

(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
2007年8月16日 (16.08.2007)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2007/090317 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/63 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C07K 14/475 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2006/000646
- (22) 国际申请日: 2006年4月11日 (11.04.2006)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200610003108.1
2006年2月10日 (10.02.2006) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 台湾尖端先进生技医药股份有限公司(TAIWAN ADVANCED

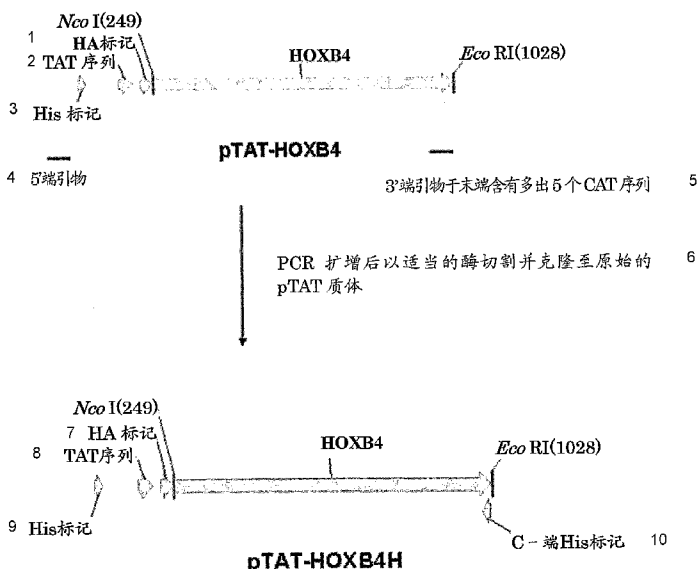
BIO-PHARM INC.) [CN/CN]; 中国台湾省台北县汐止市康宁街169巷25号12楼, Taiwan (CN)。

- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 吴国瑞(WU, Kou-juey) [CN/CN]; 中国台湾省台北市北投区石碑路二段343巷7号3楼, Taiwan (CN)。
- (74) 代理人: 北京中博世达专利商标代理有限公司(BEIJING ZBSD PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.); 中国北京市海淀区大柳树路17号富海大厦B座501室, Beijing 100081 (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,

[见续页]

(54) Title: A METHOD FOR THE PRODUCTION OF THE RECOMBINANT HOXB4 PROTEIN CONTAINING HIS TAG AT C-TERMINAL AND USE THEREOF

(54) 发明名称: C - 端含有组氨酸标记的HOXB4重组蛋白质的制造方法及用途



- 1 HA TAG
- 2 TAT SEQUENCE
- 3 HIS TAG
- 4 5'-END PRIME
- 5 3'-END PRIME CONTAINING ADDITIONAL 5 CAT SEQUENCE AT THE END
- 6 CLEAVED WITH THE APPROPRIATE ENZYME AND CLONED INTO THE ORIGINAL PTAT PLASMID AFTER PCR AMPLICATION
- 7 HA TAG
- 8 TAT SEQUENCE
- 9 HIS TAG
- 10 C-END HIS TAG

(57) Abstract: A method of producing modified recombinant HOXB4 protein containing His tag at C-terminal (i.e., TAT-HOXB4H), wherein the TAT-HOXB4 has more than 6 histidine tag at C-terminal. The method comprises creating the DNA construct that contain the fragment encoding at least 6 His tag at the C-terminal in the open reading frame of HOXB4; transforming the resulting construct into the host cell to express the recombinant HOXB4 protein containing 6 His tag at the C-terminal; and purifying the recombinant protein from the host cells' lysate. In particularly, a construct for production of recombinant HOXB4H protein could increase the efficiency of the protein's purification up to 3 to 5 folds, after the recombinant protein had been produced in the host cells (e.g., E. coli.). The method of using the resulting recombinant TAT-HOXB4H protein for in vitro expansion of the stem cells and composition thereof.

[见续页]

WO 2007/090317 A1



KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

- (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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS,

根据细则4.17的声明:

- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(57) 摘要:

本发明关于一种经改良的C-端含有组氨酸标记的HOXB4重组蛋白质(即, TAT-HOXB4H)的制造方法, 其中该TAT-HOXB4H于C-端含有6个或其以上组氨酸标记。该方法包含构筑得其中于HOXB4开放读框的C端含有至少6个组氨酸编码片段的DNA构建体; 将所得构建体转形至宿主细胞中表现该C-端含有至少6个组氨酸标记的HOXB4重组蛋白; 以及自该宿主细胞溶解产物纯化该重组蛋白质。更特别地, 关于构筑一种用于生产TAT-HOXB4H重组蛋白质的构建体, 该重组蛋白于宿主细胞(例如大肠杆菌)产生后, 可增加蛋白纯化效率达三至五倍。本发明也关于使用所制造得的TAT-HOXB4H重组蛋白质于活体外干细胞增生的方法及组合物。

C-端含有组氨酸标记的HOXB4重组蛋白质的制造方法及用途

技术领域

本发明关于通过构筑一种用于制造C-端含有组氨酸标记的HOXB4重组蛋白质(TAT-HOXB4H)的DNA构建体,而提高该重组蛋白纯化效率的方法,其中该TAT-HOXB4H于C-端含有6个或其以上组氨酸标记。本发明还进一步关于使用所制造得的TAT-HOXB4H重组蛋白质于活体外干细胞增生的方法及组合物。

