

(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9月26日 (26.09.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/179361 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/495 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/078293

(22) 国际申请日: 2019年3月15日 (15.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
62/646,347 2018年3月21日 (21.03.2018) US

(71) 申请人: 傅惠芳 (CHAROENFUPRASERT, Sulawan) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙土瓜湾宋皇台道38号傲云峰第五座7楼B室, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: 詹勋锦 (JAN, Hsun-Jin); 中国台湾省桃园市桃园区中埔一街88巷68号3楼, Taiwan (CN)。 洪诚孝 (HUNG, Cheng-Hsiao); 中国台湾省桃园市桃园区中埔一街88巷68号3楼, Taiwan (CN)。 黄彦钧 (HUANG, Yan-Jiun); 中国台湾省新北市中和区安平路36巷1号7楼, Taiwan 235 (CN)。 吴骏翊 (WU, Tsang-Hsien Alexander); 中国

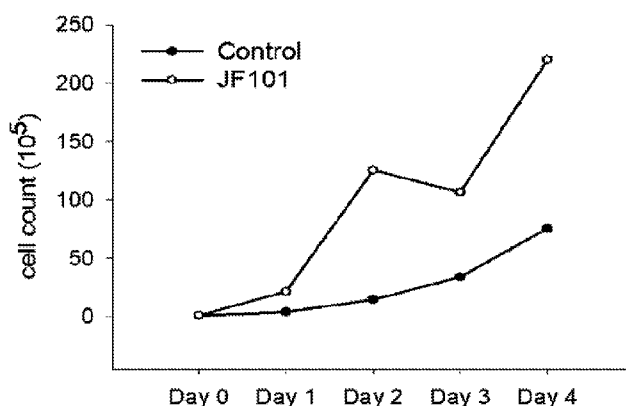
台湾省台北市大同区重庆北路3段256号3F, Taiwan 10372 (CN)。 王开鼎 (WANG, Kai-Ting); 中国台湾省桃园市桃园区中埔一街88巷68号3楼, Taiwan (CN)。 陈韦陆 (CHEN, Wei-Lu); 中国台湾省台中市北屯区军福十六路273号13楼之一, Taiwan 406 (CN)。

(74) 代理人: 北京汇信合知识产权代理有限公司 (BEIJING HUI & XIN IP LAW OFFICE); 中国北京市海淀区上地东路一号院5号院4层401-B4, Beijing 100085 (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。

(54) Title: COMPOSITION FOR IMPROVING SPHINCTER INSUFFICIENCY AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USER THEREOF

(54) 发明名称: 改善括约肌闭锁不全的组合物及其医药组合物与用途



	10000	40000	145000	340000	755000
Control	10000	40000	145000	340000	755000
JF101	10000	215000	1255000	1065000	2200000

图3

(57) Abstract: Provided is a composition for improving sphincter insufficiency, comprising a substrate additive and a recombinant protein. The composition is used to achieve the effect of reducing sphincter atrophy, promoting sphincter growth and sphincter recovery or maintenance.

(57) 摘要: 提供一种改善括约肌闭锁不全的组合物, 其由一基质添加物以及一重组蛋白所组成。通过该组合物, 以达成减少括约肌萎缩、促进括约肌增长、括约肌恢复或维持括约肌的效果。

[见续页]



WO 2019/179361 A1

(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))。

改善括约肌闭锁不全的组合物及其医药组成物与用途

技术领域

本发明关于一种组合物，特别是指一种改善括约肌闭锁不全的组合物；本发明另关于一种组合物的用途，特别是指一种用于制造改善括约肌闭锁不全的药物的用途。本发明另关于一种医药组成物，特别是指一种改善括约肌闭锁不全的医药组成物。

背景技术

大便失禁(fecal incontinence)是影响健康个体心理和社交能力的疾病之一。研究报告显示，一般人群中大便失禁的患病率约为2%至3%。Nelson及其同事发现威斯康星州小区居民的患病率为2.2%。在其研究中，总共调查了6959人，其中30%的人年龄超过65岁且63%是女性。在另一项研究中，Johanson和Lafferty在访问初级保健医生或胃肠病学家时观察到个体的总体患病率为18.4%，但只有三分之一的人曾与医生讨论过这个问题。在养老院环境中，大便失禁的患病率接近50%并且可能是入院的主要原因。

女性大便失禁率包括立即的产后失禁以及长期产后失禁。在阴道或剖腹产分娩后3至6个月，多达13%至25%的女性患有大便失禁。在一项针对6000名女性(年龄30至90岁)的产后调查中，大便失禁的患病率(定义为至少每月失去液体或实体粪便)为7.2%。老年人、严重抑郁症、尿失禁(urinary incontinence)、医学合并症和手术阴道分娩与大便失禁的机率显著相关。

大便失禁的经济成本很高，每年超过4亿美元花费在用于控制尿失禁和大便失禁的成人尿布上，这也是美国长期护理机构入院的第二大原因。对于需要治疗和矫正的年轻患者中，成本也惊人地高。在1996年针对63例因产科损伤继发大便失禁患者的研究中，每名患者的平均治疗费用为17,166美元。在1998年至2003年期间，约有21,000名妇女因大便失禁接受了住院手术(每年约3500名妇女)，总费用从1998年的3400万美元逐渐增加到2003年的5750万美元。2003年每次手术入院的平均费用为16,847美元

2015年，国家糖尿病和消化和肾脏疾病研究所(National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIDDK)研讨会上发表了2013

年大便失禁的流行病学、病理生理学、治疗和分类的摘要。

大便失禁是一种综合症，涉及无意中失去固体或液体粪便。而真正的肛门失禁是肛门括约肌丧失控制，导致粪便或气体不必要或不合时宜的释放。这必须与导致粪便通过肛门的其它条件区分开来。

大便渗漏(stool seepage)所造成的内衣污垢可能是痔疮、皮肤赘瘤增大(enlarged skin tags)、卫生条件差、肛管内瘘(fistula-in-ano)和直肠粘膜脱垂(rectal mucosal prolapse)造成的。

其他导致肠道控制不良的病症像是发炎性肠病(inflammatory bowel disease)、泻药滥用(laxative abuse)、寄生虫感染和毒素。

大便急迫(fecal urgency)必须和大便失禁分开来看，因为急迫可能与肛门括约肌破坏(anal sphincter disruption)以外的医学问题有关。

该研究的重点将放在肛门失禁患者身上，其定义是至少4岁已能控制的个体中，大便或气体在至少1个月的持续时间内不受控制的通过肛门。

药物治疗：

1. 大便失禁的保守治疗方案包括填充剂和生物回馈(biofeedback)。药物治疗的目标是减少大便次数和改善大便稠度。通过简单的保守措施，通常可以改善轻度失禁(mild incontinence)。对于罕见且低容量粪便的患者而言，填充剂是有帮助的，因为成形的粪便比液体粪便更容易控制。另外，对于软便或液体粪便失禁的患者来说，通过摄入填充剂来限制流体以使粪便固定成形可能是有用的治疗方法。

2. 生物回馈是一种安全、微创技术，其使用听觉或视觉回馈来重新培养骨盆底肌肉组织。尽管已经使用了许多不同的疗法，但是一些研究表明通过生物回馈治疗显著改善了大便失禁。其他包括最近的Cochrane评论显示生物回馈没有提供治疗益处的明确证据。最常用的技术是直肠敏感性训练(rectal sensitivity training)以及肛门括约肌力量训练(anal sphincter strength training)。

3. 生物回馈需要一些直肠感觉和自动收缩括约肌的能力，这似乎对神经源性(neurogenic)和特发性(idiopathic)肛门失禁以及与肛门括约肌破坏有关的尿失禁有效，但最近的Cochrane评论未显示出确定的治疗益处，且生物回馈的结果也会随着时间的推移而减少。

手术治疗:

1. 注射用有机硅已被证明是有效的。在一项对82名患有严重大便失禁和肛门内括约肌功能障碍引起的肛门静息压低(low anal resting pressure)的患者研究中,患者被随机分配到A组(n=42)或B组(n=40),在A组的括约肌间隙和肛门内括约肌内通过肛门内超音波引导注射硅胶(B组也注射硅胶但未通过超音波引导)。结果显示,追踪12个月,两组患者的大便失禁均有显著改善,但在超音波引导下的A组注有更大程度改善,且没有发生严重的并发症。但临床上有病例显示若外注射物持续存在,有时可能造成穿孔或局部黏膜溃烂的病例。

2. 碳包覆微珠(carbon-coated microbeads)的结果不太有希望。在一项对33名患者进行的初步研究中,可通过黏膜下注射碳包覆微珠以增加肛门压力改善了轻微的大便失禁,但没有显著改善生活质量。注射胶原蛋白的试验更加有限。

3. Solesta[®](Oceana Therapeutics, Inc.)是一种填充剂,由玻尿酸稳定的葡萄聚糖(dextranomer)组成,2011年被FDA批准用于治疗其他保守治疗失败的患者的被动性大便失禁(passive fecal incontinence)在欧洲和加拿大,它被称为NASHA Dx或Zuidex[®]。葡萄聚糖/玻尿酸是一种可用于肛门黏膜下注射的生物兼容性填充剂。将四次1 ml注射剂施予于肛管高压区近端部分的深层黏膜下层,在齿状线(dentate line)上方约5mm处。如果在至少4周后效果不显著,则可以第二次重复治疗。通过扩张肛门组织,使近端肛管变窄,从而防止粪便泄漏。葡萄聚糖/玻尿酸注射剂可以在门诊中给药而无需麻醉。

最近的研究显示,超过一半的患者在6个月时粪便失禁发作次数减少了约50%,且效果持续长达3年。此外,患者在使用葡萄聚糖/玻尿酸注射剂后,大便失禁生活质量量表(fecal incontinence quality of life scale)的大多数领域从基线(baseline)有显著改善。保守治疗失败后比较葡萄聚糖/玻尿酸注射剂和荐神经刺激(sacral nerve stimulation)的3年成本效益模型显示,葡萄聚糖/玻尿酸注射剂具有成本效益,比荐神经刺激更有效地用于治疗大便失禁。

