



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-248865-00000-0000

Fecha: 2013-10-21 13:55:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

21. EXPEDIENTE No. _

Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

248865

54. TÍTULO POUPEPTIDO DE ANTICUERPO RECOMBINANTE
ANTI - CIANOBACTERIAS, GEN DEL MISMO, Y
MÉTODO DE PREPARACION DEL MISMO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE PROTEIN DESIGN LAB, LTD

DOMICILIO DIANSHAJIANCUN, SUJIATUOZHEN HAI DIAN
DISTRICT, BEIJING 100095.

74. APODERADO ANDRES MARQUEZ ACOSTA.

22. BOGOTÁ, D. C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-248865-00000-0000

Fecha: 2013-10-21 13:55:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-248865-00000-0000

Fecha: 2013-10-21 13:55:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

ivo de radicación

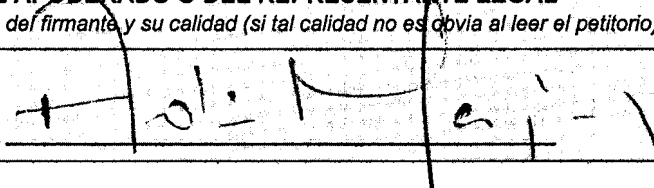
DIRECC

SOLIC

Patente

Capítulo

1	TIPO DE SOLICITUD			Patente	Capítulo	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)					
Solicitud Internacional No.		PCT/CN2012/073120		Fecha	Marzo 27 de 2012	
Publicación Internacional No.		WO/2012/142899		Fecha	Octubre 26 de 2012	
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)					
POLIPÉPTIDO DE ANTICUERPO RECOMBINANTE ANTI-CIANOBACTERIAS, GEN DEL MISMO, Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL MISMO						
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)					
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria					
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE		IDENTIFICACIÓN	TIPO	
1. PROTEIN DESIGN LAB, LTD						
6	DATOS DEL SOLICITANTE					
DIRECCIÓN		Qianshajiancun, Sujiatuozhen Haidian District, Beijing 100095		No. TELÉFONO		
CIUDAD				CORREO ELECTRÓNICO	amarquez@contextointelectual.com	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Beijing		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Beijing, China	
PAÍS DE RESIDENCIA		China				
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria					
APELLIDOS		NOMBRES		NACIONALIDAD		
1. QIU		Xiaoqing		Chino		
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: amarquez@contextointelectual.com						
8	DATOS INVENTOR (ES)					
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO		CIUDAD	DIRECCIÓN	
1. China		Beijing			Qianshajiancun, Sujiatuozhen Haidian District, Beijing 100095	
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)						
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.						
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO					
APELLIDOS		NOMBRES		IDENTIFICACIÓN		
MÁRQUEZ ACOSTA		ANDRÉS		C.C. 71.666.347 T.P. 156.659		
DIRECCIÓN		Calle 11 B No. 41 – 53		No. TELÉFONO	574 - 6040450	
CIUDAD		Medellín		CORREO ELECTRÓNICO	amarquez@contextointelectual.com	
PAÍS		Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL		
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO					
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS		(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)	
1. China				201110100775.2	2011/04/21	
2. China				201110155221.2	2011/06/10	

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. Descripción N° de folios:		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. Reivindicaciones N° Reivindicaciones:		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 No. 13 - 106023 Bogotá D.C., Octubre 21 de 2013 - 13:47:01 RECIBIDO DE : CONTEXTO INTELLECTUAL S.A CONS., BANCO DE BOGOTÁ 062754387 587433151 21/10/2013 \$*500.000 1 50005-01-01 SOLICITUDES 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION 500.0 Valor Recaudo \$500.000.00 -**.		Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 No. 13 - 106024 Bogotá D.C., Octubre 21 de 2013 - 13:50:18 RECIBIDO DE : CONTEXTO INTELLECTUAL S.A CONS., BANCO DE BOGOTÁ 062754387 587433152 21/10/2013 \$*90.000. 3 50005-01-01 SOLICITUDES 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 Valor Recaudo \$90.000.00 -***.		Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 No. 13 - 106025 Bogotá D.C., Octubre 21 de 2013 - 13:52:51 RECIBIDO DE : CONTEXTO INTELLECTUAL S.A CONS., BANCO DE BOGOTÁ 062754387 587433173 21/10/2013 \$*175.000 1 50005-01-01 SOLICITUDES 82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NUEVAS CREACIONES Valor Recaudo \$175.000.00 -****.			

POLIPÉPTIDO DE ANTICUERPO RECOMBINANTE ANTI-CIANOBACTERIAS,
GEN DEL MISMO, Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL MISMO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con biotecnología en protección ambiental, especialmente un polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias, un gen del mismo, y un método de preparación del mismo.

ANTECEDENTES

La proliferación de cianobacterias y la contaminación del agua causada por eutrofización del agua son el daño más grande para todo el ambiente del agua mundial que lleva a grandes pérdidas económicas y daños irreparables en la biosfera de la tierra. Junto con la industrialización y urbanización acelerada por parte del desarrollo económico de China, la contaminación ambiental y la degeneración son cada día más severas, y el control bionómico sobre el ambiente del agua se ha vuelto un problema crucial a enfrentar y resolver.

Los agentes antibacterianos actuales son poco efectivos contra las cianobacterias, un procariocito que pertenece al Phylum X de cianobacterias, Bacteria Dominante. Actualmente, sólo hay un reactivo químico de metales pesados, por ejemplo, sulfato de cobre y etc., que pueden controlar las cianobacterias. Sin embargo, en el uso práctico contra las cianobacterias, la sobredosis y el uso repetido de fármacos, debido a sus efectos limitados, destruye otros organismos beneficiosos, algas, plantas acuáticas, y trae una destrucción irreversible y permanente para el medio ambiente, así como residuos de agente de metales pesados con el aumento de la cantidad en el medio ambiente y los productos agrícolas. Por lo tanto, hay una gran demanda para el desarrollo de fármacos anti-cianobacterias altamente eficaces y seguros.

RESUMEN

En un aspecto, la presente invención proporciona genes, plásmidos recombinantes, y un novedoso polipéptido anti-anticuerpo recombinante anti-cianobacterias; dicho polipéptido es capaz de matar específicamente a las células de cianobacterias, sin dañar otras células de algas, plantas y animales. Otro aspecto de la presente invención es proporcionar métodos para la preparación de dichos polipéptidos de anticuerpos recombinantes anti- cianobacterias.

Se proporciona un hibridoma con un número de depósito de CGMCC No.4783.

También se proporciona un anticuerpo monoclonal secretado por dicho hibridoma.

También se proporciona un anticuerpo que imita al polipéptido con la función de reconocer y unirse a las cianobacterias, que es un fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo monoclonal, o un pequeño polipéptido molecular que está diseñado sobre la base de las regiones funcionales de dicho fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo monoclonal.

Dicho anticuerpo imitador polipéptido, es una secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID N°3.

También se proporciona un gen que codifica cualquiera de dichos polipéptidos anticuerpos imitadores.

Dicho gen tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 2.

También se proporciona un polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias, construido al operar y conectar linealmente dicho anticuerpo imitador polipéptido capaz de reconocer y unirse a las cianobacterias a la terminal-C del polipéptido colicina, y dicha colicina se selecciona de la colicina E1, Ia, Ib, Un, B o N.

Dicho polipéptido de anticuerpo recombinante anti- cianobacterias tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEC ID N° 7.

También se proporciona un gen que codifica dicho polipéptido de anticuerpo recombinante anti- cianobacterias.

Dicho gen tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 6.

También se proporciona un vector de expresión recombinante, que comprende el gen que codifica dicho polipéptido de anticuerpo recombinante anti- cianobacterias.

También se proporciona un método para preparar dicho polipéptido de anticuerpo recombinante anti- cianobacterias, con los pasos de la siguiente manera: transducir el gen que codifica el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias en un sistema de expresión de *E. coli*, cultivar el *E. coli* transducido, y separar el polipéptido expresado por el *E. coli*.

También se proporciona el uso de dicho polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias en el control de la eutrofización de las aguas.

La invención proporciona un polipéptido de anticuerpo recombinante anti- cianobacterias, que se construye a partir de polipéptido colicina y un polipéptido imitador anticuerpo contra el antígeno de superficie celular de las cianobacterias. En dicha molécula de polipéptido, los anticuerpos miméticos contra el antígeno de superficie de la célula de cianobacterias reconocen y se unen a las cianobacterias, llevando a la colicina de la molécula a atacar a la célula de cianobacterias reconocida. Con un anticuerpo mimético reconociendo específicamente el antígeno superficial de las células de las cianobacterias, el polipéptido de la invención ataca a las células de cianobacterias sin daño a otros organismos del agua y sin la contaminación del agua, siendo por lo tanto protector del medio ambiente y seguro en el control de la contaminación de cianobacterias del agua. El anticuerpo mimético en el polipéptido de anticuerpo recombinante anti- cianobacterias de la invención es un anticuerpo mimético capaz de reconocer y unirse a las cianobacterias, y está diseñado sobre la base de las secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos de la cadena ligera y pesada del

fragmento de unión del antígeno (Fab) del anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma CGMCC No.4783, tales como los anticuerpos miméticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, anticuerpos de una sola cadena y anticuerpos miméticos de moléculas pequeñas, etc. En la invención, el anticuerpo mimético diseñado sólo tiene que ser capaz de reconocer el antígeno, la única tarea de los anticuerpos miméticos es guiar la molécula de polipéptido recombinante para dirigirse a la superficie de la célula, y construir un túnel de iones en la membrana celular por medio de la colicina en el polipéptido recombinante, lo que resulta en la muerte de las células objetivo debido a la fuga de la sustancia intracelular. Por lo tanto, los polipéptidos recombinantes contruidos mediante la vinculación de una colicina a un anticuerpo mimético que está diseñado sobre la base de dicho anticuerpo monoclonal y puede reconocer el antígeno objetivo, caerá en el alcance de lo reivindicado de la invención.

En una modalidad de la invención, el anticuerpo mimético es un anticuerpo mimético de péptido-28 construido al enlazar los dominios de V_H CDR1, V_H FR2 y V_L CDR3 de un anticuerpo monoclonal contra el antígeno de superficie de los protoplastos de las cianobacterias (secretados por el hibridoma CGMCC No.4783) en el orden de V_H CDR1- V_H FR2- V_L CDR3. Los experimentos en el interior y al aire libre han demostrado que, el polipéptido anti-cianobacterias construido por dicho anticuerpo mimético tiene la actividad biológica de moverse alrededor y automáticamente buscar el antígeno de superficie de la célula de cianobacterias en el agua. Los anticuerpos miméticos péptido-28 tienen la ventaja de que son fáciles de clonar, expresar, y tienen una actividad de reconocimiento del anticuerpo original; puede matar a las cianobacterias guiando la colicina del polipéptido recombinante para apuntar a la membrana de la célula para contruir un túnel de iones. Dicho polipéptido recombinante tiene una seguridad más ecológica y ambiental en comparación con los fármacos actuales en el control de la contaminación del agua (por ejemplo, sulfato de cobre).

En la invención, la colicina para la construcción del polipéptido de anticuerpo recombinante anti- cianobacterias se puede seleccionar de colicina E1, la, lb, A, B o N que podrían formar canales iónicos. El polipéptido recombinante construido por anticuerpos miméticos anti-cianobacterias y la colicina la se verifica por medio de ejemplos de la invención. Sin embargo, con la propiedad de formar un canal iónico en la membrana celular de las cianobacterias, cualquiera de estos colicinas de acuerdo a la concepción de la invención pueden estar unidos linealmente a anticuerpos miméticos anti-cianobacterias para construir el polipéptido recombinante para llevar a cabo la invención, que es, proporcionar polipéptidos recombinantes que matan a las cianobacterias.

La invención también proporciona un método de preparación de plásmido recombinante que comprende el gen del polipéptido recombinante, donde la secuencia de nucleótidos de codificación del anticuerpo mimético se inserta en el extremo terminal-C de la colicina por oligonucleótidos de doble cadena de mutagénesis dirigida al sitio, para formar el plásmido recombinante de la invención. Tomando la colicina la como un ejemplo, el plásmido recombinante de la invención se construye mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos de codificación de los anticuerpos miméticos en el sitio después del aminoácido 626 del gen de colicina la (en el extremo terminal-C). El vector original pSELECT-1 se compra de Promega Corp., el cual contiene genes de colicina la y proteína de inmunidad. En el Ejemplo 1 de la presente invención, varios pares de secuencias de cebadores están diseñadas para los genes de los anticuerpos miméticos. El plásmido recombinante, por ejemplo, pCHCcyanoMA1, se prepara de acuerdo con las instrucciones del kit de Stratagene Corp. por medio de mutagénesis de oligonucleótidos de doble hebra dirigida al sitio.

En otro aspecto de la invención, es proporcionado un método de preparación de dicho polipéptido anti-cianobacterias de la invención, en el que un plásmido que comprende un gen que codifica el polipéptido de anticuerpo

recombinante anti-cianobacterias se obtiene mediante la vinculación operable de un gen que codifica los anticuerpos miméticos con un gen colicina, y el plásmido recombinante obtenido se transfecta en una bacteria de ingeniería de *E. coli* para obtener una célula de ingeniería de bacterias que puede producir el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias. Dicho polipéptido anti-cianobacterias de la invención se obtiene después de la separación y purificación con la columna de intercambio iónico.

Dicho polipéptido anti-cianobacterias de la invención se puede usar en el control de la contaminación del agua. Las combinaciones de fármacos adecuadas para el medio ambiente se pueden preparar mediante la adición de vectores, excipientes u otros componentes alternativos en el polipéptido de la invención, en el que el mecanismo es el siguiente: anticuerpos miméticos, dentro del polipéptido que reconocen el antígeno de la superficie de las células de cianobacterias, guían la colicina a la membrana celular de las cianobacterias con el fragmento hidrófobo del dominio del canal de iones en la colicina insertada, para formar un canal de iones, incurriendo así la muerte celular de las cianobacterias por medio de la fuga de la sustancia intracelular.

Dicho polipéptido anti-cianobacterias de la invención tiene una ventaja en la especificidad del objetivo en comparación con los fármacos anti-cianobacterias tradicionales, por lo tanto, no ataca otras algas, plantas y células de animales; la toxicidad y efectos desfavorables son mucho menores que los fármacos anti-cianobacterias tradicionales. Además, puesto que el canal de iones se forma directamente en la membrana celular de las cianobacterias para matar las células de las cianobacterias, es difícil para las células de cianobacterias reparar los daños geométricos en la membrana celular por medio de la mutación del gen y la expresión de la proteína, en el corto tiempo en el que la sustancia intracelular se fuga a través del canal iónico del polipéptido anti-cianobacterias hasta la muerte celular de las cianobacterias. Por lo tanto, hay una baja probabilidad de que las

células de cianobacterias obtengan resistencia al polipéptido anti-cianobacterias de la invención, lo que indica que hay una aplicación prometedora a dicho polipéptido anti-cianobacterias de la invención.

Depósito de la información de la hibridoma:

Número de Depósito: CGMCC No.4783

Nombre del Depósito: Hibridoma monoclonal de anticuerpos contra el antígeno de superficie celular de las cianobacterias

Fecha de Depósito: 04 de abril 2011

Institución de Depósito: Centro General de China de Recolección de Cultivos Microbiológicos, CGMCC

Dirección: No.3, Patio N°1, Beichen West Road, Distrito Chaoyangt, Beijing

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una ilustración esquemática de la estructura del plásmido recombinante pCHCcyanoMA1 que comprende los genes de los anticuerpos miméticos y la colicina la.

La figura 2 es una ilustración esquemática que ilustra la estructura del anticuerpo recombinante anti-cianobacterias de la presente invención.

La figura 3 es una ilustración esquemática de la estructura del plásmido recombinante pCHCcyanoMA2 que comprende los genes de los anticuerpos miméticos y la colicina la con orden NC invertido en parte.

La figura 4 muestra los resultados de los experimentos sobre la inhibición del polipéptido anti-cianobacterias de la invención en *Microcystis aeruginosa* cultivada en medio líquido,

donde, **A**, control en blanco; **B**, 50 µg/ml de ampicilina; **C**, 50 µg/ml de feromona espectro (Ph-NM); **D**, 50 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **E**, 50 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (2).

La figura 5 muestra los resultados de los experimentos sobre la inhibición del polipéptido anti-cianobacterias (1) de la invención en *Microcystis aeruginosa* cultivada en un medio líquido, donde, **A**, resultado del tratamiento durante 48 horas; **B**, resultado del tratamiento durante 72 horas; **C**, resultado de tratamiento durante 96 horas.

En donde hay 6 frascos en cada columna, de izquierda a derecha, es decir, de la siguiente manera: **1**, control; **2**, 0,1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **3**, 0,5 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **4**, 1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **5**, 5 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **6**, 10 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1).

La figura 6 muestra los resultados de los experimentos sobre la inhibición del polipéptido anti-cianobacterias (1) de la invención en *Scenedesmus* cultivado en un medio líquido.

En donde hay 6 frascos en cada columna que se tratan durante 10 días, desde la izquierda hacia la derecha, es decir, de la siguiente manera: **1**, control; **2**, 1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **3**, 5 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **4**, 10 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **5**, 15 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); **6**, 20 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1).

La figura 7 muestra los resultados de los experimentos sobre la inhibición del polipéptido anti-cianobacterias (1) de la invención en *Microcystis aeruginosa* y *Scenedesmus* cultivado en un medio líquido.

En donde, el resultado del *Microcystis aeruginosa* se muestra en la parte superior, y que del *Scenedesmus* se muestra en la parte inferior.

La figura 8 muestra los resultados de los experimentos sobre la inhibición del polipéptido anti-cianobacterias de la invención en *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena*, *Chlorella* y *Scenedesmus* cultivados en un medio líquido.

En donde, el matraz de la izquierda es el control, y el de la derecha es de 35 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1). Donde A: *Microcystis aeruginosa*; B: *Anabaena*; C: *Chlorella*; D: *Scenedesmus*.

La figura 9 muestra el resultado del experimento sobre la inhibición del polipéptido anti-cianobacterias de la invención en agua natural contaminada por cianobacterias.

En donde, A, control en blanco; B, 1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); C, 5 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); D, 10 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); E, 0,7 µg/ml de sulfato de cobre.

La figura 10 muestra algunos aspectos de los resultados del experimento de inhibición en la figura 9.

En donde, A, cambios de densidad óptica en agua; B, cambios de clorofila en el agua; C, cambios de pH en el agua; D, cambios de población de algas dominantes en agua.

En donde, D-1, grupo de control; D-2, grupo tratado por 1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); D-3, grupo tratado por 0,7 µg/ml de sulfato de cobre.

La figura 11 muestra la observación microscópica (magnificada 400 veces) de la inhibición del polipéptido anti-cianobacterias en agua natural contaminada por las cianobacterias en la figura 9.

En donde, se muestran respectivamente los cambios de las algas (*Anabaena*) que se tratan mediante el control, 1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1) y 0,7 µg/ml de sulfato de cobre en agua en el primera Día 1 (A), el segundo día (B), el tercer día (C), el cuarto día (D), el quinto día (E).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Ejemplo 1. Construcción del plásmido que expresa polipéptido anti-cianobacterias y la preparación del polipéptido recombinante anti-cianobacterias

Material: Hibridoma CGMCC No.4783.

Paso 1. La obtención de la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos miméticos: el anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma se recogió y se secuenció mediante el uso de métodos convencionales para obtener la secuencia de la cadena pesada y la cadena ligera del fragmento de unión del antígeno Fab; la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mimético fue diseñada sobre la base de la secuencia de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad, como se muestra en la SEC ID N° 3. La secuencia nucleotídica que codifica dichos anticuerpos miméticos se expone en la SEC ID N° 2.

Paso 2. El vector original es el plásmido pSELECT-1 (adquirido de Promega Corp.), que lleva los genes de colicina Ia y la proteína de Inmunidad (dichos genes se cargan en el laboratorio donde se llevan a cabo los experimentos de esta invención). El gen que codifica los anticuerpos miméticos anti-cianobacterias (secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID N° 2 en el listado de secuencias) se insertan después del sitio de I626 en el gen de colicina Ia por medio de la tecnología de Mutagénesis de sitio-dirigido de oligonucleótidos de doble cadena (QuickChange™ Kit, Stratagene Corp.), para obtener un plásmido recombinante pCHCcyanoMA1 (como se muestra en la fig. 1). El plásmido de recombinación se transfecta entonces en la bacteria de ingeniería de *E. coli* B834 (DE3) para preparar el polipéptido. Se obtiene dicho polipéptido anti-cianobacterias con la secuencia de ácido amonio que se muestra en la SEC ID N° 7 (en lo sucesivo denominado como "polipéptido anti-cianobacterias (1)") y de peso molecular de aproximadamente 70.000.

El proceso de mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótido de doble cadena se realizó de acuerdo al manual del Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio de Stratagene QuickChange (Nº de catálogo 200518).

1. Preparación de reactivos para mutagénesis dirigida al sitio:

5 µl 10 x tampón

2 µl (10 ng) plásmido de colicina la de tipo salvaje

1 µl (125ng) 5'-3' cebadores de oligonucleótidos como se diseñaron

1 µl (125ng) 5'-3' cebadores de oligonucleótidos como se diseñaron

1 µl dNTP

Agua doblemente destilada 50 µl

1 µl pfu

(Todos se proporciona en el kit de plásmido a excepción de los cebadores y el agua doblemente destilada)

2. Amplificación por PCR, las condiciones de amplificación: 20 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 35 segundos, recocido a 53 °C durante 70 segundos, y extensión a 68 °C durante 17 minutos;

3. Se añadió 1µl de endonucleasa Dpn 1 para digerir la cadena de ADN (37 °C, 1 hora); 1 µl de reactivo y 50 µl de célula competente HMS174 se incubaron juntos en hielo durante 30 minutos, y después se incubó en hielo durante 2 minutos después de un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos;

4. Se añadió 0,5 ml de cultivo del medio NZY, y se cultivó por agitación a 37 °C y 220 rpm durante 1 hora. Se esparció 50-100 µl de reactivo sobre la placa de medio LB más 1% de agar y 50 µg/ml de ampicilina para el cultivo durante toda la noche a 37 °C;

5. Las colonias se recogieron después de cultivar durante 18 horas. El plásmido se extrajo usando el kit de extracción de Qiagene Corp. o Gibco Corp., y luego fueron secuenciados para confirmar si la mutación fue exitosa;

6. Se incubaron 50 ng de plásmido de recombinación con 50 µl de los componentes de célula de *E. coli* B834 preparados (DE3) en hielo durante 30 minutos, y calor conmocionado a 42 °C durante 30 segundos. Se añadió 50-100 µl de la sustancia reaccionante con 0,5 ml del medio de cultivo SOC, cultivada por agitación a 37 °C y 220 rpm durante 1 hora y se esparció sobre la placa de medio LB más 1 % de agar y 50 µg/ml de ampicilina para la incubación a 37 °C durante 12 - 16 horas. Después, una sola colonia fue recogida;

7. Las bacterias fueron amplificadas en 8-16 litros de medio LB a 250 rpm y 37 °C durante 6-8 horas. La bacteria se precipitó por centrifugación a 6000 g y 4 °C durante 20 minutos, se re suspendió con 50-80 ml de 50 mM borato, 2mM EDTA (pH 9,0) a 4 °C; se añadió 250 microlitros de 0.2 M PMSF y se trataron con ultrasonido a 4 °C y 400W durante 2 minutos. Los escombros de la Bacteria fueron centrifugados a alta velocidad a 4 °C y 75.000g durante 1,5 horas. El sobrenadante se añadió con sulfato de estreptomicina para precipitar el ADN, se dializó durante la noche en una bolsa de diálisis con un peso molecular de 15.000, así como con 10 L de 50 mM de borato, 2 mM EDTA, tampón de pH 9,0 a 4 °C, y después se cargó en una columna CM (Amersham Biosciences). La columna se eluyó mediante un tampón de 50 mM de borato, 0,3 M de NaCl, 2 mM EDTA y pH 9,0 para obtener el polipéptido recombinante anti-cianobacterias (1) (ver fig. 2).

