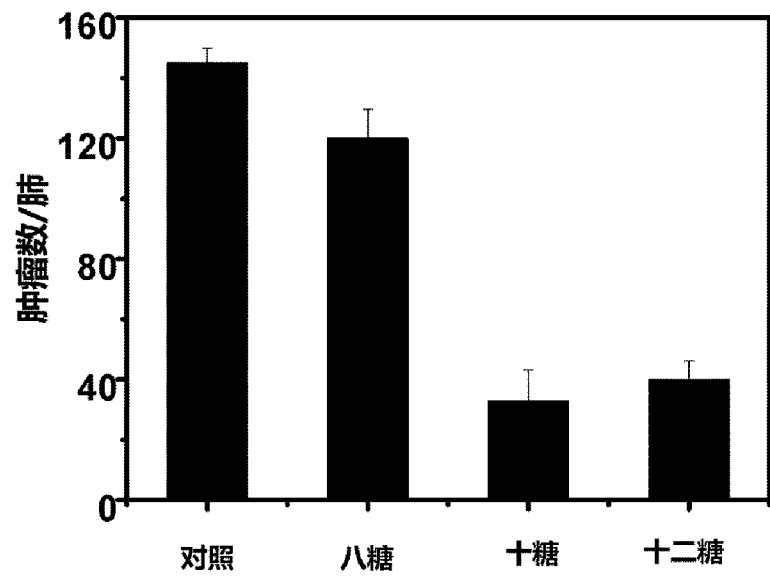


图 10

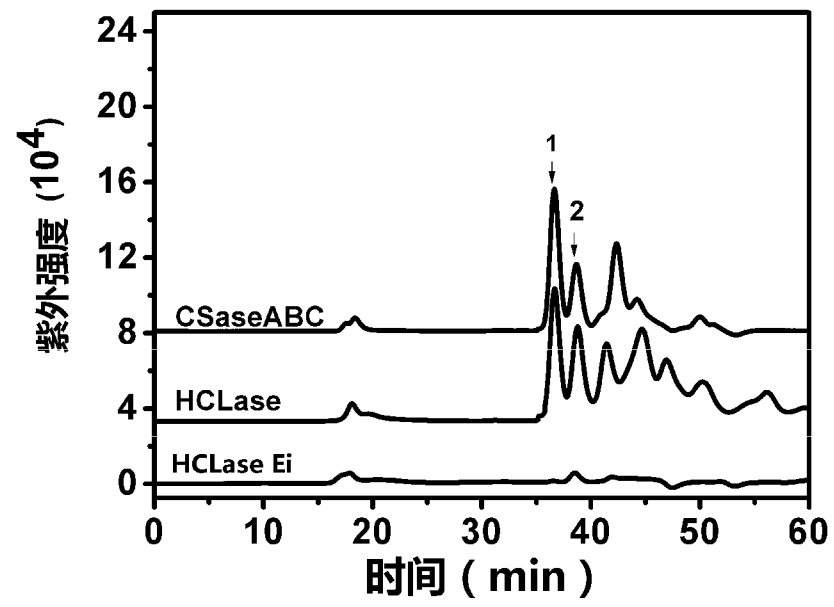


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/073401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/88 (2006.01) i; C12N 15/60 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12P 19/04 (2006.01) i; C12P 19/00 (2006.01) i; A61K 47/42 (2017.01) 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)

C12N 9; C12N 15; C12P 19; A61K 47

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, WANFANG, GOOGLE, Pubmed, DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, NCBI, EBI: 糖胺聚糖裂解酶, CSase, 糖胺聚糖, 粘多糖, glycosaminoglycan, GAG lyase, Fc509, 硫酸软骨素, CS-E, Chondroitin Sulfate, CS, applicant/inventor, sequence search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107312765 A (SHANDONG UNIVERSITY) 03 November 2017 (03.11.2017), claims 1-10	1-10
X	Hypothetical Protein [Vibrio sp. EJY3]. NCBI Reference Sequence: WP_014232125.1. 18 May 2013 (18.05.2013), entire document	1
Y	Hypothetical Protein [Vibrio sp. EJY3]. NCBI Reference Sequence: WP_014232125.1. 18 May 2013 (18.05.2013), entire document	1-10
X	Hypothetical Protein [Vibrio natriegens]. NCBI Reference Sequence: WP_020334673.1. 03 July 2013 (03.07.2013), entire document	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“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	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 19 March 2018	Date of mailing of the international search report 09 April 2018
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 ZHANG, Ying Telephone No. (86-10) 53961952