4. 2005年,Secca[®]治疗大便失禁的程序包括:最终治疗或短期方案。肛门内括约肌射频(radiofrequency, RF)能量的应用。理论上,RF引起的肛门

内括约肌损伤应理想地导致胶原沉积(collagen deposition)和纤维化(fibrosis)并可能收紧受影响的区域。临床上是利用纤维化产生缩小肛门口的效果,其缺点是困难重复治疗至完全复原,病人必须忍受较长时间的痛苦。

肌生成抑制素(myostatin)的基因序列与转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)家族其他成员高度相似。肌生成抑制素的基因结构包括有三部分:(1)作为蛋白质分泌释放信号的N端疏水结构域;(2)高度保守的蛋白质切割位置RXRR;以及(3)富含半胱氨酸(cysteine)的C端活性结构域。许多研究报告指出,脊椎动物中肌生成抑制素的氨基酸序列在C端活性结构域具有高度的保守性。现有研究提出对肌生成抑制素具有高特异性的单株抗体JA16(Whittemore *et al.*, 2003, *Biochemical and Biophysical Research Communications*300:965-971),通过分析肌生成抑制素的结合位置,发现结合位置位在小鼠肌生成抑制素C端15个氨基酸DFGLDCDEHSTESRC,从而可知C端结构域为抗原片段(antigenic fragment)。

然而,目前施予肌生成抑制素的抗体皆会产生全身性的反应,如Camporez等人于2016年的文献指出,局部注射抗肌生成抑制素抗体后,使年老的小鼠全身性的肌肉增长,进而使全身重量增加。此外,针对肌生成抑制剂ACE-031(myostatin inhibitor)于2010年的临床试验结果显示虽可用于增加全身肌肉及加强肌肉力量,但受试者分别出现自发性出血(spontaneous bleeding)、流鼻血(nosebleeds)、皮肤微血管扩张(small expansion of blood vessels in skins)或头痛(headaches)等副作用,因此该临床试验不得不因负面现象(negative phenomena)而于2011年中止试验;尤其抗体会引起受体免疫系统的全身性作用,诸如过敏反应、寒颤、腹泻、恶心呕吐、皮肤瘙痒等症状。此外,如H.N. Peiris于2012年的文献[*Placenta* 33(2012)902-907]指出,在“双重肌肉”基因型(double-muscling)的牛种中,产犊(calving)和生育(fertility)都存在困难;然而在myostatin基因缺乏的小鼠(Mstn^{-/-})却是可生育的(fertile);由此推测,肌肉生长抑制素可能与妊娠期促成胎盘及其功能有关。

中国台湾发明专利I540968揭露含有肌肉倍增片段与绿脓杆菌外毒素区域Ia片段融合形成多肽片段或抗体,其中绿脓杆菌外毒素片段的目的在于有效增强诱导免疫反应;然而,就所属领域技术人员所知,绿脓杆菌在细菌生

产过程中可能会产生内涵体(inclusion body), 因此萃取片段或抗体时需要额外添加尿素(urea)去破坏细胞而导致尿素残留, 以及重新折迭(refolding)片段而可能影响蛋白质功能; 更重要的是, 该篇专利所揭露的效果仍是全身性的反应, 因此, 现有技术的肌生成抑制素抗体仍有改善的空间。

另外, 目前研究显示, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)分泌的肠外蛋白(enterotoxin)可被分为 A、B、C1、C2、D、E 和 F 等几种类型, 其中金黄色葡萄球菌肠毒素(*Staphylococcal enterotoxin*)SEA、SEB、SEC1 及 SEC2)的肠毒素蛋白分子量都相近似且在结构上有较高的类似性, 故皆会引起全身性的免疫反应并具有相同的临床症状, 如发烧、血压升高等较大的副作用。

发明内容

为了克服现有技术的缺点, 本发明的目的在于提供一种组合物, 以达成改善括约肌闭锁不全的效果。

本发明关于一种改善括约肌闭锁不全的组合物, 其由一基质(matrix)添加物以及一重组蛋白所组成, 其中该重组蛋白包含一第一多肽以及一第二多肽, 其中该第一多肽如SEQ ID NO: 8所示具有相似度至少90%以上的序列, 该第二多肽, 其包含如SEQ ID NO: 14所示序列1至10个重复单元(repeat units)。

较佳的, 所述的基质添加物具有生物兼容性(biocompatibility)或生物可分解性(biodegradable)。

更佳的, 所述的基质添加物包含, 但不限于蛋白质、多醣(polysaccharide)、醣蛋白(glycoprotein)或其任意组合; 其中, 蛋白质包含, 但不限于胶原蛋白(collagen)或明胶(gelatin); 多醣包含, 但不限于几丁质(chitosan)、琼脂(agar)或糖胺聚醣(glycosaminoglycan)。

更佳的, 所述的糖胺聚醣包含, 但不限于硫酸软骨素、硫酸皮肤素(dermatan sulfate)、硫酸角质素(keratan sulfate)、肝素(heparin)、硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)或玻尿酸(hyaluronic acid)。

更佳的, 所述的糖胺聚醣为玻尿酸。

其中, 该重组蛋白可被上述的基质添加物(例如: 玻尿酸)包裹(enclosed)或包覆(coated), 而封入(enclosure)形成一聚合物(polymer)或球状物

(globular)。在括约肌施予部位中，玻尿酸除了能作为维持括约肌原有形状的填充物外、玻尿酸也能保持一特定量的药物及使得药物能缓慢释放于施予部位并发挥药效。

较佳的，所述的第二多肽为纵列重复单元(tandem repeated units)的线性排列重复抗原(linear array epitope, LAE)，其中该第二多肽为如SEQ ID NO: 14所示序列1至10个重复单元。

较佳的，所述的第一多肽在SEQ ID NO: 8所示序列中包括四个胺基酸位点突变。

更佳的，所述的四个胺基酸位点突变对应于如SEQ ID NO: 8所示序列的位点7、9、13及105的位置。

更佳的，所述的四个胺基酸位点突变对应于位点7具有T或L、位点9具有G或E、位点13具有Y或V及位点105具有H或Y。

较佳的，所述的第一多肽选自由如SEQ ID NO: 4、5、6、7、8、9、10、11及12所示序列所组成的群组。

在另一个态样中，所述的重组蛋白更包含一连接符，其介于该第一多肽以及该第二多肽之间；其中该重组蛋白的序列如SEQ ID NO: 17所示。

在另一个态样中，所述的重组蛋白自N端至C端排列顺序包括，但不限于，一个第一多肽与一个第二多肽、一个第一多肽与多个第二多肽、一个第二多肽与一个第一多肽、或多个第二多肽与一个第一多肽。

在一个较佳的制备例中，该第一多肽与该第二多肽可选自以下例示：

第一多肽		第二多肽
金黄色葡萄球菌肠毒素的多肽		肌生成抑制素C端的抗原决定位多肽
SEA	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次
SEB	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次
SEC1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次
SEC2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次
SEC2m	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次

SED	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次
SEE	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次
SEG	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次
SEH	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 14, 重复次1至10次

本发明另关于一种改善括约肌闭锁不全的组合物，其由一基质(matrix)添加物以及一重组蛋白所组成，其中所述的重组蛋白包含一金黄色葡萄球菌肠毒素多肽以及一肌生成抑制素多肽。

较佳的，所述的金黄色葡萄球菌肠毒素的多肽选自于由金黄色葡萄球菌肠毒素A、B、C1、C2、D、E、F、G及H所组成的群组。

SEC2具有27 kDa的分子量，含有239个胺基酸。甫经转录的SEC2为266个胺基酸的蛋白质，分子量计为30 kDa；于丙氨酸27处切断SEC2多肽可产生成熟毒素，其含有239个胺基酸，分子量计为27 kDa。通过N端多肽定序可确定SEC2中的讯息多肽切割位置并确认成熟毒素的N端，藉此可证明SEC2能够有效地增强所引发的免疫反应。更佳的，所述的金黄色葡萄球菌肠毒素C2序列的多肽序列与SEQ ID NO: 8中所示序列具有至少90%以上的序列一致性，举例而言，对应于SEQ ID NO: 8所示序列中选自由位点7具有T或L、位点9具有G或E、位点13具有Y或V及位点105具有H或Y所组成的群组。

较佳的，所述的肌生成抑制素多肽包含，但不限于生长分化因子8 (growth differentiation factor 8, GDF8)、滤泡抑素(follistatin)或第二型活化素受体(activin receptor type-2B, ACTR-IIIB)。

更佳的，所述的肌生成抑制素多肽包含，但不限于生长分化因子8如SEQ ID NO: 13所示序列、滤泡抑素如SEQ ID NO: 15所示序列或第二型活化素受体如SEQ ID NO: 16所示序列。

较佳的，所述的肌生成抑制素的抗原决定位多肽为纵列重复单元(tandem repeated units)的线性排列重复抗原(linear array epitope, LAE)。