Las secuencias de oligonucleótidos de doble cadena diseñados para la preparación de los genes de los anticuerpos miméticos del plásmido pCHCcyanoMA1 son las siguientes:

pCHCcyanoMA1

1. 5'-3'

gcg aat AAG ttc tgg ggt att TCT TGG TAT CAG ATG AAG TGG GTT CAA
taa ata aaa tat AAG aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta TTG AAC CTT CTG CAT CCA CCA ATA AGA aat
acc cca gaa ctt att cgc

2. 5'-3'

tat tgg atg cag tgg gtt AAG AGA caa CAA CCG GGG GGG CTG GAG TGG
ATT GGC taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GCC AAT CCA CTC CAG CCC TTG CCC CGG TCT
ttg ctt aac cca cca ctg gato ata

3. 5' -3'

ggg ggg caa ctg gag tgg att ggc CAG CAG TAT YGG TCT ACG CCC CCG
TGG ACG taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CGT CCA CGG GGG CGT AGA CCA ATA CTG
CTG gcc aat cca ctc cag ccc ttg ccc

Ejemplo 2. Construcción de un plásmido de control que expresa polipéptido anti-cianobacterias y la preparación del polipéptido anti-cianobacterias de control

El vector original es el plásmido pSELECT-1 (adquirido de Promega Corp.), que lleva los genes de colicina la y la proteína de Inmunidad (dichos genes se cargan en el laboratorio donde se llevan a cabo los experimentos de esta invención). El gen que codifica los anticuerpos miméticos anti-cianobacterias (secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID N° 4 en el listado de secuencias) se insertan después del sitio de l626 en el gen de colicina la por medio de la tecnología de Mutagénesis de sitio-dirigido de oligonucleótidos de doble cadena (QuickChange™ Kit, Stratagene Corp.), para obtener un plásmido recombinante pCHCcyanoMA2 (como se muestra en la fig. 3). El plásmido de recombinación se transfecta entonces en la bacteria de ingeniería de *E. coli* B834

(DE3) para preparar el polipéptido. Se obtiene dicho polipéptido anti-cianobacterias con la secuencia de ácido amonio que se muestra en la SEC ID N° 9 (en lo sucesivo denominado como "polipéptido anti-cianobacterias (2)") y de peso molecular de aproximadamente 70.000.

Las secuencias de oligonucleótidos de doble cadena para la preparación de los genes de los polipéptidos miméticos del plásmido pCHCcyanoMA2 fueron diseñadas y preparadas de acuerdo con el método del Ejemplo 1.

Ejemplo 3. Resultados del experimento de inhibición del polipéptido anti-cianobacteria en *Microcystis aeruginosa*

Experimento (1)

Paso 1. Preparación de las algas para el experimento: *Microcystis aeruginosa* FACHB-978 es comprada al Instituto de Hidrobiología de la Academia de Ciencias de China.

Método de cultivo de las algas: la semilla del alga se inoculó con una densidad celular inicial de 5×10^4 /ml en un matraz cónico de 500 ml que contiene 250 ml de medio BG11 y se coloca en una incubadora de iluminación, en la que el matraz cónico se cubre con una película respirable para evitar contaminaciones. Las algas fueron cultivadas a 25 °C con una intensidad de iluminación de $(2500 \pm 10 \%)$ lux y la relación luz/oscuridad de 12h/12h. Los matraces cónicos se meneaban y se intercambiaron de posición una vez cada 2-3 horas. Se tomaron muestras y se ensayaron una vez cada 24 horas desde el quinto día después de la inoculación. El siguiente paso se puede realizar hasta que la densidad celular alcanzó aproximadamente 10^6 /ml.

Paso 2. Se añade 1 ml de líquido de cianobacterias preparado respectivamente en 5 tubos, a saber, A, B, C, D, y E, y a continuación, se añadieron inhibidores de la siguiente manera: **A**, control en blanco; **B**, 50µg/ml de ampicilina; **C**, 50 µg/ml de feromona de amplio espectro (Ph-AM1 se describe en la

Solicitud de Patente N° CN200910092128.4); D, 50µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1); E, 50µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (2). Después de agitar el cultivo a baja velocidad durante 12 horas en una incubadora, los 5 tubos se añadieron respectivamente con naranja de acridina (50 nM) y yoduro de propidio (600 nM) para la incubación durante 30 min; varios microlitros se muestrearon en un portaobjetos para observar las cianobacterias vivas marcadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon 90i con filtro de DM505 y DM565).

Los resultados se muestran en la figura 4. Se manifiesta por los resultados que sólo el polipéptido anti-cianobacterias (1) mató a los *Microcystis aeruginosa* cultivados, mientras que ningún polipéptido anti-cianobacterias (2), ampicilina y Ph-NM mostró efectos sobre la *Microcystis aeruginosa* cultivada.

Experimento (2)

Paso 1. Fue igual que en el Paso 1 en el Experimento (1).

Paso 2. Los polipéptidos anti-cianobacterias fueron añadidos por gradiente de concentración en 6 de los matraces cónicos de 500 ml llenos de algas. El polipéptido anti-cianobacterias fue añadido a la *Microcystis aeruginosa* en dosis de 0, 0.1, 0.5, 1, 5, y 10 µg/ml. Se observó la inhibición de las cianobacterias cada día.

Los resultados se muestran en la figura 5. Debido a que la concentración de polipéptido anti-cianobacterias (1) era diferente en cada grupo, el tiempo del cambio de color de verde a amarillo claro de la *Microcystis aeruginosa* líquida en cada matraz cónico era proporcional a la concentración de polipéptido anti-cianobacterias (1). Sin embargo, se observó visualmente que la *Microcystis aeruginosa* en todos los tratamientos podría ser matada efectivamente en 72 horas.

El resultado anterior mostró que el polipéptido anti-cianobacterias (1) es capaz de matar a la *Microcystis aeruginosa* cultivada, mientras que el polipéptido anti-cianobacterias (2) casi no muestra ningún efecto.

Experimento (3)

Material: *Scenedesmus obliquus* FACHB -417 es comprado al Instituto de Hidrobiología de la Academia de Ciencias de China, y se cultiva de acuerdo con el método en el paso 1 del Experimento (1).

Paso 2. Se añadió polipéptido anti-cianobacterias (1) en 6 matraces cónicos de 500 ml con las algas por medio de un gradiente de concentración de 0, 1, 5, 10, 15, y 20 µg/ml, respectivamente. Se observó la inhibición del *Scenedesmus* cada día.

Los resultados se muestran en la figura 6. Aunque la dosis de polipéptido anti-cianobacterias (1) era 10 veces mayor que el añadido en *Microcystis aeruginosa*, no se observó ningún efecto mortal del polipéptido anti-cianobacterias (1) en el *Scenedesmus* durante el experimento (190 horas).

Experimento (4)

0,1 ml de líquido de cultivo se toma de cada matraz del Experimento (1) - (3) y se coloca en una cámara de recuento de sangre para observar y contar con un microscopio. Se muestra por el número de células de algas en la figura 7 que, en comparación con el control, 1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1) puede matar a la *Microcystis aeruginosa* en 72 horas, mientras que 1 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1) casi no mostraron efecto alguno contra el *Scenedesmus*.

Ejemplo 4. Experimento del polipéptido anti-cianobacterias contra *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena*, *Chlorella* y *Scenedesmus* en un medio de cultivo líquido.

Microcystis aeruginosa, *Anabaena*, *Chlorella* y *Scenedesmus* se adquieren en el Instituto de Hidrobiología de la Academia de Ciencias de China, se cultivan y tratan de acuerdo con los métodos en el paso 1, Experimento (1) del Ejemplo 3.

40 ml del líquido de algas con la densidad celular de 10^6 /ml se distribuyó en dos matraces cónicos de 300 ml, y se añadió respectivamente con **A**: líquido de control en blanco con la misma cantidad, **B**: 35 µg/ml de polipéptido anti-cianobacterias (1), y fueron cultivados durante 4 días. Se observó el crecimiento.

Los resultados se muestran en la figura 8. Después de 24 horas, el color del líquido de las algas de *Microcystis aeruginosa* y *Anabaena* se volvió claro y se hizo evidente en el cuarto día, mientras que el color y la turbidez del líquido de *Chlorella* y *Scenedesmus* permanecieron constantes. Se ilustra por los resultados que, el polipéptido anti-cianobacterias 1 inhibió el crecimiento de la *Microcystis aeruginosa* y *Anabaena*, pero no inhibió el crecimiento de *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Los resultados anteriores demostraron que el polipéptido anti-cianobacterias (1) es capaz de matar las cianobacterias.

Ejemplo 5. Experimento de matar a las cianobacterias en el agua natural con el polipéptido anti-cianobacterias

Agua natural gravemente contaminada por las cianobacterias fue tomada de una piscina de cría de camarones del lago Suzhou Yangcheng, 25~35 L de agua se distribuyó en las cuencas de cría de plástico de 60x40x30 cm, con 10 min de suministro de aire cada 20 min, la temperatura se ajustó automáticamente a 27 °C, la intensidad de la iluminación (2500 ± 10 %) lux y la relación luz/oscuridad de

12h/12h. Se tomaron muestras de agua cada día para detectar el pH, absorbancia a 650 nm, y la absorbancia a la clorofila (véase la fig. 9).

La absorbancia a 650 nm se detectó mediante la colocación de la muestra de líquido en un espectrofotómetro visible (Ver fig. 10).

El contenido de clorofila se detectó mediante el uso del método de espectrofotometría de etanol caliente – descongelación (ver fig. 10). Las absorbancias a 650 y 700 nm se detectaron mediante un espectrofotómetro para calcular la concentración de clorofila a, con una fórmula de:

$$[C]a = [12.12 (D664 - D750) - 1.58 (D647 - D750) - 0.08 (D630 - D750)] \\ VE/VS \cdot d.$$

El PH, la absorbancia a 650 nm, y la absorbancia de la clorofila a en el agua del grupo de control se mantuvo alta durante el experimento, mientras que los del grupo del polipéptido anti-cianobacterias (1) y el grupo de sulfato de cobre se redujo dramáticamente desde el segundo día.

Se tomaron muestras de 30 ml de agua todos los días, se fijaron con formalina, y después se concentró 10 veces por centrifugación. 0,1 ml se tomaron en una cámara de recuento de sangre para ser observados y se contaron bajo un microscopio (ver fig. 11). Se muestra mediante un examen microscópico que, en el primer día, muchas *Anabaena* florecidas se podían ver en el grupo control, el grupo del polipéptido anti-cianobacterias (1) y el grupo de sulfato de cobre; mientras que a partir del segundo día, la *Anabaena* en el grupo de polipéptido anti-cianobacterias (1) y en el grupo de sulfato de cobre disminuyó y se fragmentó en gran medida en el agua; y no *Anabaena* se podía ver en el grupo de polipéptido anti-cianobacterias (1) y en el grupo de sulfato de cobre en el quinto día, pero muchas *Anabaena* estaban vivas en el grupo de control.

Los cambios de forma de las algas se observaron bajo un microscopio, y diversas algas se contaron para detectar los cambios dinámicos sobre la población dominante de plantas flotantes en el agua (ver fig. 10). En el grupo de control,

Anabaena y *Microcystis aeruginosa* fueron las algas dominantes todo el tiempo; en el grupo de polipéptido anti-cianobacterias (1), *Anabaena* y *Microcystis aeruginosa* disminuyeron gradualmente mientras *Chlorella* se convirtió en dominante; en el grupo de sulfato de cobre, *Anabaena* y *Microcystis aeruginosa* disminuyeron gradualmente, y otras cianobacterias, la *Oscillatoria*, llegó a ser dominante.

Tabla 1. Conteo del número y el cambio de la forma de las plantas flotantes tratadas con polipéptido anti-cianobacterias (/ L)

	1 ^{er} Día de tratamiento	2 ^{do} Día	3 ^{er} Día	4 ^{to} Día	5 ^{to} Día
Grupo de Control	32745	26363 Ningún cambio en la forma de las algas	33194 Ningún cambio en la forma de las algas	41068 Ningún cambio en la forma de las algas	17954 Ningún cambio en la forma de las algas
1 mg/L de polipéptido	50394	43981 Muchas de las <i>Anabaena</i> se volvieron células sencillas o cadenas cortas de 2-5 células	10624 Muchas de las <i>Anabaena</i> se volvieron cadenas cortas de 1-5 células, sin cadenas largas	5370 Muchas de las <i>Anabaena</i> se volvieron cadenas cortas de 1-5 células en pocas cantidades	3432 Casi ninguna célula de <i>Anabaena</i>
5 mg/L of polipéptido	43987	40828 Igual al cambio tratado por 1 mg/L	20744 Igual al cambio tratado por 1 mg/L	9890 Igual al cambio tratado por 1 mg/L	3680 Casi ninguna célula de

		polipéptido	polipéptido	polipéptido	<i>Anabaena</i>
10 mg/L of polipéptido	48101	41787 Igual al cambio tratado por 1 mg/L polipéptido	23443 Igual al cambio tratado por 1 mg/L polipéptido	14214 Igual al cambio tratado por 1 mg/L polipéptido	4902 Casi ninguna célula de <i>Anabaena</i>
20 mg/L of polipéptide	45588	39194 Igual al cambio tratado por 1 mg/L polipéptido	33453 Igual al cambio tratado por 1 mg/L polipéptido	4800 Casi ninguna célula de <i>Anabaena</i>	3508 Casi ninguna célula de <i>Anabaena</i>
0.7 mg/L de sulfato de cobre	22930	1266 Todas las <i>Anabaena</i> se volvieron células sencillas	499 Casi todas las algas se convirtieron en detritus orgánico	305 Pocas algas	379 Pocas algas

Los resultados se muestran en las figuras 9-11 y la Tabla 1. Se manifiesta por los resultados que 0,7 ppm de sulfato de cobre mató todo tipo de algas sin selección. Sin embargo, el polipéptido anti-cianobacterias (1) ha atacado la inhibición en el crecimiento de las cianobacterias (*Anabaena*, *Microcystis aeruginosa*) en agua, pero tiene poca influencia sobre el crecimiento de otro fitoplancton.

REIVINDICACIONES

1. Un hibridoma con un número de depósito de CGMCC No.4783.
2. Un anticuerpo monoclonal secretado por dicho hibridoma de la reivindicación 1.
3. Un polipéptido mimético anticuerpo con la función de reconocer y unirse a las cianobacterias, dicho polipéptido mimético anticuerpo es un fragmento de unión-antígeno de dicho anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2, o un pequeño polipéptido molecular que está diseñado sobre la base de las regiones funcionales de dicha unión a antígeno fragmento y expresado y aislado artificialmente.
4. El polipéptido mimético anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, donde su secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID N°. 3.
5. Un gen que codifica el polipéptido mimético anticuerpo de la reivindicación 3 o 4.
6. El gen de acuerdo con la reivindicación 5, donde su secuencia de nucleótidos se establece en la SEQ ID N°. 2.
7. Un polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias, construido al conectar operativamente y linealmente dicho polipéptido mimético anticuerpo con la función de reconocer y unirse a las cianobacterias de la reivindicación 3 o 4 al terminal-C del polipéptido colicina, dicha colicina se selecciona de colicina E1, Ia, Ib, A, B o N.
8. El polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias de acuerdo con la reivindicación 7, en donde su secuencia de aminoácidos se establece en las SEC ID N ° 7.

9. Un gen que codifica el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias.

10. El gen de acuerdo con la reivindicación 9, el cual su secuencia de nucleótidos se establece en la SEC ID N° 6.

11. Un vector de expresión recombinante que comprende el gen que codifica el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias.

12. Un método de preparación del polipéptido recombinante anti-cianobacterias de la reivindicación 7 u 8, que comprende las etapas de: transformar el gen que codifica el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias en un sistema de expresión de *E. coli*, cultivar el *E. coli* transformado, y separar el polipéptido expresado por el *E. coli*.

13. La aplicación de dicho polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias de la reivindicación 7 u 8 en la eutrofización del agua de control.

RESUMEN

Se suministra una célula hibridoma CGMCC No. 4783 que secreta un anticuerpo monoclonal de un antígeno de superficie de célula anti-cianobacterial, y el anticuerpo monoclonal secretado del mismo. También se suministra un polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterial, gen codificador, método de preparación y uso del mismo. El polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterial se compone de un polipéptido mimético de anticuerpo anti-cianobacterial que se conecta linealmente de forma operable con el terminal carboxilo de un polipéptido de *Escherichia coli*. El polipéptido mimético de anticuerpo anti-cianobacterial es un polipéptido con capacidad de identificación y unión de cianobacteria diseñada con base en un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal secretado por la célula hibridoma CGMCC No. 4783. El polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterial forma directamente un canal de iones sobre la membrana celular de una cianobacteria para matar la cianobacteria, matando de forma específica la cianobacteria (procariota) sin matar otras algas de células eucariotas benéficas.

Medellín, 18 de octubre de 2013

SEÑORES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
JOSE LUIS SALAZAR LÓPEZ
 Director de Nuevas Creaciones
 Bogotá

REFERENCIA: Patente PCT No. PCT/CN2012/073120
 Solicitante: PROTEIN DESIGN LAB., LTD
 Modificaciones presentadas con base en los artículos 28 y 41
 durante la Fase Internacional

Cordial saludo,

Teniendo en cuenta los artículos 28 y 41 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes – PCT, los cuales relaciono a continuación:

"Artículo 28: *Modificación de las reivindicaciones, la descripción y los dibujos ante las oficinas designadas: 1) el solicitante deberá tener la oportunidad de modificar las reivindicaciones, la descripción y los dibujos presentados en cada Oficina designada dentro del plazo prescrito. Ninguna Oficina designada concederá una patente ni denegará su concesión antes del vencimiento de ese plazo, salvo con el consentimiento expreso del solicitante; 2) Las modificaciones no deberán exceder la divulgación contenida en la solicitud internacional tal como fuera presentada, salvo que la legislación nacional del Estado designado lo permita, 3) Las modificaciones deberán ser conformes a la legislación nacional del Estado designado en todos los aspectos que no estén previstos en el presente Tratado y en su Reglamento; y 4) Cuando la oficina designada exija una traducción de la solicitud internacional, las modificaciones deberán presentarse en el idioma de la traducción.*

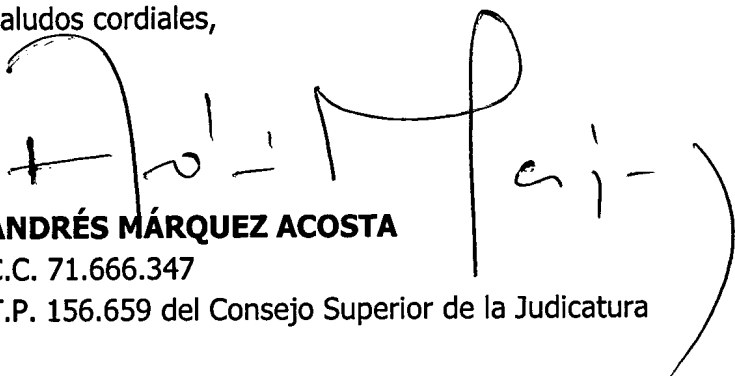
Artículo 41: *Modificación de las reivindicaciones, la descripción y los dibujos ante las oficinas elegidas: 1) el solicitante deberá tener la oportunidad de modificar las reivindicaciones, la descripción y los dibujos presentados en cada Oficina designada dentro del plazo prescrito. Ninguna Oficina designada concederá una patente ni denegará su concesión antes del vencimiento de ese plazo, salvo con el consentimiento expreso del solicitante; 2) Las modificaciones no deberán exceder la divulgación contenida en la solicitud internacional tal como fuera presentada, salvo que la legislación nacional del Estado designado lo permita, 3) Las modificaciones deberán ser conformes a la legislación nacional del Estado elegido en todos los aspectos que no estén*

*previstos en el presente Tratado y en su Reglamento; y
4) Cuando la oficina elegida exija una traducción de la
solicitud internacional, las modificaciones deberán
presentarse en el idioma de la traducción."*

Me permito relacionar las enmiendas o modificaciones presentadas a la solicitud PCT No. PCT/CN2012/073120, durante la fase internacional, las cuales solicito sean tenidas en cuenta como parte integral de la presente solicitud.

Agradeciendo de antemano sus gestiones.

Saludos cordiales,


ANDRÉS MÁRQUEZ ACOSTA

C.C. 71.666.347

T.P. 156.659 del Consejo Superior de la Judicatura

Modificaciones de las REIVINDIACIONES según el PCT Artículo 28/41

1. Un hibridoma con un número de depósito de CGMCC No.4783.
2. Un anticuerpo monoclonal secretado por dicho hibridoma de la reivindicación 1.
3. Un polipéptido mimético anticuerpo con la función de reconocer y unirse a las cianobacterias, dicho polipéptido mimético anticuerpo es un fragmento de unión-antígeno de dicho anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2, o un pequeño polipéptido molecular que está diseñado sobre la base de las regiones funcionales de dicha unión a antígeno fragmento y expresado y aislado artificialmente.
4. El polipéptido mimético anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, donde su secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID N°. 3.
5. Un gen que codifica el polipéptido mimético anticuerpo de la reivindicación 3 o 4.
6. El gen de acuerdo con la reivindicación 5, donde su secuencia de nucleótidos se establece en la SEQ ID N°. 2.
7. Un polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias, construido al conectar operativamente y linealmente dicho polipéptido mimético anticuerpo con la función de reconocer y unirse a las cianobacterias de la reivindicación 3 o 4 al terminal-C del polipéptido colicina, dicha colicina se selecciona de colicina E1, Ia, Ib, A, B o N.
8. El polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias de acuerdo con la reivindicación 7, en donde su secuencia de aminoácidos se establece en las SEC ID N ° 7.

9. Un gen que codifica el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias de la reivindicación 7 u 8.

10. El gen de acuerdo con la reivindicación 9, el cual su secuencia de nucleótidos se establece en la SEC ID N° 6.

11. Un vector de expresión recombinante que comprende el gen que codifica el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias de la reivindicación 7 u 8.

12. Un método de preparación del polipéptido recombinante anti-cianobacterias de la reivindicación 7 u 8, que comprende las etapas de: transformar el gen que codifica el polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias en un sistema de expresión de *E. coli*, cultivar el *E. coli* transformado, y separar el polipéptido expresado por el *E. coli*.

13. La aplicación de dicho polipéptido de anticuerpo recombinante anti-cianobacterias de la reivindicación 7 u 8 en la eutrofización del agua de control.

