

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 6 月 12 日 (12.06.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/085947 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/001629

(22) 国际申请日: 2012 年 12 月 5 日 (05.12.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(72) 发明人: 及

(71) 申请人: 邱绣河 (CHIOU, Shioh-Her) [CN/CN]; 中国台湾省台中市南区国光路 250 号, Taiwan 402 (CN)。

(72) 发明人: 周宽基 (CHOW, Kuan-Chih); 中国台湾省台中市南区国光路 250 号, Taiwan 402 (CN)。 沈瑞鸿 (SHIEN, Jui-Hung); 中国台湾省台中市南区国光路 250 号, Taiwan 402 (CN)。 范怡馨 (FAN, Yi-Hsin); 中国台湾省台中市南区国光路 250 号, Taiwan 402 (CN)。 林佩桦 (LIN, Pei-Hua); 中国台湾省台中市南区国光路 250 号, Taiwan 402 (CN)。 吴佩珊

(WU, Pei-Shan); 中国台湾省台中市南区国光路 250 号, Taiwan 402 (CN)。

(74) 代理人: 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 (KELONG INTERNATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市海淀区知春路 6 号锦秋国际大厦 A 座 1303, Beijing 100088 (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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, 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,

[见续页]

(54) Title: CHEMOKINE-CYTOKINE FUSION PROTEIN AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 趋化素-细胞素融合蛋白和其应用

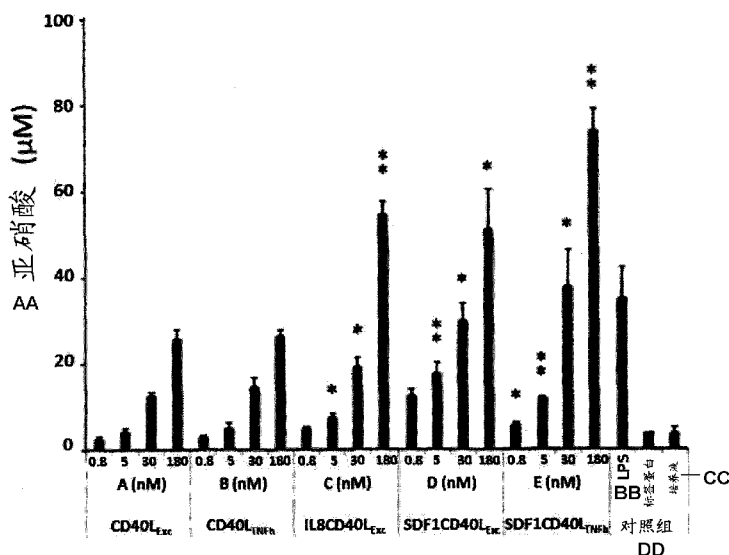


图 6 / Fig. 6

AA Nitrous acid
BB Tag protein

CC Culture medium
DD Control

(57) Abstract: The present invention provides a fusion protein comprising the chemokine polypeptide which is a chemokine or receptor-binding domain thereof, and the cytokine polypeptide linked to said chemokine polypeptide, the cytokine polypeptide is an interleukin, a TNF-superfamily cytokine or receptor-binding domain thereof, the chemokine polypeptide and the cytokine polypeptide possess same target cells, and the fusion protein has enhanced chemokine activity comparing with said chemokine polypeptide and enhanced cytokine activity comparing with said cytokine polypeptide.

(57) 摘要: 本发明提供一种融合蛋白, 其包含趋化素多肽, 其为一趋化素或其受体结合域; 和连接至该趋化素多肽的细胞素多肽, 其为一介白素、一 TNF-超家族细胞素或其受体结合域; 其中该趋化素多肽和该细胞素多肽具有共同的标的细胞, 且该融合蛋白具有相较于该趋化素多肽的增进的趋化素活性, 以及相较于该细胞素多肽的增进的细胞素活性。

WO 2014/085947 A1



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, 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))。

趋化素-细胞素融合蛋白和其应用

技术领域

本发明涉及一种融合蛋白，其包含趋化素和连接至该趋化素的细胞素，其中该趋化素和该细胞素具有共同的标的细胞，且其具有增进的细胞素活性和增进的趋化素活性的作用。

背景技术

细胞素 (cytokine) 是一群当细胞受外来刺激后所分泌出来 (只有极少种细胞素可表达于细胞膜) 的蛋白，细胞素自细胞产生后可以就近或经由血液的运输而作用于标的细胞以产生影响，而且在极低的浓度下就会发挥作用，广泛具有可促使标的细胞生长、分化或活化等功能，许多细胞素可作用在免疫细胞而参与免疫反应。细胞素可依其结构作用不同大致分为趋化素 (chemokines)、介白素 (interleukins)、生长因子 (growth factors)、转形生长因子 (transforming growth factors)、群落生成刺激因子 (colony stimulating factors)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factors) 和干扰素 (interferons) 等。

趋化素 (chemokines) 是一群可趋化吸引白血球的细胞素，通常为分子量小、带正电、可分泌性的蛋白，主要的功能是将免疫细胞吸引到组织受伤或是有病原感染的区域，白血球继而能够在此特定的部位进行吞噬反应 (phagocytosis) 或是引发发炎反应 (inflammation)，以抵御病原，趋化素所吸引的白血球可能包括属于先天性免疫力 (innate immunity) 的中性粒细胞 (neutrophils)、单核球/巨噬细胞 (monocytes/macrophages)、自然杀伤细胞 (natural killer cells)、树突细胞 (dendritic cells) 和其他白血球等，或者是属于特异性免疫反应 (adaptive immunity) 的 T (淋巴) 细胞 (T lymphocytes, T cells) 或 B (淋巴) 细胞 (B lymphocytes, B cells)，在生物体的免疫系统中扮演相当重要的角色。趋化素大多拥有 4 个高度保留的半胱氨酸 (cysteine, C) 形成双硫键来稳定其结构，依据前两个 C 的间的氨基酸数不同和第一个 C 有无进行分类，可分成 CXC (或称 α)、CC (或称 β)、C (或称 γ) 与 CX₃C 四个亚群 (subfamilies)。基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 被归类在趋化素的 CXC 亚群里，又称为 CXC 配体 12 (CXCL12)，在许多的物种中均有发现，包括哺乳类动物中的人类、小鼠和猫与两栖类动物中的非洲爪蟾 (*Xenopus*) 以及斑马鱼 (zebra fish) 都有发现，在不同物种间变异不大，有相当好的保留性 (Shirozu

et al., *Genomics* 28, 495-500)。SDF-1 基因在小鼠和人类中转录出的 mRNA 会先经过不同剪接 (splicing)，所以可发现有两种 SDF-1 同型异构物 (isoform)：SDF-1 α 和 SDF-1 β 。SDF-1 的分布极广，包括淋巴组织、肾、肺、肝、脑和肌肉等都可侦测的到 (Shirozu *et al.*, *Genomics* 28, 495-500)。SDF-1 的受体 CXCR4 除了长存于脏器中，亦可见于造血干细胞 (hematopoietic stem cells)、内皮细胞、树突细胞、B 细胞、和 T 细胞，因此这些细胞会受 SDF-1 吸引，移动到该趋化素浓度高的部位 (Bleul *et al.*, *Nature*, 382: 829-833; Oberlin *et al.*, *Nature* 382: 833-835; Read *et al.*, *Developmental and comparative immunology*, 29, 143-152)。介白素-8 (interleukin-8, IL-8) 亦被归类在趋化素的 CXC 亚群里，又称为 CXCL8，首度在人类发现后，陆续在猪、牛、鸡等经济动物发现。IL-8 在低浓度时可以趋化多种免疫细胞，包括单核球、巨噬细胞和淋巴细胞、中性粒细胞等。