本发明所述的组合物具有缓慢释放的效果，可施予于括约肌周围，以改善括约肌闭锁不全的情形。

本发明更关于一种用于改善括约肌闭锁不全的医药组成物，其包含如上

所述的组合物以及一药学上可接受的载剂。

在本文中，所述的“药学上可接受的载剂”包含，但不限于水、醇 (alcohols)、甘醇 (glycol)、碳氢化合物 (hydrocarbons) [诸如石油胶 (petroleum jelly) 以及白凡士林 (white petrolatum)]、蜡 (wax) [诸如石蜡 (paraffin) 以及黄蜡 (yellow wax)]、保存剂 (preserving agents)、抗氧化剂 (antioxidants)、溶剂 (solvent)、乳化剂 (emulsifier)、悬浮剂 (suspending agent)、分解剂 (decomposer)、黏结剂 (binding agent)、赋形剂 (excipient)、安定剂 (stabilizing agent)、螯合剂 (chelating agent)、稀释剂 (diluent)、胶凝剂 (gelling agent)、防腐剂 (preservative)、润滑剂 (lubricant)、吸收增强剂 (absorption enhancers)、活性剂 (active agents)、保湿剂 (humectants)、气味吸收剂 (odor absorbers)、香料 (fragrances)、pH调整剂 (pH adjusting agents)、闭塞剂 (occlusive agents)、软化剂 (emollients)、增稠剂 (thickeners)、助溶剂 (solubilizing agents)、渗透增强剂 (penetration enhancers)、抗刺激剂 (anti-irritants)、着色剂 (colorants)、推进剂 (propellants)、表面活性剂 (surfactant)、佐剂 (adjuvant) 及其他类似或适用本发明的载剂。

在本文中，所述的“佐剂”包括，但不限于明矾沉淀、弗朗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant)、弗朗氏不完全佐剂 (Freund's incomplete adjuvant) 或单磷氧基-脂质A/海藻糖 (monophosphoryl-lipid A/trehalose dicorynomycolate) 佐剂。

较佳的，所述的医药组成物的剂型包含，但不限于注射剂、胶凝剂 (gelling agent)、填充剂或缝线。

本发明关于一种改善括约肌闭锁不全的用途，其将如上所述的组合物用于制造改善括约肌闭锁不全的药物，其将药物以有效剂量施予受体括约肌以达成改善括约肌闭锁不全的效果。

较佳的，所述的用途用于制造适用于幽门括约肌闭锁不全、贲门括约肌闭锁不全、回盲括约肌闭锁不全、口轮匝肌闭锁不全、阴道括约肌闭锁不全、尿道括约肌闭锁不全或肛门括约肌闭锁不全的药物。

在本发明的一个较佳实施例中，通过使用上述组合物或医药组成物以达成改善括约肌闭锁不全的效果，包括给予肌生成抑制素片段与SEC2的融合蛋

白，从而获得抗肌生成抑制素的特异性免疫细胞。本发明的免疫细胞可以由肌生成抑制素片段的抗原决定位引入其他动物中，并经过纯化或通过将免疫细胞或其抗原决定位加上基质添加物(诸如几丁质)引入哺乳动物体内，以使哺乳动物的局部能够改善括约肌闭锁不全。在本发明中，上述的免疫细胞可为多株B淋巴球或T细胞殖株；较佳的是，上述免疫细胞是调节型T细胞。

在本文中，用语“括约肌”是指动物体内管腔壁的一种环形肌肉，常见于消化道和泌尿系统，其包括，但不限于幽门括约肌(pyloric sphincter)、贲门括约肌(cardiac sphincter)、回盲括约肌(ileocecal sphincter)、口轮匝肌(musculus orbicularis oris)、阴道括约肌(vaginal sphincter)、尿道括约肌(urethral sphincter)或肛门括约肌(anal sphincter)。

在本文中，用语“括约肌闭锁不全”是指括约肌失去神经支配，无收缩功能，处于弛缓状态。

在本文中，用语“改善括约肌闭锁不全”是指减少括约肌萎缩、促进括约肌增长、括约肌恢复或维持括约肌。依据本案实施例所例示，是指通过施予特定浓度范围量的重组蛋白溶液与基质添加物能够促进肌纤维细胞生长速率以及肌纤维细胞分化，藉以达成减少括约肌萎缩、促进括约肌增长、括约肌恢复或维持括约肌的功效。

在本文中，用语“抗原决定位(epitope)”是指能够引发免疫反应以产生蛋白质抗原中的抗原的片段，其可以通过结构预测或通过选择蛋白片段来观察免疫动物的免疫反应。

在本文中，用语“有效剂量”指在剂量上及对于所需要的时间而言达成促进括约肌增长、减少括约肌萎缩、括约肌恢复或维持括约肌有效的量。

在本文中，用语“生物兼容性”指含有基质添加物的组合物或医药组成物接触受体后，组合物或医药组成物不会释放有毒物质，也不会造成局部或全身性细胞毒性、致癌性及生殖毒性，更不会引起发炎反应、免疫反应、毒性反应、血栓形成反应等危害。

在本文中，用语“生物可分解性”指含有基质添加物的组合物或医药组成物植入受体后，历经一段时间即会在受体内分解，且不会引起排斥现象。

由于该抗原决定位是小型多肽片段，如果以该小型多肽片段在动物中直接进行免疫，则免疫反应可能未尽理想。较佳的是，建构含有纵列重复单元

的线性排列重复抗原(LAE)，以改善免疫反应。此外，可以使用细菌毒素来帮助抗原的传递，通过使用消除毒素活性的毒素作为运输系统，从而以毒素的性质来加强整体免疫效果。在一态样中，本发明的肌生成抑制素C端的抗原定位的线性排列重复抗原与金黄色葡萄球菌肠毒素C2 (SEC2)融合。

一种宿主细胞包含该上述核酸是可被生产的。实施例包括大肠杆菌、昆虫细胞、植物细胞、酵母菌细胞及哺乳动物细胞。该核酸分子可以用于表达本说明书所述的多肽或融合蛋白，操作上可将该核酸分子连接至合适的载体的多种限制酶酶切位(multiple cloning site, MCS)以产生所述的多肽或融合蛋白。

载体实施例包含一质体。该载体较佳的是包括启动子、增强子、多种限制酶酶切位等，核酸分子连接至合适的载体的多种限制酶酶切位后，该表达载体可以被导入该宿主细胞以产生本说明书所述的多肽或融合蛋白。该宿主细胞包括，但不限于大肠杆菌、百日咳杆菌、芽孢杆菌、非洲绿猴肾脏细胞、嗜血杆菌、真菌或酵母。

上述组合物或医药组成物适用的受体是脊椎动物。较佳的，脊椎动物是人、猪、牛、羊、犬、家禽或水禽等动物。由于肌生成抑制素已获选殖，且其氨基酸序列具有高度的保守性，因此可假定上述脊椎动物的肌生成抑制素具有相同的功能；更佳的，上述脊椎动物是人、猪、牛、羊或犬。

当本案所述的重组蛋白与基质添加物所形成的组合物或医药组成物施予受体局部括约肌部位，可通过组合物或医药组成物中的重组蛋白促进局部括约肌增长、减少括约肌萎缩，并通过组合物或医药组成物中的基质添加物达到填充萎缩空间，并促进括约肌恢复或维持括约肌的功效，进以使本发明所述的组合物及医药组成物达成改善括约肌闭锁不全的效果。

附图说明

图1A为本发明以小鼠肌纤维细胞C2C12加入不同浓度几丁质的细胞生长曲线图。

图1B为本发明以小鼠肌纤维细胞C2C12加入不同浓度明胶的细胞生长曲线图。

图1C为本发明以小鼠肌纤维细胞C2C12加入不同浓度胶原蛋白的细胞生长曲线图。

图2A为本发明以不同浓度的JF101 (3 ng/ml、10 ng/ml、30 ng/ml、100 ng/ml)及AICAR(0.5 mM)处理已分化C2C12老鼠肌纤维细胞的电泳图。

图2B为本发明的图2A电泳图的量化柱状图。

图3为本发明以小鼠肌纤维细胞C2C12加入单独基质添加物(几丁质)或基质添加物(几丁质)与重组蛋白溶液(JF101)混合液的细胞生长曲线图。

图4为本发明以小鼠肌纤维细胞C2C12加入控制组、单独基质添加物(几丁质)、或基质添加物(几丁质)与重组蛋白溶液(JF101)混合液的细胞图,其中显微镜的放大倍率是40倍。

具体实施方式

为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

制备例 制备重组蛋白

对照组和实验组共使用8周龄的10只小鼠,实验时间为28天。本制备例所采用的融合蛋白是采用大肠杆菌(*E. coli*)的pET表现系统表现的载体;较佳的,选用pET-28a。其中第一多肽「SEC2m」所示是金黄色葡萄球菌肠毒素C2具有点突变(point mutation),核酸序列如SEQ ID NO: 1所示、蛋白质序列如SEQ ID NO: 8所示(突变点于位点7具有L、位点9具有E、位点13具有V及位点105具有Y);第二多肽「Myo epitope」所示则为肌生成抑制素的抗原决定位,其为肌生成抑制素C端15个氨基酸(如序列SEQ ID NO: 14所示;该序列具有高度的保守性,因此多个物种皆具有此序列)具有6个重复片段,其单一片段的核酸序列如SEQ ID NO: 2所示。位于pET载体多种限制酶酵素切位(multiple cloning site, MCS)内的基因序列从N端依序为「SEC2m」、连接符(linker)与「Myo epitope」,如序列SEQ ID NO: 3所示。

建立35 L发酵培养程序以在50 L发酵罐中培养含有SEQ ID NO: 3所示

的 pET 载体的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株。4 管 5 ml 菌株在 37°C 下用 LB / 氨苄青霉素 (Ampicillin) 培养基培养过夜，各菌株分别接种到 0.2 公升的 LB / 氨苄青霉素培养基中，共 1 公升，于 37°C 持续摇动培养至 OD600 为 0.3。其后加入至 35 μ l 培养基中进行培养，并以每两小时取样测定 OD600 为以监测生长曲线的变化，并根据生长曲线进一步选择合适的时间点，加入最终浓度为 0.1 mM 的异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导大肠杆菌以高度表现融合蛋白，于 37°C 持续摇动培养 3 小时，离心回收菌株。通过 SDS-PAGE 电泳和西方墨点法测定融合蛋白的表现，以确定最佳 35 L 发酵条件。大致上，是将大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达的融合多肽在细胞裂解后，进行该融合多肽的萃取与分离，最终获得一重组蛋白(如 SEQ ID NO: 17 所示)；由于该表现蛋白的萃取与分离属公知技术，在此不再赘述。