0-1	PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	PCT-SAFE 版本 3. 51. 053. 229 MT/FOP 20120101/0. 20. 5. 19
0-2	国际申请号	PCT/CN2012/073120
0-3	申请人或代理人的档案号	PC11853-JJQ

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	第4页
1-2	行号:	第13~18行
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	CGMCC 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
1-3-2	保藏单位地址	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No. 1, West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China
1-3-3	保藏日期	2011年 4月 20日 (20. 04. 2011)
1-3-4	保藏号	CGMCC No. 4783
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

中国微生物菌种保藏管理委员会
普通微生物中心
China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)

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， 邮政编码：100101
电话：010-64807355 传真：010-64807288 电子邮件：cgmmc@sun.jlu.ac.cn http://www.cgmmc.net

受理通知书（收据）

存活性报告书

用于专利程序的生物材料保存

发出日期 2011 年 04 月 20 日

(请求保藏人或代理人的姓名、地址)

丘小庆
微普沃三联（北京）生物技术有限公司
北京市顺义区高家营乡沙坨村东1600米

本保藏中心登记入册编号

CGMCC No. 4783

你（们）提供的请求保藏并注明以下鉴定
参照的生物材料（株）：BC5

上述请求保藏的生物材料（株）附有

☒ 科学描述

☐ 建群的分类命名：

抗疟疾细胞表面抗原的单克隆抗体分泌细胞

申请号 82.

申请日期 年 月 日

该生物材料（株）已于 2011 年 04 月 20 日由本保藏中心收到，并登记入册。
根据你（们）的请求，由该日起保存三十年，在期满前收到提供生物材料样品的请求后再
延续保存五年。

该生物材料（株）的存活性经本保藏中心于 2011 年 04 月 20 日检测，结果是

(1) 存活 ☒

(2) 失活 ☐

中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心负责人签字和日期

姓名

2011 年 04 月 20 日

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Protein Design Lab, Ltd.

<120> POLIPÉPTIDO DE ANTICUERPO RECOMBINANTE ANTI-CIANOBACTERIAS, GEN DEL MISMO, Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL MISMO

<130> PC11853/JJQ

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1878

<212> DNA

<213> Secuencia Nucleotida que codifica la colicin Ia

<400> 1

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctgggta tgattcagat 60
ggccatgaaa ttatggccgt tgatatttat gtaaaccctc cacgtgtoga tgtcttcat 120
ggtagcccgct ctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg
180
gttgatgatt cccaacccg aagtgatatc gaaaaaagg acaaggaaat cacagcgta
240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa
300
cgctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactcgt
360
gccggaacg cagatgccg tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag
420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca
480
gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctcccc ggaggccagg 540

tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc
600

gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacacccg gttgtcagag
660

ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc cctgtctgctc
720

gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg
780

acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa
840

cagaaaaaca cgcctgacgg caaaacgata gttcccctg aaaaattccc ggggcgttca
900

tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccggtac gataaaaatc 960

acaaccagcg cagtcacgca taaccgtgca aacctgaatt atctctgag ccattccggg
1020

ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa
1080

ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg
1140

cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac
1200

ctcagtgccga gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag
1260

gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa
1320

agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg
1380

aatcagttt cagaaaaata tggtgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg
1440

caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac
1500

cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt
1560

gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680
acagagaact ggcgctctct ttttgtaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggg cttcagtatt cttaccggaa gcgcttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
aataagttctgggggtatt 1878

<210> 2

<211> 87

<212> DNA

<213> Gen del anticuerpo mimético contra el antígeno de superficie de
Microcystis aeruginosa

<400> 2

tcttattgga tgcagtgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag
60

cagtattggt ctacgccgcc gtggacg 87

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> La secuencia de aminoácidos de los anticuerpos miméticos contra
el antígeno de superficie de *Microcystis aeruginosa*

<400> 3

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr

20 25

<210> 4

<211> 87

<212> DNA

<213> Secuencia VHCDR1 N-C en orden inverso de los genes de los anticuerpos miméticos contra el antígeno de superficie de *Microcystis aeruginosa*

<400> 4

cagatgtggt attcttgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag

60

cagtattggt ctacgccgcc gtggacg 87

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia VHCDR1 N-C en orden inverso de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos miméticos contra el antígeno de superficie de *Microcystis aeruginosa*

<400> 5

Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr

20 25

<210> 6

<211> 1965

<212> DNA

<213> Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido anti-cianobacterias 1

<400> 6

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctgggga tgattcagat 60
ggccatgaaa ttatggccgt tgatattat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtcttcat 120
ggtagcccgct ctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg
180
gttgatgatt cccaacccg aagtgatatc gaaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtag
240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa
300
cgctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt
360
gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag
420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca
480
gagagccgga tgctgttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc
600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggatttc tggacacccg gttgtcagag
660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc
720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg
780

acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa
840

cagaaaaaca cgcctgacgg caaaacgata gttcccctg aaaaattccc ggggcgttca
900

tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccggtac gataaaaatc 960

acaaccagcg cagtcacgca taaccgtgca aacctgaatt atctctgag ccattccggt
1020

ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa
1080

ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg
1140

cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgagg taaattcggc gagaaataac
1200

ctcagtgccca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag
1260

gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa
1320

agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg
1380

aatcagttt cagaaaaata tggtagcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg
1440

caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac
1500

cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt
1560

gagtctgtga agctgtctga tatactgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620

tatgcaggaa aattacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtta ggctgtccgg 1680

acagagaact ggctctctct ttgtgttaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca
1740

acggctcttg tggcactggg cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800

tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860

aataagttct ggggtatttc ttattggatg cagtgggtta agcaaagacc ggggcaaggg

1920

ctggagtgga ttggccagca gtattggtct acgccgccgt ggacg 1965

<210> 7

<211> 654

<212> PRT

<213> Secuencia de amino ácidos de polipéptido anti-cianobacterias 1

<400> 7

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr

1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro

20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe

35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro

50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys

65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu

85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu

100 105 110

Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile

115 120 125

Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly

130 135 140

Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu

145 150 155 160

Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg

165 170 175

Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala

180 185 190

Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg

195 200 205

Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly

210 215 220

Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu

245 250 255

Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg

260 265 270

Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr

275 280 285

Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser

290 295 300

Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr

305 310 315 320

Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser

325 330 335

His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro

340 345 350

Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu

355 360 365

Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn

370 375 380

Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu

385 390 395 400

Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala

405 410 415

Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn

420 425 430

Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr

435 440 445

Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu

450 455 460

Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln

465 470 475 480

Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr

485 490 495

Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg

500 505 510

Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser

515 520 525

Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe

530 535 540

Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr

545 550 555 560

Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly

565 570 575

Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly

580 585 590

Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly

595 600 605

Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly

610 615 620

Ile Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

625 630 635 640

Glu Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr

645 650

<210> 8

<211> 1965

<212> DNA

<213> Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido Antifugal 2

<400> 8

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat 60

ggccatgaaa ttatggccgt tgatatttat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtctttcat 120

ggtaacccgc ctgcatggag ttccctcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg

180

gttgatgatt cccaacccg aagtgatatc gaaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac

240

aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa
300

cgctctctg cggcgattgc tgcaagggaa aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt
360

gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag
420

ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca
480

gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540

tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc
600

gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacacccg gttgtcagag
660

ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc
720

gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagt
780

acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa
840

cagaaaaaca cgcctgacgg caaaacgata gtttcccctg aaaaattccc ggggcgttca
900

tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccgttac gataaaaatc 960

acaaccagcg cagtcacga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt
1020

ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa
1080

ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg
1140

cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac
1200

ctcagtgcc a gaacaaatga gcaaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag
1260

gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcataatc agaagatagc ggaagagaaa
1320

agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg
1380

aatcagttt cagaaaaata tggtgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg
1440

caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac
1500

cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt
1560

gagtcttga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620

tatgcaggaa aatttacaag tcttctgac tggatcactg agtttggtta ggctgtccgg 1680

acagagaact ggcgtcctct tttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca
1740

acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800

tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860

aataagttct ggggtattca gatgtggtat tcttgggtta agcaaagacc ggggcaaggg
1920

ctggagtgga ttggccagca gtattggtct acgccgccgt ggacg 1965

<210> 9

<211> 654

<212> PRT

<213> Secuencia de amino ácido del polipéptido anti-cianobacterias 2

<400> 9

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr

1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro

20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe

35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro

50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys

65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu

85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu

100 105 110

Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile

115 120 125

Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly

130 135 140

Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu

145 150 155 160

Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg

165 170 175

Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala

180 185 190

Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg

195 200 205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly

210 215 220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly

225 230 235 240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu

245 250 255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg

260 265 270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr

275 280 285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser

290 295 300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr

305 310 315 320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser

325 330 335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro

340 345 350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu

355 360 365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn

370 375 380
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu

385 390 395 400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala

405 410 415

Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn

420 425 430

Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr

435 440 445

Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu

450 455 460

Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln

465 470 475 480

Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr

485 490 495

Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg

500 505 510

Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser

515 520 525

Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe

530 535 540

Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr

545 550 555 560

Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly

565 570 575

Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly

580 585 590

Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly

595 600 605

Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly

610 615 620

Ile Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

625 630 635 640

Glu Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr

645 650

VIII-4-1	声明：发明人资格 (仅为指定美国目的) 为指定美国目的的发明人资格声明 (细则4.17(iv)和51之二.1(a)(iv)):	我在此声明我相信我是要求保护和寻求专利的主题的原始、最初和唯一的 (如果只列出了一个发明人) 或者共同的 (如果列出了不只一个发明人) 发明人。 本声明是关于本国际申请的，它是其一个组成部分 (如果本声明与国际申请一起提出)。 本声明是关于PCT/_____号国际申请的 (如果本声明根据细则26之三提出)。 我在此声明我的居所，邮寄地址，和国籍和列在我名字下面的一样。 我在此声明我已检查过并理解上述国际申请的内容，包括所述申请的权利要求书。在所述申请的请求书中，我按照PCT细则4.10写明了对外国优先权的任何要求，并且在下面的“在先申请”栏目下，通过申请号，国家或世界贸易组织成员，申请的日、月、年，我写明了向美国以外的国家提出的，其申请日早于所要求的外国优先权申请的申请日的任何专利申请或者发明人证书申请，包括指定至少一个除美国以外的国家的任何PCT国际申请。
VIII-4-1-1	在先申请:	201110155221.2, CN, 2011年 6月 10日 (10.06.2011) ;201110100775.2, CN, 2011年 4月 21日 (21.04.2011)
		我在此承认自己有义务公开我知道的，根据美国联邦法规 (CFR) 第37篇第1.56条对确定专利性有实质意义的信息，包括对于部分继续申请，在该在先申请的申请日和该部分继续申请的PCT国际申请日之间可得到的实质性信息。 我在此声明所有根据我自己的知识所作的声明是真实的，并且所有根据信息和相信所作的声明相信是真实的；而且在作这些声明时我知道根据美国法典第18篇第1001条故意作假声明以及有关类似行为将受到罚款或监禁或二者并罚的惩罚，并且这样的故意假声明将危害申请或根据该申请授予的任何专利的有效性。

VIII-4-1-1-1	姓名: Name (LAST, First):	丘 小庆 QIU, Xiaoqing
VIII-4-1-1-2	居所: (城市 and 美国的州 (适用时), 或 国家)	北京市, 中国
VIII-4-1-1-3	邮寄地址: Mailing Address:	中国北京市 海淀区苏家坨镇前沙涧村 100095 Qianshajiancun, Sujiatuozen, Haidian District, Beijing 100095, China
VIII-4-1-1-4	国籍:	CN
VIII-4-1-1-5	发明人签字: (该签字必须是发明人的签字, 而不是代理人的签字)	/丘小庆/
VIII-4-1-1-6	日期:	2012年 3月 27日 (27. 03. 2012)

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY
& PARTNERS
9th Floor, Tower B, Zhongguancun Intellectual
Property Mansion
No.21, South Road HaiDian, Haidian District
Beijing 100080
CHINE

Date of mailing (day/month/year) 13 April 2012 (13.04.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC11853-JJQ	International application No. PCT/CN2012/073120

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

PROTEIN DESIGN LAB, LTD. (for all designated States except US)
QIU, Xiaoqing (for US)

International filing date: 27 March 2012 (27.03.2012)

Priority date(s) claimed: 21 April 2011 (21.04.2011)

10 June 2011 (10.06.2011)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau: 06 April 2012 (06.04.2012)

List of designated Offices:

AP: BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP: 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

OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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

ATTENTION: The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to:**

- time limits for entry into the national phase (see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and *PCT Applicant's Guide*, National Phase, especially Chapters 3 and 4)
- requirements regarding priority documents (if applicable) (see *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraph 5.070)

A copy of this notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Blanc Mathieu e-mail pt02.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 02
Facsimile No. +41 22 338 89 65	

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION,
OBTENTION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY
& PARTNERS
9th Floor, Tower B, Zhongguancun Intellectual
Property Mansion
No.21, South Road HaiDian, Haidian District
Beijing 100080
CHINE

Date of mailing (day/month/year) 13 August 2012 (13.08.2012)	
Applicant's or agent's file reference PC11853-JJQ	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/CN2012/073120	International filing date (day/month/year) 27 March 2012 (27.03.2012)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 21 April 2011 (21.04.2011)
Applicant PROTEIN DESIGN LAB, LTD. et al	

The applicant is hereby notified of the date of receipt (or of obtaining by the International Bureau) of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to the date of receipt, **the priority document concerned was submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis)**. This Form replaces any previously issued notification concerning submission, transmittal or obtaining of priority documents.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
21 April 2011 (21.04.2011)	201110100775.2	CN	09 August 2012 (09.08.2012)
10 June 2011 (10.06.2011)	201110155221.2	CN	09 August 2012 (09.08.2012)

The letters "NR" denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis). Where the applicant has failed to either submit, request to prepare and transmit, or to request the International Bureau to obtain the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

An asterisk "*" next to a date of receipt, denotes a priority document submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a); the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b) or the request to the International Bureau to obtain the priority document was made after the applicable time limit under Rule 17.1(b-bis)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 65	Authorized officer Lingfei Bai e-mail pt02.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 02
---	---



**DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE
PATENT COOPERATION TREATY (PCT)**

International application number:	PCT/CN2012/073120
International filing date:	27 March 2012 (27.03.2012)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: CN
	Number: 201110100775.2
	Filing date: 21 April 2011 (21.04.2011)
Date of receipt at the International Bureau:	09 August 2012 (09.08.2012)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请文件副本。

申 请 号： 201110100775.2

申 请 类 型： 发明专利

发 明 创 造 名 称： 抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法

申 请 日： 2011.04.21

申 请 人： 畿晋庆三联(北京)生物技术有限公司

发明人或设计人： 丘小庆

中华人民共和国国家知识产权局局长

2012 年 07 月 30 日

权 利 要 求 书

P 1 1 2 0 4 / J J Q

- 1.抗蓝藻重组抗体多肽,由抗蓝藻的抗体模拟物多肽可操作地线性连接在大肠菌素多肽的羧基端构成,所述抗蓝藻的抗体模拟物多肽是基于 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体的抗原结合片段设计的具有蓝藻识别结合能力的多肽。
- 2.根据权利要求 1 所述的抗蓝藻重组抗体多肽,所述抗体模拟物多肽为 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体的抗原结合片段的重链 V_HCDR1、V_HFR2 结构域和抗原结合片段的轻链 V_LCDR 结构域按 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 连接而成。
- 3.根据权利要求 1 或 2 所述的抗蓝藻重组抗体多肽,所述大肠菌素选自大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N。
- 4.根据权利要求 3 所述的抗蓝藻重组抗体多肽,其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。
- 5.编码权利要求 1~4 任一所述抗蓝藻重组抗体多肽的基因。
- 6.根据权利要求 5 所述的基因,核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。
- 7.含有权利要求 5 或 6 所述的基因的重组表达载体。
- 8 权利要求 1~4 任一所述抗蓝藻重组抗体多肽的制备方法,其步骤如下:将编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因导入到大肠杆菌表达系统中,培养转化的大肠杆菌,然后分离大肠杆菌表达的多肽。
9. 权利要求 1~4 任一所述抗蓝藻重组抗体多肽在治理水体过度营养化中的应用。



抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法

技术领域

本发明涉及环保生物技术，特别是一种重组的抗蓝藻重组多肽及其基因与制备方法。

背景技术

水体过度营养化造成的蓝藻增生、水体污染是目前威胁世界范围水环境的最大危害，给人类造成巨大的经济损失，给地球生物圈造成无法修复的危害。随着我国经济发展造成的加速工业化和城镇化，生态环境污染和恶化日益加剧，水环境生态防治已成为我们必需面对和解决的重大问题。

现用抗菌药物对蓝藻基本无效；蓝藻属细菌域第 X 门-蓝细菌门的一类原核细胞，目前能够控制蓝藻的只有重金属类化学制剂，如硫酸铜等。而在实际应用中，由于效果有限，往往不惜超剂量多次重复用药，造成的结果是在杀伤蓝藻的同时也将水体中其他有益藻类、水生植物和生物破坏殆尽，给环境造成了无法逆转的永久性破坏。同时重金属类化学制剂在环境和农产品的残留量越来越大，因此人类急需开发高效且使用安全的抗蓝藻药物。

发明内容

本发明的一个目的在于提供一种新型的重组抗蓝藻多肽的基因、重组质粒、多肽；此种多肽能特异的杀灭蓝藻细胞而不会伤害其他藻类细胞、植物和动物。本发明的再一目的是提供上述重组抗蓝藻多肽的制备方法。

一种抗蓝藻重组抗体多肽，由抗蓝藻的抗体模拟物多肽可操作地线性连接在大肠菌素多肽的羧基端构成，所述抗蓝藻的抗体模拟物多肽是基于 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体的抗原结合片段设计的具有蓝藻识别结合能力的多肽。

所述抗体模拟物多肽为 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体的抗原结合片段的重链 V_HCDR1、V_HFR2 结构域和抗原结合片段的轻链 V_LCDR 结构域按 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 连接而成。

所述大肠菌素选自大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N。

所述抗蓝藻重组抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。

所述抗蓝藻重组抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.9 所示。

编码上述抗蓝藻重组抗体多肽的基因。

所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。



所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。

含有上述基因的重组表达载体。

上述抗蓝藻多肽的制备方法，其步骤如下：将编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因导入到大肠杆菌表达系统中，培养转化的大肠杆菌，然后分离大肠杆菌表达的多肽。

上述抗蓝藻重组抗体多肽在治理水体过度营养化中的应用。

本发明提供一种抗蓝藻重组抗体多肽，由大肠菌素多肽和抗蓝藻细胞表面抗原的抗体模拟物多肽组合而成。在该多肽分子中，抗蓝藻细胞表面抗原的抗体模拟物用于识别并结合蓝藻使分子中的大肠菌素攻击蓝藻。由于抗体模拟物为识别蓝藻表面抗原的抗体模拟物，因此本发明的多肽具有专门攻击蓝藻细胞而不损害其它水体生物，因而不会污染水源，用于水体蓝藻污染的治理非常环保和安全。本发明的抗蓝藻重组抗体多肽的基于 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体的抗原结合片段（Fab）的轻链和重链的氨基酸序列及核苷酸序列设计出的具有蓝藻识别结合能力的抗体模拟物，如单链抗体、抗体小分子模拟物等本领域已经熟知的抗体模拟物。在本发明中，设计的抗体模拟物只需要具有抗原识别能力即可实现发明目的，因为抗体模拟物的任务只是引导重组多肽分子到达目标生物细胞表面，然后由重组多肽中的大肠菌素在目标细胞膜上制造离子通道从而是目标细胞内溶物泄露而死。因此，基于上述单克隆抗体设计的抗体模拟物，只要能起到识别目标抗原的目的，这些抗体模拟物与大肠菌素连接而成的重组多肽都属于本发明保护的范围。

在本发明的优选实施方式中，抗体模拟物为抗蓝藻原生质体表面抗原的单克隆抗体（由 CGMCC No.4783 的杂交瘤细胞分泌）的几个结构域按 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构连接而成的 28 肽抗体模拟物。室内外实验证明，该抗体模拟物构成的抗蓝藻多肽可以在水介质中自由游动，具有自动寻找蓝藻细胞表面抗原的生物学活性。28 肽抗体模拟物构成具有易于克隆和表达且具有与原始抗体相同的识别活性的优点，可以引导重组多肽中的大肠菌素到达蓝藻细胞膜上形成离子通道来杀伤这些蓝藻细胞，该重组多肽具有现用治理水污染药物（如硫酸铜等）所无法比拟的、具有生态-环境安全性。

本发明中，构建重组抗蓝藻多肽的大肠菌素可选自能形成离子通道的大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N，在本发明的实施例验证了大肠菌素 Ia 与抗蓝藻抗体模拟物构建的重组多肽，但发明利用的是这些大肠菌素在细菌胞膜上形成离子通道来杀死细菌的这一共性，因此，按照本发明的构思，这些大肠菌素与抗蓝藻的抗体模拟物多肽线性连接构成的重组多肽都能够实现本发明的目的—即提供能够杀死蓝藻的重组多肽。

本发明还提供了包含重组多肽的基因的重组质粒的制备方法，是将编码抗体模拟物的核苷酸序列经双链寡聚核苷酸点突变技术插入大肠菌素的羧基端形成本发明的重组质粒。



说明书

以选用大肠菌素 Ia 为例，将编码抗体模拟物的核苷酸序列插入 Ia 基因的第 626 位氨基酸后（羧基端）而形成本发明的重组质粒。构建重组质粒的原始商用质粒 pSELECT-1 来自于 Promega 公司,其中装载了大肠菌素 Ia 和相应的 Immunity 蛋白基因,针对抗体模拟物基因设计了数对引物,其序列见实施例 1。利用双链寡聚核苷酸点突变技术，按照 Strategene 公司试剂盒操作获得重组质粒，例如 pCHCcyanoMA1。

本发明的又一方面，提供本发明所述抗蓝藻多肽的制备方法，将编码抗体模拟物的基因可操作地与大肠菌素基因连接获得编码重组抗蓝藻多肽基因的重组质粒，将获得的重组质粒转染入大肠杆菌工程菌中而获得可产生重组抗蓝藻多肽的工程菌细胞。用离子交换柱分离纯化即获得本发明所述的抗蓝藻多肽。

本发明所述抗蓝藻多肽可用于治理水污染。可以通过将本发明中的多肽添加可接受的载体或赋形剂或可选的其它成分而制成适于环境使用的药物组合物。其机理是：多肽中可与蓝藻细胞表面抗原识别的抗体模拟物诱导大肠菌素到达蓝藻细胞膜附近，然后大肠菌素离子通道结构域的疏水区段插入蓝藻细胞膜中，进而大肠菌素离子通道结构域在蓝藻细胞膜上形成离子通道,使蓝藻细胞内容物泄漏而致蓝藻细胞死亡，从而达到杀死蓝藻细胞的目的。

本发明所述的抗蓝藻多肽相较于传统抗蓝藻药物的优点在于，其具有特异的靶向性，因而在治理过程中不会攻击其他藻类、植物和动物细胞，其毒性和不良反应远低于传统抗蓝藻药物。再由于它是在蓝藻细胞膜上直接形成离子通道来杀伤蓝藻细胞，因此在抗蓝藻多肽—离子通道造成泄漏而致蓝藻细胞死亡的这一较短时限内，蓝藻细胞较难利用突变基因—蛋白表达方式来修复抗蓝藻多肽—离子通道在蓝藻细胞膜上造成的几何缺损，所以蓝藻细胞对本发明的抗蓝藻多肽产生耐药性的概率较低。这预示本发明所述抗蓝藻多肽具有良好的应用前景。