背景技术

脐带血(umbilical cord blood; UCB)是指在婴儿出生时,于脐带及胎盘内所存留的血。脐带血中富含“零岁”的原始干细胞,其功用与骨髓相当,是人体制造血液及免疫系统的主要来源。脐带血的干细胞又称为全能细胞,因为它类似胚胎一般,是“年轻”而较未分化的细胞,可以发展成不同型态的细胞或组织,可用于治疗癌症、血液疾病,甚至先天代谢疾病等。脐带血干细胞的数量和品质都比其他干细胞优良,因为脐带血中的造血干细胞以及母细胞的浓度比骨髓内的多10-20倍,它的增生能力也比较高。再者,由于脐带血造血干细胞比较不成熟(primitive; immature),它的T细胞辨识“自我”与“非我(non-self)”的能力就比骨髓或周边血的成熟造血干细胞要差,因此可以减少移植物抗宿主疾病(graft versus host disease; GVHD)及排斥反应(rejection)的发生,还可以增加少数族群移植的机会。此外,脐带血干细胞配对的要求比较低,非亲属间的骨髓移植,会要求六个白血球抗原(HLA)都符合,脐带血干细胞移植只要五个甚至四个抗原相同就可以移植。

脐带血干细胞采集数量有限,对于婴孩童时期使用尚可,但如果用于成人,则可能会稍有不足。加拿大蒙特利尔大学(University of Montreal)的盖·萨瓦格(Guy Sauvageau)博士曾经探讨骨髓中干细胞数目受限制的现象,他的研究显示同位序列基因(homeobox gene) *HOXB4*对于造血干细胞自我更新的调控十分重要,可维持它在骨髓中的群集大小。最早证明*HOX*基因会在血球细胞表现,是利用人类及老鼠的细胞株(cell line)而证实的。有些*HOX*基因在不同的细胞形态有明显广泛的表现,有些*HOX*基因则只活化表现于特定细胞中。例如,人类的*HOXB*串群中的八个成员会在红血球细胞发育初表现,有些*HOXB*基因包

括 *HOXB4* 及 *HOXB7* 也会在 T 细胞及 B 细胞表现。Sauvageau 等人证实有九个 *HOXA* 基因、八个 *HOXB* 基因及四个 *HOXC* 基因会在 CD34⁺ 骨髓细胞内表现，其中又以 *HOXB2*、*HOXB9* 及 *HOXA10* 在 CD34⁺ 的细胞族群内的红血球原始细胞表现最多。另外，实验结果也检测出在 CD34⁻ 的细胞群中，没有 *HOX* 基因或少量 *HOX* 基因表现。因此，“HOXB4” 蛋白已最常被用于做为活体外造血干细胞（HSC）增生的有效刺激剂。

已知通过遗传工程所产制的重组“HOXB4” 蛋白质，是为了使蛋白能进入细胞而在“HOXB4” 蛋白质的 N 端接上了一段 TAT 的蛋白序列，该 TAT 序列能使“HOXB4” 蛋白质进入细胞后，通过热休克蛋白 90 的协助而将“HOXB4” 蛋白质折叠成有活性的构形。而且，于其 N-端含有一段含 6 个组氨酸（His - 6）的组氨酸标记，以利进行该重组蛋白质的纯化及回收。已证实，此外源性“TAT - HOXB4” 重组蛋白能够促进造血干细胞增生达 2 - 6 倍（Amsellem, S. 等人, *Nature Medicine* 9, 1423 - 1427, 2003; 及 Krosi, J. 等人, *Nature Medicine* 9, 1428 - 1432, 2003）。然而，该 TAT - HOXB4 重组蛋白质自大肠杆菌宿主的纯化回收产率偏低，故为得到足够供干细胞增生的 TAT - HOXB4 重组蛋白质量，必须培养大量的大肠杆菌表现细胞，以及使用更繁复的纯化步骤。

于是，本发明针对欲提高 TAT - HOXB4 重组蛋白质的回收产量提出解决方案，其主要是通过构筑一种用于生产 C-端含组氨酸标记的 HOXB4（TAT - HOXB4H）重组蛋白质的构建体，其中于所表现的重组 TAT - HOXB4 蛋白 C-端另具有一段至少 6 个组氨酸残基的标记，而提高该重组蛋白纯化效率的方法。

发明内容

于一方面，本发明关于一种制备 C-端含有至少 6 个组氨酸标记的 HOXB4 重组蛋白质（TAT - HOXB4H）的方法，该方法包含构筑其中于 HOXB4 开放读框（ORF）的 C 端含有至少 6 个组氨酸编码片段的 DNA 构建体；将所得构建体转形至宿主细胞中表现该 TAT - HOXB4H 重组蛋白；以及纯化该重组蛋白质。