实施例 1 基质添加物对肌纤维母细胞的影响

以不同浓度几丁质、胶原蛋白与明胶以灭菌后的生理食盐水分别配制成不同浓度(1000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml 以及 1 ng/ml)的基质添加物溶液。将不同浓度的基质添加物溶液分别制成总体积为 2500 μ l 的混合溶液并滴在 6 孔盘中，于 -20°C 冰箱冷冻一晚后，放进冻干机冷冻干燥 18 小时以分别形成生物多孔结构，其中以不含基质的生理食盐水做为控制组。将小鼠肌纤维细胞 C2C12 以 1×10^4 cells 分别加入 well 中，每 24 小时以染料排除试验(dye exclusion assay)方式计算细胞数目。

dye exclusion assay 步骤如下：

利用胰蛋白酶(trypsin)将细胞自培养盘(dish)中分离，加入含 FBS 的培养液中和 trypsin，离心除去上清液。再加入 PBS 清除杂质，混匀后离心。重新加入 PBS，混合均匀。取 100 μ l 细胞悬浮液与 0.4% w/v、100 μ l 台盼蓝(trypan blue)等体积混合均匀形成混合液。将少许混合液(约 15 μ l)加入血球计数盘或是自动粒子计数器(coulter counter)容室(chamber)上方凹槽，盖上盖玻片，于 100 倍倒立显微镜下观察，其中活细胞因细胞膜完整，染料无法渗入而不会被染色，死细胞则为蓝色。chamber 上方盖上盖玻片后，每个大正方形的体积为 $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ ml}$ 。使用时，计数每个大正方形内的细胞数目，乘以稀释倍数，再乘以 10^4 ，即为每 ml 中的细胞数目。

如图 1A 所示, 当基质添加物是几丁质时, 不同浓度的几丁质组别和控制组相比, 细胞生长速率并无差异; 如图 1B 所示, 当基质添加物是明胶时, 不同浓度的明胶组别和控制组相比, 细胞生长速率并无差异; 如图 1C 所示, 当基质添加物是胶原蛋白时, 不同浓度的胶原蛋白组别和控制组相比, 细胞生长速率并无差异。总言之, 基质添加物无论是几丁质、胶原蛋白或是明胶皆不影响细胞生长, 也不影响细胞生长速率。

实施例 2 重组蛋白诱导肌纤维细胞代谢 (metabolism)

将小鼠肌纤维细胞 (C2C12 myotubes) 培养于含 10% 胎牛血清 (FBS)、100 unit/ml penicillan G、100 μ g/ml streptomycin 的 10 cm 培养皿中, 并置于 37°C 恒温且含 5% CO₂ 的细胞培养箱中, 待细胞长至八九分满时, 进行继代培养。首先, 将细胞培养液抽干, 以 PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂PHO₄、2 mM KH₂PO₄ 于一公升 distilled H₂O 中, pH 7.4) 冲洗一遍后, 加入 1 ml trypsin-EDTA 作用 3 分钟, 将细胞自培养皿切下, 再以 10 ml 含有 FBS 的 DMEM 培养基终止反应, 收集细胞液至 15 ml 离心管, 以 3000 rpm 离心 5 分钟, 移除上清液, 加入 1 ml 含有 FBS 的 DMEM 培养基均匀混合, 取 150 μ l 加入含有 10 ml 培养基的 10 cm 培养皿中; 剩余细胞液则培养新的 6-well 培养盘, 每个 well 加入 2 ml 培养液及 15 μ l 细胞, 放入 5% CO₂、37°C 培养箱培养至细胞长满后, 移除培养液, 并以 PBS 清洗一次, 加入 2 ml 含 2% 的马血清 (HRS)、100 unit/ml penicillan G、100 μ g/ml streptomycin 的 DMEM 培养液诱导细胞分化, 每两天换一次培养液。当细胞分化为肌小管细胞时, 换上新的含 2% HRS 的 DMEM 培养液后开始进行实验。

将不同浓度 (3 ng/ml、10 ng/ml、30 ng/ml、100 ng/ml) 的重组蛋白溶液 (以下简称 JF101), 分别加入 6-well 培养盘中分化的 C2C12 细胞, 24 小时后, 取细胞并以西方墨点法分析细胞活性。其中以等体积 PBS 溶液做为控制组, 并以浓度为 0.5 mM 的 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸 (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, AICAR) 做为对照组, 其中 AICAR 是一种 AMP-activated protein kinase (AMPK) 活化剂。

西方墨点法: 吸除 6-well 培养盘中的培养液并以 PBS 冲洗三次, 以减缓细胞本身的生理作用, 每孔加入 30 μ l lysis buffer (50 mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、100 μ M PMSF、1% NP-40、0.1% SDS、0.5% DOS)

作用 1 分钟，用刮棒将细胞刮下并收集至 1.5 ml 微量离心管中，置于冰上作用 30 分钟，以 13000 rpm 于 4℃ 离心 30 分钟，收集上清液，即蛋白质萃取液。

蛋白质定量：准备 10 个 1.5 ml 微量离心管，将 protein assay dye (购自于 Bio-Rad) 经去离子水以 5 倍稀释后，以 Whatman No. 1 滤纸过滤，取 1 μ l 加入各个 1.5 ml 微量离心管中，分别加入 2 μ l、4 μ l、8 μ l 的 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA) 做成 4 mg/ml、8 mg/ml、16 mg/ml 标准溶液(standard) 与各个蛋白质样品 1 μ l，经 vortex 震荡于 595 nm 测定吸光值，对照 blank，计算标准曲线(standard curve)，进一步推算各样品相同含量所需体积，于 95℃ 下作用 5 分钟，保存在 -20℃。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)：利用 6%~10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后将胶体转渍至聚偏二氟乙烯膜(PVDF，购自 GE Healthcare, Fairfield, CT) 上。转渍条件 300 mA、120 分钟，转渍结束后将 PVDF 膜放至含 5% 脱脂牛奶的一倍 TBST 中清洗 1 小时，随后以一倍 TBST 清洗 15 分钟三次，加入初级抗体(1: 1000) 35 rpm 隔夜，隔天将 PVDF 用一倍 TBST 清洗 15 分钟三次，加入二级抗体(rabbit or mouse; 1: 2000) 一小时，结束后以一倍 TBST 清洗 15 分钟三次，随即利用 ECL(enhanced chemiluminescence) plus detection kit (购自 Amersham Life Sciences, Piscataway, NJ) 作用，再用 high performance chemiluminescence film 底片(购自 GE healthcare Limited, UK) 感光呈像。

如图 2A 及图 2B 所示，本发明所述的重组蛋白溶液(JF101) 相较于控制组皆能活化肌纤维细胞代谢，且重组蛋白溶液(JF101) 相较于 AICAR(对照组) 能够更有效率活化已分化的肌肉细胞，其中重组蛋白溶液(JF101) 又以浓度为 30 ng/ml、100 ng/ml 活化肌纤维细胞代谢的效果较为明显。

实施例 3 重组蛋白诱导肌纤维细胞增殖(proliferation)

将 100 ng/ml 几丁质与 100 ng/ml 重组蛋白溶液(JF101) 以灭菌后的生理食盐水配制成总体积为 2500 μ l 的混合溶液并分别滴在 6 孔盘中，于 -20℃ 冰箱冷冻一晚后，放进冻干机冷冻干燥 18 小时，形成生物可分解性多孔结构。另以 100 ng/ml 几丁质做为控制组。将小鼠肌纤维细胞 C2C12 以 1×10^4 cells 分别加入 well 中，每 24 小时以 dye exclusion assay 方式计算细胞数目。

如图 3 所示，控制组(单独施予几丁质) 并不影响小鼠肌纤维细胞生长，

但当几丁质(基质添加物)与重组蛋白溶液(JF101)混合后可以促进小鼠肌纤维细胞生长速率。

实施例 4 重组蛋白诱导肌纤维细胞分化(differentiation)

将 100 ng/ml 几丁质与 100 ng/ml 重组蛋白溶液(JF101)以灭菌后的生理食盐水配制成总体积为 2500 μ l 的混合溶液并分别滴在 6 孔盘中,于-20℃冰箱冷冻一晚后,放进冻干机冷冻干燥 18 小时,形成生物可分解性多孔结构。另以胎马血清做为正控制组并以单独 100 ng/ml 几丁质作为对照组。将小鼠肌纤维细胞 C2C12 以 1×10^4 cells 分别加入 well 中,每 24 小时观察细胞分化情形。

如图 4 所示,对照组(单独施予几丁质)并不影响小鼠肌纤维细胞分化,但当几丁质(基质添加物)与重组蛋白溶液(JF101)混合后所形成的组合物,相较于控制组可以促进小鼠肌纤维细胞分化。

权利要求书

1、一种改善括约肌闭锁不全的组合物，其特征在于，其由一基质(matrix)添加物以及一重组蛋白所组成，其中该重组蛋白包含一第一多肽以及一第二多肽，其中该第一多肽如SEQ ID NO: 8所示具有相似度至少90%以上的序列，该第二多肽，其包含如SEQ ID NO: 14所示序列1至10个重复单元(repeat units)。

2、如权利要求1所述的组合物，其特征在于，其中该基质添加物包含蛋白质、多糖(polysaccharide)、糖蛋白(glycoprotein)或其任意组合。

3、如权利要求2所述的组合物，其特征在于，其中该蛋白质包含胶原蛋白(collagen)或明胶(gelatin)。

4、如权利要求2所述的组合物，其特征在于，其中该多糖包含几丁质(chitosan)、琼脂(agar)或糖胺聚糖(glycosaminoglycan)。

5、如权利要求4所述的组合物，其特征在于，其中该糖胺聚糖包含硫酸软骨素、硫酸皮肤素(dermatan sulfate)、硫酸角质素(keratan sulfate)、肝素(heparin)、硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)或玻尿酸(hyaluronic acid)。