杂交瘤保藏信息：

保藏号：CGMCC No.4783

杂交瘤名称：抗蓝藻细胞表面抗原的单克隆抗体杂交瘤细胞

保藏日期：2011 年 4 月 20 日

保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会 普通微生物中心

保藏单位地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

附图说明

图 1.是含有抗体模拟物和大肠菌素 Ia 基因的重组质粒 pCHCcyanoMA1 的结构示意图。



说明书

P 1 1 2 0 4 / J J Q

图 2.为抗蓝藻多肽结构示意图。

图 3.是含有部分基因颠倒 N-C 顺序的抗体模拟物基因和大肠菌素 Ia 基因的重组质粒 pCHCcyanoMA2 的结构示意图。

图 4.为本发明抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中铜绿微囊藻的抑制试验结果。

图中 A， 空白对照液， B， 氨苄青霉素 50 μ g/ml， C， 广谱信息菌素（Ph-NM） 50 μ g/ml， D， 抗蓝藻多肽（1） 50 μ g/ml， E， 抗蓝藻多肽（2） 50 μ g/ml。

图 5. 为本发明抗蓝藻多肽（1） 对生长于液体培养基中铜绿微囊藻的抑制试验结果。

图中 A， 处理 48 小时后， B， 处理 72 小时后， C， 处理 96 小时后。图中每一列从左至右共 6 个烧瓶， 依次为 1， 对照， 2， 0.1 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 3， 0.5 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 4， 1 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 5， 5 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 6， 10 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）。

图 6. 为本发明抗蓝藻多肽（1） 对生长于液体培养基中栅藻的抑制试验结果。

处理 10 日后， 图中每一列从左至右共 6 个烧瓶， 依次为 1， 对照， 2， 1 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 3， 5 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 4， 10 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 5， 15 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）， 6， 20 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）。

图 7.为本发明抗蓝藻多肽（1） 对生长于液体培养基中铜绿微囊藻、 栅藻的抑制试验结果。上图为铜绿微囊藻的结果， 下图为栅藻的试验结果。

图 8.为本发明抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中铜绿微囊藻、 鱼腥藻、 小球藻、 栅藻的抑制试验结果。

图中左侧烧瓶为对照， 右侧烧瓶为 35 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1）。A， 铜绿微囊藻， B， 鱼腥藻， C， 小球藻， D， 栅藻。

图 9.为本发明抗蓝藻多肽对蓝藻污染的自然水体抑制试验结果。

图中 A， 空白对照， B， 抗蓝藻多肽（1） 1 μ g/ml， C， 抗蓝藻多肽（1） 5 μ g/ml， D， 抗蓝藻多肽（1） 10 μ g/ml， E， 硫酸铜 0.7 μ g/ml。

图 10.为图 9 抑制试验的部分测试结果。

A， 水体中光密度变化， B， 水体中叶绿素 a 变化， C， 水体中 pH 变化， D， 水体中优势藻类种群变化。

D-1, 对照组， D-2, 1 μ g/ml 抗蓝藻多肽（1） 处理组， D-3, 0.7 μ g/ml 硫酸铜处理组。

图 11.为图 9 中抗蓝藻多肽对蓝藻污染的自然水体抑制试验的显微镜观察结果（放大 400 倍）。



说明书

P 1 1 2 0 4 / J J Q

分别为对照、抗蓝藻多肽(1) 1 $\mu\text{g/ml}$ 和硫酸铜 0.7 $\mu\text{g/ml}$ 处理水体中藻类(鱼腥藻)在 A, 第一日, B, 第二日, C, 第三日, D, 第四日, E, 第五日的变化。

具体实施方式

实施例 1 表达抗蓝藻多肽的质粒的构建和重组抗蓝藻多肽的制备

材料: 杂交瘤细胞 CGMCC No.4783。

步骤 1. 抗体模拟物的核苷酸序列及氨基酸序列的获得: 收集杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体, 采用常规方法对单克隆抗体进行测序获得抗原结合片段 Fab 重链和轻链序列后, 根据抗原互补决定区的氨基酸序列设计得到抗体模拟物氨基酸序列, 如 SEQ ID NO.3 所示, 编码该抗体模拟物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

步骤 2. 原始质粒为装载了大肠菌素 Ia 和 Immunity 蛋白基因的 pSELECT-1 质粒(购自 Promega 公司, 上述基因由本实验室装载), 经双链寡聚核苷酸点突变技术(QuickChange™ Kit, Strategene 公司)将编码抗蓝藻的抗体模拟物的基因(序列表中 SEQ ID NO.2 所述核苷酸序列)插入到大肠菌素 Ia 基因的 I626 位点后, 得到重组质粒 pCHCcyanoMA1 (如图 1 所示), 重组质粒转染入 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌里表达制备多肽, 获得序列表如 SEQ ID NO.7 所述的抗蓝藻多肽, 在后续的实施例中称为“抗蓝藻多肽(1)”, 其分子量约 70,000。

突变程序按 Strategene QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (catalog#200518)药箱手册进行:

1、准备点突变反应物

- 5 ul 10 x buffer
- 2 ul (10 ng) 野生型大肠菌素 Ia 质粒
- 1 ul(125ng) 设计的 5'-3' 寡聚核苷酸引物
- 1 ul(125ng) 设计的 3'-5' 寡聚核苷酸引物
- 1 ul dNTP
- 双蒸水 50 ul
- 1 ul pfu
- (除质粒, 引物和双蒸水外,均为药箱所备试剂)

2、进行 PCR 扩增, 扩增条件: 变性 95℃, 35 秒, 退火 53℃, 70 秒, 延伸 68℃, 17 分共 20 个循环;

3、加入 Dpn1 内切酶 1 ul 消化母体 DNA 链后(37℃, 1 小时), 取 1 ul 反应物与 HMS174 感受态细胞 50 ul 冰孵 30 分钟, 行热冲击 42℃, 45 秒, 再置入冰中 2 分钟;



说明书

4、加入 NZY 培养基 0.5 ml 后 220rpm, 37℃摇菌 1 小时后, 取 50-100 ul 反应物铺板(LB 培养基加 1%琼脂加 50 ug/ml 氨苄青霉素, 37℃过夜);

5、18 小时后挑菌,循 Qiagene,Gibco 等公司的各种商用提取质粒药箱提取质粒均可, 测序确定突变成功;

6、将质粒 50 ng 与制备的 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌感受态细胞 50 ul 冰孵 30 分, 42℃, 30 秒热冲击, 取 50-100 ul 反应物加入 SOC 培养基 0.5 ml, 220 rpm, 37℃摇菌 1 小时后铺板(LB 培养基加 1 % 琼脂加 50 ug/ml 氨苄青霉素) 37℃孵育,12-16 小时后挑取菌落;

7、大量增菌,8-16 升 LB 培养基, 250rpm, 37℃,6-8 小时;离心沉淀菌体, 4℃, 6000g, 20 分钟,取 4℃, 50 mM Borate, 2mM EDTA, pH 9.0) 50-80ml 悬浮菌体,加入 0.2 M PMSF 250 微升后行超声破碎(4℃, 400W, 2 分钟), 高速离心沉淀破碎菌体(4℃, 75000g, 1.5 小时), 取上清经硫酸链霉素沉淀 DNA, 装入分子量 15,000 的透析袋于 4℃, 50 mM Borate, 2mM EDTA, pH 9.0 缓冲液 10 升 透析过夜后, 将上清上样于 CM 柱 (Amersham Biosciences), 经 50 mM Borate, 0.3 M NaCl, 2mM EDTA, pH 9.0 缓冲液, 4℃) 洗脱后即可得到重组抗蓝藻多肽 (1) (请见图 2)。

下面列出为制备 pCHCcyanoMA1 质粒的抗体模拟物基因所设计的具体双链寡聚核苷酸序列:

pCHCcyanoMA1

1、 5'-3'

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCT TAT TGG ATG CAG TGG GTT AAG CAA taa ata aaa tat
aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta TTG CTT AAC CCA CTG CAT CCA ATA AGA aat acc cca gaa ctt
att cgc

2、 5'-3'

tat tgg atg cag tgg gtt aag caa AGA CCG GGG CAA GGG CTG GAG TGG ATT GGC taa ata aaa tat
aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GCC AAT CCA CTC CAG CCC TTG CCC CGG TCT ttg ctt aac
cca ctg cat cca ata



3、5'-3'

ggg caa ggg ctg gag tgg att ggc CAG CAG TAT YGG TCT ACG CCC CCG TGG ACG taa ata aaa tat
aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CGT CCA CGG GGG CGT AGA CCA ATA CTG CTG gcc aat cca
ctc cag ccc ttg ccc

实施例 2 表达抗蓝藻多肽的对照质粒的构建和对照重组抗蓝藻多肽的制备

原始质粒为装载了大肠菌素 Ia 和 Immunity 蛋白基因的 pSELECT-1 质粒(购自 Promega 公司,上述基因由本实验室装载),经双链寡聚核苷酸点突变技术(QuickChange™ Kit, Strategene 公司) 将编码抗蓝藻的抗体模拟物的基因(序列表中 SEQ ID NO.4 所述核苷酸序列)插入到大肠菌素 Ia 基因的 I626 位点后, 得到重组质粒 pCHCcyanoMA2 (如图 3 所示), 重组质粒转染入 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌里表达制备多肽, 获得序列表如 SEQ ID NO.9 所述的抗蓝藻多肽, 在后续的实施例中称为“抗蓝藻多肽 (2)”, 其分子量约 70,000。

制备 pCHCcyanoMA2 质粒的模拟物基因的双链寡聚核苷酸序列按实施例 1 的方法设计。其制备方法同实施例 2。

实施例 3 抗蓝藻多肽对铜绿微囊藻的抑制试验结果

试验 (1)

步骤1. 准备试验藻: 蓝藻为购自中国科学院水生生物研究所的 FACHB-978 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)。

试验藻的培养方法: 将藻种接种到装有250ml BG11培养基的500 ml容积锥形瓶中, 置于光照培养箱中。接种初始藻细胞密度为 5×10^4 个/mL, 锥形瓶用透气膜封盖, 以防污染。培养温度为 25℃, 光照强度为 $(2500 \pm 10\%)$ Lux; 光暗比为12h/12h。为减少因光照不均匀可能造成的影响, 每隔 2~3 h 摇动并更换各实验组锥型瓶的位置 1 次。自接种的第 5 天起, 每隔 24 h 取样、测定 1 次。待藻细胞数密度达到 10^6 个/mL数量级左右时, 即可开始下一步试验。

步骤 2.在五个试管 A、B、C、D、E 中分别加入制备好的蓝藻液 1 ml, 然后加入抑制剂: A 空白对照液, B 氨苄青霉素 50 μ g/ml, C 广谱信息菌素 (申请号为 200910092128.4



中公开的 Ph-AM1) 50 $\mu\text{g/ml}$, D 抗蓝藻多肽 (1) 50 $\mu\text{g/ml}$, E 抗蓝藻多肽 (2) 50 $\mu\text{g/ml}$ 后, 五个试管置于孵箱中低速振荡培养 12 小时后, 都加入吖啶橙 (按 50 nM 加入) 和碘化丙啶 (按 600 nM 加入) 孵化 30 分钟, 吸取数微升置于载玻片上, 荧光显微镜 (Nikon 90i, DM505 和 DM565 滤光镜片) 观察活蓝藻染色情况。

结果如图 4 所示。结果显示只有抗蓝藻多肽 (1) 杀伤了培养的铜绿微囊藻。而抗蓝藻多肽 (2)、氨苄青霉素、Ph-NM 对所培养的铜绿微囊藻均无作用。

试验 (2)

步骤 1 同试验 (1) 步骤 1。

步骤 2. 直接在 6 个接种了试验藻的 500 ml 的锥形瓶中按浓度梯度加入抗蓝藻多肽。铜绿微囊藻加入抗蓝藻多肽的剂量为: 0、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/ml}$, 每日观察对蓝藻的生长抑制情况。

结果如图 5 所示。由于各处理组所用的抗蓝藻多肽 (1) 浓度不一样, 锥形瓶中铜绿微囊藻液由绿色变成浅黄色之时间快慢与多肽的浓度成正比, 然在 72 小时内, 肉眼可观察到各处理组均可有效杀灭所试之铜绿微囊藻。

上述结果证明, 抗蓝藻多肽 (1) 具有靶向杀伤蓝藻的效力, 而抗蓝藻多肽 2 几乎无效。

试验 (3)

材料: 购自中科院水生生物研究所的 FACHB-417 斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 采用试验 (1) 中步骤 1 的方法培养试验藻。

步骤 2. 直接在 6 个接种了试验藻的 500 ml 的锥形瓶中按浓度梯度加入抗蓝藻多肽 (1), 剂量分别为: 0、1、5、10、15、20 $\mu\text{g/ml}$ 。每日观察对栅藻的生长抑制情况。

结果如图 6 所示。虽然加入的抗蓝藻多肽 (1) 剂量相对铜绿微囊藻处理组大了 10 倍, 肉眼在试验期间 (190 小时) 未观察到抗蓝藻多肽 (1) 表现出任何对所试栅藻的杀伤作用。

结果如图 6 所示。虽然加入的抗蓝藻多肽 (1) 剂量相对铜绿微囊藻处理组大了 10 倍, 肉眼在试验期间 (190 小时) 未观察到抗蓝藻多肽 (1) 表现出任何对所试栅藻的杀伤作用。

试验 (4)

以上试验 (1) ~ (3) 每瓶取 0.1 mL 培养液, 置于血球计数板中, 在显微镜下观察、计数。图 7 所示的藻细胞计数显示与对照相比较, 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1) 在 72 小时内即可杀灭所试之铜绿微囊藻。而 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1) 对所试之栅藻几乎无任何作用。



实施例 4. 抗蓝藻多肽对抗铜绿微囊藻、鱼腥藻、小球藻、栅藻的液体培养基试验

所试藻类为购自中科院水生所的铜绿微囊藻、鱼腥藻、小球藻和栅藻。藻类培养和加入处理剂之方法同实施例 3 的试验 (1) 的步骤 1。

取藻细胞数密度达到 10^6 个/mL 数量级的培养藻液 40 ml 分装于 300ml 锥形瓶中, 各加入 A: 加入等量的空白对照液, B: 加入抗蓝藻多肽 (1) 35 $\mu\text{g/ml}$, 继续培养 4 日, 观察其生长情况。

结果如图 8 所示。24 小时后, 铜绿微囊藻和鱼腥藻藻液颜色开始变浅, 至第 4 日藻液已变清亮。而小球藻和栅藻藻液颜色和浊度均无变化。该结果显示抗蓝藻多肽 1 抑制了所试铜绿微囊藻、鱼腥藻的生长, 却不能抑制小球藻、栅藻的生长。

上述结果证明, 抗蓝藻多肽 (1) 具有靶向杀伤蓝藻的效力。

实施例 5 抗蓝藻多肽对自然水体中蓝藻的杀灭试验

自然水体采自被蓝藻严重污染的苏州阳澄湖沼虾养殖池, 25-35 升分装于 60 x 40 x 30 厘米塑料养殖盆中, 每隔 20 分钟气泵送气 10 分钟; 加热器自动调温至 27°C , 光照强度为 $(2500 \pm 10\%) \text{ lux}$; 光暗比为 12 h / 12 h, 每日采样检测养殖水体 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值 (请见图 9)。

将采样液置于可见分光光度计中测定 650 nm 光吸收值 (请见图 10)。

利用热乙醇-反复冻融-分光光度法测定叶绿素 a 含量 (请见图 10)。用分光

光度计于 665、700 nm 下测其吸光度, 计算叶绿素 a 的浓度。其公式为:

$$[\text{Chl}a] = [12.12 (D_{664} - D_{750}) - 1.58 (D_{647} - D_{750}) - 0.08 (D_{630} - D_{750})] \times 10^6 / V \cdot d。$$

对照组水体中的 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值在试验期间一直居高不下, 而抗蓝藻多肽 (1) 组和硫酸铜组水体的 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值自第二日起即显著下降。

每日采样 30 ml 水样用福尔马林固定后, 离心浓缩 10 倍, 取 0.1 mL 置于血球计数板中, 在显微镜下观察、计数 (请见图 11)。镜检中可见在第一日, 对照组、抗蓝藻多肽 (1) 组和硫酸铜组水体中可见大量生长茂盛的鱼腥藻; 而自第二日起, 抗蓝藻多肽 (1) 组和硫酸铜组水体中的鱼腥藻大量减少、碎裂; 至第五日抗蓝藻多肽 (1) 组和硫酸铜组水体中已找不到鱼腥藻, 而对照组水体中仍见大量鱼腥藻生长。

显微镜检观察藻类形态变化, 同时对各种藻类计数以确定养殖水体中浮游植物优势种群的动态变化 (请见图 10)。在对照组水体中, 鱼腥藻和铜绿微囊藻始终为优势藻种; 在抗蓝藻多肽 (1) 组水体中, 鱼腥藻和铜绿微囊藻逐渐减少, 小球藻变成为优势藻种;





说明书

P 1 1 2 0 4 / J J Q

在硫酸铜组水体中，鱼腥藻和铜绿微囊藻逐渐减少，而另一种蓝藻，颤藻变成为优势藻种。

表 1 抗蓝藻多肽处理之浮游植物细胞计数及形态变化（个/升）

	给药当日	第二日	第三日	第四日	第五日
对照组	32745	26363 藻形态无变化	33194 藻形态无变化	41068 藻形态无变化	17954 藻形态无变化
1mg/L 多肽	50394	43981 大多数鱼腥藻 变成单细胞或 2-5 个的短链	10624 鱼腥藻已无长 链，多为 1-5 个细胞的短链	5370 很少量鱼腥藻， 多为 1-5 个细 胞的短链	3432 几乎无鱼腥藻 细胞
5mg/L 多肽	43987	40828 同 1mg/L 之 变化	20744 同 1mg/L 之 变化	9890 同 1mg/L 之 变化	3680 几乎无鱼腥藻 细胞
10mg/L 多肽	48101	41787 同 1mg/L 之 变化	23443 同 1mg/L 之 变化	14214 同 1mg/L 之 变化	4902 几乎无鱼腥藻 细胞
20mg/L 多肽	45588	39194 同 1mg/L 之 变化	33453 同 1mg/L 之 变化	4800 几乎无鱼腥藻 细胞	3508 几乎无鱼腥藻 细胞
0.7mg/L 硫酸铜	22930	1266 鱼腥藻全部变 成单细胞	499 藻类几乎都变 成有机碎屑	305 藻类少	379 藻类少

结果如图 9-11 和表 1 所示。结果显示 0.7 ppm 硫酸铜几乎不加选择的杀伤了所有藻类。而抗蓝藻多肽（1）却能够靶向抑制养殖水体中蓝藻（鱼腥藻、铜绿微囊藻）的生长，而对养殖水体中其他浮游植物的生长基本无影响。



SEQUENCE LISTING

<110> 畿晋庆三联（北京）生物技术有限公司

<120> 抗蓝藻多肽及其基因与制备方法

<130> P11204/JJQ

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1878

<212> DNA

<213> 编码大肠菌素 Ia 的核苷酸序列

<400> 1

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat	60
ggccatgaaa ttatggccgt tgatatattat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtctttcat	120
ggtacccgcg ctgcatggag ttccttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg	180
gttgatgatt ccccaaccg aagtgatatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac	240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa	300
cgctctcttg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt	360
gccgaaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag	420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccgatatg acgccctcgg gctgcataca	480
gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctcccgg ggaggccagg	540
togttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc	600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacaccgg gttgtcagag	660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc	720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg	780



acggaatgc ttaacacggc cegtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840
cagaaaaaca cgcctgacgg caaaacgata gtttccctg aaaaattccc ggggcgttea 900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatecgagat ttgccgtac gataaaaatc 960
acaaccagcg cagtcatcga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt 1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtgacaga ggatgtggaa 1080
ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
cttgatgcc aataaaaat cacctctgct gaatctcgg taaattcggc gagaaataac 1200
ctcagtgcc gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag 1260
gaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
aatcagttt cagaaaaata tggcgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatggt gaagaggcat taaaacgta tgaaaagtac 1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgcctgac tggatcactg agtttggtta ggctgtccgg 1680
acagagaact ggcgctctct tttgtttaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaaccgaa gcgctttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccgggtgc ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
aataagttct ggggtatt 1878

- <210> 2
- <211> 87
- <212> DNA
- <213> 抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物基因





<400> 2
tcttattgga tgcagtgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag 60

cagtattgggt ctacgccgcc gtggacg 87

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物的氨基酸序列

<400> 3

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr
20 25

<210> 4
<211> 87
<212> DNA
<213> VHCDR1 N-C 序列颠倒之抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物的基因

<400> 4
cagatgtgggt attcttgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag 60

cagtattgggt ctacgccgcc gtggacg 87

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> VHCDR1 N-C 序列颠倒之抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物氨基酸序列

<400> 5

Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr



20

25

<210> 6

<211> 1965

<212> DNA

<213> 编码抗蓝藻多肽 1 核苷酸序列

<400> 6

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat 60

ggccatgaaa ttatggccgt tgatatttat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtctttcat 120

ggtacccgcg ctgcatggag ttccttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg 180

gttgatgatt cccaaccog aagtgatatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac 240

aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa 300

cgctctcttg cggcgattgc tgcaagggaa aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt 360

gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactoct gcaggcagag 420

ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480

gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540

tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600

gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacaccog gttgtcagag 660

ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720

gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg 780

acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840

cagaaaaaca cgctgacgg caaaacgata gtttccctg aaaaattccc ggggcgttca 900

tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccgttac gataaaaatc 960

acaaccagcg cagtcacga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt 1020

ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa 1080





ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac 1200
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag 1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
aatcagttt cagaaaaata tgggtcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtog gggactggga 1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcaactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680
acagagaact ggcgtcctct ttttgtaaa acagaaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggg cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccgggtcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
aataagttct ggggtatttc ttattggatg cagtgggtta agcaaagacc ggggcaaggg 1920
ctggagtgga ttggccagca gtattggtct acgccgcgt ggaacg 1965

<210> 7
<211> 654
<212> PRT
<213> 抗蓝藻多肽 1 氨基酸序列

<400> 7

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro





	20		25		30
Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe					
	35		40		45
Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro					
	50		55		60
Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys					
65		70		75	80
Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu					
	85		90		95
Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu					
	100		105		110
Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile					
	115		120		125
Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly					
	130		135		140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu					
145		150		155	160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg					
	165		170		175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala					
	180		185		190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg					





195	200	205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly		
210	215	220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly		
225	230	235 240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu		
	245	250 255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg		
	260	265 270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr		
	275	280 285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser		
	290	295 300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr		
305	310	315 320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser		
	325	330 335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro		
	340	345 350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu		
	355	360 365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn		





370	375	380
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu		
385	390	395 400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala		
	405	410 415
Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn		
	420	425 430
Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr		
	435	440 445
Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu		
	450	455 460
Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln		
465	470	475 480
Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr		
	485	490 495
Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg		
	500	505 510
Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser		
	515	520 525
Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe		
	530	535 540
Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr		