术语“表现载体”、“聚核苷酸载体”、“DNA 构建体”及“载体构建体”于本文中可交替使用而意指任何用于基因转殖的构建体，如熟悉本项技术的人员所了解。

术语“Histidine tag（组氨酸标记，His tag）”于本文中所指为至少 6 个的组氨酸残基。

于本发明的一项具体方式中，通过聚合酶链反应（PCR）方法扩增得其C-端引入一段含有7个组氨酸编码片段的HOXB4开放读框，并将此DNA片段克隆入适当宿主细胞中进行表现。

于另一具体方式中，以可表现TAT-HOXB4重组蛋白质的载体为模板，通过PCR方法于扩增时将一段较原始TAT-HOXB4多出5个组氨酸的编码序列导入C-端核苷酸序列中，而使最终表现得的TAT-HOXB4H重组蛋白质的C-端含有7个组氨酸标记。经此构建体转形至大肠杆菌中表现制得TAT-HOXB4H重组蛋白质，经纯化后的产量较原始TAT-HOXB4重组蛋白质高出3-5倍。

于另一方面，本发明关于一种用于增加TAT-HOXB4H重组蛋白质产量的DNA构建体，其特征在于，TAT-HOXB4开放读框的C-端已导入7个组氨酸标记。于一具体方式中，本发明的DNA构建体是质体pTAT-HOXB4H。

经本发明方法制得的TAT-HOXB4H重组蛋白质同样可用于干细胞增生。经实验证明，其可于活体外使脐带血干细胞增生达6倍，与原始TAT-HOXB4重组蛋白质相比较功效相当，表示根据本发明方法将5个组氨酸导入TAT-HOXB4重组蛋白质的C-端所制得的经改良TAT-HOXB4H重组蛋白质，不仅能增加于宿主细胞的纯化效率（及纯化后的产量），也可有效用于干细胞增生。

因此，本发明的另一方面是关于包含所制得新颖TAT-HOXB4H重组蛋白质于干细胞增生的干细胞增生培养基及其使用方法。即，一种用于干细胞增生的培养基，其包含5-100nM根据本发明的方法所制得的TAT-HOXB4H重组蛋白质，及适用于干细胞增生的细胞营养物质、细胞因子与抗生素。于本发明的一项具体方式中，该用以增生的干细胞是脐带血干细胞。于另一项具体方式中，该用以增生的干细胞是脐带血造血干细胞。

术语“干细胞”指具有增殖、自我修复及大量制造分化后代能力的细胞。干细胞具有分化或转变成其他细胞的能力，这群细胞通常来自胚胎发育初期，在适当的环境下能够转变成特定的组织与器官。

由本申请实施例的纯化及干细胞增生实验数据显示，经由本发明制法所得的TAT-HOXB4H重组蛋白质产量，较原始TAT-HOXB4重组蛋白质的纯化效率（及纯化后的产量）高出3-5倍，且具有与TAT-HOXB4重组蛋白质相当的干细胞增生促进能力。

附图说明

图1表示本发明新颖C-端含7个组氨酸标记的构建体pTAT-HOXB4H的构筑流程。

图2为pTAT-HOXB4H构建体的DNA序列(序列:4),其中划横线处以(6)表示的CAT序列代表经添加于pTAT-HOXB4H构建体中的C-端组氨酸标记编码序列。

图3表示经纯化后,本发明的TAT-HOXB4H与已知TAT-HOXB4的产量比较结果。箭头所指为TAT-HOXB4H及TAT-HOXB4的蛋白质电泳位置,显示TAT-HOXB4H较TAT-HOXB4的纯化产量增加大约4倍。

图4表示以TAT-HOXB4H(空圆形)及TAT-HOXB4(三角形)促进活体外脐带血干细胞增生的比较结果,其以CD34+细胞数量的测量值表示。对照组以BSA(牛血清白蛋白)处理(实心圆)。

具体实施方式

下列实施例用以说明本发明的技术内容即可达成的功效,但非以限制本发明。凡依本发明所作的任何均等变化及修饰,皆属本发明权利要求书所界定的范畴。

实施例1: 质体pTAT-HOXB4H的构筑

将质体pTAT-HOXB4(Nature Medicine 9, 1428-1432 (2003)),通过使用下列引物对的PCR反应进行扩增:

5'-ctccatggctatgagttcttttttg-3'(序列:1)及

5'-atgatgatgatga tgatgatggagcgcgcgg-3'(序列:2),

而得一段于该HOXB4开放读框(ORF)的C-端含有多出四个组氨酸残基的片段(参见图2)。将此经扩增得的片段再以下列引物对进行PCR反应扩增:

5'-ctccatggctatgagttcttttttg-3'(序列:1)及

5'-cagaattcctaatg atgatgatgatga-3'(序列:3),

而得一段于3'端具有一个新产生的EcoRI切位的片段。接着将此片段以限制酶NcoI与EcoRI进行切割,并亚克隆至经该二相同酶切割并回收得的原始pTAT-HOXB4质体的骨架(接至其上的NcoI与EcoRI切位),而制得新颖质体pTAT-HOXB4H。本发明中,将具有上述特征的重组pTAT-HOXB4蛋白质称为pTAT-HOXB4H。