6、如权利要求1所述的组合物，其特征在于，其中该第二多肽为纵列重复单元(tandem repeated units)的线性排列重复抗原(linear array epitope, LAE)，其中该第二多肽为如SEQ ID NO: 14所示序列1至10个重复单元。

7、如权利要求1所述的组合物，其特征在于，其中该第一多肽在如SEQ ID NO: 8所示序列中包括四个胺基酸位点突变，对应于如SEQ ID NO: 8所示序列的位点7、9、13及105的位置。

8、如权利要求7所述的组合物，其特征在于，其中该四个胺基酸位点突变对应于位点7具有T或L、位点9具有G或E、位点13具有Y或V及位点105具有H或Y。

9、如权利要求1所述的组合物，其特征在于，其中该第一多肽选自由如SEQ ID NO: 4、5、6、7、8、9、10、11及12所示序列所组成的群组。

10、如权利要求1至9中任一项所述的组合物，其特征在于，其中，该重组蛋白更包含：

一连接符，其介于该第一多肽以及该第二多肽之间；其中该重组蛋白的

序列如SEQ ID NO: 17所示。

11、一种改善括约肌闭锁不全的医药组成物，其特征在于，其包含如权利要求1至10中任一项所述的组合物以及一药学上可接受的载剂。

12、如权利要求11所述的医药组成物，其特征在于，其中医药组成物的剂型包含注射剂、胶凝剂、填充剂或缝线。

13、一种如权利要求1至10中任一项所述的组合物用于制造改善括约肌闭锁不全的药物的用途。

14、如权利要求13所述的用途，其特征在于，其用于制造适用于幽门括约肌闭锁不全、贲门括约肌闭锁不全、回盲括约肌闭锁不全、口轮匝肌闭锁不全、阴道括约肌闭锁不全、尿道括约肌闭锁不全或肛门括约肌闭锁不全的药物。

15、一种改善括约肌闭锁不全的组合物，其特征在于，其由一基质添加物以及一重组蛋白所组成，其中该重组蛋白包含一金黄色葡萄球菌肠毒素多肽以及一肌生成抑制多肽。

16、如权利要求15所述的组合物，其特征在于，其中该基质添加物包含蛋白质、多醣、醣蛋白或其任意组合。

17、如权利要求16所述的组合物，其特征在于，其中该蛋白质包含胶原蛋白或明胶。

18、如权利要求16所述的组合物，其特征在于，其中该多醣包含几丁质、琼脂或糖胺聚醣。

19、如权利要求18所述的组合物，其特征在于，其中该糖胺聚醣包含硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸乙酰肝素或玻尿酸。

20、如权利要求15所述的组合物，其特征在于，其中该肌生成抑制多肽包含生长分化因子8 (growth differentiation factor 8, GDF8)、滤泡抑素 (follistatin) 或第二型活化素受体 (activin receptor type-2B, ACTR-IIIB)。

21、如权利要求15所述的组合物，其特征在于，其中该金黄色葡萄球菌肠毒素多肽选自于由金黄色葡萄球菌肠毒素A、B、C1、C2、D、E、F、G及H所组成的群组

22、一种改善括约肌闭锁不全的医药组成物，其特征在于，其包含如权利要求15至21中任一项所述的组合物以及一药学上可接受的载剂。

23、如权利要求22所述的医药组成物，其特征在于，其中该医药组成物的剂型包含注射剂、胶凝剂、填充剂或缝线。

24、一种如权利要求15至21中任一项所述的组合物用于制造改善括约肌闭锁不全的药物的用途。

25、如权利要求24所述的用途，其特征在于，其用于制造适用于幽门括约肌闭锁不全、贲门括约肌闭锁不全、回盲括约肌闭锁不全、口轮匝肌闭锁不全、阴道括约肌闭锁不全、尿道括约肌闭锁不全或肛门括约肌闭锁不全的药物。