73

545550555560

Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly

565570575

Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly

580585590

Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly

595600605

Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly

610615620

Ile Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

625630635640

Glu Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr

645650

<210> 8
<211> 1965
<212> DNA
<213> 编码抗真菌多肽 2 核苷酸序列

<400> 8

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat60

ggccatgaaa ttatggccgt tgatatattat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtctttcat120

ggtaccccg cctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg180

gttgatgatt cccaacccg aagtgatatc gaaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac240

aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa300

cgcctctctg cggcgattgc tgcaagggaa aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt360



gccggaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480
gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacacccg gttgtcagag 660
ctggaaaaaa atggcggggc agccctigcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagt 780
acggaatgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840
cagaaaaaca cgctgacgg caaaaagata gttcccttg aaaaattccc ggggcgttca 900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccgtac gataaaaatc 960
acaaccagcg cagtcatoga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt 1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa 1080
ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac 1200
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag 1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
aatcagttt cagaaaaata tgggtcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
caggctaaag ggaagaaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680



acagagaact ggcgtcctct tttgtttaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggc cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccggcgct ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
aataagttct ggggtattca gatgtggtat tcttgggtta agcaaagacc ggggcaaggg 1920
ctggagtgga ttggccagca gtattgtctc acgccgccgt ggacg 1965

<210> 9
<211> 654
<212> PRT
<213> 抗蓝藻多肽 2 氨基酸序列

<400> 9

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro
20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu





100	105	110
Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile		
115	120	125
Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly		
130	135	140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu		
145	150	155 160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg		
165	170	175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala		
180	185	190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg		
195	200	205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly		
210	215	220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly		
225	230	235 240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu		
245	250	255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg		
260	265	270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr		





275	280	285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser		
290	295	300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr		
305	310	315 320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser		
	325	330 335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro		
	340	345 350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu		
	355	360 365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn		
	370	375 380
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu		
385	390	395 400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala		
	405	410 415
Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn		
	420	425 430
Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr		
	435	440 445
Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu		





450	455	460
Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln		
465	470	475 480
Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr		
	485	490 495
Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg		
	500	505 510
Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser		
	515	520 525
Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe		
	530	535 540
Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr		
545	550	555 560
Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly		
	565	570 575
Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly		
	580	585 590
Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly		
	595	600 605
Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly		
	610	615 620
Ile Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		