实施例2: TAT - HOXB4H重组蛋白质与TAT - HOXB4重组蛋白质的纯化及产量比较

将pTAT - HOXB4 (或pTAT - HOXB4H) 载体转形至大肠杆菌株BL21 (DE3) pLysS (Novagen)。令经转形的细胞于37°C下生长过夜。将过夜培养物稀释成起始OD₆₀₀值 (在600nm的光密度值) 为0.05, 并置于37°C下生长至OD₆₀₀值为0.5, 接着以1mM异丙基硫代-β-D-半乳糖 (IPTG) 于37°C下进行诱导表现3小时, 期间伴随剧烈摇晃。于诱导作用后, 将细胞以离心收集并再悬浮于缓冲液A (8M尿素, 20mM HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸), 0.5mM DTT (二硫苏糖醇) 及100mM NaCl, pH8.0) 中。将细胞悬浮液通过法兰西压榨器 (French press) 挤压三次, 并将胞溶产物以20,000×g于4°C下离心30分钟使其澄清。将上清液调整至10mM咪唑并加样至HisTrap螯合管柱 (Amersham Pharmacia)。将结合的蛋白以50、100及250mM配制于缓冲液A中的咪唑进行溶析。将含有HOXB4 (或HOXB4H) 的流份加样至存在缓冲液B (4M尿素, 20mM HEPES及50mM NaCl, pH6.5) 的MonoSP管柱, 以1.5M NaCl及20mM HEPES (pH8.0) 溶析并置于PD - 10 Sephadex G - 25管柱去盐。以PBS (磷酸缓冲液) 将HOXB4 (或HOXB4H) 蛋白质从PD - 10 Sephadex G - 25管柱溶析出, 流份纯度 > 99%。将全部溶析物加入以1% BSA及10%甘油, 分装并于 - 80°C下急速冷冻。

由图3的电泳结果显示, 经本发明方法所产制的C - 端新增5个组氨酸的TAT - HOXB4H重组蛋白质, 在大肠杆菌宿主的回收产量较原始TAT - HOXB4重组蛋白质的产量增加大约3 - 5倍。通过Bradford assay分析法定量重组蛋白质的产量, 其以OD₅₉₅对BSA已知浓度做图, 并利用此标准曲线以内插法计算出样本中的蛋白质含量, 得知TAT - HOXB4H重组蛋白质的产量为5.5mg/L, 而TAT - HOXB4重组蛋白质的产量为1.2mg/L。

实施例3: TAT - HOXB4H重组蛋白质对于造血干细胞增生的能力

将人类脐带血中的红血球通过于4°C下于含有0.1%碳酸氢钠的0.83%氯化铵 (pH 7.0) 中进行溶解而去除。将经收集的白血球部份与磁珠结合的特定抗体与细胞共同培养后, 通过Stemsep管柱分离方式进行磁性细胞分离程序以收集带CD34+细胞, 并除去表现成熟人类白血球细胞的部分, 将经纯化的细胞于干细胞培养基 (DMEM, 含10% FCS (胎牛血清), 5ng/ml 白介素 - 3, 10ng/ml白介素 - 6, 100ng/ml STF (干细胞生长因子), 青霉素100单位/ml及100µg/ml链霉素) 中培养2天, 然后置于含有15nM HOXB4 (或HOXB4H) 或1% BSA的干

细胞培养基中培养4天。于培养第3天（以处理当天为第0天），将 4×10^5 细胞/毫升再悬浮于补充以BSA或HOXB4（或HOXB4H）的干细胞培养基中。然后于每3个小时添加新鲜的BSA或HOXB4（或HOXB4H）蛋白质（含50%最初蛋白质量溶于5%总培养基）。经12小时后，加入FCS与细胞因子以校正其于稀释浓度达20%的培养基中所含的正确量。经24小时后，将细胞再悬浮于含有目标蛋白质的新鲜培养基中。于处理的第0、2及4天以ISHAGE方法（CD45/CD34染色加正向与侧向散射光）计数干细胞量。

由图4的结果证明，本发明的TAT-HOXB4H重组蛋白质对于脐带血干细胞的增生可达约6倍，此效能与已知TAT-HOXB4重组蛋白质相当。表示，根据本发明所制得于C-端含有额外5个组氨酸的TAT-HOXB4H重组蛋白质，相较于原始TAT-HOXB4重组蛋白质的干细胞增生能力并无影响。

此外，将经与TAT-HOXB4H蛋白共培养增生的人类CD34⁺脐带血干细胞（每只小鼠施予5000个细胞）与 5×10^4 CD34⁻经放射线照射的辅助细胞一起注射入经放射线照射（2.5Gy）的NOD-LtSz-scid/scid（NOD-SCID）小鼠中。经移植后七周，通过流式细胞计量术分析取自该经移植动物的血液细胞中人类CD45⁺细胞的存在量。结果，相较于相同数量以BSA处理的脐带血干细胞，经本发明TAT-HOXB4H蛋白处理的干细胞能够混入NOD-SCID小鼠的骨髓内，而在该小鼠的周边小鼠白血球细胞中相当于含有0.05%至0.07%人类CD45阳性白血球细胞。表示，该经增生的干细胞仍保有多潜能性（pluripotency）。