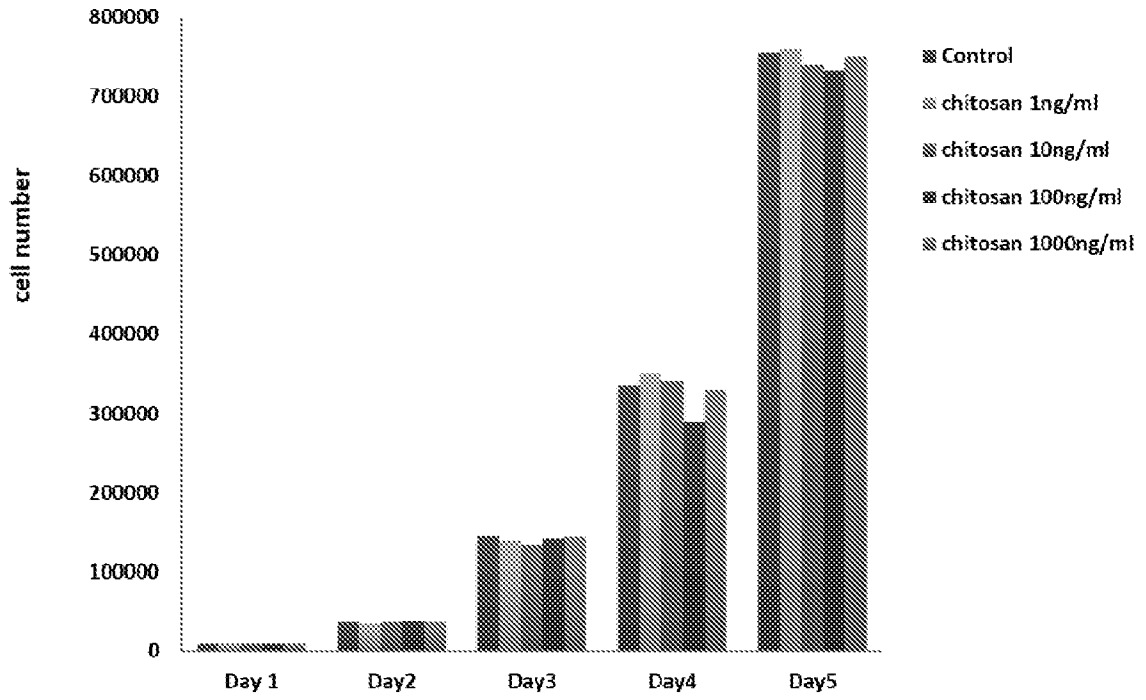


图 1A

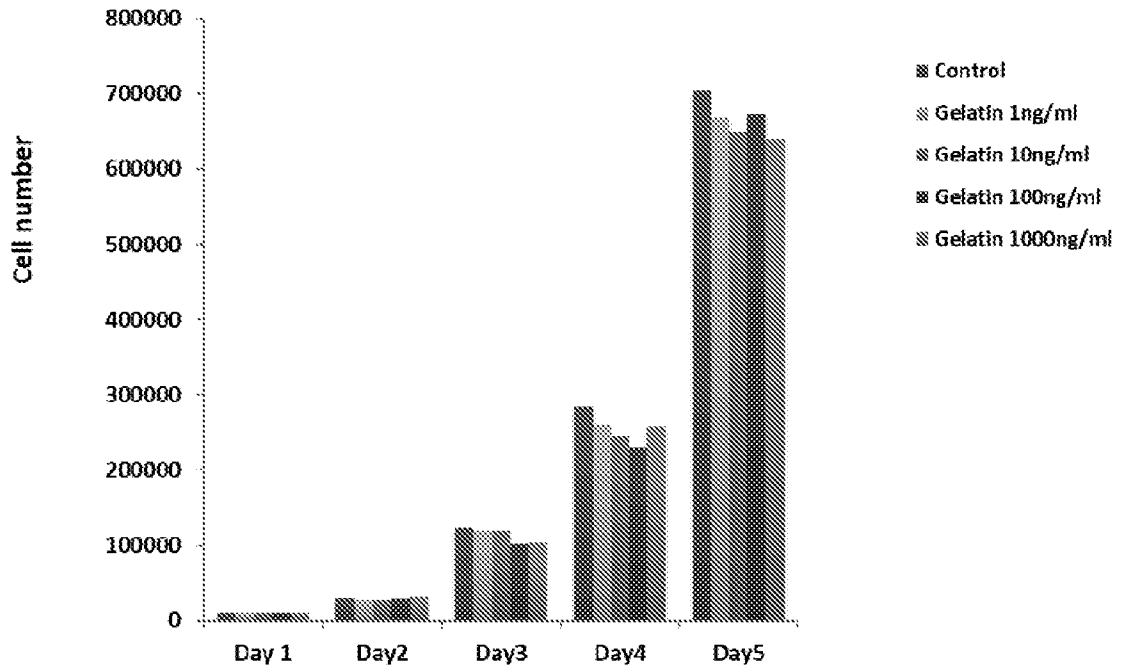


图 1B

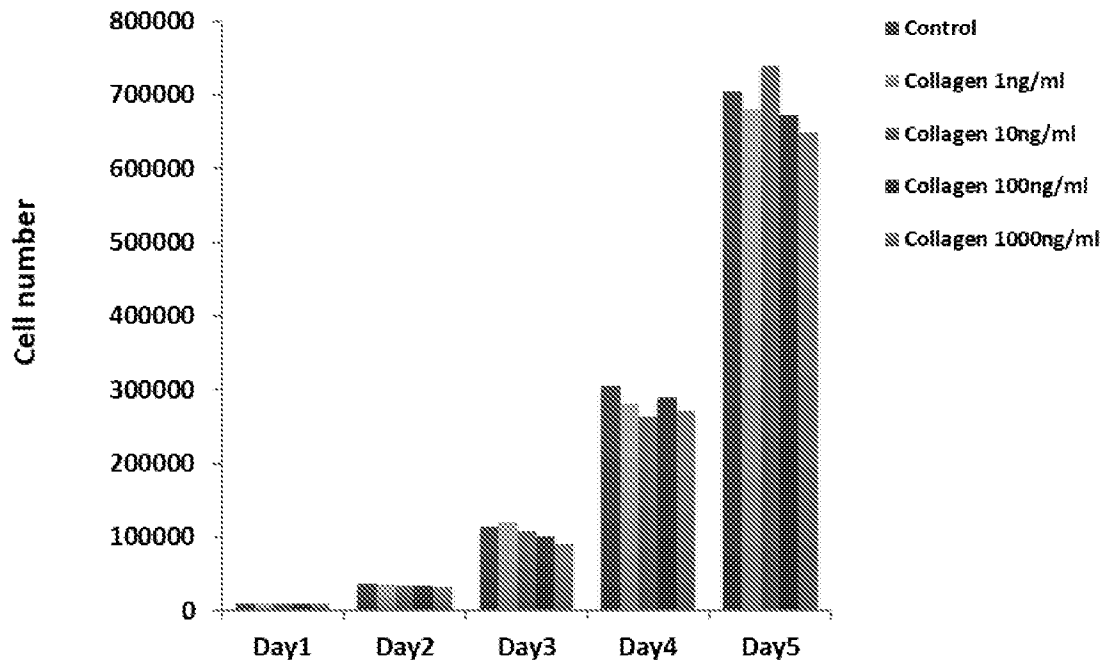


图 1C

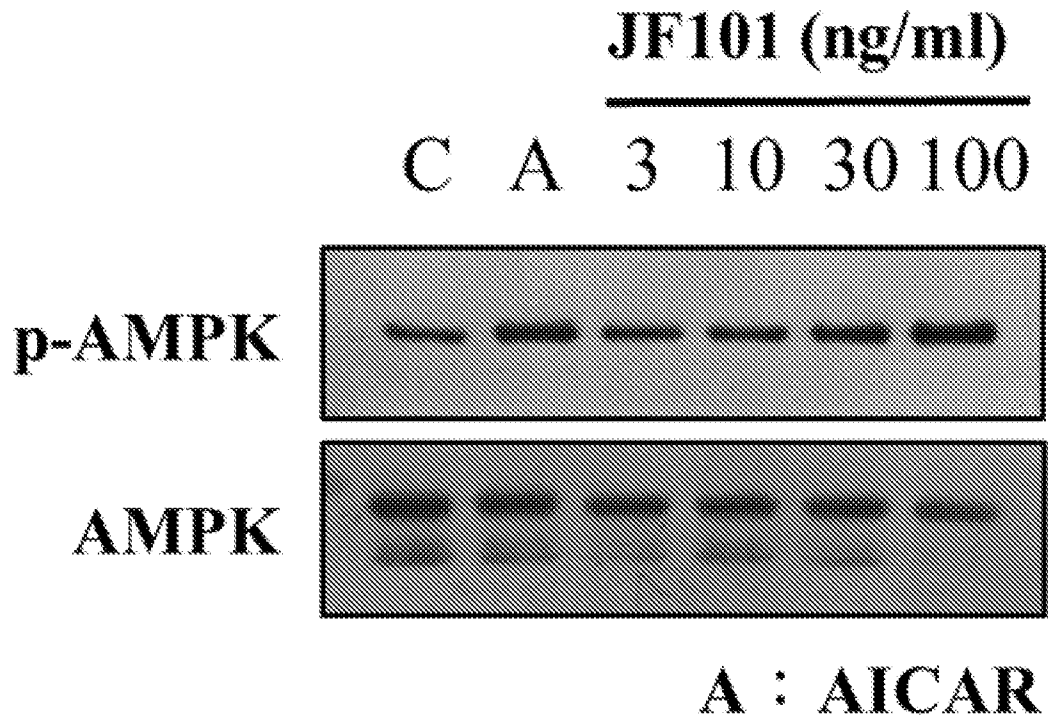


图 2A

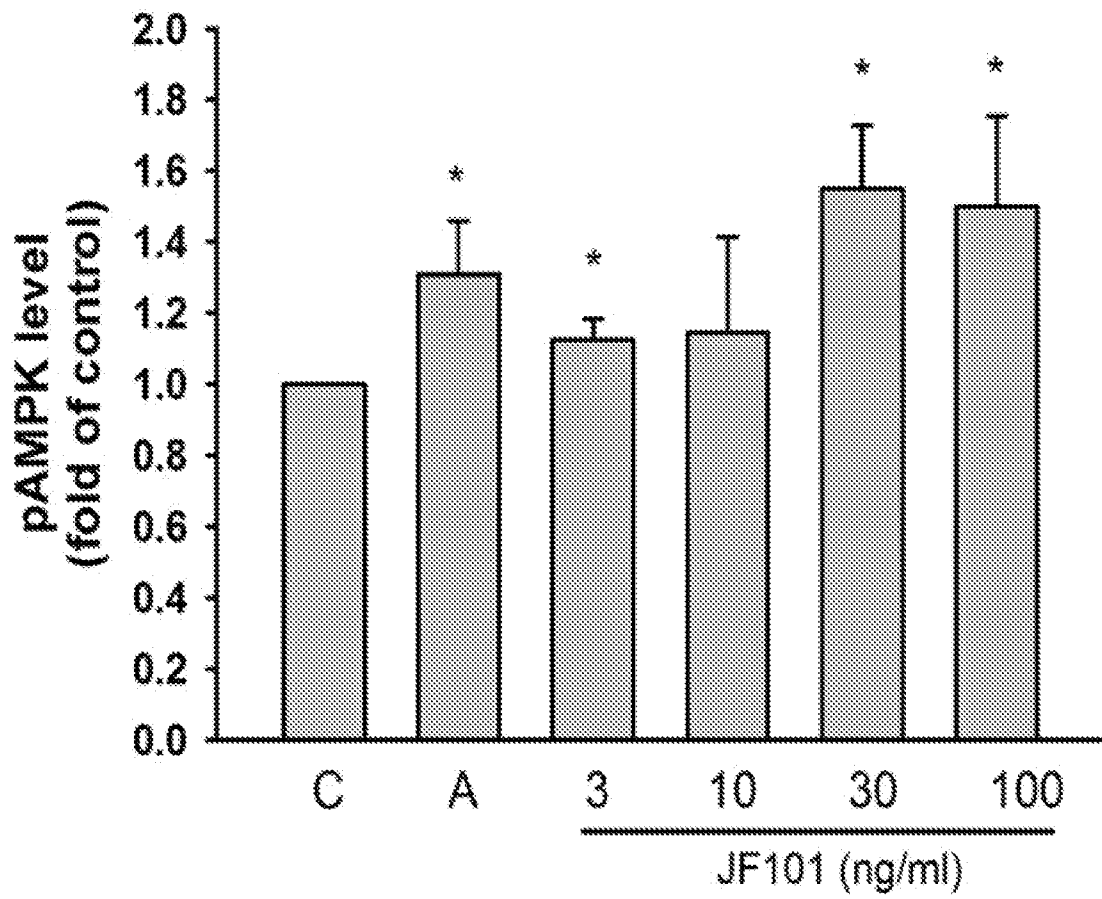
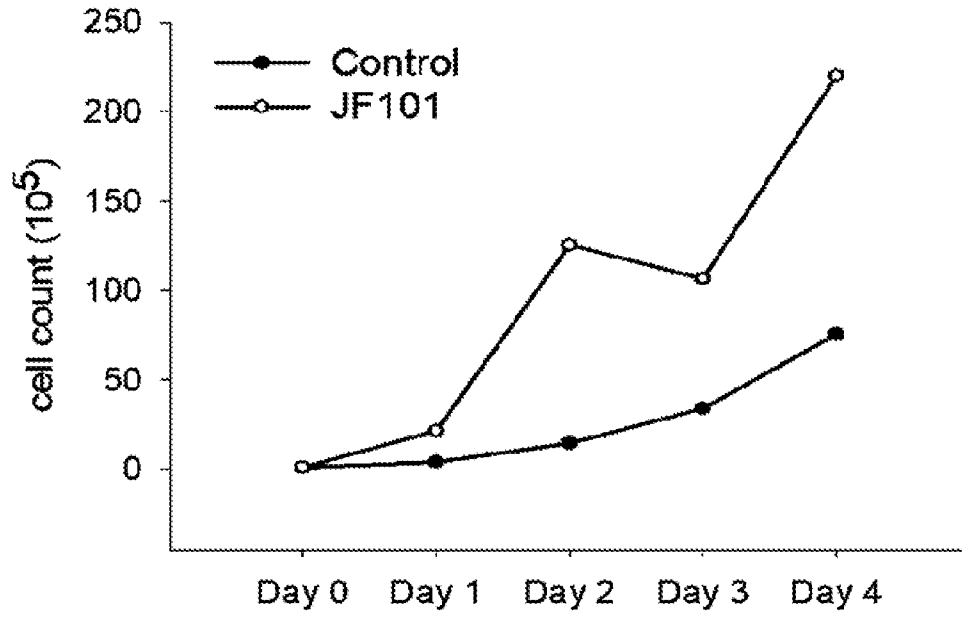


图 2B



Control	10000	40000	145000	340000	755000
JF101	10000	215000	1255000	1065000	2200000