CD40 配体 (CD40 ligand, CD40L) 是肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 超家族 (superfamily) 里的一员，此种细胞素具有使肿瘤坏死与促进白血球细胞分化、增生、凋亡的功用。CD40L 蛋白合成时为一跨膜蛋白 (transmembrane protein)，以人类 CD40L 为例，蛋白共 261 个氨基酸，首先氨基端 22 个氨基酸为细胞内区域，接着 24 个氨基酸为穿膜区域，靠羧基端 215 个氨基酸序列为细胞外 (extracellular, Exc) 区域，Exc 区域在羧基端具有一个 TNF 超家族蛋白均保留的 TNF 同源 (TNF homology, TNFh) 区域。CD40L 主要以跨膜蛋白形式存在活化的 CD4⁺ T 细胞表面，也存在 CD8⁺ T 细胞、嗜碱性粒细胞 (basophils)、嗜酸性粒细胞 (eosinophils)、肥大细胞、自然杀伤细胞、血小板、甚至在表达 CD40 的细胞表面也有发现。

CD40L 的受体为 CD40，分布于 B 细胞、树突细胞，巨噬细胞等抗原呈现细胞 (antigen presenting cells, APCs) 表面。在生理上这些抗原呈现细胞可受到辅助性 T 细胞 (T helper cells) 表达的 CD40L 活化，促进表达第二类主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex class II, MHC-II) 分子与 B7 分子以助抗原呈现。CD40L 透过与标的细胞上的 CD40 结合而活化信息传递通路，除了上述促进抗原呈现的作用，CD40L 在 B 细胞可促进 B 细胞增殖 (proliferation)、免疫球蛋白的类型转变 (isotype switching)、抗体分泌、记忆性 B 细胞的分化或避免细胞凋亡；CD40L 作用在巨噬细胞可加强其活化，促进其产生介白素-12 (interleukin-12, IL-12) 以活化第一型辅助性 T 细胞 (T helper 1, Th1) 或是分泌一些趋化素，或是促进一氧化氮 (nitric oxide, NO) 产生以提升巨噬细胞防卫微生物的能力；作用在树突细胞可使其成熟活化，活化的树突细胞除了表达大量 MHC-II 分子以助抗原呈现，还会分泌

TNF- α 以及 IL-8、巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α) 等趋化素。

目前已有许多研究将 CD40L 应用在疫苗佐剂或是治疗上, 例如做为鸭 B 型肝炎病毒 (duck hepatitis B virus, DHBV) 疫苗 (Gares *et al.*, *Clin Vaccine Immunol* 13, 958-965)、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) DNA 疫苗 (Stone *et al.*, *J Virol* 80, 1762-1772) 的佐剂或是治疗人类自体免疫性疾病 (Howard & Miller, *Autoimmunity* 37, 411-418) 等。

介白素-2 (interleukin-2, IL-2) 被归类在造血因子 (hematopoietin) 家族里, 这家族包括了一些与细胞生长有关的荷尔蒙或其他细胞素等。IL-2 的功能包括: 调节 T 细胞的成熟和分化、刺激 B 细胞的增殖和抗体分泌、促进自然杀伤细胞的毒杀能力、活化单核细胞和巨噬细胞等。IL-2 也可以刺激 T 细胞与 B 细胞持续表达 MHC, 也可以刺激自然杀伤细胞产生多种不同的细胞素, 包括 TNF- α 、IFN- γ 和粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte/macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 等。研究显示 IL-2 有抗肿瘤和提升疫苗的作用。

然而, 本领域中仍然需要具较强活性的细胞素和趋化素。

发明内容

本发明意外地发现, 包含趋化素和连接至该趋化素的细胞素的融合蛋白, 具有增进的细胞素活性和增进的趋化素活性。

因此, 本发明提供一种融合蛋白, 其包含一趋化素多肽, 其为一趋化素或其受体结合域; 和连接至该趋化素多肽的一细胞素多肽, 其为一介白素、一 TNF-超家族细胞素或其受体结合域; 其中该趋化素多肽和该细胞素多肽具有共同的标的细胞, 且该融合蛋白具有相较于该趋化素多肽的增进的趋化素活性, 以及相较于该细胞素多肽的增进的细胞素活性。

根据本发明, 该趋化素为一 CXC 趋化素、CC 趋化素、C 趋化素和 CX₃C 趋化素, 较佳为 CXC 趋化素。根据本发明的具体实施例, 该趋化素可以是基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor-1; SDF-1) 或 IL-8。

根据本发明, 该细胞素多肽为一介白素、一 TNF-超家族细胞素或其受体结合域。在本发明的具体实施例中, 该细胞素多肽为 IL-2、CD40 配体或其受体结合域。

另一方面, 本发明提供一种经分离的核酸分子, 其编码本发明的融合蛋白。

又一方面, 本发明提供一种表达载体, 其包含本发明的核酸分子。

本发明亦提供一种宿主细胞，其包含本发明的核酸分子或本发明的表达载体。

本发明的各个具体实施例的细节说明如后。本发明的其他特征将会经由以下各个具体实施例中的详细说明和申请专利范围而清楚呈现。

无须进一步的阐述，相信本发明所属技术领域中具有通常知识者基于前述说明即可利用本发明至最广的程度。因此，可以理解以下的说明仅仅是作为例示说明的用，而非以任何方式限制其余的揭露内容。

附图说明

图 1 为鸡 CD40L 和其衍生蛋白 CD40L_{Exc} 和 CD40L_{TNFh} 的示意图；

图 2 显示所表达的鸡重组融合蛋白的 SDS-PAGE 和 western blot 分析结果；

第 1 道 (lane 1): IL8CD40L_{Exc}, 预期大小为 52 kDa; 第 2 道: IL8IL2, 预期大小为 44 kDa; 第 3 道: SDF1CD40L_{Exc}, 预期大小为 38 kDa; 第 4 道: SDF1CD40L_{TNFh}, 预期大小为 44 kDa; 和第 5 道: SDF1IL2, 预期大小为 26 kDa;

图 3 显示纯化单一蛋白的 SDS-PAGE 和 western blot 分析结果；

第 1 道: 标签蛋白, 预期大小为 21 kDa; 第 2 道: IL-8, 预期大小为 13 kDa; 第 3 道: SDF-1, 预期大小为 11 kDa; 第 4 道: IL-2, 预期大小为 32 kDa; 第 5 道: CD40L_{Exc}, 预期大小为 42 kDa; 和第 6 道: CD40L_{TNFh}, 预期大小为 33 kDa;

图 4 显示 IL-8 衍生蛋白趋化 PBMCs 的情形；

细胞受到胶体外的趋化素吸引，会自中心胶体游向四周，细胞在低放大倍率下呈现云雾状，胶体周围细胞愈多代表趋化细胞程度愈大，在 2 μ M 下，IL8CD40L_{Exc} 或 IL8IL2 趋化细胞程度明显大于 IL-8 单一蛋白；

图 5 显示 SDF-1 衍生蛋白趋化 PBMCs 的情形；

在 2 μ M 下，SDF1CD40L_{Exc}、SDF1CD40L_{TNFh}、或 SDF1IL2 趋化细胞程度明显大于单一 SDF-1 蛋白；

图 6 显示 CD40L 衍生蛋白活化巨噬细胞产生 NO 的活性；

A: CD40L_{Exc}; B: CD40L_{TNFh}; C: IL8CD40L_{Exc}; D: SDF1CD40L_{Exc}; E: SDF1CD40L_{TNFh}; 和对照组: 以 LPS (4 μ g/ml) 做为阳性对照组，卷标蛋白 (250 nM) 和培养液做为阴性对照组，*表示与个别单一蛋白相比有显著较高活性 (* p < 0.05, ** p < 0.01);

图 7 显示 IL-2 融合蛋白促进淋巴球增生试验的结果；

增生指数 (stimulation index, SI) = 试验组别的 OD/仅以 RPMI 1640 培养的

OD。融合蛋白 SDF1IL2 浓度在 0.625 - 160 nM 时, 其 SI 值显著高于单独 IL-2 组别 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$);