由以上所示的产量分析及干细胞增生实验结果，证明本发明的TAT-HOXB4H重组蛋白不仅可在大肠杆菌宿主获得高纯化产率，且不影响其对干细胞增生的能力。在重组TAT-HOXB4H蛋白的制造生产方面，实为极具进步性的突破。

权利要求书

1. 一种用于制造C-端含有至少6个组氨酸标记的HOXB4重组蛋白质(TAT-HOXB4H)的方法,该方法包含构筑得其中于HOXB4开放读框的C端含有至少6个组氨酸编码片段的DNA构建体;将所得构建体转形至宿主细胞中表现该TAT-HOXB4H重组蛋白;以及自该宿主细胞溶解产物纯化该重组蛋白质。

2. 根据权利要求1所述的用于制造C-端含有至少6个组氨酸标记的HOXB4重组蛋白质的方法,其特征在于,该DNA构建体通过聚合酶链反应方法将额外5个组氨酸编码序列导入TAT-HOXB4开放读框的C端。

3. 根据权利要求1所述的用于制造C-端含有至少6个组氨酸标记的HOXB4重组蛋白质的方法,其特征在于,该宿主细胞为大肠杆菌。

4. 一种用于增加TAT-HOXB4H重组蛋白质产量的DNA构建体,其特征在于,TAT-HOXB4开放读框的C-端已导入7个组氨酸标记。

5. 根据权利要求4所述的用于增加TAT-HOXB4H重组蛋白质产量的DNA构建体,其特征在于,该DNA构建体是质体pTAT-HOXB4H。

6. 一种用于干细胞增生的培养基,该培养基包含5nM~100nM根据权利要求1所述的方法所制得的TAT-HOXB4H重组蛋白质,及适用于干细胞增生的细胞营养物质、细胞因子与抗生素。