图 3

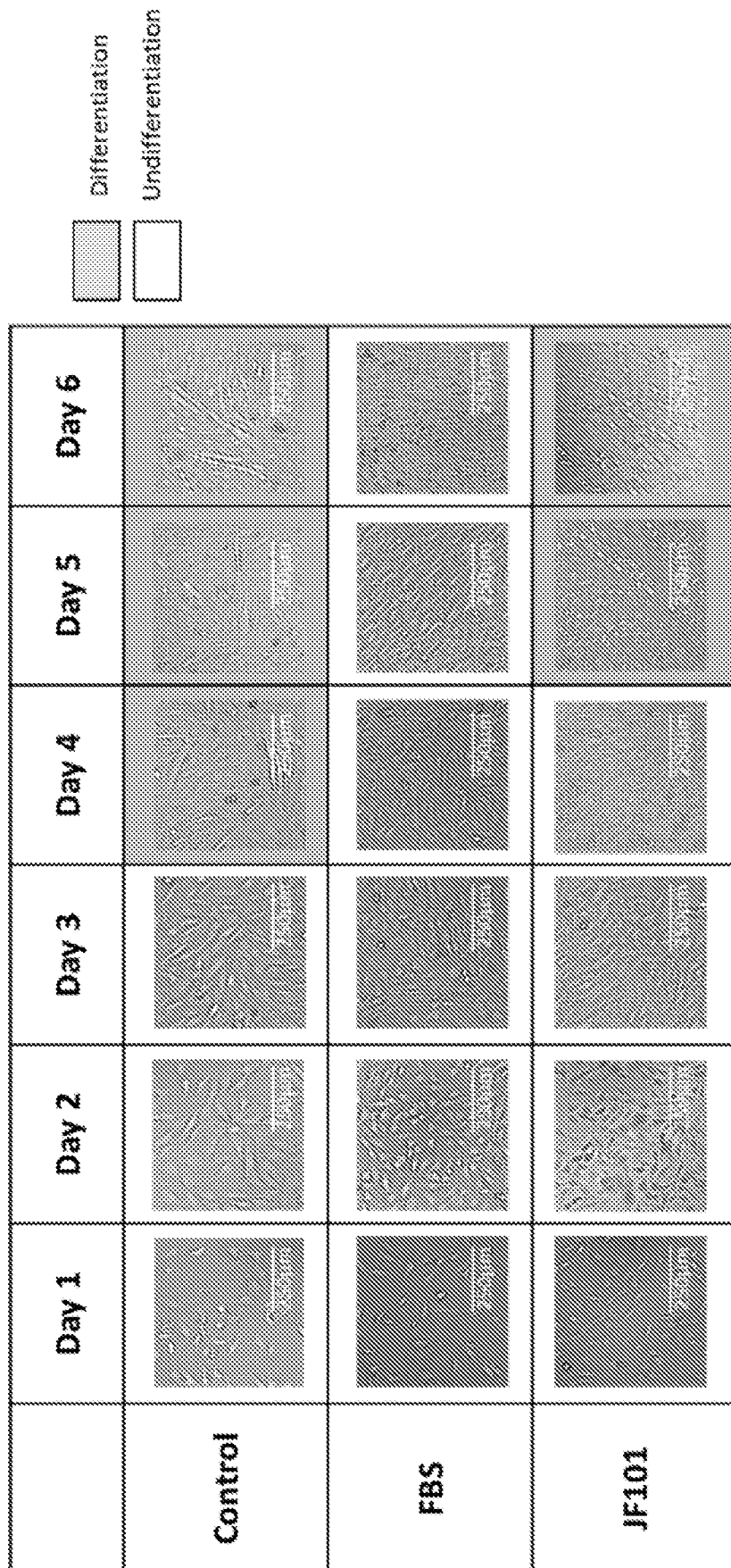


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/078293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/495(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS; CPRSABS; CJFD; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge; Patents; Genbank, EBI-EMBL, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System; 傅惠芳, 詹勋锦, 洪诚孝, 詹勳錦, 肠毒素, 肠毒素, 金黄色葡萄球菌肠毒素, 肌生成抑制素, 肌肉倍增蛋白, 括约肌, 失禁, 肌肉, 载体, 递送, 偶联, 缀合, enterotoxin, Staphylococcal enterotoxin, SEA, SEB, SEC1, SEC2, sphincter, incontinence, myostatin, DFGLDCDEHSTESR		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	TW 649332 A (VICTORIA BIOMEDICAL HOLDINGS CO., LTD.) 01 February 2019 (2019-02-01) entire document	1-25
Y	CN 102741276 A (COVITA LTD.) 17 October 2012 (2012-10-17) claims 1-12	1-25
Y	CN 102793079 A (CHEN, ZONGYUE) 28 November 2012 (2012-11-28) description, paragraphs [0020]-[0025]	1-25
Y	TW I540968 B (NATIONAL CHENG KUNG UNIVERSITY) 11 July 2016 (2016-07-11) description, p. 11, paragraphs 1 and 2	1-25
Y	CN 104066447 A (BIOVEN 3 LTD. ET AL.) 24 September 2014 (2014-09-24) description, paragraph [0079]	1-25
Y	CN 102633867 A (INSTITUTE OF APPLIED ECOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 15 August 2012 (2012-08-15) claims 1 and 7	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 May 2019		17 June 2019
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/078293

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102088995 A (AGRICULTURE VICTORIA SERV PTY ET AL.) 08 June 2011 (2011-06-08) entire document	1-25
A	CN 101597612 A (INSTITUTE OF APPLIED ECOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 December 2009 (2009-12-09) entire document	1-25
A	CN 102060916 A (SHENYANG XIEHE BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 18 May 2011 (2011-05-18) entire document	1-25
A	EP 2738257 A1 (AMGEN INC.) 04 June 2014 (2014-06-04) entire document	1-25
A	王丽婵等 (WANG, Lichan et al.). "SEA为载体蛋白的A/C群脑膜炎奈瑟菌结合物初步免疫效果评价 (Non-official translation: Evaluation of Preliminary Immune Effect of A/C Group of Neisseria Meningitidis Conjugates with SEA as Carrier Protein)" <i>微生物学免疫学进展 (Progress in Microbiology and Immunology)</i> , Vol. 45, No. (02), 30 April 2017 (2017-04-30), pp. 29-34	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/078293

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
TW	649332	A	01 February 2019	None			
CN	102741276	A	17 October 2012	EP	2483300	A4	27 February 2013
				KR	20120082909	A	24 July 2012
				MX	2012003924	A	03 August 2012
				AU	2010301196	A1	17 May 2012
				NZ	599604	A	25 July 2014
				US	2013065820	A1	14 March 2013
				JP	2013506660	A	28 February 2013
				CA	2776529	A1	07 April 2011
				WO	2011040823	A1	07 April 2011
				EP	2483300	A1	08 August 2012
CN	102793079	A	28 November 2012	AU	2012202999	B2	15 August 2013
				JP	5939888	B2	22 June 2016
				AU	2012202999	A1	13 December 2012
				US	2012301534	A1	29 November 2012
				JP	2012244994	A	13 December 2012
				US	9089150	B2	28 July 2015
TW	I540968	B	11 July 2016	TW	I540968	B	11 July 2016
				TW	201247107	A	01 December 2012
TW	I540968	B	11 July 2016	TW	201247107	A	01 December 2012
CN	104066447	A	24 September 2014	AU	2012342117	A8	03 July 2014
				CN	108864291	A	23 November 2018
				US	2018162917	A1	14 June 2018
				RU	2650574	C2	17 April 2018
				AU	2012342117	B2	31 August 2017
				JP	2017137339	A	10 August 2017
				WO	2013076580	A2	30 May 2013
				BR	112014012460	A2	06 June 2017
				AU	2017268634	A1	21 December 2017
				WO	2013076580	A3	22 August 2013
				CN	108864261	A	23 November 2018
				EP	2782598	A2	01 October 2014
				AU	2012342117	A1	30 May 2013
				KR	20140108235	A	05 September 2014
				MX	2014006232	A	10 February 2015
				RU	2014124923	A	27 December 2015
				RU	2018108421	A	25 February 2019
				IL	232645	D0	30 June 2014
				JP	6121436	B2	26 April 2017
				CA	2856255	A1	30 May 2013
				JP	2014534258	A	18 December 2014
				US	2016207972	A1	21 July 2016
				US	9902760	B2	27 February 2018
				MX	354902	B	23 March 2018
				US	2014248302	A1	04 September 2014
CN	102633867	A	15 August 2012	None			
CN	102088995	A	08 June 2011	EP	2303311	A1	06 April 2011
				RU	2519645	C2	20 June 2014
				ZA	201009003	B	25 April 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/078293

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 9119818 B2	01 September 2015
		MX 2010012437 A	01 June 2011
		WO 2009137880 A1	19 November 2009
		RU 2010150931 A	20 June 2012
		EP 2303311 A4	05 October 2011
		KR 20110036536 A	07 April 2011
		JP 5646459 B2	24 December 2014
		CA 2723987 A1	19 November 2009
		US 2011151016 A1	23 June 2011
		US 2018000908 A1	04 January 2018
		AU 2009246053 B2	24 July 2014
		IL 209285 A	30 April 2015
		JP 2011519961 A	14 July 2011
		EP 2303311 B1	01 August 2018
		IL 209285 D0	31 January 2011
		US 2016015791 A1	21 January 2016
		NZ 589308 A	30 November 2012
		KR 101760758 B1	24 July 2017
		AU 2009246053 A1	19 November 2009
		US 9789168 B2	17 October 2017
		CN 102088995 B	20 January 2016
CN 101597612 A	09 December 2009	CN 101597612 B	11 May 2011
CN 102060916 A	18 May 2011	None	
EP 2738257 A1	04 June 2014	WO 2008153745 A2	18 December 2008
		WO 2008153745 A3	16 July 2009
		US 2013217625 A1	22 August 2013
		AU 2008262490 A1	18 December 2008
		US 8420779 B2	16 April 2013
		JP 5591691 B2	17 September 2014
		JP 2014064575 A	17 April 2014
		AU 2008262490 B2	17 November 2011
		MX 2009012609 A	07 December 2009
		US 2009118181 A1	07 May 2009
		CA 2687141 C	01 April 2014
		EP 2162540 A2	17 March 2010
		CA 2840407 A1	18 December 2008
		US 2013209466 A1	15 August 2013
		JP 2010527607 A	19 August 2010
		CA 2687141 A1	18 December 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/078293