79

640

15



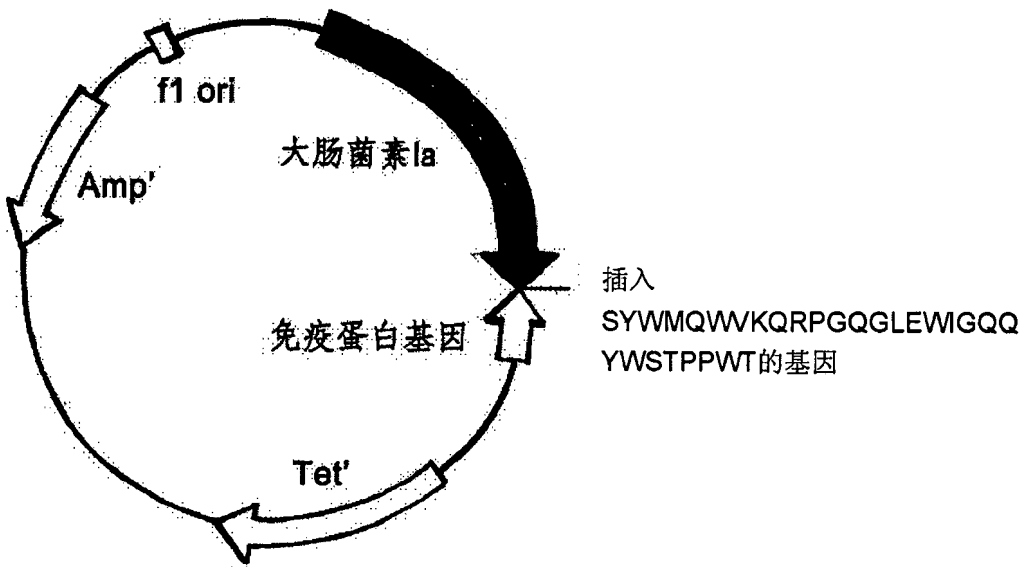


图 1

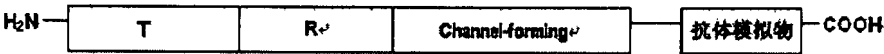


图 2

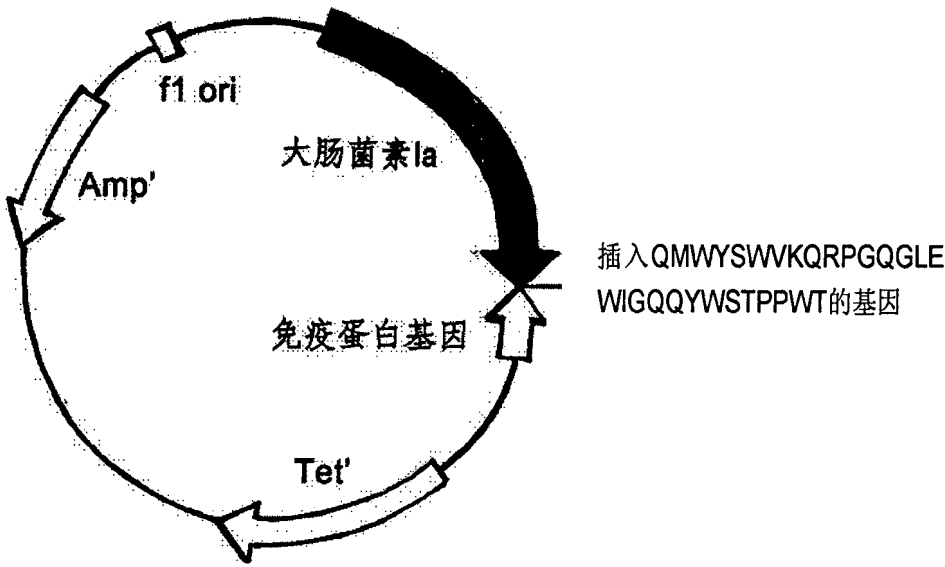


图 3



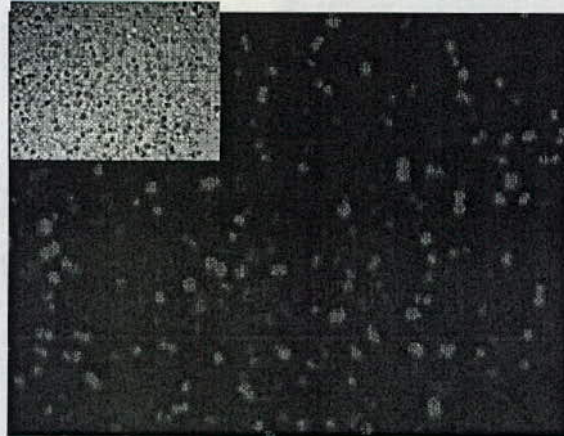


图 4A

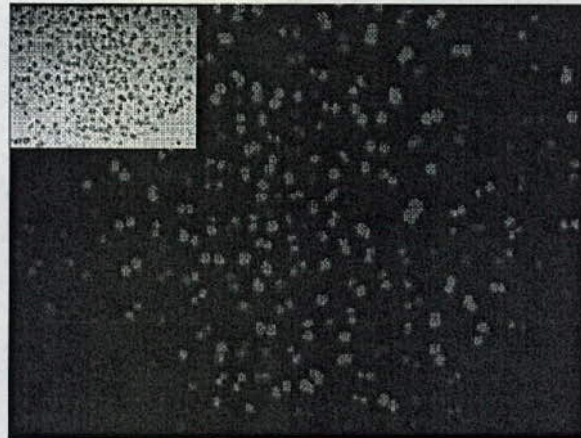


图 4B



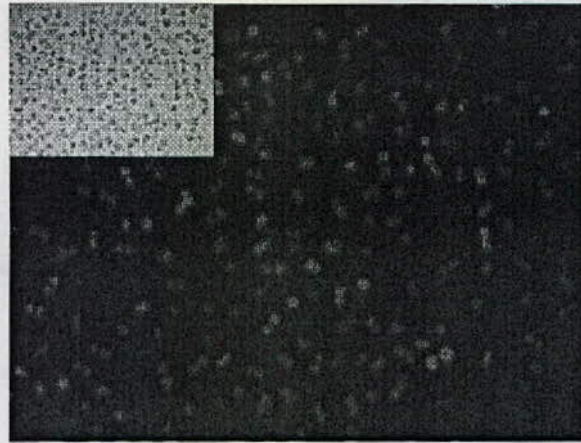


图 4C

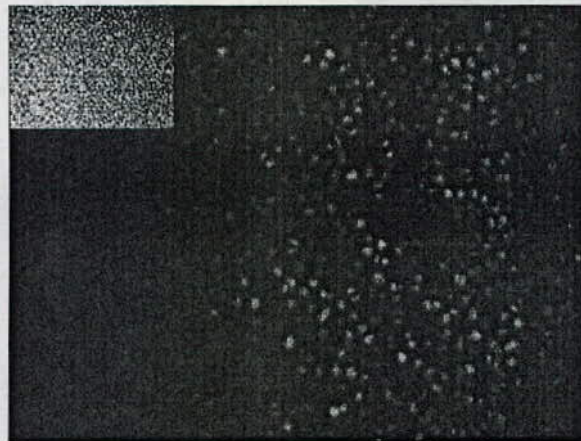


图 4D

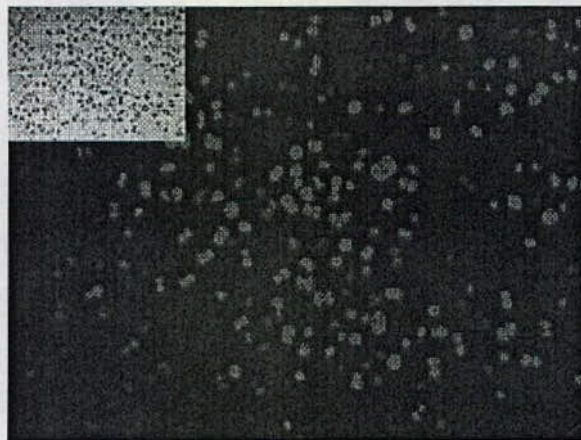


图 4E



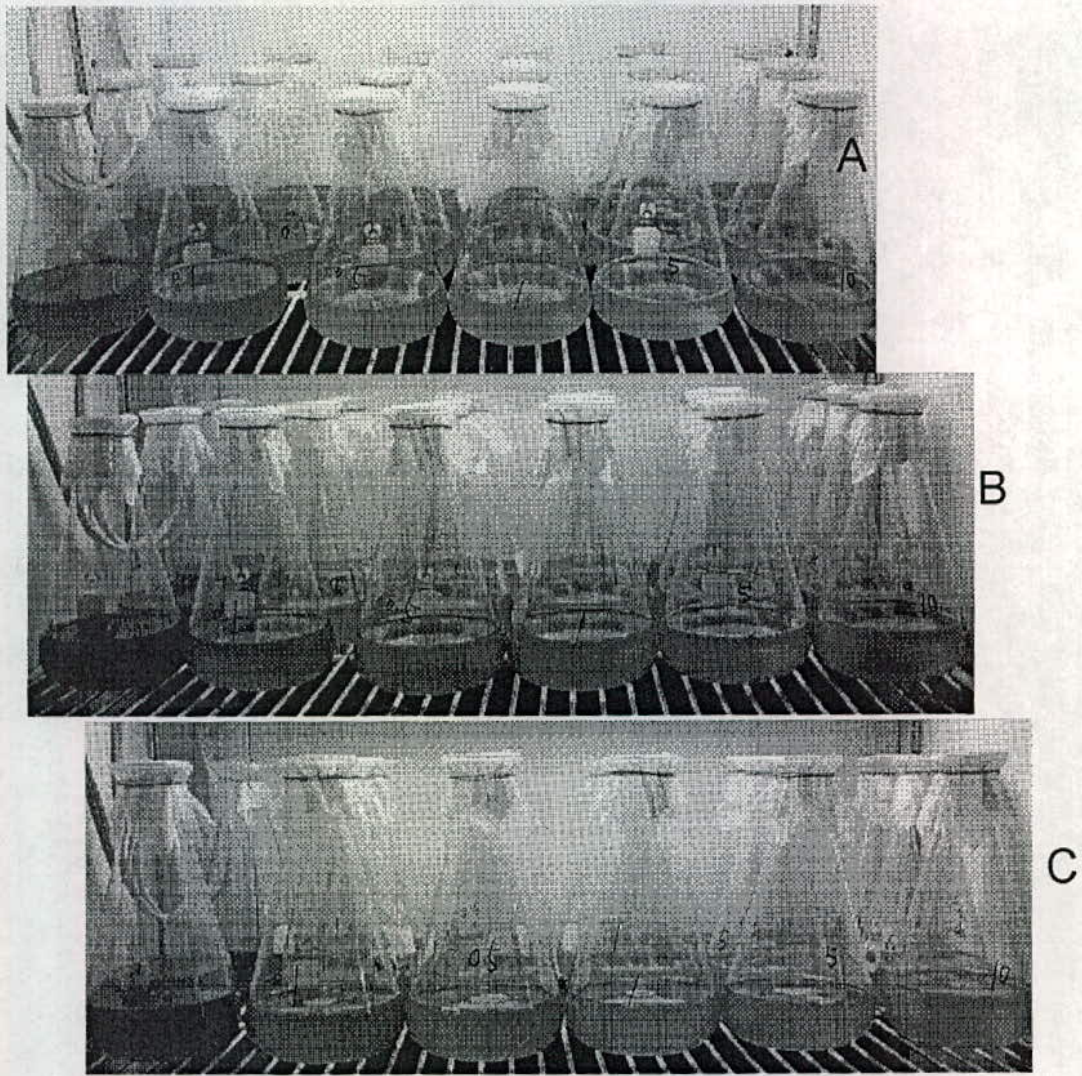


图 5

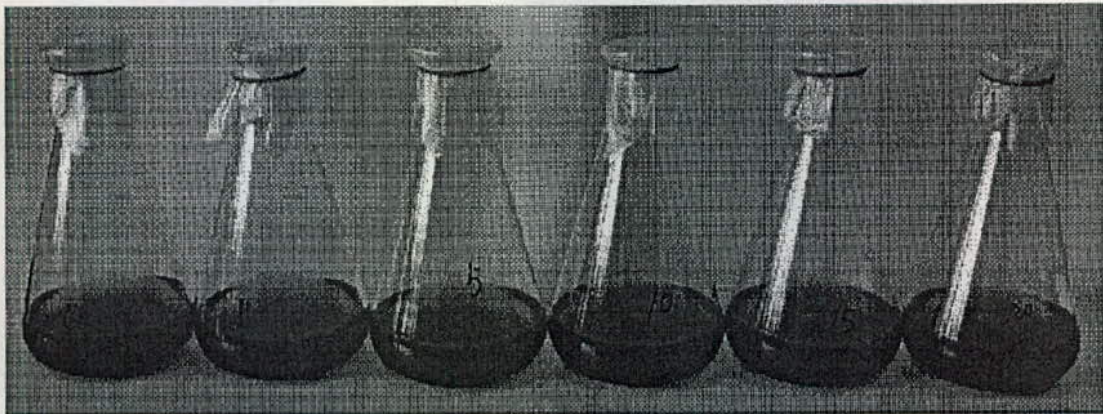


图 6



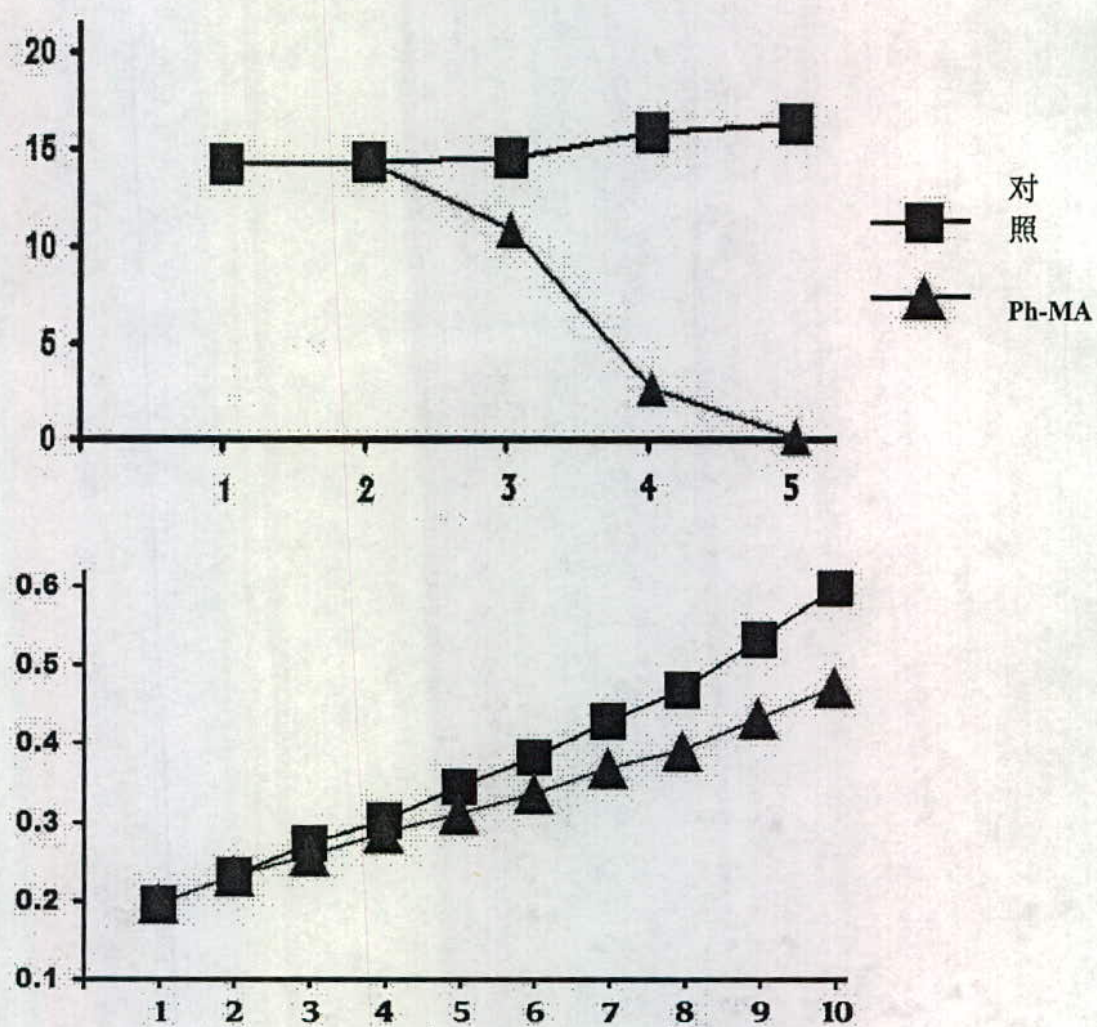


图 7

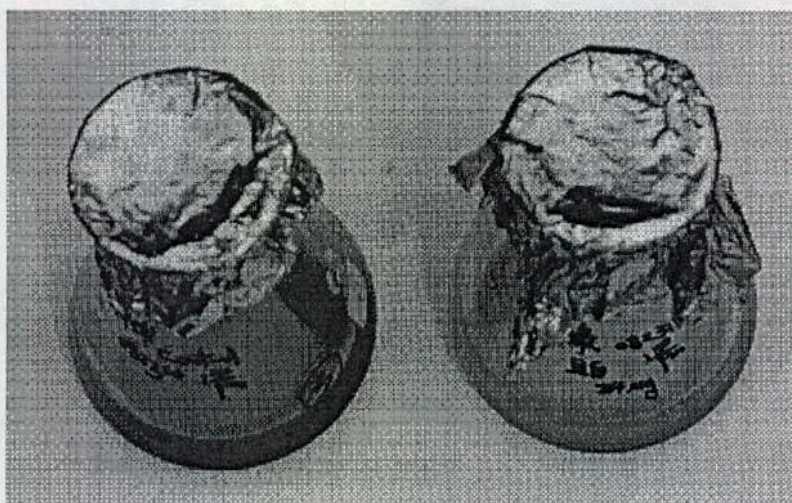


图 8A

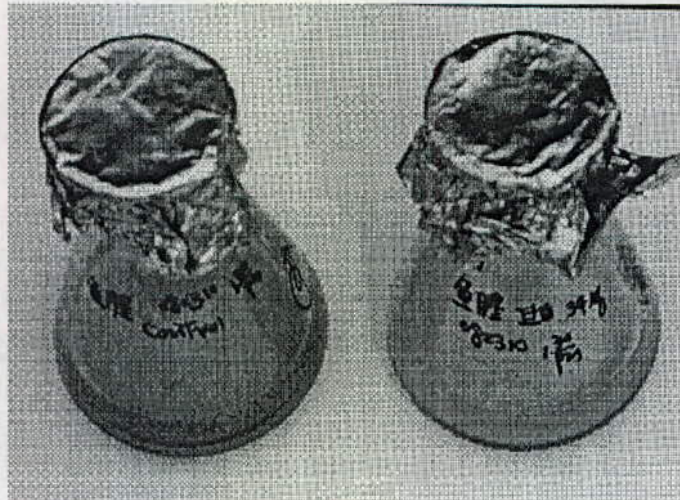


图 8B



图 8C



图 8D



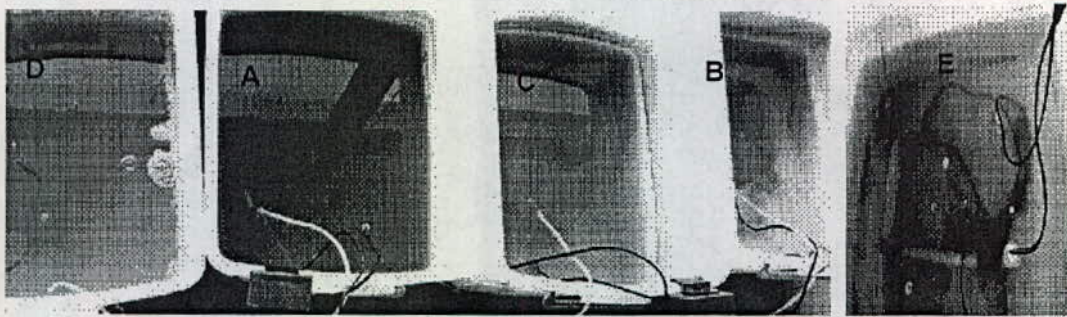


图 9

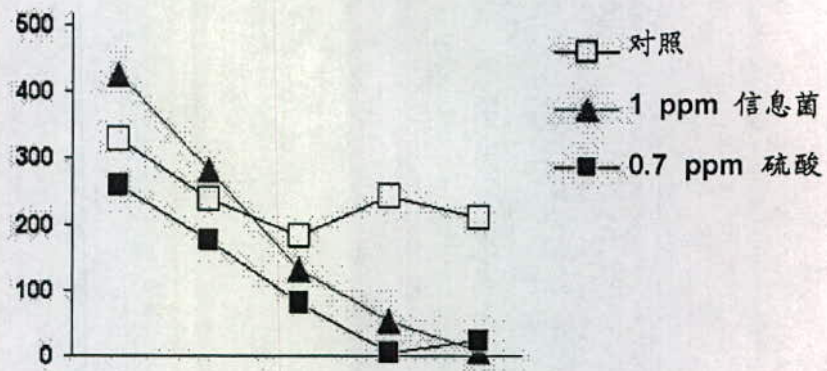


图 10A

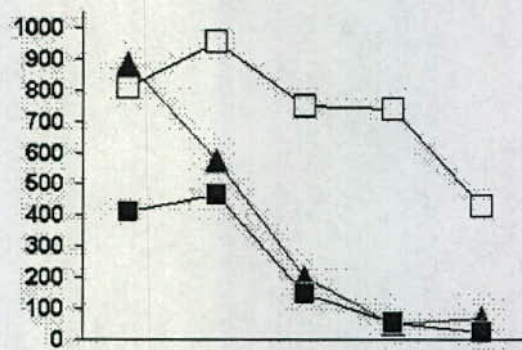


图 10B

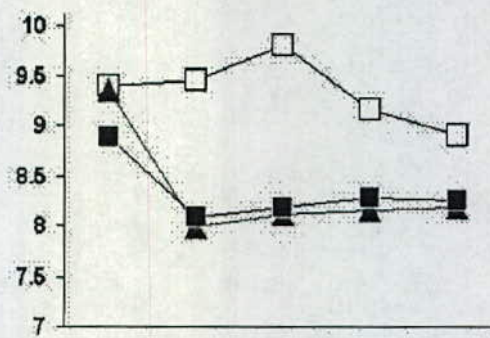


图 10C

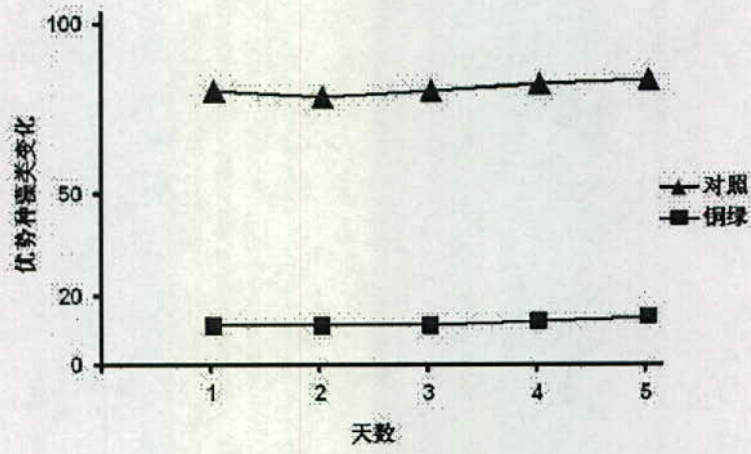


图 10D-1

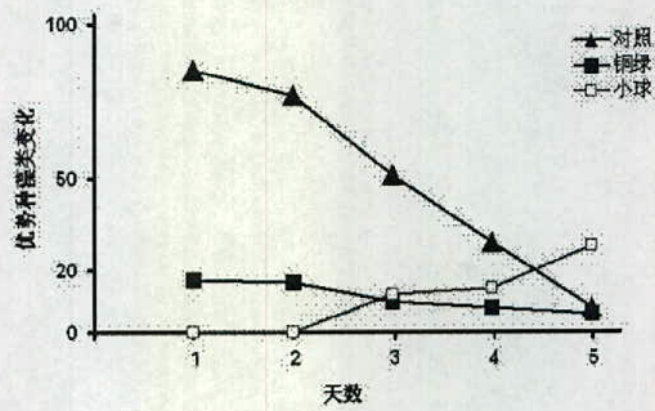


图 10D-2

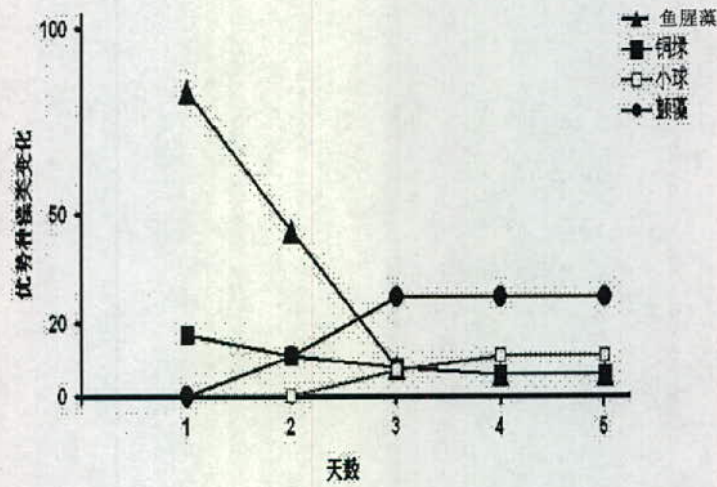


图 10D-3





空白对照组



1 微克/毫升 Ph-MA 处理组

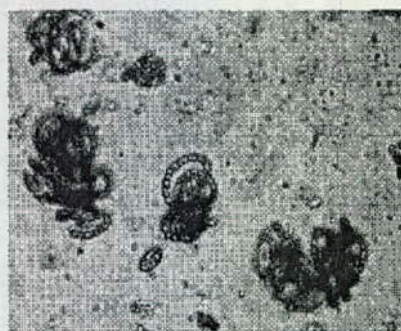


0.7 微克/毫升硫酸铜处理组

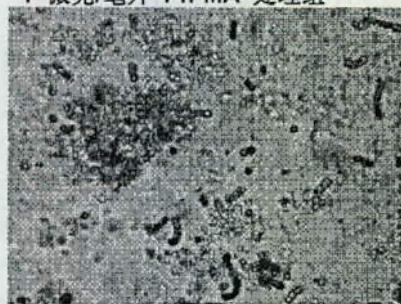


图 11A

空白对照组



1 微克/毫升 Ph-MA 处理组



0.7 微克/毫升硫酸铜处理组

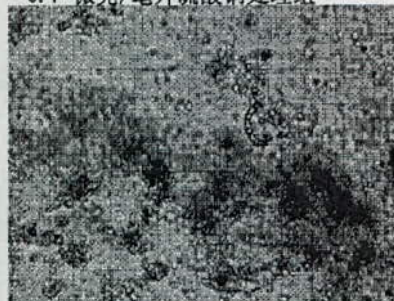


图 11B



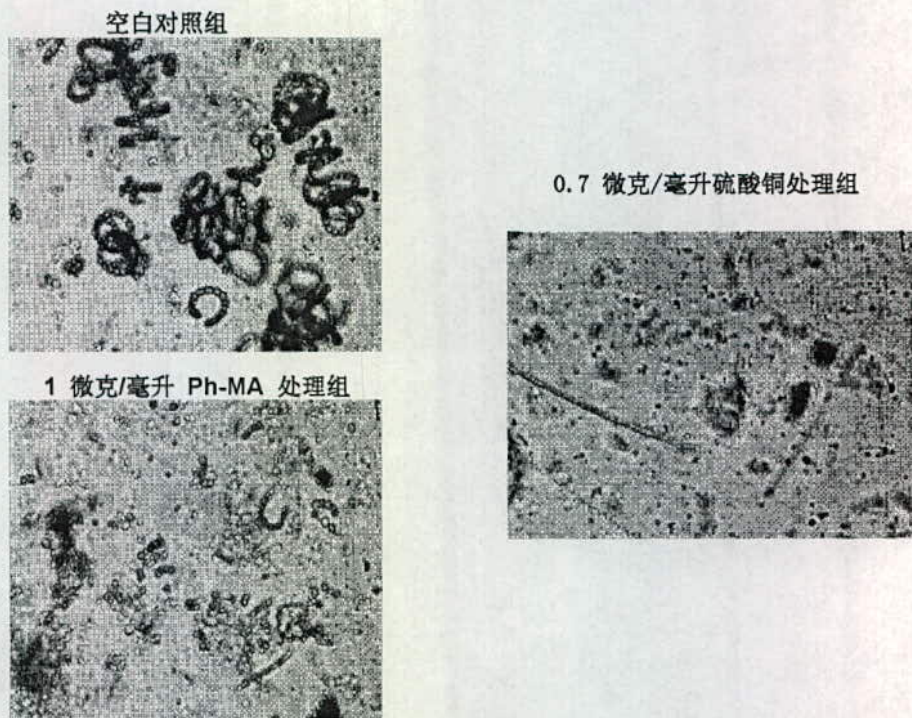


图 11C

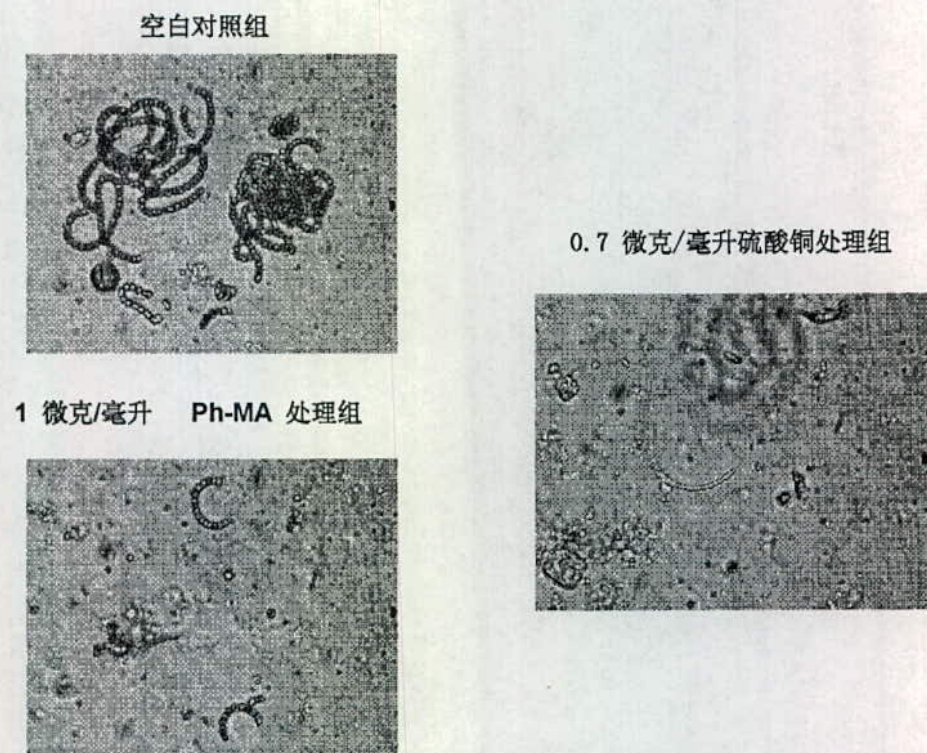
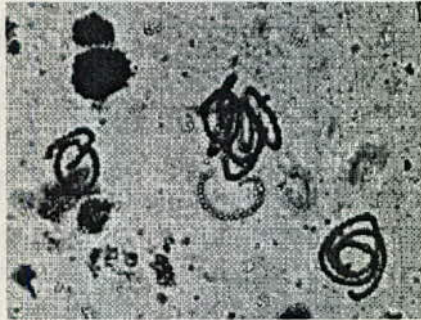


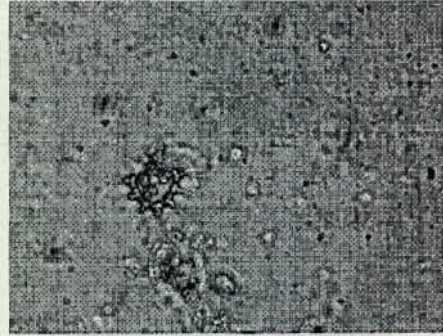
图 11D



空白对照组



0.7 微克/毫升硫酸铜处理组



1 微克/毫升 Ph-MA 处理组

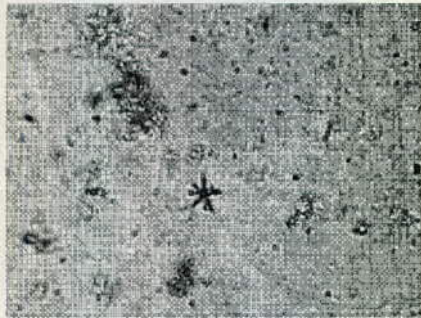


图 11E



**DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE
PATENT COOPERATION TREATY (PCT)**

International application number:	PCT/CN2012/073120
International filing date:	27 March 2012 (27.03.2012)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: CN
	Number: 201110155221.2
	Filing date: 10 June 2011 (10.06.2011)
Date of receipt at the International Bureau:	09 August 2012 (09.08.2012)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请文件副本。

申 请 号： 201110155221.2

申 请 类 型： 发明专利

发 明 创 造 名 称： 抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法

申 请 日： 2011.06.10

申 请 人： 畿晋庆三联(北京)生物技术有限公司

发明人或设计人： 丘小庆

中华人民共和国国家知识产权局局长

2012 年 07 月 30 日

权 利 要 求 书

P 1 1 3 5 9 / J J Q

- 1.杂交瘤细胞，其保藏号为：CGMCC No.4783。
- 2.权利要求 1 所述的杂交瘤分泌的单克隆抗体。
- 3.具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽，是权利要求 2 所述的单克隆抗体的抗原结合片段，或根据所述抗原结合片段上的功能区域设计然后人工表达分离而得的小分子多肽。
- 4.根据权利要求 3 所述的模拟抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。
- 5.编码权利要求 3 或 4 的模拟抗体多肽的基因。
- 6.根据权利要求 5 所述的基因，核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。
- 7.抗蓝藻重组抗体多肽，由权利要求 3 或 4 所述的具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽可操作地线性连接在大肠菌素多肽的羧基端构成，所述大肠菌素选自大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N。
- 8.根据权利要求 7 所述的抗蓝藻重组抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。
- 9.编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因。
- 10.根据权利要求 9 所述的编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因，核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。
- 11.含有编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因的重组表达载体。
- 12.权利要求 7 或 8 所述的抗蓝藻重组多肽的制备方法，其步骤如下：将编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因导入到大肠杆菌表达系统中，培养转化的大肠杆菌，然后分离大肠杆菌表达的多肽。
- 13.权利要求 7 或 8 所述的抗蓝藻重组抗体多肽在治理水体过度营养化中的应用。



抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法

技术领域

本发明涉及环保生物技术，特别是一种抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法。

背景技术

水体过度营养化造成的蓝藻增生、水体污染是目前威胁世界范围水环境的最大危害，给人类造成巨大的经济损失，给地球生物圈造成无法修复的危害。随着我国经济发展造成的加速工业化和城镇化，生态环境污染和恶化日益加剧，水环境生态防治已成为我们必需面对和解决的重大问题。

现用抗菌药物对蓝藻基本无效；蓝藻属细菌域第 X 门-蓝细菌门的一类原核细胞，目前能够控制蓝藻的只有重金属类化学制剂，如硫酸铜等。而在实际应用中，由于效果有限，往往不惜超剂量多次重复用药，造成的结果是在杀伤蓝藻的同时也将水体中其他有益藻类、水生植物和生物破坏殆尽，给环境造成了无法逆转的永久性破坏。同时重金属类化学制剂在环境和农产品的残留量越来越大，因此人类急需开发高效且使用安全的抗蓝藻药物。

发明内容

本发明的一个目的在于提供一种新型的重组抗蓝藻多肽的基因、重组质粒、多肽； 此种多肽能特异的杀灭蓝藻细胞而不会伤害其他藻类细胞、植物和动物。本发明的再一目的是提供上述重组抗蓝藻多肽的制备方法。

杂交瘤细胞，其保藏号为：CGMCC No.4783。

上述杂交瘤分泌的单克隆抗体。

具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽，是上述单克隆抗体的抗原结合片段，或根据上述单克隆抗体的抗原结合片段上的功能区域设计而得的小分子多肽。

所述模拟抗体多肽其氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

编码上述模拟抗体多肽的基因。

所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

抗蓝藻重组抗体多肽，由上述具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽可操作地线性连接在大肠菌素多肽的羧基端构成，所述大肠菌素选自大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N。

所述抗蓝藻重组抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。



编码上述抗蓝藻重组抗体多肽的基因。

所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

含有编码上述抗蓝藻重组抗体多肽的基因的重组表达载体。

上述抗蓝藻重组多肽的制备方法，其步骤如下：将编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因导入到大肠杆菌表达系统中，培养转化的大肠杆菌，然后分离大肠杆菌表达的多肽。

上述抗蓝藻重组抗体多肽在治理水体过度营养化中的应用。

本发明提供一种抗蓝藻重组抗体多肽，由大肠菌素多肽和抗蓝藻细胞表面抗原的抗体模拟物多肽组合而成。在该多肽分子中，抗蓝藻细胞表面抗原的抗体模拟物用于识别并结合蓝藻使分子中的大肠菌素攻击蓝藻。由于抗体模拟物为识别蓝藻表面抗原的抗体模拟物，因此本发明的多肽具有专门攻击蓝藻细胞而不损害其它水体生物，因而不会污染水源，用于水体蓝藻污染的治理非常环保和安全。本发明的抗蓝藻重组抗体多肽的基于 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体的抗原结合片段（Fab）的轻链和重链的氨基酸序列及核苷酸序列设计出的具有蓝藻识别结合能力的抗体模拟物，如单链抗体、抗体小分子模拟物等本领域已经熟知的抗体模拟物。在本发明中，设计的抗体模拟物只需要具有抗原识别能力即可实现发明目的，因为抗体模拟物的任务只是引导重组多肽分子到达目标生物细胞表面，然后由重组多肽中的大肠菌素在目标细胞膜上制造离子通道从而是目标细胞内容物泄露而死。因此，基于上述单克隆抗体设计的抗体模拟物，只要能起到识别目标抗原的目的，这些抗体模拟物与大肠菌素连接而成的重组多肽都属于本发明保护的范围。

在本发明的优选实施方式中，抗体模拟物为抗蓝藻原生质体表面抗原的单克隆抗体（由 CGMCC No.4783 的杂交瘤细胞分泌）的几个结构域 V_HCDR1 、 V_HFR2 和 V_LCDR3 按 V_HCDR1 - V_HFR2 - V_LCDR3 结构连接而成的 28 肽抗体模拟物。室内外实验证明，该抗体模拟物构成的抗蓝藻多肽可以在水介质中自由游动，具有自动寻找蓝藻细胞表面抗原的生物学活性。28 肽抗体模拟物构成具有易于克隆和表达且具有与原始抗体相同的识别活性的优点，可以引导重组多肽中的大肠菌素到达蓝藻细胞膜上形成离子通道来杀伤这些蓝藻细胞，该重组多肽具有现用治理水污染药物（如硫酸铜等）所无法比拟的、具有生态-环境安全性。

本发明中，构建重组抗蓝藻多肽的大肠菌素可选自能形成离子通道的大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N，在本发明的实施例验证了大肠菌素 Ia 与抗蓝藻抗体模拟物构建的重组多肽，但发明利用的是这些大肠菌素在细菌胞膜上形成离子通道来杀死细菌的这一共性，因此，按照本发明的构思，这些大肠菌素与抗蓝藻的抗体模拟物多肽线性连接构成的重组多肽都能够实现本发明的目的一即提供能够杀死蓝藻的重组多肽。

本发明还提供了包含重组多肽的基因的重组质粒的制备方法，是将编码抗体模拟物的



说明书

核苷酸序列经双链寡聚核苷酸点突变技术插入大肠菌素的羧基端形成本发明的重组质粒。以选用大肠菌素 Ia 为例,将编码抗体模拟物的核苷酸序列插入 Ia 基因的第 626 位氨基酸后(羧基端)而形成本发明的重组质粒。构建重组质粒的原始商用质粒 pSELECT-1 来自于 Promega 公司,其中装载了大肠菌素 Ia 和相应的 Immunity 蛋白基因,针对抗体模拟物基因设计了数对引物,其序列见实施例 1。利用双链寡聚核苷酸点突变技术,按照 Stratagene 公司试剂盒操作获得重组质粒,例如 pCHCcyanoMA1。

本发明的又一方面,提供本发明所述抗蓝藻多肽的制备方法,将编码抗体模拟物的基因可操作地与大肠菌素基因连接获得编码重组抗蓝藻多肽基因的重组质粒,将获得的重组质粒转染入大肠杆菌工程菌中而获得可产生重组抗蓝藻多肽的工程菌细胞。用离子交换柱分离纯化即获得本发明所述的抗蓝藻多肽。

本发明所述抗蓝藻多肽可用于治理水污染。可以通过将本发明中的多肽添加可接受的载体或赋形剂或可选的其它成分而制成适于环境使用的药物组合物。其机理是:多肽中可与蓝藻细胞表面抗原识别的抗体模拟物诱导大肠菌素到达蓝藻细胞膜附近,然后大肠菌素离子通道结构域的疏水区段插入蓝藻细胞膜中,进而大肠菌素离子通道结构域在蓝藻细胞膜上形成离子通道,使蓝藻细胞内容物泄漏而致蓝藻细胞死亡,从而达到杀死蓝藻细胞的目的。

本发明所述的抗蓝藻多肽相较于传统抗蓝藻药物的优点在于,其具有特异的靶向性,因而在治理过程中不会攻击其他藻类、植物和动物细胞,其毒性和不良反应远低于传统抗蓝藻药物。再由于它是在蓝藻细胞膜上直接形成离子通道来杀伤蓝藻细胞,因此在抗蓝藻多肽—离子通道造成泄漏而致蓝藻细胞死亡的这一较短时限内,蓝藻细胞较难利用突变基因—蛋白表达方式来修复抗蓝藻多肽—离子通道在蓝藻细胞膜上造成的几何缺损,所以蓝藻细胞对本发明的抗蓝藻多肽产生耐药性的概率较低。这预示本发明所述抗蓝藻多肽具有良好的应用前景。

杂交瘤保藏信息:

保藏号: CGMCC No.4783

杂交瘤名称: 抗蓝藻细胞表面抗原的单克隆抗体杂交瘤细胞

保藏日期: 2011 年 4 月 20 日

保藏单位: 中国微生物菌种保藏管理委员会 普通微生物中心

保藏单位地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

附图说明





说明书

P 1 1 3 5 9 / J J Q

图 1.是含有抗体模拟物和大肠菌素 Ia 基因的重组质粒 pCHCcyanoMA1 的结构示意图。

图 2.为抗蓝藻多肽结构示意图。

图 3.是含有部分基因颠倒 N-C 顺序的抗体模拟物基因和大肠菌素 Ia 基因的重组质粒 pCHCcyanoMA2 的结构示意图。

图 4.为本发明抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中铜绿微囊藻的抑制试验结果。

图中 A， 空白对照液， B， 氨苄青霉素 50 $\mu\text{g/ml}$ ， C， 广谱信息菌素 (Ph-NM) 50 $\mu\text{g/ml}$ ， D， 抗蓝藻多肽 (1) 50 $\mu\text{g/ml}$ ， E， 抗蓝藻多肽 (2) 50 $\mu\text{g/ml}$ 。

图 5. 为本发明抗蓝藻多肽 (1) 对生长于液体培养基中铜绿微囊藻的抑制试验结果。

图中 A， 处理 48 小时后， B， 处理 72 小时后， C， 处理 96 小时后。图中每一列从左至右共 6 个烧瓶， 依次为 1， 对照， 2， 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 3， 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 4， 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 5， 5 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 6， 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)。

图 6. 为本发明抗蓝藻多肽 (1) 对生长于液体培养基中栅藻的抑制试验结果。

处理 10 日后， 图中每一列从左至右共 6 个烧瓶， 依次为 1， 对照， 2， 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 3， 5 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 4， 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 5， 15 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)， 6， 20 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)。