7. 根据权利要求6所述的用于干细胞增生的培养基,其特征在于,该干细胞为脐带血干细胞。

8. 根据权利要求6所述的用于干细胞增生的培养基,其特征在于,该干细胞为造血干细胞。

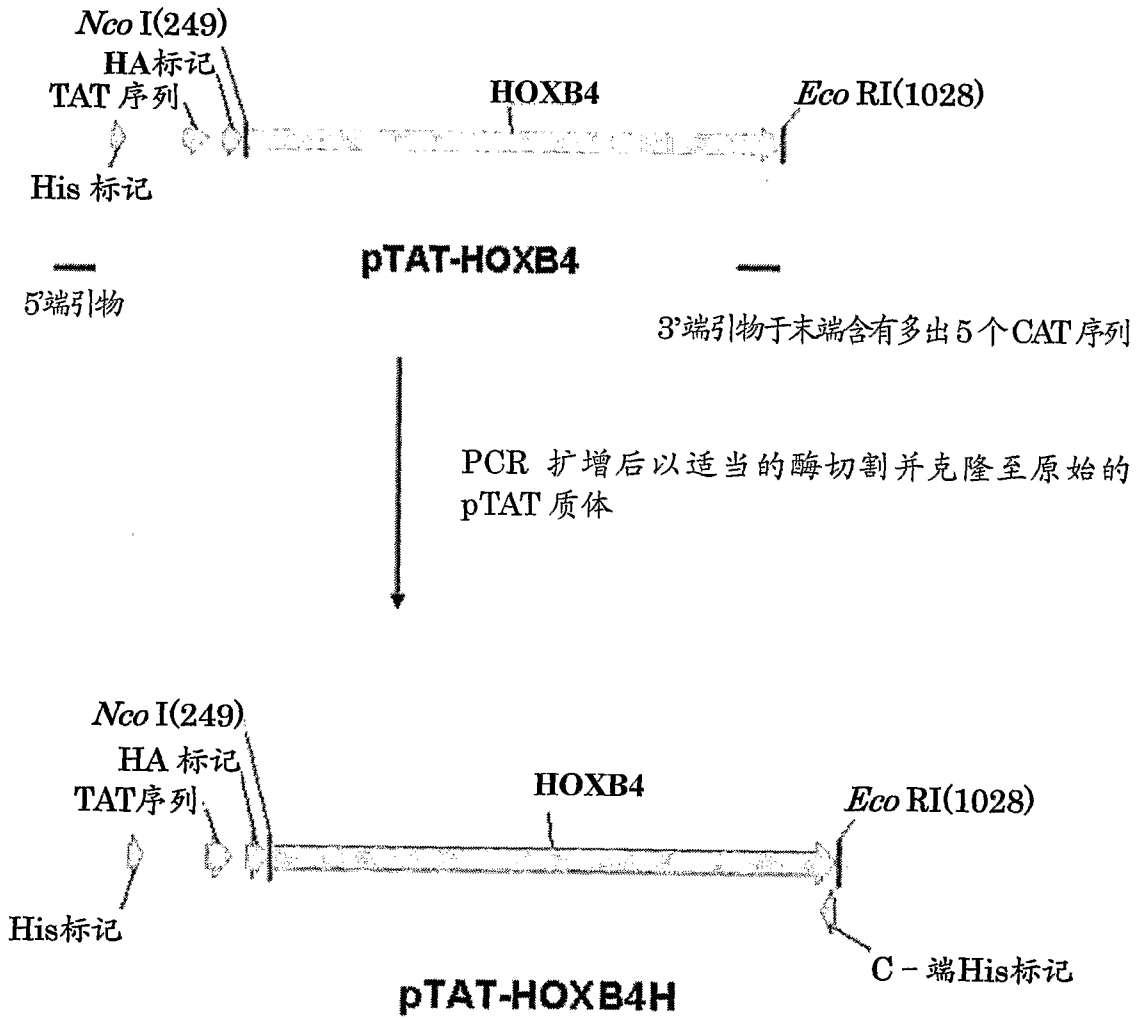


图 1

pTAT-HA-HOXB4H 序列

1
 GTTTCCTCTAGAATAATTTTGTCTTACTTTAAGAAGGAGATATACATATGC
 (1) Met (起始)

51
 GGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGA
 (2) His₆

101
 CAGCAAATGGGTCTGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGG
 151
 ATCCAAGCTTGGCTACGGCCGCAAGAAACGCCGCCAGCGCCGCCGGTG
 (3) TAT序列

201
 GATCCACCATGTCCGGCTATCCATATGACGTCCAGACTATGCTGGCTCC
 (4) HA标记

251
 ATGGCTATGAGTTCCTTTTTGATCAACTCAAACATATGTCGACCCCAAGTT
 (5) *NcoI*

301
 CCCTCCATGCGAGGAATATTCACAGAGCGATTACCTACCCAGCGACCACT
 351
 CGCCCGGGTACTACGCCGGCGGCCAGAGGCGAGAGAGCAGCTTCCAGCCG
 401
 GAGGCGGGCTTCGGGCGGCGCGGGCGTGCACCGTGCAGCGCTACGCGGC
 451
 CTGCCGGGACCCTGGGCCCCCGCCGCTCCGCCACCACCCCGCCGCCCC
 501
 CGCCACCGCCCGGTCTGTCCCCTCGGGCTCCTGCGCCGCCACCCGCGGG
 551
 GCCCTCCTCCCGAGCCCGGCCAGCGCTGCGAGGCGGTCAGCAGCAGCCC
 601
 CCCGCCGCTCCCTGCGCCAGAACCCCTGCACCCAGCCCGTCCCCT
 651
 CCGCGTGCAAAGAGCCCGTCGTCTACCCCTGGATGCGCAAAGTTCACGTG
 701
 AGCACGGTAAACCCCAATTACGCCGGCGGGGAGCCCAAGCGCTCTCGGAC
 751
 CGCCTACACGCGCCAGCAGGTCTTGGAGCTGGAGAAGGAATTTCACTACA
 801
 ACCGCTACCTGACACGGCGCCGGAGGGTGGAGATCGCCACGCGCTCTGC
 851
 CTCTCCGAGCGCCAGATCAAGATCTGGTTCCAGAACCGGCGCATGAAGTG
 901
 GAAAAAAGACCACAAGTTGCCCAACACCAAGATCCGCTCGGGTGGTGCGG
 951
 CAGGCTCAGCCGGAGGGCCCCCTGGCCGGCCCAATGGAGGCCCCCGCGCG
 1001
 CTCCATCATCATCATCATCATATTAGGAATTCAAAGCTTGATCCGGCTG
 (6) C端组氨酸标记 (7) *EcoRI*