图 8 显示 IL-2 融合蛋白作为新城疫病毒 (ND) 疫苗佐剂, 可显著促进细胞免疫反应; 施用 IL-2 融合蛋白佐剂与 ND 疫苗组别鸡只, 于新城疫病毒 (NDV) 抗原再刺激时, 其记忆淋巴细胞增生情形显著高于 ND 疫苗组;

图 9 显示融合蛋白作为传染性支气管炎 (IB) 疫苗佐剂, 可显著促进细胞免疫反应;

进行传染性支气管炎病毒 (IBV) 抗原再刺激试验, 施用 IL-2 融合蛋白佐剂与 ND 疫苗组别鸡只, 其记忆淋巴细胞增生情形显著 ($p < 0.01$) 高于 IB 疫苗组; 施用 CD40L_{Exc} 融合蛋白佐剂与 ND 疫苗组别鸡只, 其记忆淋巴细胞增生情形亦显著 ($p < 0.05$) 高于 IB 疫苗组。

具体实施方式

除非另有指明, 所有在此处使用的技术性和科学性术语具有如同本发明所属技艺中的通常技术者一般所了解的意义。

本文所使用的“一”一词, 如未特别指明, 是指至少一个 (一个或一个以上) 的数量。

本文所使用的“趋化素多肽”一词是指一多肽, 其为趋化素 (chemokine) 或其受体结合域 (receptor binding domain), 其中该趋化素包括但不限于 CXC 趋化素、CC 趋化素、C 趋化素和 CX₃C 趋化素。

本文所使用的“细胞素多肽”一词是指一多肽, 其为细胞素 (cytokine) 或其受体结合域, 其中该细胞素包括但不限于介白素和 TNF-超家族细胞素。

本文所使用的「趋化素活性」一词是指趋化素于生物体内所具备或可发挥的活性, 包括但不限于趋化多种免疫细胞 (包括单核细胞、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、树突细胞和中性粒细胞等)。

本文所使用的“细胞素活性”一词是指细胞素于生物体内所具备或可发挥的活性, 包括但不限于促进 B 细胞增殖、免疫球蛋白的类型转变、抗体分泌; 记忆性 B 细胞的分化或避免细胞凋亡; 促进巨噬细胞分泌介白素-12 以活化第一型辅助性 T 细胞或分泌趋化素; 促进巨噬细胞产生一氧化氮以提升防卫微生物的能力; 促进树突细胞成熟活化; 调节 T 细胞的成熟和分化; 促进自然杀伤细胞的毒杀能力、产生多种不同的细胞素; 活化单核细胞和巨噬细胞; 和刺激 T 细胞与 B 细胞持续表达

MHC 等。

本发明提供一种融合蛋白，其包含一趋化素多肽，其为一趋化素或其受体结合域；和连接至该趋化素多肽的一细胞素多肽，其为一介白素、一 TNF-超家族细胞素或其受体结合域；其中该趋化素多肽和该细胞素多肽具有共同的标的细胞，且该融合蛋白具有相较于该趋化素多肽更增进的趋化素活性，以及相较于该细胞素多肽更增进的细胞素活性。

在本发明的较佳具体实施例中，该趋化素多肽和该细胞素多肽是通过多肽接头（peptide linker）连接。为了将两种蛋白接合在一起并且还保有原来的构形与功能，可在两蛋白的中间加上适当的多肽接头以降低两蛋白折叠时的互相干扰。而这类多肽接头例如具有一定程度的弹性和亲水性的弹性多肽接头 $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_n$ （通常 n 小于 6），或是具亲水性的螺旋多肽接头 $(\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys})_n$ （通常 n 小于 6）。

在本发明一具体实施例中，该趋化素系为一 CXC 趋化素。在一特定实施例中，该趋化素为基质细胞衍生因子（SDF-1）。在另一特定实施例中，该趋化素为 IL-8。

在本发明的部分具体实施例中，该趋化素多肽系具有选自下列的氨基酸序列之一：SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和其同源物（homolog）和类似物（analog）。

在本发明部分具体实施例中，该细胞素多肽为 IL-2、CD40 配体（CD40 ligand; CD40L）或其受体结合域。

在本发明部分具体实施例中，该细胞素多肽具有选自下列的氨基酸序列之一：SEQ ID NO: 20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 和其同源物和类似物。

在本发明特定具体实施例中，本发明的融合蛋白具有选自下列的氨基酸序列之一：SEQ ID NO: 40、42、44、46 和 48。

另一方面，本发明提供一种经分离的核酸分子，其编码本发明的融合蛋白。

在本发明部分具体实施例中，该经分离的核酸分子包含选自下列的编码趋化素多肽的核苷酸序列之一：SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和其同源物和类似物。

在本发明部分具体实施例中，该经分离的核酸分子包含选自下列的编码细胞素多肽的核苷酸序列之一：SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、29、31、33、35、37 和其同源物和类似物。

在本发明特定具体实施例中，该经分离的核酸分子具有选自下列序列之一：SEQ

ID NO: 39、41、43、45 和 47。

又一方面，本发明提供一种表达载体，其包含本发明的核酸分子。

本发明亦提供一种宿主细胞，其包含本发明的核酸分子或本发明的表达载体。

以下实施例仅作为说明，而非作为本发明的限制。

实施例 1: 原核表达载体的构建

利用先前已构建的鸡 SDF-1、IL-8、CD40L 衍生蛋白和 IL-2 的表达载体（吴佩珊，国立中兴大学兽医微生物学研究所硕士论文 2008，鸡 CD40L 和趋化素的研究；Tsai *et al.*, *Taiwan Vet J* 31: 38-45）做为模版，进行重组聚合酶链反应，其中鸡 CD40L（chCD40L）衍生蛋白包括 CD40L 的细胞外区域（extracellular domain of CD40L, CD40L_{Exc}）或 TNF 同源区域（TNF homology domain of CD40L, CD40L_{TNFh}）（参见图 1）。由此扩增 SDF1CD40L_{Exc}、SDF1CD40L_{TNFh}、SDF1IL2、IL8CD40L_{Exc}、IL8CD40L_{TNFh}、IL8IL2 等连接蛋白（conjugate protein）或融合蛋白（fusion protein）的基因序列。

方法简述如下，根据各基因序列分别设计出两对专一性引物对，第一对引物的正向引物带有限制性酶切位点 *EcoR* I 切位和融合蛋白位于前段的 N-端基因序列，反向引物则带有螺旋多肽接头和融合蛋白位于前段的 C-端基因序列，此对引物可专一性扩增出编码融合蛋白前段与多肽接头的 DNA 片段；第二对引物的正向引物带有螺旋多肽接头和融合蛋白位于后段的 N-端基因序列，反向引物则带有限制性酶切位点 *Xho* I 切位和融合蛋白位于后段的 C-端基因序列，此对引物则可专一性扩增出编码多肽接头与融合蛋白后段的 DNA 片段；将这两 PCR 产物做为模板，以第一对引物的正向引物与第二对引物的反向引物再做一次 PCR，则两个片段会因为螺旋多肽接头重迭的部分序列而达到连接的目的，所得的产物即为其间含有螺旋多肽接头的融合基因序列。将上述产物以限制性酶切位点 *EcoR* I 与 *Xho* I 作用后，与经过 *EcoR* I 和 *Xho* I 作用过的 pET 载体（Novagen, Darmstad, Germany）以 T4 DNA 接合酶（Invitrogen）在 16 °C 进行 16 小时连接作用，构建的原核表达载体分别命名为 pETSDF1CD40L_{Exc}、pETSDF1CD40L_{TNFh}、pETSDF1IL2、pETIL8CD40L_{Exc} 和 pETIL8IL2。