图 7.为本发明抗蓝藻多肽 (1) 对生长于液体培养基中铜绿微囊藻、 栅藻的抑制试验结果。上图为铜绿微囊藻的结果， 下图为栅藻的试验结果。

图 8.为本发明抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中铜绿微囊藻、 鱼腥藻、 小球藻、 栅藻的抑制试验结果。

图中左侧烧瓶为对照， 右侧烧瓶为 35 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1)。A， 铜绿微囊藻， B， 鱼腥藻， C， 小球藻， D， 栅藻。

图 9.为本发明抗蓝藻多肽对蓝藻污染的自然水体抑制试验结果。

图中 A， 空白对照， B， 抗蓝藻多肽 (1) 1 $\mu\text{g/ml}$ ， C， 抗蓝藻多肽 (1) 5 $\mu\text{g/ml}$ ， D， 抗蓝藻多肽 (1) 10 $\mu\text{g/ml}$ ， E， 硫酸铜 0.7 $\mu\text{g/ml}$ 。

图 10.为图 9 抑制试验的部分测试结果。

A， 水体中光密度变化， B， 水体中叶绿素 a 变化， C， 水体中 pH 变化， D， 水体中优势藻类种群变化。

D-1, 对照组， D-2, 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1) 处理组， D-3, 0.7 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸铜处理组。

图 11.为图 9 中抗蓝藻多肽对蓝藻污染的自然水体抑制试验的显微镜观察结果 (放大 400





倍)。

分别为对照、抗蓝藻多肽(1) 1 μg/ml 和硫酸铜 0.7 μg/ml 处理水体中藻类(鱼腥藻)在 A, 第一日, B,第二日, C, 第三日, D, 第四日, E, 第五日的变化。

具体实施方式

实施例 1 表达抗蓝藻多肽的质粒的构建和重组抗蓝藻多肽的制备

材料: 杂交瘤细胞 CGMCC No.4783。

步骤 1. 抗体模拟物的核苷酸序列及氨基酸序列的获得: 收集杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体, 采用常规方法对单克隆抗体进行测序获得抗原结合片段 Fab 重链和轻链序列后, 根据抗原互补决定区的氨基酸序列设计得到抗体模拟物氨基酸序列, 如 SEQ ID NO.3 所示, 编码该抗体模拟物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

步骤 2. 原始质粒为装载了大肠菌素 Ia 和 Immunity 蛋白基因的 pSELECT-1 质粒(购自 Promega 公司, 上述基因由本实验室装载), 经双链寡聚核苷酸点突变技术(QuickChange™ Kit, Strategene 公司)将编码抗蓝藻的抗体模拟物的基因(序列表中 SEQ ID NO.2 所述核苷酸序列)插入到大肠菌素 Ia 基因的 I626 位点后, 得到重组质粒 pCHCcyanoMA1 (如图 1 所示), 重组质粒转染入 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌里表达制备多肽, 获得序列表如 SEQ ID NO.7 所述的抗蓝藻多肽, 在后续的实施例中称为“抗蓝藻多肽(1)”, 其分子量约 70,000。

突变程序按 Strategene QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (catalog#200518)药箱手册进行:

1、准备点突变反应物

- 5 ul 10 x buffer
- 2 ul (10 ng) 野生型大肠菌素 Ia 质粒
- 1 ul(125ng) 设计的 5'-3' 寡聚核苷酸引物
- 1 ul(125ng) 设计的 3'-5' 寡聚核苷酸引物
- 1 ul dNTP
- 双蒸水 50 ul
- 1 ul pfu
- (除质粒, 引物和双蒸水外,均为药箱所备试剂)

2、进行 PCR 扩增, 扩增条件: 变性 95℃, 35 秒, 退火 53℃, 70 秒, 延伸 68℃, 17 分共 20 个循环;

3、加入 Dpn1 内切酶 1 ul 消化母体 DNA 链后(37℃,1 小时), 取 1 ul 反应物与 HMS174



说明书

P 1 1 3 5 9 / J J Q

感受态细胞 50 ul 冰孵 30 分钟, 行热冲击 42℃, 45 秒,再置入冰中 2 分钟;

4、加入 NZY 培养基 0.5 ml 后 220rpm, 37℃摇菌 1 小时后, 取 50-100 ul 反应物铺板(LB 培养基加 1%琼脂加 50 ug/ml 氨苄青霉素, 37℃过夜);

5、18 小时后挑菌,循 Qiagene,Gibco 等公司的各种商用提取质粒药箱提取质粒均可, 测序确定突变成功;

6、将质粒 50 ng 与制备的 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌感受态细胞 50 ul 冰孵 30 分, 42℃, 30 秒热冲击, 取 50-100 ul 反应物加入 SOC 培养基 0.5 ml, 220 rpm, 37℃摇菌 1 小时后铺板(LB 培养基加 1 % 琼脂加 50 ug/ml 氨苄青霉素) 37℃孵育,12-16 小时后挑取菌落;

7、大量增菌,8-16 升 LB 培养基, 250rpm, 37℃,6-8 小时;离心沉淀菌体, 4℃, 6000g, 20 分钟,取 4℃, 50 mM Borate, 2mM EDTA, pH 9.0) 50-80ml 悬浮菌体,加入 0.2 M PMSF 250 微升后行超声破碎(4℃, 400W, 2 分钟), 高速离心沉淀破碎菌体(4℃, 75000g, 1.5 小时), 取上清经硫酸链霉素沉淀 DNA, 装入分子量 15,000 的透析袋于 4℃, 50 mM Borate, 2mM EDTA, pH 9.0 缓冲液 10 升 透析过夜后, 将上清上样于 CM 柱 (Amersham Biosciences), 经 50 mM Borate, 0.3 M NaCl, 2mM EDTA, pH 9.0 缓冲液, 4℃) 洗脱后即可得到重组抗蓝藻多肽 (1) (请见图 2)。

下面列出为制备 pCHCcyanoMA1 质粒的抗体模拟物基因所设计的具体双链寡聚核苷酸序列:

pCHCcyanoMA1

1、 5'-3'

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCT TAT TGG ATG CAG TGG GTT AAG CAA taa ata aaa tat
aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta TTG CTT AAC CCA CTG CAT CCA ATA AGA aat acc cca gaa ctt
att cgc

2、 5'-3'

tat tgg atg cag tgg gtt aag caa AGA CCG GGG CAA GGG CTG GAG TGG ATT GGC taa ata aaa tat
aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GCC AAT CCA CTC CAG CCC TTG CCC CGG TCT ttg ctt aac



cca ctg cat cca ata

3、5'-3'

ggg caa ggg ctg gag tgg att ggc CAG CAG TAT YGG TCT ACG CCC CCG TGG ACG taa ata aaa tat
aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CGT CCA CGG GGG CGT AGA CCA ATA CTG CTG gcc aat cca
ctc cag ccc ttg ccc

实施例 2 表达抗蓝藻多肽的对照质粒的构建和对照重组抗蓝藻多肽的制备

原始质粒为装载了大肠菌素 Ia 和 Immunity 蛋白基因的 pSELECT-1 质粒(购自 Promega 公司,上述基因由本实验室装载),经双链寡聚核苷酸点突变技术(QuickChange™ Kit, Strategene 公司) 将编码抗蓝藻的抗体模拟物的基因(序列表中 SEQ ID NO.4 所述核苷酸序列)插入到大肠菌素 Ia 基因的 I626 位点后, 得到重组质粒 pCHCcyanoMA2 (如图 3 所示), 重组质粒转染入 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌里表达制备多肽, 获得序列表如 SEQ ID NO.9 所述的抗蓝藻多肽, 在后续的实施例中称为“抗蓝藻多肽 (2)”, 其分子量约 70,000。

制备 pCHCcyanoMA2 质粒的模拟物基因的双链寡聚核苷酸序列按实施例 1 的方法设计。其制备方法同实施例 2。

实施例 3 抗蓝藻多肽对铜绿微囊藻的抑制试验结果

试验 (1)

步骤1. 准备试验藻: 蓝藻为购自中国科学院水生生物研究所的 FACHB-978 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)。

试验藻的培养方法: 将藻种接种到装有250ml BG11培养基的500 ml容积锥形瓶中, 置于光照培养箱中。接种初始藻细胞密度为 5×10^4 个/mL, 锥形瓶用透气膜封盖, 以防污染。培养温度为 25℃, 光照强度为 (2500±10%)Lux; 光暗比为12h/12h。为减少因光照不均匀可能造成的影响, 每隔 2~3 h 摇动并更换各实验组锥型瓶的位置 1 次。自接种的第 5 天起, 每隔 24 h 取样、测定 1 次。待藻细胞数密度达到 10^6 个/mL数量级左右时, 即可开始下一步试验。

步骤 2.在五个试管 A、B、C、D、E 中分别加入制备好的蓝藻液 1 ml, 然后加入抑制剂: A 空白对照液, B 氨苄青霉素 50 μg/ml, C 广谱信息菌素 (申请号为 200910092128.4





说明书

P 1 1 3 5 9 / J J Q

中公开的 Ph-AM1) 50 $\mu\text{g/ml}$, D 抗蓝藻多肽 (1) 50 $\mu\text{g/ml}$, E 抗蓝藻多肽 (2) 50 $\mu\text{g/ml}$ 后, 五个试管置于孵箱中低速振荡培养 12 小时后, 都加入吖啶橙 (按 50 nM 加入) 和碘化丙啶 (按 600 nM 加入) 孵化 30 分钟, 吸取数微升置于载玻片上, 荧光显微镜 (Nikon 90i, DM505 和 DM565 滤光镜片) 观察活蓝藻染色情况。

结果如图 4 所示。结果显示只有抗蓝藻多肽 (1) 杀伤了培养的铜绿微囊藻。而抗蓝藻多肽 (2)、氨苄青霉素、Ph-NM 对所培养的铜绿微囊藻均无作用。

试验 (2)

步骤 1 同试验 (1) 步骤 1。

步骤 2. 直接在 6 个接种了试验藻的 500 ml 的锥形瓶中按浓度梯度加入抗蓝藻多肽。铜绿微囊藻加入抗蓝藻多肽的剂量为: 0、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/ml}$, 每日观察对蓝藻的生长抑制情况。

结果如图 5 所示。由于各处理组所用的抗蓝藻多肽 (1) 浓度不一样, 锥形瓶中铜绿微囊藻液由绿色变成浅黄色之时间快慢与多肽的浓度成正比, 然在 72 小时内, 肉眼可观察到各处理组均可有效杀灭所试之铜绿微囊藻。

上述结果证明, 抗蓝藻多肽 (1) 具有靶向杀伤蓝藻的效力, 而抗蓝藻多肽 2 几乎无效。

试验 (3)

材料: 购自中科院水生生物研究所的 FACHB-417 斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 采用试验 (1) 中步骤 1 的方法培养试验藻。

步骤 2. 直接在 6 个接种了试验藻的 500 ml 的锥形瓶中按浓度梯度加入抗蓝藻多肽 (1), 剂量分别为: 0、1、5、10、15、20 $\mu\text{g/ml}$ 。每日观察对栅藻的生长抑制情况。

结果如图 6 所示。虽然加入的抗蓝藻多肽 (1) 剂量相对铜绿微囊藻处理组大了 10 倍, 肉眼在试验期间 (190 小时) 未观察到抗蓝藻多肽 (1) 表现出任何对所试栅藻的杀伤作用。

结果如图 6 所示。虽然加入的抗蓝藻多肽 (1) 剂量相对铜绿微囊藻处理组大了 10 倍, 肉眼在试验期间 (190 小时) 未观察到抗蓝藻多肽 (1) 表现出任何对所试栅藻的杀伤作用。

试验 (4)

以上试验 (1) ~ (3) 每瓶取 0.1 mL 培养液, 置于血球计数板中, 在显微镜下观察、计数。图 7 所示的藻细胞计数显示与对照相比较, 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1) 在 72 小时内即可杀灭所试之铜绿微囊藻。而 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蓝藻多肽 (1) 对所试之栅藻几乎无任何作用。



实施例 4. 抗蓝藻多肽对抗铜绿微囊藻、鱼腥藻、小球藻、栅藻的液体培养基试验

所试藻类为购自中科院水生所的铜绿微囊藻、鱼腥藻、小球藻和栅藻。藻类培养和加入处理剂之方法同实施例 3 的试验（1）的步骤 1。

取藻细胞数密度达到 10^6 个/mL 数量级的培养藻液 40 ml 分装于 300ml 锥形瓶中，各加入 A：加入等量的空白对照液，B：加入抗蓝藻多肽（1） 35 $\mu\text{g/ml}$ ，继续培养 4 日，观察其生长情况。

结果如图 8 所示。24 小时后，铜绿微囊藻和鱼腥藻藻液颜色开始变浅，至第 4 日藻液已变清亮。而小球藻和栅藻藻液颜色和浊度均无变化。该结果显示抗蓝藻多肽 1 抑制了所试铜绿微囊藻、鱼腥藻的生长，却不能抑制小球藻、栅藻的生长。

上述结果证明，抗蓝藻多肽（1）具有靶向杀伤蓝藻的效力。

实施例 5 抗蓝藻多肽对自然水体中蓝藻的杀灭试验

自然水体采自被蓝藻严重污染的苏州阳澄湖沼虾养殖池，25-35 升分装于 60 x 40 x 30 厘米塑料养殖盆中，每隔 20 分钟气泵送气 10 分钟；加热器自动调温至 27°C ，光照强度为 $(2500 \pm 10\%) \text{ lux}$ ；光暗比为 12 h / 12 h，每日采样检测养殖水体 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值（请见图 9）。

将采样液置于可见分光光度计中测定 650 nm 光吸收值（请见图 10）。

利用热乙醇-反复冻融-分光光度法测定叶绿素 a 含量（请见图 10）。用分光

光度计于 665、700 nm 下测其吸光度，计算叶绿素 a 的浓度。其公式为：

$$[\text{Chl}a] = [12.12 (D_{664} - D_{750}) - 1.58 (D_{647} - D_{750}) - 0.08 (D_{630} - D_{750})] \times 10^6 / V \cdot d.$$

对照组水体中的 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值在试验期间一直居高不下，而抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体的 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值自第二日起即显著下降。

每日采样 30 ml 水样用福尔马林固定后，离心浓缩 10 倍，取 0.1 mL 置于血球计数板中，在显微镜下观察、计数（请见图 11）。镜检中可见在第一日，对照组、抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体中可见大量生长茂盛的鱼腥藻；而自第二日起，抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体中的鱼腥藻大量减少、碎裂；至第五日抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体中已找不到鱼腥藻，而对照组水体中仍见大量鱼腥藻生长。

显微镜检观察藻类形态变化，同时对各种藻类计数以确定养殖水体中浮游植物优势种群的动态变化（请见图 10）。在对照组水体中，鱼腥藻和铜绿微囊藻始终为优势藻种；在抗蓝藻多肽（1）组水体中，鱼腥藻和铜绿微囊藻逐渐减少，小球藻变成为优势藻种；





说明书

P 1 1 3 5 9 / J J Q

在硫酸铜组水体中，鱼腥藻和铜绿微囊藻逐渐减少，而另一种蓝藻，颤藻变成为优势藻种。

表 1 抗蓝藻多肽处理之浮游植物细胞计数及形态变化（个/升）

	给药当日	第二日	第三日	第四日	第五日
对照组	32745	26363 藻形态无变化	33194 藻形态无变化	41068 藻形态无变化	17954 藻形态无变化
1mg/L 多肽	50394	43981 大多数鱼腥藻 变成单细胞或 2-5 个的短链	10624 鱼腥藻已无长 链，多为 1-5 个细胞的短链	5370 很少量鱼腥藻， 多为 1-5 个细 胞的短链	3432 几乎无鱼腥藻 细胞
5mg/L 多肽	43987	40828 同 1mg/L 之 变化	20744 同 1mg/L 之 变化	9890 同 1mg/L 之 变化	3680 几乎无鱼腥藻 细胞
10mg/L 多肽	48101	41787 同 1mg/L 之 变化	23443 同 1mg/L 之 变化	14214 同 1mg/L 之 变化	4902 几乎无鱼腥藻 细胞
20mg/L 多肽	45588	39194 同 1mg/L 之 变化	33453 同 1mg/L 之 变化	4800 几乎无鱼腥藻 细胞	3508 几乎无鱼腥藻 细胞
0.7mg/L 硫酸铜	22930	1266 鱼腥藻全部变 成单细胞	499 藻类几乎都变 成有机碎屑	305 藻类少	379 藻类少

结果如图 9-11 和表 1 所示。结果显示 0.7 ppm 硫酸铜几乎不加选择的杀伤了所有藻类。而抗蓝藻多肽（1）却能够靶向抑制养殖水体中蓝藻（鱼腥藻、铜绿微囊藻）的生长，而对养殖水体中其他浮游植物的生长基本无影响。





SEQUENCE LISTING

<110> 畿晋庆三联（北京）生物技术有限公司

<120> 抗蓝藻多肽及其基因与制备方法

<130> P11359/JJQ

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1878

<212> DNA

<213> 编码大肠菌素 Ia 的核苷酸序列

<400> 1

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat	60
ggccatgaaa ttatggccgt tgatatttat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtctttcat	120
ggtaccccg cctgcatggag ttccttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg	180
gttgatgatt ccccaaccg aagtgatatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac	240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa	300
cgctctctg cggcgattgc tgcaagggaa aaagatgaaa acacactgaa aacctccgt	360
gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag	420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca	480
gagagccgga tgctgtttgc tgatgtgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg	540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc	600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacaccog gttgtcagag	660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc	720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg	780





acggaatgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840
cagaaaaaca cgctgacgg caaaacgata gtttccctg aaaaattccc ggggcgttca 900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgcgggtac gataaaaatc 960
acaaccagcg cagtcatcga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt 1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtgacaga ggatgtggaa 1080
ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
cttgatgcc a gaaataaaat cacctctgct gaatctcggg taaattcggc gagaaataac 1200
ctcagtgcc a gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag 1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
aatcagttt cagaaaaata tgggtcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatggt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttctgac tggatcactg agtttggtaa ggtgtccgg 1680
acagagaact ggctctctct tttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggt cttcagtatt ctacccgaa gcgctttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccgggtcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
aataagttct ggggtatt 1878

- <210> 2
- <211> 87
- <212> DNA
- <213> 抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物基因





<400> 2
tcttattgga tgcagtgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag 60

cagtattgggt ctacgccgcc gtggacg 87

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物的氨基酸序列

<400> 3

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr
20 25

<210> 4
<211> 87
<212> DNA
<213> VHCDR1 N-C 序列颠倒之抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物的基因

<400> 4
cagatgtggt attcttgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag 60

cagtattgggt ctacgccgcc gtggacg 87

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> VHCDR1 N-C 序列颠倒之抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物氨基酸序列

<400> 5

Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr





20

25

<210> 6
<211> 1965
<212> DNA
<213> 编码抗蓝藻多肽 1 核苷酸序列

<400> 6
atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat 60

ggccatgaaa ttatggccgt tgatatttat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtctttcat 120

ggtaccccg ctcgatggag ttccttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg 180

gttgatgatt ccccaaccg aagtgatatc gaaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac 240

aaaaacaagc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa 300

cgctctctg cggcgattgc tgcaagggaa aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt 360

gccggaaaag cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420

ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480

gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540

tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600

gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacaccog gttgtcagag 660

ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720

gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaaact cagttcagtg 780

acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840

cagaaaaaca cgctgacgg caaaacgata gtttccctg aaaaattccc ggggcgttca 900

tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccgttac gataaaaatc 960

acaaccagcg cagtcacga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt 1020

ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa 1080





ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
cttgatgcc aataaaaat cacctctgct gaatctcggg taaattcggc gaaaaataac 1200
ctcagtgcc aacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag 1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcacatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
aatcagttt cagaaaaata tgggtcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcagattgc cgcagccctt 1560
gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtta ggctgtccgg 1680
acagagaact ggcgtcctct ttttgtaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggg cttcagtatt cttaccgga gcgctttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccgggtcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
aataagttct ggggtatttc ttattggatg cagtgggtta agcaaagacc ggggcaaggg 1920
ctggagtgga ttggccagca gtattggtct acgccgcgt ggacg 1965

<210> 7
<211> 654
<212> PRT
<213> 抗蓝藻多肽 1 氨基酸序列

<400> 7

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro





	20		25		30										
Pro	Arg	Val	Asp	Val	Phe	His	Gly	Thr	Pro	Pro	Ala	Trp	Ser	Ser	Phe
	35						40					45			
Gly	Asn	Lys	Thr	Ile	Trp	Gly	Gly	Asn	Glu	Trp	Val	Asp	Asp	Ser	Pro
	50					55					60				
Thr	Arg	Ser	Asp	Ile	Glu	Lys	Arg	Asp	Lys	Glu	Ile	Thr	Ala	Tyr	Lys
65				70					75					80	
Asn	Thr	Leu	Ser	Ala	Gln	Gln	Lys	Glu	Asn	Glu	Asn	Lys	Arg	Thr	Glu
				85					90					95	
Ala	Gly	Lys	Arg	Leu	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Arg	Glu	Lys	Asp	Glu
			100					105					110		
Asn	Thr	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala	Asp	Ala	Ala	Asp	Ile
		115					120					125			
Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Tyr	Gly
	130					135						140			
Phe	Arg	Thr	Glu	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Arg	Leu	His	Thr	Glu
145				150						155				160	
Ser	Arg	Met	Leu	Phe	Ala	Asp	Ala	Asp	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Pro	Arg
			165						170					175	
Glu	Ala	Arg	Ser	Leu	Ile	Glu	Gln	Ala	Glu	Lys	Arg	Gln	Lys	Asp	Ala
		180						185					190		
Gln	Asn	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Ala	Asp	Met	Leu	Ala	Glu	Tyr	Glu	Arg





195	200	205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly		
210	215	220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly		
225	230	235 240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu		
	245	250 255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg		
	260	265 270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr		
	275	280 285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser		
	290	295 300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr		
305	310	315 320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser		
	325	330 335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro		
	340	345 350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu		
	355	360 365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn		





370 375 380

Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu
385 390 395 400

Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala
405 410 415

Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn
420 425 430

Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr
435 440 445

Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu
450 455 460

Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln
465 470 475 480

Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr
485 490 495

Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg
500 505 510

Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser
515 520 525

Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe
530 535 540

Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr



545550555560

Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly
565570575

Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly
580585590

Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly
595600605

Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly
610615620

Ile Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
625630635640

Glu Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr
645650

<210> 8
<211> 1965
<212> DNA
<213> 编码抗真菌多肽 2 核苷酸序列

<400> 8

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat60

ggccatgaaa ttatggccgt tgatatattat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtctttcat120

ggtacccgcg ctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg180

gttgatgatt cccaacccg aagtgatatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac240

aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa300

cgctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt360



gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480
gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacaccgc gttgtcagag 660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagt 780
acggaatgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840
cagaaaaaca cgctgacgg caaaacgata gtttccctg aaaaattccc ggggcgttca 900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccgtac gataaaaatc 960
acaaccagcg cagtcatoga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt 1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa 1080
ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac 1200
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag 1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
aatcagttt cagaaaaata tggcgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
caggctaaag ggaagaaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680



acagagaact ggcgtcctct tttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccggcg cgatgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
aataagttct ggggtattca gatgtggtat tcttgggtta agcaaagacc ggggcaaggg 1920
ctggagtgga ttggccagca gtattggtct acgccgcgt ggacg 1965