1051
 CTA

图 2

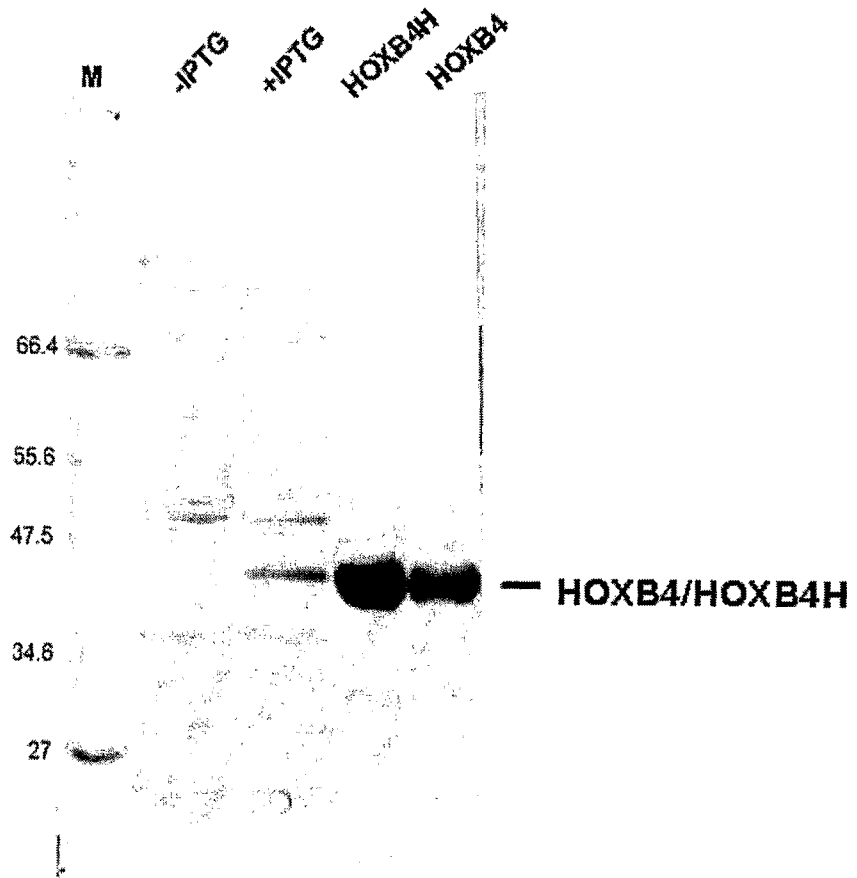


图 3

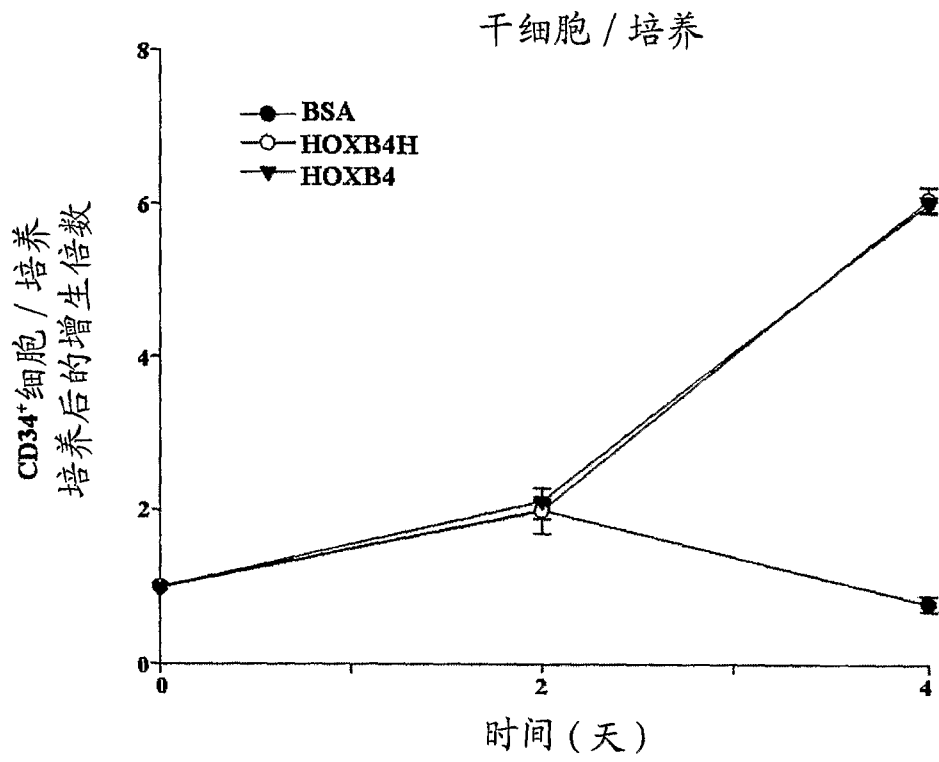


图 4

序列表

<110> 台湾尖端先进生技医药股份有限公司

<120> C-端含有组氨酸标记的 HOXB4 重组蛋白质的制造方法及用途

<130> 060332PCT

<140> 200620003108.1

<141> 2006-02-10

<150> CN200610003108.1

<151> 2006-02-10

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 1

ctccatggct atgagttctt ttttg

25

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

atgatgatga tgatgatgat ggagcgcgcg g

31

<210> 3

<211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 3
 cagaattcct aatgatgatg atgatga 27

<210> 4
 <211> 1053
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221>
 <222> (1010)..(1024)
 <223> 经添加于 pTAT-HOXB4 构建体中的 C-端组氨酸标记编码序列

<400> 4
 gtttcctcta gaataatfff gttfacttta agaaggagat atacatatgc ggggttctca 60
 tcatcatcat catcatggta tggctagcat gactggtgga cagcaaatgg gtcgggatct 120
 gtacgacgat gacgataagg atogatgggg atccaagctt ggctacggcc gcaagaaacg 180
 ccgccagcgc cgccgcggtg gatccacct gtccggctat ccatatgacg tcccagacta 240
 tgctggctcc atggctatga gttcttttt gatcaactca aactatgtcg accccaagtt 300
 ccctccatgc gaggaatatt cacagagcga ttacctacc agcgaccact cgccccggta 360
 ctacgccggc ggccagaggc gagagagcag ctccagccg gaggcgggct tcgggcggcg 420
 cgcgcggtgc accgtgcagc gctacgggc ctgccgggac cctgggcccc cgccgcctcc 480
 gccaccacc ccgccgcccc cgccacegcc cggctgttcc cctcgggctc ctgcgcgcc 540
 accgccggg gcctctctcc cggagcccgg ccagcgtgc gaggcgggta gcagcagccc 600
 cccgccgcct ccctgcgccc agaaccctt gcacccagc ccgtcccact ccgctgcaa 660

agagcccgctc gcttaccctt ggatgcgcaa agttcacgtg agcacggtaa accccaatta	720
cgccggcgagg gagccaagc gctctcggac cgcctacacg cgccagcagg tcttggagct	780
ggagaaggaa ttactaca accgctacct gacacggcgc cggagggtgg agatcgcca	840
cgcgctctgc ctctccgagc gccagatcaa gatctggttc cagaaccggc gcatgaagtg	900
gaaaaaagac cacaagttgc ccaacaccaa gatccgctcg ggtggtgcgg caggctcagc	960
cggaggggccc cctggccggc ccaatggagg cccccgcgcg ctccatcatic atcatcatca	1020
tcattaggaa ttcaaagctt gatccggctg cta	1053