实施例 2: 重组蛋白的表达

将构建好的原核表达载体转化至 *E. coli* 表达菌株 BL21（DE3）中，以 0.5 mM

IPTG 诱导重组蛋白表达,以离心的方式收取菌体去除培养液。所有的菌体接着以结合缓冲液 (binding buffer) 重悬,使用高压细胞裂解仪 (French Pressure Cell Press, Thermo IEC, Needham, Height, MA, USA) 裂解菌体,高速离心的后水溶性的蛋白会位于上清液,以镍离子亲和柱进行纯化。不可溶蛋白则会位于离心后的底部团块中,以 8 M 尿素处理此部分不可溶蛋白后,尿素会将蛋白质的折叠打开使其溶解于水溶液中,接着离心 12000 rpm 30 分钟取其上清液进行透析,将尿素慢慢置换出来,使蛋白重新折叠成原来的构型,最后将蛋白质溶解于含有 10 %甘油的磷酸盐缓冲液 (pH 7.3) 中,经 0.22 μ m 滤膜过滤后,以 BCA 蛋白分析试剂盒 (Pierce, Rockford, IL, USA) 测定蛋白浓度,储存在 -20 $^{\circ}$ C。蛋白纯化后经 MALDI-TOF 质谱仪分析鉴定为正确的融合蛋白,SDS-PAGE 与 western blot (一级抗体为 anti-His 抗体,二级抗体为 AP-标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,显色剂为 NBT/BCIP) 分析显示所表达的鸡重组融合蛋白 IL8CD40L_{Exc}、IL8IL2、SDF1CD40L_{Exc}、SDF1CD40L_{TNF α} 和 SDF1IL2 等的分子量如预期大小,分别为 52 kDa、44 kDa、38 kDa、44 kDa 和 26 kDa (参见图 2)。此外,亦制备纯化单一蛋白做为对照,方法如前述 (吴佩珊,国立中兴大学兽医微生物学研究所硕士论文 2008,鸡 CD40L 和趋化素的研究; Tsai *et al.*, *Taiwan Vet J* 31: 38-45)。

实施例 3: 趋化活性试验 (chemotactic activity assay)

评估趋化素 (SDF-1 或 IL-8) 与 CD40L 衍生蛋白或 IL-2 融合后的趋化活性,以 Histopaque 1077 (Sigma, Saint Louis, Mo, USA) 分离周边血液单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),以 PBS 冲洗两次后,再以含 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 悬浮后加入融溶状态 0.6 % 洋菜胶,混合均匀,使洋菜胶的终浓度为 0.3 %,接着取此混合液 2 μ l/孔 点在 48 孔盘的中央,放入冰箱五分钟使洋菜胶凝固,而将细胞固定在胶的范围内。接着每孔加入 250 μ l 含有各浓度待测蛋白的培养液,于 37 $^{\circ}$ C 培养隔夜后观察。

依据各蛋白发挥趋化活性的最低有效浓度 (minimal effective concentration, MEC),MEC 值愈小即趋化活性愈佳,IL-8 无论融合 CD40L 衍生蛋白或 IL-2 (IL8CD40L_{Exc} 或 IL8IL2) 均可明显降低 MEC 值,提高趋化活性,其融合蛋白趋化活性比 IL-8 的更好 (参见表 1); SDF-1 无论融合 CD40L 衍生蛋白或 IL-2 (SDF1CD40L_{Exc} 或 SDF1IL2) 均可降低 MEC 值,提高趋化活性,其融合蛋白的趋

化活性比 SDF-1 更好 (参见表 1)。各蛋白浓度愈高, 趋化效果愈佳, 在相同浓度下, IL8CD40L_{Exc} (趋化程度最大) 或 IL8IL2 (趋化程度次的) 趋化细胞程度明显大于 IL-8 单一蛋白 (参见图 4); 在相同浓度下, SDF1CD40L_{Exc}、SDF1CD40L_{TNFh}、或 SDF1IL2 趋化细胞程度明显大于混合液或 SDF-1 单一蛋白 (参见图 5)。

表 1: 趋化活性的最低有效浓度 (MEC)

编号	蛋白名称	最低有效浓度
A	IL-8	125 nM
B	IL8CD40L _{Exc}	62.5 nM
C	IL8IL2	62.5 nM
D	SDF-1	125 nM
E	SDF1CD40L _{Exc}	62.5 nM
F	SDF1CD40L _{TNFh}	62.5 nM
G	SDF1IL2	62.5 nM

实施例 4: CD40L 衍生蛋白活化巨噬细胞产生一氧化氮 (nitric oxide, NO) 活性分析

基于 CD40L 可活化巨噬细胞产生 NO 的特性, 评估趋化素与 CD40L 衍生蛋白融合后的 CD40L 活性。分离周边血液单核细胞, 以 PBS 冲洗两次后, 以含 10 % FBS 的 RPMI 1640 外加 125 ng/ml 鸡 IL-2 和 4 µg/ml LPS 调整细胞至 2×10^6 /ml, 24 孔盘中各放入 1 ml, 两天后外加新鲜培养液 1 ml (同样添加 125 ng/ml 鸡 IL-2 和 4 µg/ml LPS), 五天后完成刺激, 单核细胞会分化成巨噬细胞。以 PBS 冲洗三次去除悬浮细胞后加入不同浓度的 CD40L 衍生蛋白或融合蛋白, 并以培养液、载体表达的标签蛋白和加入 4 µg/ml LPS 的培养液分别做为阴性和阳性对照组, 培养 48 小时后取 50 µl 利用可通过商业途径购买的试剂盒 (Griess Reagent System; Promega, Madison, WI, USA) 测定培养液中亚硝酸 (由 NO 转化) 浓度。

融合蛋白 IL8CD40L_{Exc} 与只加入 CD40L_{Exc} 的组别相比, 有显著较好的活性 (5-30 nM, $p < 0.05$; 180 nM, $p < 0.01$)。融合蛋白 SDF1CD40L_{Exc} 的效果显著较单一 CD40L_{Exc} 蛋白更好 (5 nM, $p < 0.01$; 30-180 nM, $p < 0.05$)。而在 SDF-1 和 CD40L_{TNFh} 的组合亦有类似结果, 融合蛋白 SDF1CD40L_{TNFh} 的效果也是显著比单一蛋白 (CD40L_{TNFh}) 还要好 (5 nM and 180 nM, $p < 0.01$; 0.8 nM and 30 nM, $p < 0.05$) (参

见图 6)。

实施例 5: IL2 融合蛋白促进淋巴球增生的活性

基于 IL-2 可促进淋巴球增生的活性, 评估趋化素与 IL-2 融合后的 IL-2 活性。利用细胞内酸性磷酸酶 (acid phosphatase) 的活性与细胞数成正比, 加入显色底物对硝基磷酸苯酯 (p-nitrophenyl phosphate, pNpp)。分离周边血液单核细胞后, 以含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液加上不同浓度的蛋白、10 $\mu\text{g/ml}$ ConA (阳性对照组)、或 10 nM 标签蛋白 (阴性对照组), 培养于 96 孔板当中, 每孔细胞量为 2×10^5 , 培养三天后 3000 rpm 离心 10 分钟, 接着去掉培养液, 每孔加入 100 μl 的显色试剂 (0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 0.1% Triton X-100, and 10 mM pNpp), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养两个小时, 接着加入 10 μl 1 N NaOH 终止反应, 以波长 405 nm 读取吸光值并计算增生指数 (stimulation index, SI), 其中 $\text{SI} = \text{试验组别的 OD} / \text{仅以 RPMI 1640 培养的 OD}$ 。结果显示融合蛋白 SDF1IL2 于 0.625 – 160 nM 时促进增生的活性均显著高于 IL-2 (0.625 nM, $p < 0.05$; 1.25 – 80 nM, $p < 0.001$; 160 nM, $p < 0.01$), 此结果显示融合趋化素后 IL-2 活性显著提高 (参见图 7)。