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2018/073401

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hypothetical Protein [Vibrio natriegens]. NCBI Reference Sequence: WP_020334673.1. 03 July 2013 (03.07.2013), entire document	1-10
Y	CN 103923857 A (SHANDONG UNIVERSITY) 16 July 2014 (16.07.2014), the abstract, and description, embodiments 1-8	1-10
Y	CN 105713890 A (SHANDONG UNIVERSITY) 29 June 2016 (29.06.2016), the abstract, description, paragraph [0045], and embodiments 1-12	1-10
Y	CN 105924544 A (SHANDONG UNIVERSITY) 07 September 2016 (07.09.2016), the abstract, description, paragraphs [0002]-[0004], and embodiments 1-9	1-10
Y	CN 103923899 A (SHANDONG UNIVERSITY) 16 July 2014 (16.07.2014), the abstract, and description, embodiments 1-8	1-10
Y	HAN, W. J. et al. A Novel Eliminase from a Marine Bacterium That Degrades Hyaluronan and Chondroitin Sulfate. The Journal of Biological Chemistry. 03 October 2014 (03.10.2014), 289(40), pp. 27886-27898	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/073401

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 107312765 A	03 November 2017	None	
CN 103923857 A	16 July 2014	CN 103923857 B	20 January 2016
CN 105713890 A	29 June 2016	None	
CN 105924544 A	07 September 2016	None	
CN 103923899 A	16 July 2014	CN 103923899 B	11 May 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/073401

A. 主题的分类

C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 19/04(2006.01)i; C12P 19/00(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)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)

C12N9, C12N15, C12P19, A61K47

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, 万方, GOOGLE, Pubmed, DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, NCBI, EBI:糖胺聚糖裂解酶, CSase, 糖胺聚糖, 粘多糖, glycosaminoglycan, GAG lyase, Fc509, 硫酸软骨素, CS-E, Chondroitin Sulfate, CS, 申请人/发明人, 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
PX	CN 107312765 A (山东大学) 2017年 11月 3日 (2017 - 11 - 03) 权利要求1-10	1-10
X	"hypothetical protein[Vibrio sp. EJY3]" NCBI Reference Sequence:WP_014232125.1, 2013年 5月 18日 (2013 - 05 - 18), 全文	1
Y	"hypothetical protein[Vibrio sp. EJY3]" NCBI Reference Sequence:WP_014232125.1, 2013年 5月 18日 (2013 - 05 - 18), 全文	1-10
X	"hypothetical protein[Vibrio natriegens]" NCBI Reference Sequence:WP_020334673.1, 2013年 7月 3日 (2013 - 07 - 03), 全文	1
Y	"hypothetical protein[Vibrio natriegens]" NCBI Reference Sequence:WP_020334673.1, 2013年 7月 3日 (2013 - 07 - 03), 全文	1-10

☒ 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

2018年 3月 19日

国际检索报告邮寄日期

2018年 4月 9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)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

张颖

电话号码 (86-10)010-53961952

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
Y	CN 103923857 A (山东大学) 2014年 7月 16日 (2014 - 07 - 16) 摘要，说明书实施例1-8	1-10
Y	CN 105713890 A (山东大学) 2016年 6月 29日 (2016 - 06 - 29) 摘要，说明书第0045段、实施例1-12	1-10
Y	CN 105924544 A (山东大学) 2016年 9月 7日 (2016 - 09 - 07) 摘要，说明书第0002-0004段，实施例1-9	1-10
Y	CN 103923899 A (山东大学) 2014年 7月 16日 (2014 - 07 - 16) 摘要，说明书实施例1-8	1-10
Y	HAN, W.J. 等. "A Novel Eliminase from a Marine Bacterium That Degrades Hyalu- ronan and Chondroitin Sulfate" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第289卷, 第40期, 2014年 10月 3日 (2014 - 10 - 03), 第27886 - 27898页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/073401

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	107312765	A	2017年 11月 3日	无			
CN	103923857	A	2014年 7月 16日	CN	103923857	B	2016年 1月 20日
CN	105713890	A	2016年 6月 29日	无			
CN	105924544	A	2016年 9月 7日	无			
CN	103923899	A	2014年 7月 16日	CN	103923899	B	2016年 5月 11日