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/000646

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See 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)

IPC⁸: C12N, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI, MEDLINE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, HOXB4 HOMEBOX GENE TAT HIS TAG

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KROSL, J. et al., <i>In vitro</i> expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. NATURE MEDICINE, Vol. 9, No. 11 pages 1428-1432. November 2003.	1-8
Y	AMSELLEM, S. et al., <i>Ex vivo</i> expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. NATURE MEDICINE, Vol. 9, No. 11, pages 1423-1427, November 2003.	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10.Aug. 2006 (10.08.2006)

Date of mailing of the international search report

14 · SEP 2006 (14 · 09 · 2006)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

FENG, Yi

Telephone No. 86-10-62085347

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000646

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/63 (2006.01) i
C12N15/70 (2006.01) i
C12N15/09 (2006.01) i
C12N5/00 (2006.01) i
C07K14/475 (2006.01) i

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2006/000646

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN1246147A (ANTI) 01.Mar. 2000 (01.03.2000) Claims 1-8, Example 4	1-8
Y	CN1560229A (UYFU-N) 05.Jan. 2005 (05.01.2005) Claims 1-7	1-8
A	WO2004029231A1 (INRM) 08.Apr. 2004 (08.04.2004) Claims 1-15, SEQ ID NO:1	1-8
A	WO2006005153A1 (BCCA-N &UYMO-N) 19.Jan. 2006 (19.01.2006) Claims 1-59	1-8
A	ZHOU Shi-Xin et al., The Progress in Complex Homeobox Domains. HEREDITAS, Vol. 26, No. 6, pages 984-990, 2004.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/000646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family Members	Publication Date
CN1246147A	01.03.2000	US6635458 B2 WO9915632 A1 EP0969088 A1 JP2001506868T US2003119087 A1 ES2131018 B1	21.10.2003 01.04.1999 01.05.2000 29.05.2001 26.06.2003 01.04.2000
CN1560229A	05.01.2005	NONE	
WO2004029231A1	08.04.2004	AU2002348947 A1	19.04.2004
WO2006005153A1	19.01.2006	NONE	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/000646

A. 主题的分类 参见附加页 按照国际专利分类表(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 ⁸ : C12N, C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 CNKI, MEDLINE 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)) WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT HOXB4 HOMEBOX GENE TAT W HOXB4 HIS TAG 同源盒基因 同源框 同源异型 组氨酸 标记 标签		
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	KROSL, J. et al. <i>In vitro</i> expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. NATURE MEDICINE, 第 9 卷, 第 11 期, 第 1428-1432 页, 2003 年 11 月	1-8
Y	AMSELLEM, S. et al. <i>Ex vivo</i> expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. NATURE MEDICINE, 第 9 卷, 第 11 期, 第 1423-1427 页, 2003 年 11 月	1-8
<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。		
* 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, 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 “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 10.8 月 2006 (10.08.2006)		国际检索报告邮寄日期 14.9 月 2006 (14.09.2006)
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		授权官员 冯怡 电话号码: (86-10)62085347

主题的分类

C12N15/63 (2006.01) i
C12N15/70 (2006.01) i
C12N15/09 (2006.01) i
C12N5/00 (2006.01) i
C07K14/475 (2006.01) i

C(续). 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	CN1246147A (抗生素有限公司) 01.3 月 2000 (01.03.2000) 权利要求 1-8, 实施例 4	1-8
Y	CN1560229A (复旦大学) 05.1 月 2005 (05.01.2005) 权利要求 1-7	1-8
A	WO2004029231A1 (INRM) 08.4 月 2004 (08.04.2004) 权利要求 1-15, 序列 1	1-8
A	WO2006005153A1 (BCCA-N &UYMO-N) 19.1 月 2006 (19.01.2006) 权利要求 1-59	1-8
A	周士新等, 复合同源异型结构的研究进展, 遗传, 第 26 卷, 第 6 期, 第 984-990 页, 2004 年	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/000646

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1246147A	01.03.2000	US6635458 B2	21.10.2003
		WO9915632 A1	01.04.1999
		EP0969088 A1	01.05.2000
		JP2001506868T	29.05.2001
		US2003119087 A1	26.06.2003
		ES2131018 B1	01.04.2000
CN1560229A	05.01.2005	无	
WO2004029231A1	08.04.2004	AU2002348947 A1	19.04.2004
WO2006005153A1	19.01.2006	无	