实施例 6: 融合蛋白作为禽类新城疫病 (Newcastle disease, ND) 疫苗佐剂促进疫苗引发的免疫反应

以 IL-2 融合蛋白作为禽类新城疫病 (Newcastle disease, ND) 疫苗佐剂 (vaccine adjuvant) 施用于鸡只, 于施用疫苗后抽取鸡血, 培养淋巴细胞并加入灭活的 (inactivated) 新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 为抗原, 进行抗原再刺激试验 (antigen re-stimulation assay), 另于培养液加入 10 $\mu\text{g/ml}$ ConA 做为阳性对照组, 比较各组鸡只可识别 NDV 抗原的记忆淋巴细胞 (memory lymphocytes) 增生情形, 决定增生情形的方法与实施例 5 所描述相同, 增生百分比 = (试验组别的 OD / 仅以 RPMI 1640 培养的 OD) $\times 100\%$ 。与仅接种 ND 疫苗的组别 (ND vaccine) 相较, 接种 IL-2 融合蛋白为 ND 疫苗佐剂的组别 (SDF1IL2 + ND vaccine) 可显著 ($p < 0.05$) 提升抗原再刺激时具抗原识别特异性 (antigen-specific) 的记忆淋巴细胞增生活性 (参见图 8)。

实施例 7: 融合蛋白作为禽类传染性支气管炎 (infectious bronchitis, IB) 疫苗佐剂促进疫苗引发的免疫反应

以 IL-2 融合蛋白或 CD40L_{Exc} 融合蛋白作为禽类传染性支气管炎 (infectious bronchitis, IB) 疫苗佐剂, 于施用疫苗后抽取鸡血, 培养淋巴细胞并加入去活性传染性支气管炎病毒 (infectious bronchitis virus, IBV) 为抗原, 进行抗原再刺激试验, 比较各组鸡只可识别 IBV 抗原的记忆淋巴细胞增生情形, 决定增生情形的方法与实施例 5 所描述相同, 增生百分比 = (试验组别的 OD/仅以 RPMI 1640 培养的 OD) × 100%。与仅接种 IB 疫苗的组别 (IB vaccine) 相较, 接种 IL-2 融合蛋白为 IB 疫苗佐剂的组别 (SDF1IL2 + IB vaccine) ($p < 0.01$) 或接种 CD40L_{Exc} 融合蛋白为 IB 疫苗佐剂的组别 (SDF1CD40L_{Exc} + IB vaccine) ($p < 0.05$) 均可显著提升抗原再刺激时具抗原识别特异性的记忆淋巴细胞增生活性 (参见图 9)。

权利要求

- 1、一种融合蛋白，其包含：
趋化素多肽，其为一趋化素或其受体结合域；和
连接至该趋化素多肽的细胞素多肽，其为一介白素、一 TNF-超家族细胞素或其受体结合域；
其中该趋化素多肽和该细胞素多肽具有共同的标的细胞，且该融合蛋白具有相较于该趋化素多肽的增进的趋化素活性，以及相较于该细胞素多肽的增进的细胞素活性。
- 2、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中该趋化素多肽和该细胞素多肽是通过多肽接头连接。
- 3、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中该趋化素选自于由 CXC 趋化素、CC 趋化素、C 趋化素和 CX₃C 趋化素所组成的群。
- 4、根据权利要求 3 所述的融合蛋白，其中该趋化素为一 CXC 趋化素。
- 5、根据权利要求 4 所述的融合蛋白，其中该趋化素为基质细胞衍生因子或 IL-8。
- 6、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中该趋化素多肽具有选自下列的氨基酸序列之一：SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和其同源物和类似物。
- 7、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中该细胞素多肽系为 IL-2、CD40 配体或其受体结合域。
- 8、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中该细胞素多肽具有选自下列的氨基酸序列之一：SEQ ID NO: 20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 和其同源物和类似物。
- 9、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其具有选自下列的氨基酸序列之一：SEQ ID NO: 40、42、44、46 和 48。
- 10、一种经分离的核酸分子，其编码如权利要求 1-5 任一项所述的融合蛋白。
- 11、根据权利要求 10 所述的核酸分子，其包含选自下列的编码趋化素多肽的核苷酸序列之一：SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和其同源物和类似物。
- 12、根据权利要求 10 所述的核酸分子，其包含选自下列的编码细胞素多肽的核苷酸序列之一：SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、29、31、33、35、37 和其同源物和类似物。
- 13、根据权利要求 10 所述的核酸分子，其包含选自下列序列之一：SEQ ID NO:

39、41、43、45 和 47。

14、一种表达载体，其包含根据权利要求 10-13 任一项中所述的核酸分子。

15、一种宿主细胞，其包含根据权利要求 10-13 任一项中所述的核酸分子。

16、一种宿主细胞，其包含根据权利要求 14 所述的表达载体。

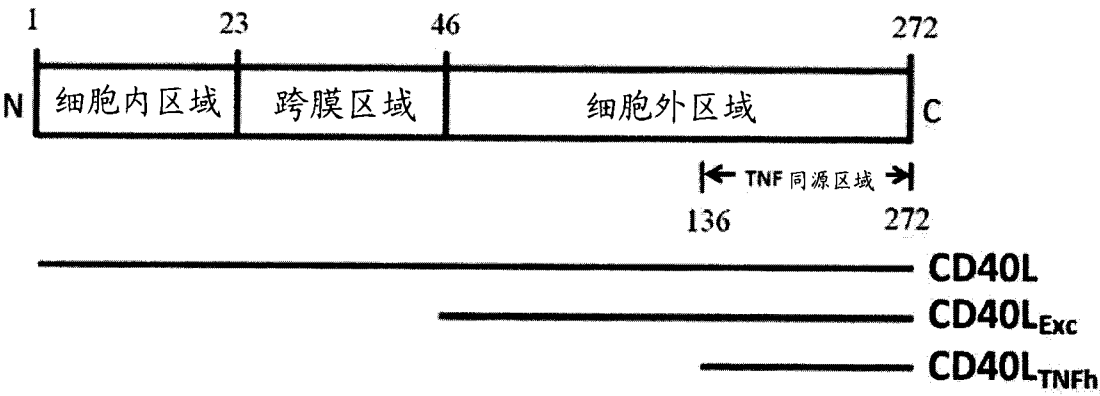


图 1

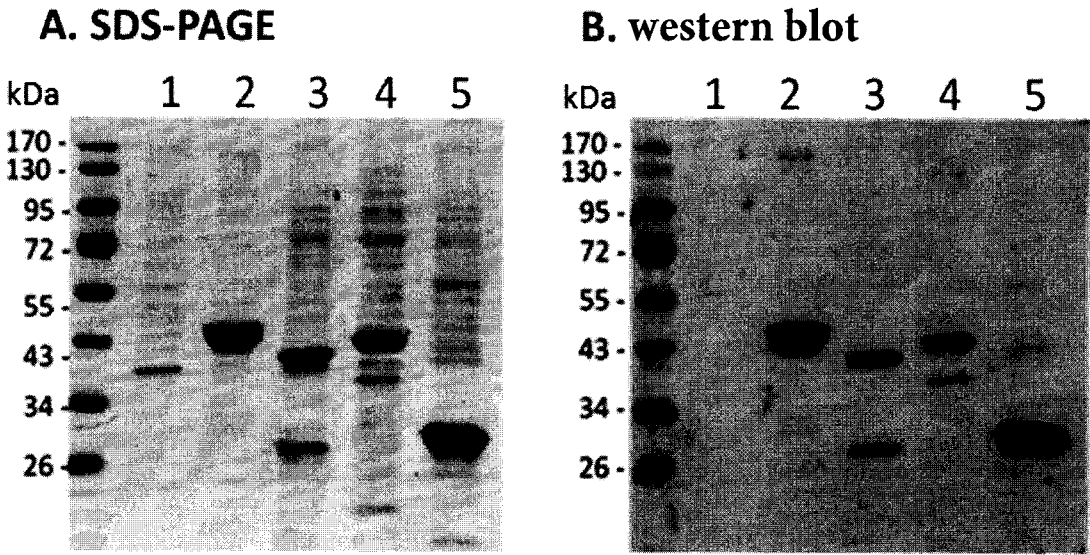


图 2

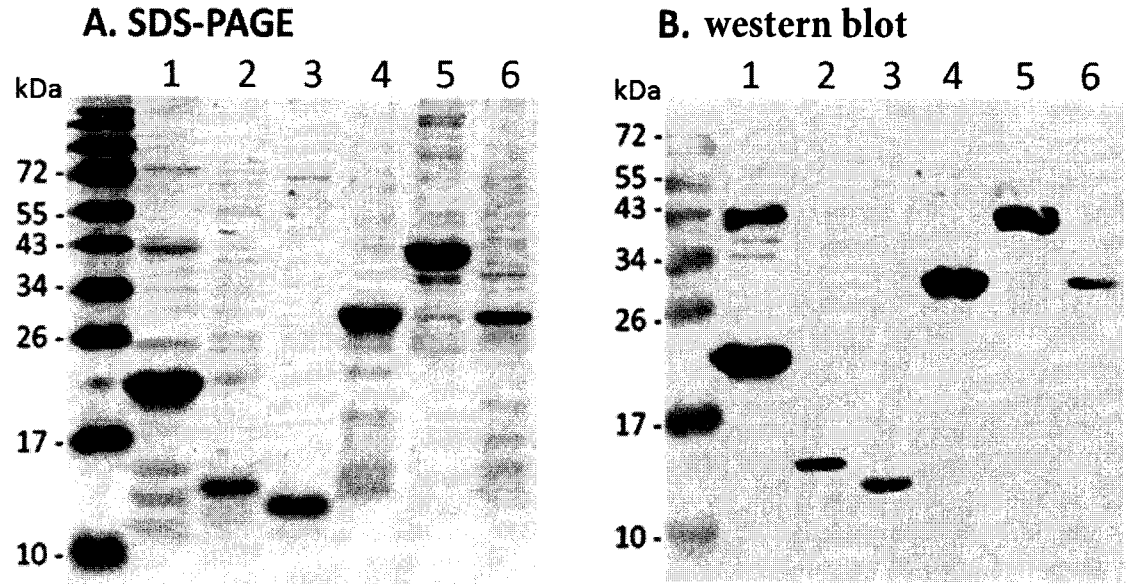


图 3

4/9

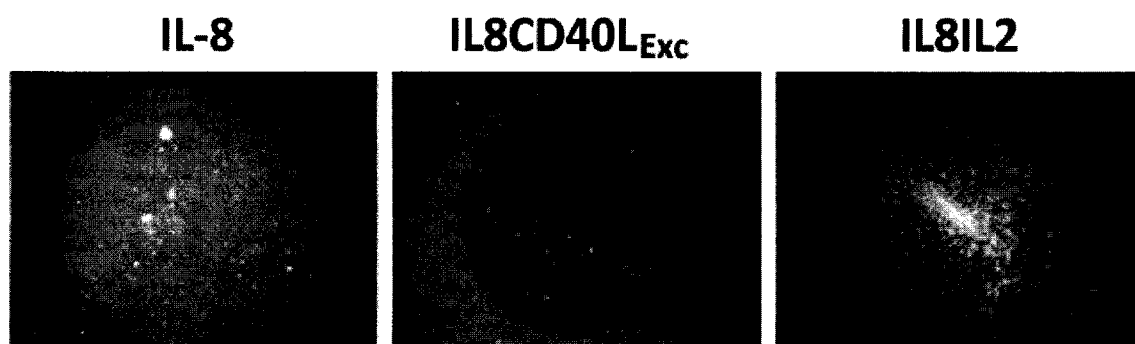


图 4

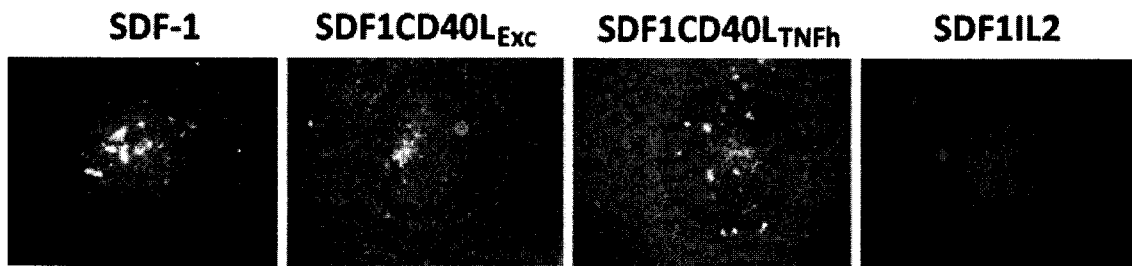