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 14/495(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61P 21/00(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>C07K; A61K; A61P</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>CNABS; CPRSABS; CJFD; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge; Patents; Genbank, EBI-EMBL, 中国专利生物序列检索系统: 傅惠芳, 詹勋锦, 洪诚孝, 詹勤锦, 肠毒素, 肠毒素, 金黄色葡萄球菌肠毒素, 肌生成抑制素, 肌肉倍增蛋白, 括约肌, 失禁, 肌肉, 载体, 递送, 偶联, 缀合, enterotoxin, Staphylococcal enterotoxin, SEA, SEB, SEC1, SEC2, sphincter, incontinence, myostatin, DFGLDCDEHSTESR</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>TW 649332 A (英属安圭拉商维多利亚生物医学控股有限公司) 2019年 2月 1日 (2019 - 02 - 01) 全文</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102741276 A (可维塔有限公司) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 权利要求1-12</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102793079 A (陈宗岳) 2012年 11月 28日 (2012 - 11 - 28) 说明书第[0020]-[0025]段</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>TW I540968 B (国立成功大学) 2016年 7月 11日 (2016 - 07 - 11) 说明书第11页第1-2段</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104066447 A (拜奥文斯瑞有限公司等) 2014年 9月 24日 (2014 - 09 - 24) 说明书第[0079]段</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102633867 A (中国科学院沈阳应用生态研究所) 2012年 8月 15日 (2012 - 08 - 15) 权利要求1, 7</td> <td>1-25</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文件的具体类型:</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	TW 649332 A (英属安圭拉商维多利亚生物医学控股有限公司) 2019年 2月 1日 (2019 - 02 - 01) 全文	1-25	Y	CN 102741276 A (可维塔有限公司) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 权利要求1-12	1-25	Y	CN 102793079 A (陈宗岳) 2012年 11月 28日 (2012 - 11 - 28) 说明书第[0020]-[0025]段	1-25	Y	TW I540968 B (国立成功大学) 2016年 7月 11日 (2016 - 07 - 11) 说明书第11页第1-2段	1-25	Y	CN 104066447 A (拜奥文斯瑞有限公司等) 2014年 9月 24日 (2014 - 09 - 24) 说明书第[0079]段	1-25	Y	CN 102633867 A (中国科学院沈阳应用生态研究所) 2012年 8月 15日 (2012 - 08 - 15) 权利要求1, 7	1-25	* 引用文件的具体类型:	“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	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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	“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)	“&” 同族专利的文件	“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	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																																	
PX	TW 649332 A (英属安圭拉商维多利亚生物医学控股有限公司) 2019年 2月 1日 (2019 - 02 - 01) 全文	1-25																																	
Y	CN 102741276 A (可维塔有限公司) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 权利要求1-12	1-25																																	
Y	CN 102793079 A (陈宗岳) 2012年 11月 28日 (2012 - 11 - 28) 说明书第[0020]-[0025]段	1-25																																	
Y	TW I540968 B (国立成功大学) 2016年 7月 11日 (2016 - 07 - 11) 说明书第11页第1-2段	1-25																																	
Y	CN 104066447 A (拜奥文斯瑞有限公司等) 2014年 9月 24日 (2014 - 09 - 24) 说明书第[0079]段	1-25																																	
Y	CN 102633867 A (中国科学院沈阳应用生态研究所) 2012年 8月 15日 (2012 - 08 - 15) 权利要求1, 7	1-25																																	
* 引用文件的具体类型:	“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																																		
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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																																		
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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																																		
“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)	“&” 同族专利的文件																																		
“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																																			
国际检索实际完成的日期	2019年 5月 17日	国际检索报告邮寄日期	2019年 6月 17日																																
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员	陈莹																																
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(010)-53961975																																	

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	CN 102088995 A (维多利亚农业服务控股公司等) 2011年 6月 8日 (2011 - 06 - 08) 全文	1-25
A	CN 101597612 A (中国科学院沈阳应用生态研究所) 2009年 12月 9日 (2009 - 12 - 09) 全文	1-25
A	CN 102060916 A (沈阳协合生物制药股份有限公司) 2011年 5月 18日 (2011 - 05 - 18) 全文	1-25
A	EP 2738257 A1 (AMGEN INC.) 2014年 6月 4日 (2014 - 06 - 04) 全文	1-25
A	王丽婵等. "SEA为载体蛋白的A/C群脑膜炎奈瑟菌结合物初步免疫效果评价" 微生物学免疫学进展, 第45卷, 第02期, 2017年 4月 30日 (2017 - 04 - 30), 第29-34页	1-25

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/078293

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)
TW	649332	A	2019年 2月 1日	无			
CN	102741276	A	2012年 10月 17日	EP	2483300	A4	2013年 2月 27日
				KR	20120082909	A	2012年 7月 24日
				MX	2012003924	A	2012年 8月 3日
				AU	2010301196	A1	2012年 5月 17日
				NZ	599604	A	2014年 7月 25日
				US	2013065820	A1	2013年 3月 14日
				JP	2013506660	A	2013年 2月 28日
				CA	2776529	A1	2011年 4月 7日
				WO	2011040823	A1	2011年 4月 7日
				EP	2483300	A1	2012年 8月 8日
CN	102793079	A	2012年 11月 28日	AU	2012202999	B2	2013年 8月 15日
				JP	5939888	B2	2016年 6月 22日
				AU	2012202999	A1	2012年 12月 13日
				US	2012301534	A1	2012年 11月 29日
				JP	2012244994	A	2012年 12月 13日
				US	9089150	B2	2015年 7月 28日
TW	I540968	B	2016年 7月 11日	TW	I540968	B	2016年 7月 11日
				TW	201247107	A	2012年 12月 1日
TW	I540968	B	2016年 7月 11日	TW	201247107	A	2012年 12月 1日
CN	104066447	A	2014年 9月 24日	AU	2012342117	A8	2014年 7月 3日
				CN	108864291	A	2018年 11月 23日
				US	2018162917	A1	2018年 6月 14日
				RU	2650574	C2	2018年 4月 17日
				AU	2012342117	B2	2017年 8月 31日
				JP	2017137339	A	2017年 8月 10日
				WO	2013076580	A2	2013年 5月 30日
				BR	112014012460	A2	2017年 6月 6日
				AU	2017268634	A1	2017年 12月 21日
				WO	2013076580	A3	2013年 8月 22日
				CN	108864261	A	2018年 11月 23日
				EP	2782598	A2	2014年 10月 1日
				AU	2012342117	A1	2013年 5月 30日
				KR	20140108235	A	2014年 9月 5日
				MX	2014006232	A	2015年 2月 10日
				RU	2014124923	A	2015年 12月 27日
				RU	2018108421	A	2019年 2月 25日
				IL	232645	D0	2014年 6月 30日
				JP	6121436	B2	2017年 4月 26日
				CA	2856255	A1	2013年 5月 30日
				JP	2014534258	A	2014年 12月 18日
				US	2016207972	A1	2016年 7月 21日
				US	9902760	B2	2018年 2月 27日
				MX	354902	B	2018年 3月 23日
				US	2014248302	A1	2014年 9月 4日
CN	102633867	A	2012年 8月 15日	无			
CN	102088995	A	2011年 6月 8日	EP	2303311	A1	2011年 4月 6日
				RU	2519645	C2	2014年 6月 20日
				ZA	201009003	B	2012年 4月 25日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/078293

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)
		US 9119818 B2	2015年 9月 1日
		MX 2010012437 A	2011年 6月 1日
		WO 2009137880 A1	2009年 11月 19日
		RU 2010150931 A	2012年 6月 20日
		EP 2303311 A4	2011年 10月 5日
		KR 20110036536 A	2011年 4月 7日
		JP 5646459 B2	2014年 12月 24日
		CA 2723987 A1	2009年 11月 19日
		US 2011151016 A1	2011年 6月 23日
		US 2018000908 A1	2018年 1月 4日
		AU 2009246053 B2	2014年 7月 24日
		IL 209285 A	2015年 4月 30日
		JP 2011519961 A	2011年 7月 14日
		EP 2303311 B1	2018年 8月 1日
		IL 209285 D0	2011年 1月 31日
		US 2016015791 A1	2016年 1月 21日
		NZ 589308 A	2012年 11月 30日
		KR 101760758 B1	2017年 7月 24日
		AU 2009246053 A1	2009年 11月 19日
		US 9789168 B2	2017年 10月 17日
		CN 102088995 B	2016年 1月 20日
CN 101597612 A	2009年 12月 9日	CN 101597612 B	2011年 5月 11日
CN 102060916 A	2011年 5月 18日	无	
EP 2738257 A1	2014年 6月 4日	WO 2008153745 A2	2008年 12月 18日
		WO 2008153745 A3	2009年 7月 16日
		US 2013217625 A1	2013年 8月 22日
		AU 2008262490 A1	2008年 12月 18日
		US 8420779 B2	2013年 4月 16日
		JP 5591691 B2	2014年 9月 17日
		JP 2014064575 A	2014年 4月 17日
		AU 2008262490 B2	2011年 11月 17日
		MX 2009012609 A	2009年 12月 7日
		US 2009118181 A1	2009年 5月 7日
		CA 2687141 C	2014年 4月 1日
		EP 2162540 A2	2010年 3月 17日
		CA 2840407 A1	2008年 12月 18日
		US 2013209466 A1	2013年 8月 15日
		JP 2010527607 A	2010年 8月 19日
		CA 2687141 A1	2008年 12月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)