图 5

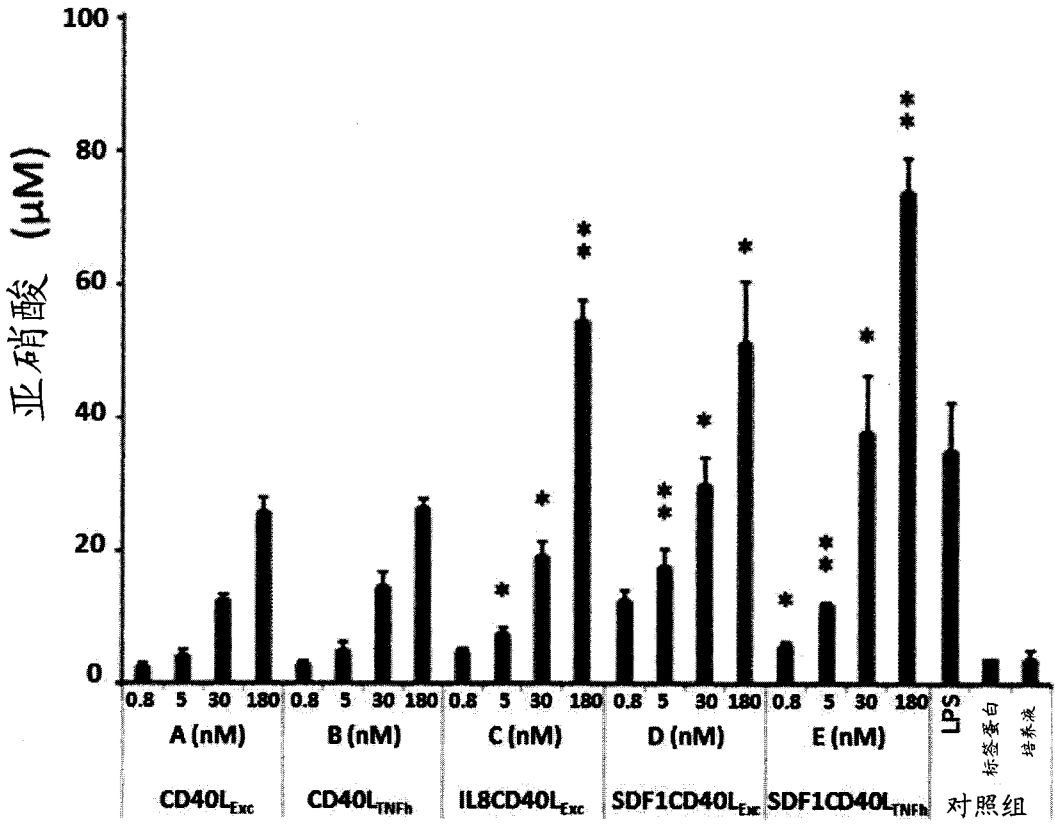


图 6

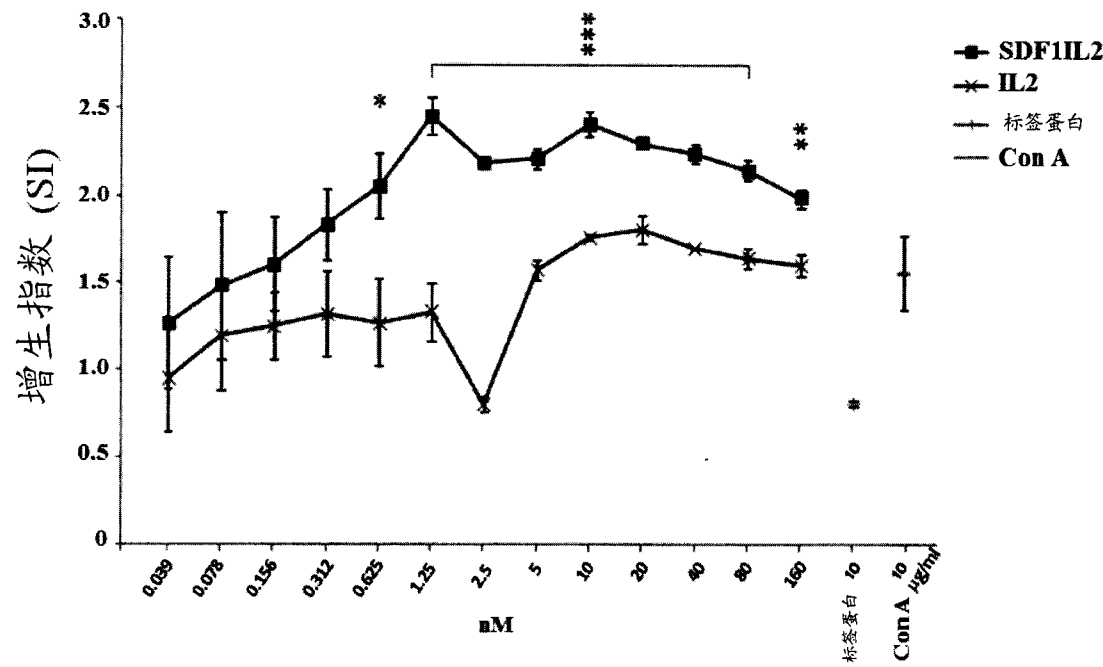


图 7

8/9

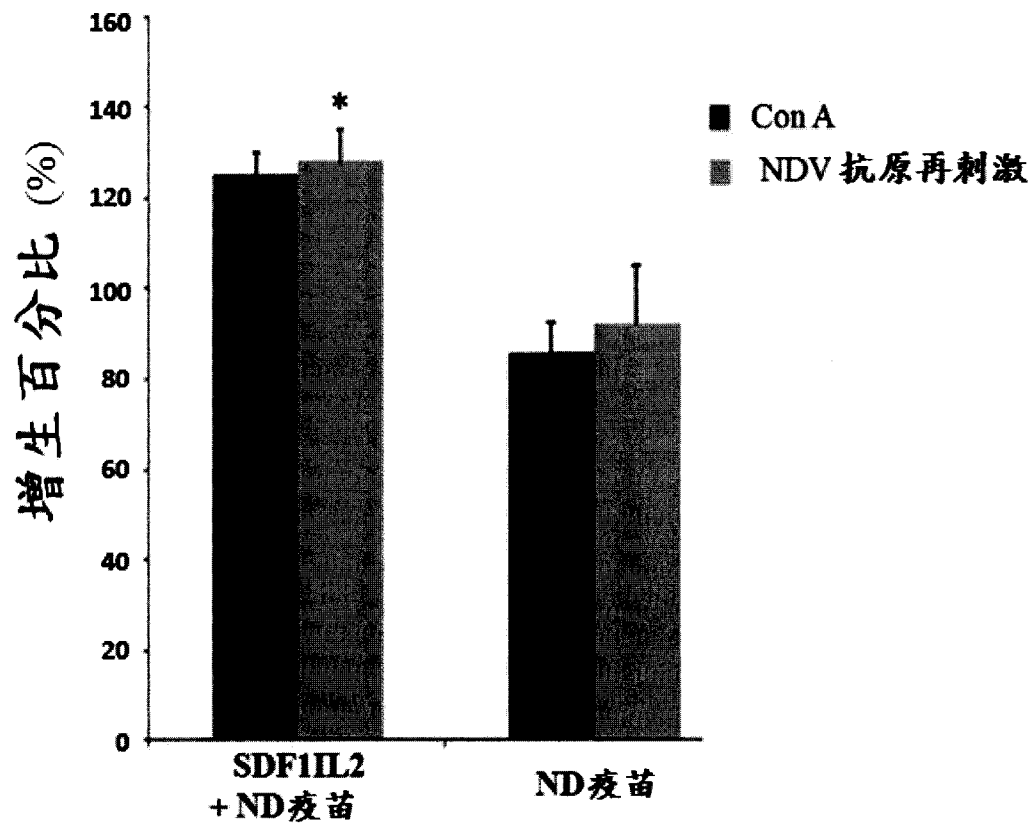


图 8

9/9

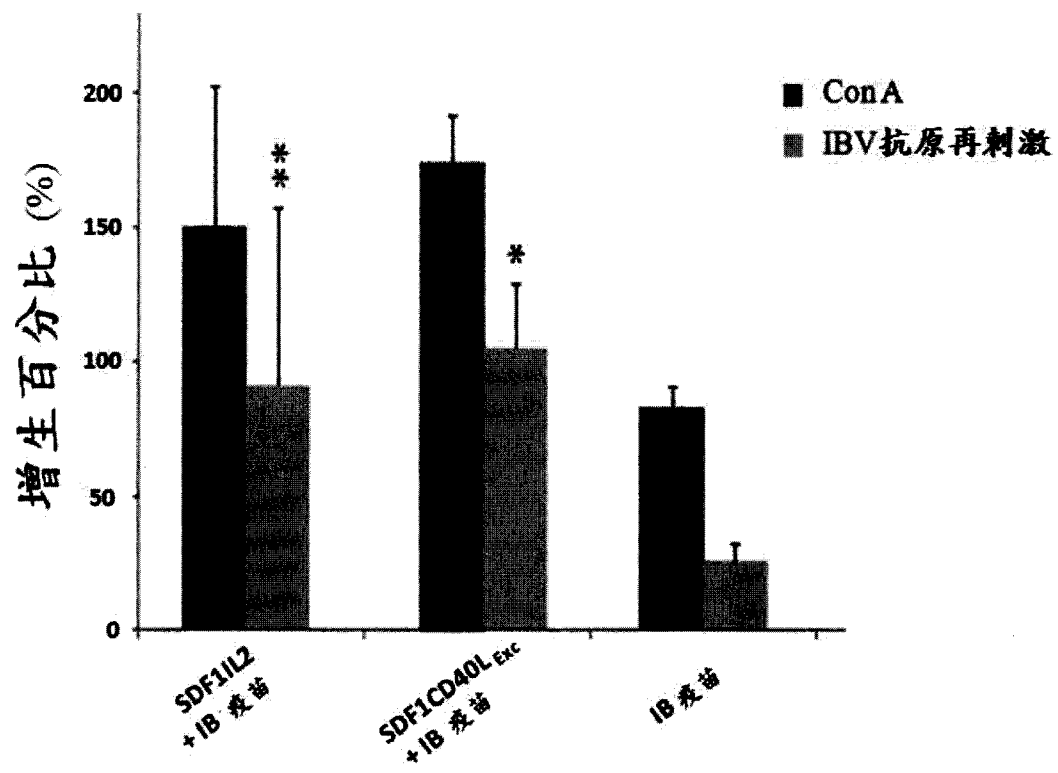


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/001629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: C07K 19/-; C07K 14/-; C12N 15/-

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)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, PubMed, NCBI: chemokine?, cytokine?, interleukin?, IL, bird?, fowl?, vaccine?, tumor necrosis factor, TNF, SDF?1, CD40L, IL?2, IL?8, ND, IB, newcastle disease, infectious bronchitis, fusion protein, fused, seq id no: 1-48

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	GONG, Ting, CCL21-CD40L fusion gene induces active immunity against colon cancer, Chinese Master's Theses Full-text Database Medicine and Health Sciences, 15 December 2009, no. 12, E072-122	
X	see the abstract in Chinese, the text, pages 1 and 2, 20 and 21	1-3, 7, 10, 14-16
Y	see the abstract in Chinese, the text, pages 1 and 2, 20 and 21	1-16
Y	CN 1382158 A (LEXIGEN PHARMACEUTICALS CORP.) 27 November 2002 (27.11.2002) see description, pages 19 and 20, the embodiment 18	1-16
Y	XU, Bin et al., Expression of mSDF-1 γ /GM-CS fusion protein and its protective effect on radiotherapy-induced hematopoiesis damages, Chin. J. Cancer Biother., February 2009, vol. 16, no. 1, pages 24-28	1-16

☒ 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
15 August 2013 (15.08.2013)

Date of mailing of the international search report
12 September 2013 (12.09.2013)

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) 62413783

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/001629

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JU, Xiaoping et al., Preparation of SDF-1 γ /rhGM-CSF fusion protein and its chemotactic effect, Chin. J. Cancer Biother., August 2011, vol. 18, no. 4, pages 419-423	1-16
Y	ZHANG, Yi et al., Expression of MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein and preliminary study of its biological bifunction, Chin. J. Cancer Biother., June 2004, vol. 11, no. 2, pages 133-137	1-16
Y	CN 101445560 A (HENAN BIOLOGICAL ENGINEERING TECHNIC RESEARCH CENTRE) 03 June 2009 (03.06.2009) see description, pages 2 and 3	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/001629

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1382158 A	27.11.2002	WO 0110912 A1	15.02.2001
		AU 6626800 A	05.03.2001
		EP 1200479 A1	02.05.2002
		NO 20020641 A	08.04.2002
		BR 0013231 A	23.07.2002
		KR 20020026368 A	09.04.2002
			11.12.2002
		HU 0202442 A2	28.11.2002
		JP 2003507012 A	25.02.2003
		ZA 200200789 A	26.03.2003
		US 6617135 B1	09.09.2003
			11.09.2003
		MXPA 02001417 A	01.08.2002
		US 2004072299 A1	15.04.2004
		AU 778611 B2	16.12.2004
		RU 2263118 C2	27.10.2005
		EP 1200479 B1	01.02.2006
		DE 60025832 E	13.04.2006
		ES 2256027 T3	16.07.2006
		CN 1235911 C	11.01.2006
		DE 60025832 T2	31.08.2006
		MX 238156 B	27.06.2006
		US 7141651 B2	28.11.2006
		EP 1731531 A2	13.12.2006
		US 2007258944 A1	08.11.2007
		KR 100827757 B1	07.05.2008
		US 7582288 B2	01.09.2009
		EP 1731531 A3	22.09.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/001629

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101445560 A	03.09.2009	JP 2011067211 A	07.04.2011
		JP 4793971 B2	12.10.2011
		EP 1731531 B1	30.05.2012
		CA 2380331 C	20.11.2012
		PL 353348 A	17.11.2003
		PL 202058 B	29.05.2009
		AT 316982 T	15.02.2006
		DK 1200479 T	15.05.2006
		None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/001629

Continuation of: Second Sheet: A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C07K 19/00 (2006.01) i

C07K 14/52 (2006.01) i

C07K 14/525 (2006.01) i

C07K 14/54 (2006.01) i

C12N 15/62 (2006.01) i

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC : C07K 19/-; C07K 14/-; C12N 15/-

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))

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, PubMed, NCBI: 趋化素, 趋化因子, 细胞素, 细胞因子, 介白素, 白介素, 肿瘤坏死因子, 融合蛋白, 禽, 疫苗, 新城疫, 传染性支气管炎, TNF, cytokine?, chemokine?, interleukin?, IL, SDF?1, CD40L, IL?2, IL?8, ND, IB, newcastle disease, infectious bronchitis, fusion protein, fused, seq id no:1-48

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	宫婷, 融合基因 CCL21-CD40L 对结肠癌主动免疫的诱导, 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 15.12 月 2009, 第 12 期, E072-122 参见中文摘要, 正文第 1-2、20-21 页	1-3, 7, 10, 14-16
Y	参见中文摘要, 正文第 1-2、20-21 页	1-16
Y	CN 1382158 A (利思进药品公司) 27. 11 月 2002 (27.11.2002) 参见说明书第 19-20 页, 实施例 18	1-16
Y	徐斌 等, mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白的制备及其对辐射小鼠造血损伤恢复的促进, 中国肿瘤生物治疗杂志, 2 月 2009, 第 16 卷, 第 1 期, 第 24-28 页	1-16
Y	居小萍 等, SDF-1 γ /rhGM-CSF 融合蛋白的制备及其趋化作用, 中国肿瘤生物治疗杂志, 8 月 2011, 第 18 卷, 第 4 期, 第 419-423 页	1-16
Y	张意 等, MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白的构建、表达及其双重生物学功能的初步研究, 中国肿瘤生物治疗杂志, 6 月 2004, 第 11 卷, 第 2 期, 第 133-137 页	1-16
Y	CN 101445560 A (河南省生物工程技术研究中心) 03. 6 月 2009 (03.06.2009) 参见说明书第 2-3 页	1-16



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

15. 8 月 2013 (15.08.2013)

国际检索报告邮寄日期

12.9 月 2013 (12.09.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

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) 62414403

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2012/001629

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1382158 A	27.11.2002	WO0110912 A1	15.02.2001
		AU6626800 A	05.03.2001
		EP1200479 A1	02.05.2002
		NO20020641 A	08.04.2002
		BR0013231 A	23.07.2002
		KR20020026368 A	09.04.2002
		CZ20020389 A3	11.12.2002
		HU0202442 A2	28.11.2002
		JP2003507012 A	25.02.2003
		ZA200200789 A	26.03.2003
		US6617135 B1	09.09.2003
		SK1842002 A3	11.09.2003
		MXPA02001417 A	01.08.2002
		US2004072299 A1	15.04.2004
		AU778611 B2	16.12.2004
		RU2263118 C2	27.10.2005
		EP1200479 B1	01.02.2006
		DE60025832 E	13.04.2006
		ES2256027 T3	16.07.2006
		CN1235911 C	11.01.2006
		DE60025832 T2	31.08.2006
		MX238156 B	27.06.2006
		US7141651 B2	28.11.2006
		EP1731531 A2	13.12.2006
		US2007258944 A1	08.11.2007
		KR100827757 B1	07.05.2008
		US7582288 B2	01.09.2009
		EP1731531 A3	22.09.2010
		JP2011067211 A	07.04.2011
		JP4793971 B2	12.10.2011
		EP1731531 B1	30.05.2012
		CA2380331 C	20.11.2012
		PL353348 A	17.11.2003
		PL202058 B	29.05.2009
		AT316982 T	15.02.2006
		DK1200479 T	15.05.2006
CN101445560A	03.09.2009	无	

续第 2 页: **A.** 主题的分类

C07K 19/00 (2006.01) i

C07K 14/52 (2006.01) i

C07K 14/525 (2006.01) i

C07K 14/54 (2006.01) i

C12N 15/62 (2006.01) i