<210> 9
<211> 654
<212> PRT
<213> 抗蓝藻多肽 2 氨基酸序列

<400> 9

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro
20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu





100	105	110
Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile		
115	120	125
Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly		
130	135	140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu		
145	150	155 160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg		
165	170	175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala		
180	185	190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg		
195	200	205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly		
210	215	220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly		
225	230	235 240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu		
245	250	255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg		
260	265	270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr		





275	280	285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser		
290	295	300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr		
305	310	315 320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser		
325	330	335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro		
340	345	350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu		
355	360	365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn		
370	375	380
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu		
385	390	395 400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala		
405	410	415
Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn		
420	425	430
Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr		
435	440	445
Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu		





450	455	460
Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln		
465	470	475 480
Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr		
	485	490 495
Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg		
	500	505 510
Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser		
	515	520 525
Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe		
	530	535 540
Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr		
545	550	555 560
Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly		
	565	570 575
Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly		
	580	585 590
Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly		
	595	600 605
Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly		
	610	615 620
Ile Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		



118

640

15

SECRET

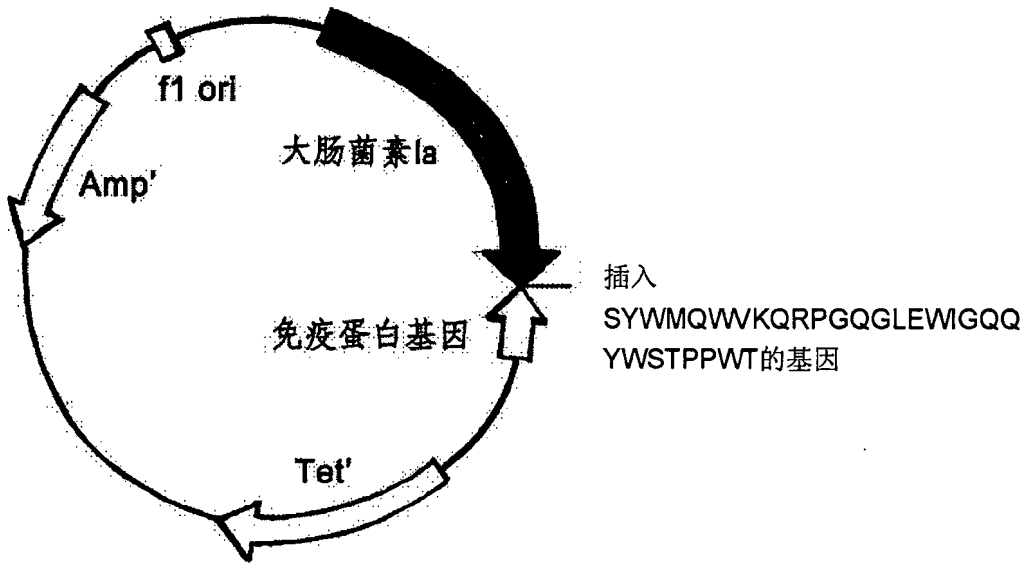


图 1

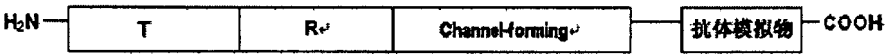


图 2

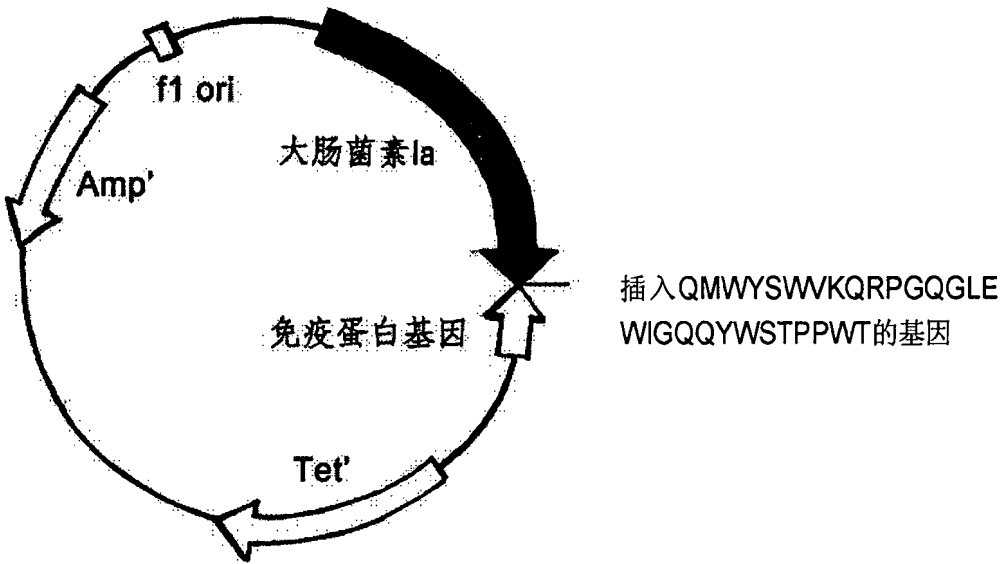


图 3



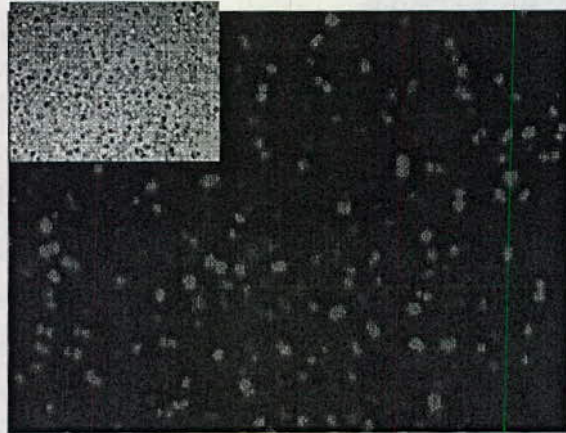


图 4A

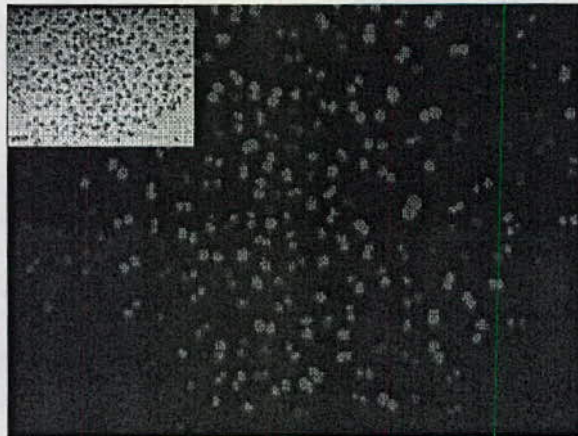


图 4B



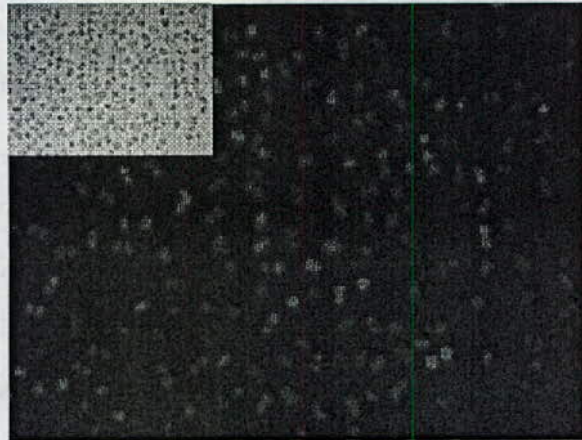


图 4C

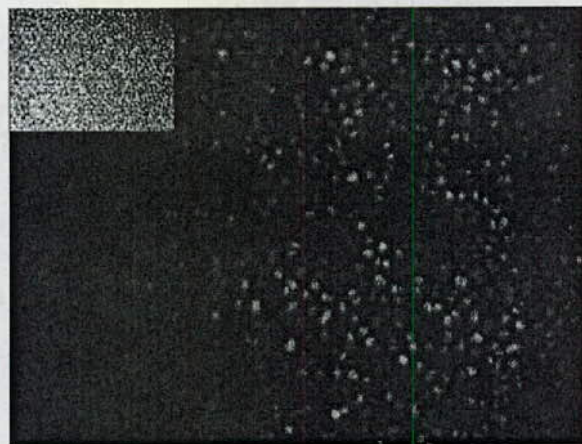


图 4D

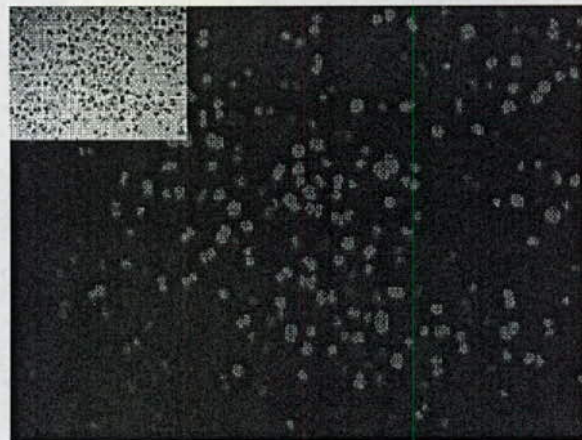


图 4E



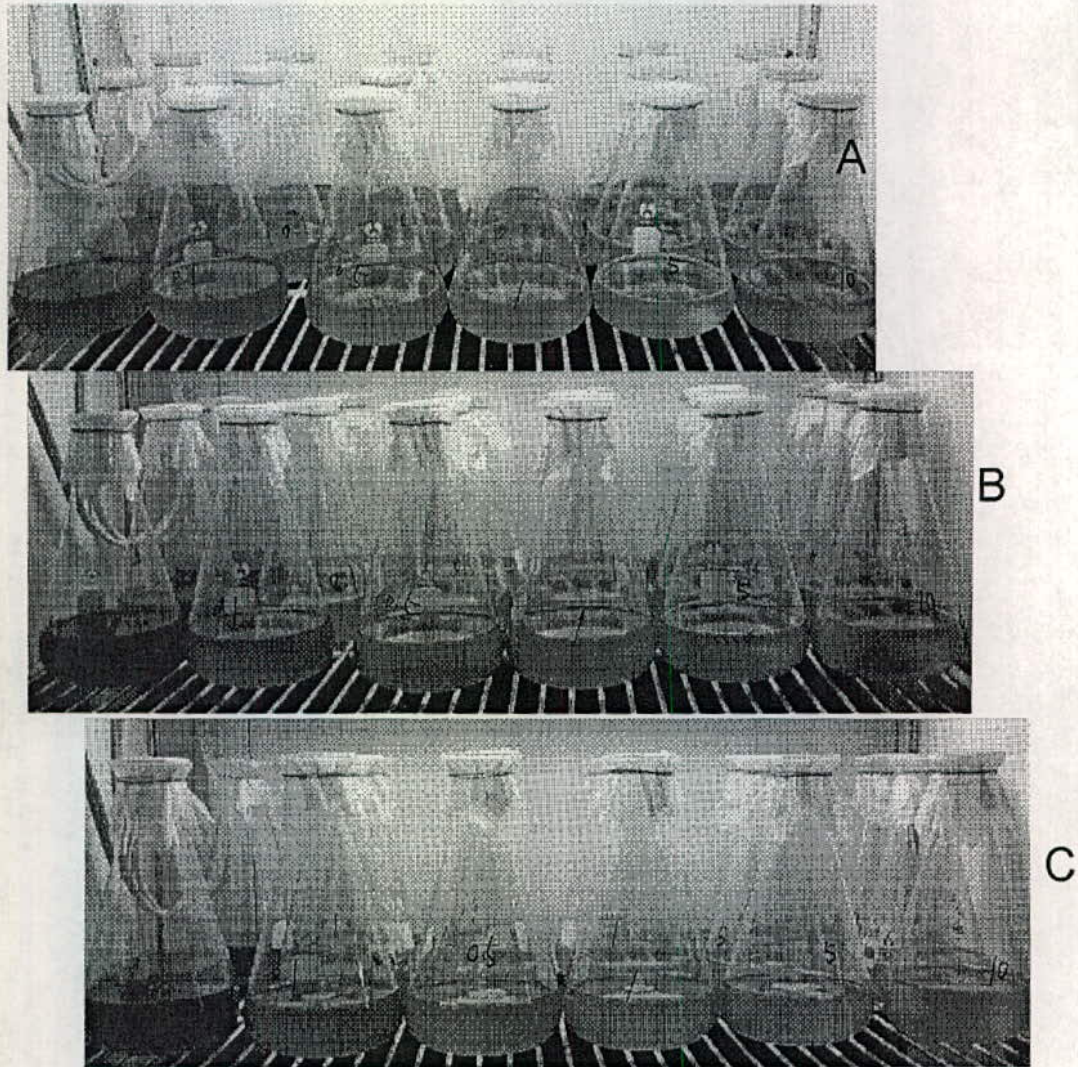


图 5

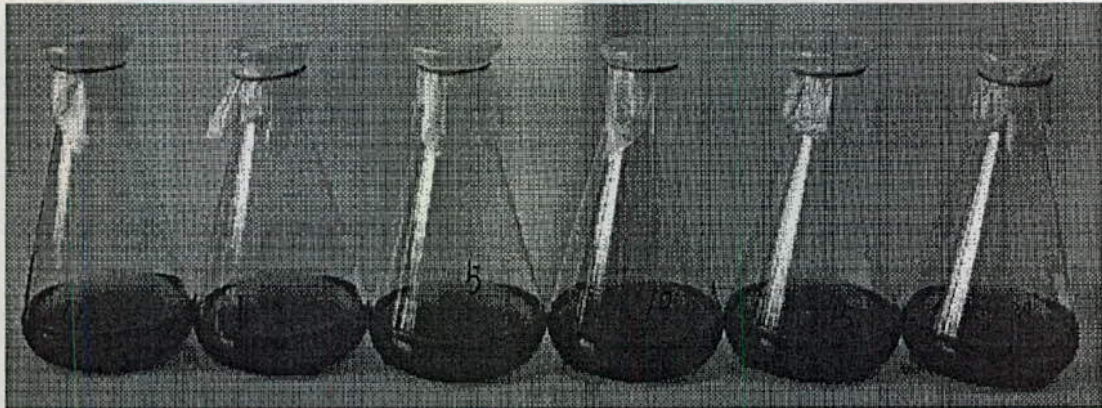


图 6



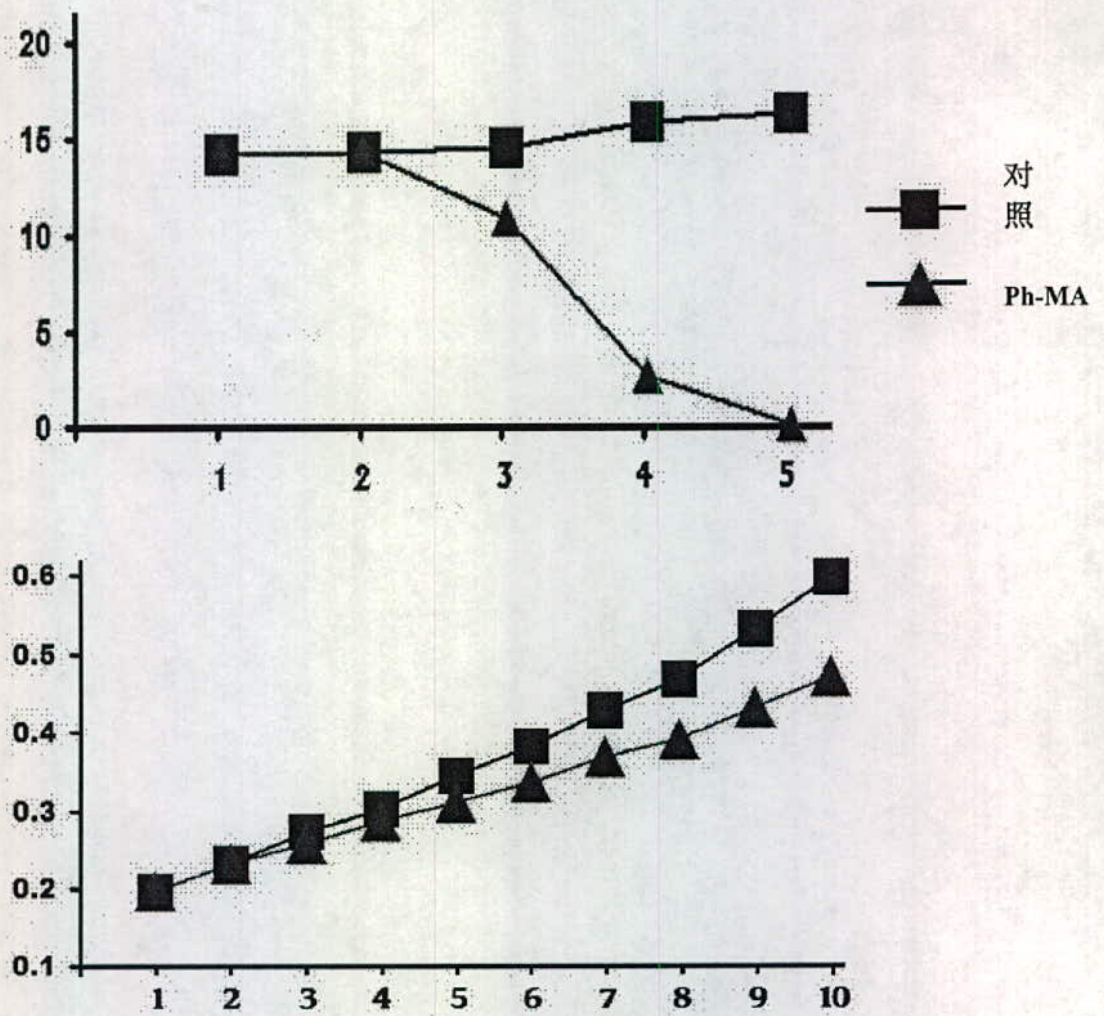


图 7

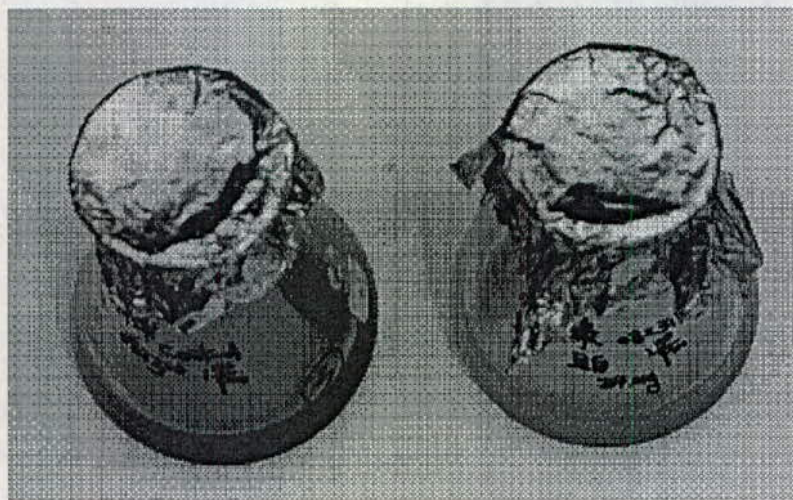


图 8A



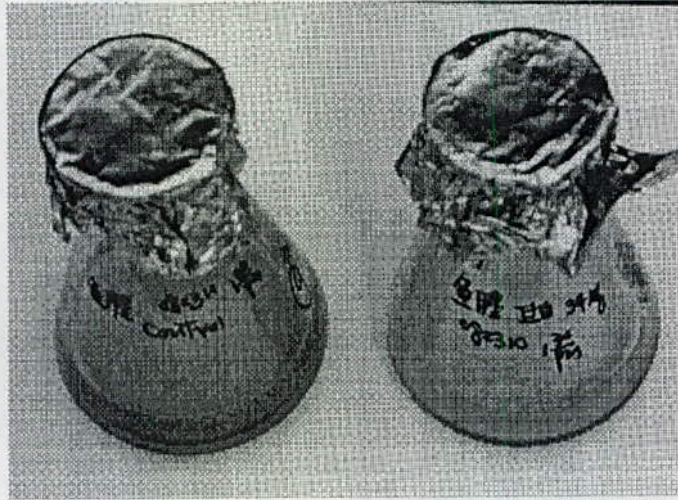


图 8B



图 8C



图 8D



说明书附图

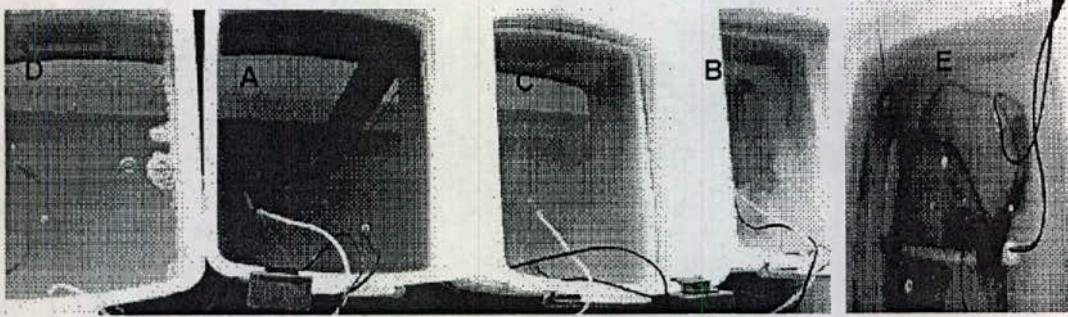


图 9

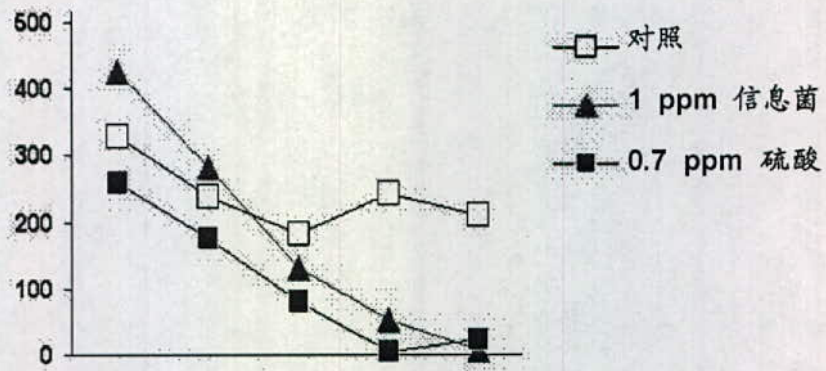


图 10A

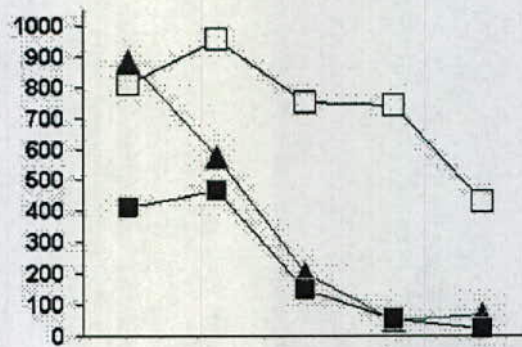


图 10B

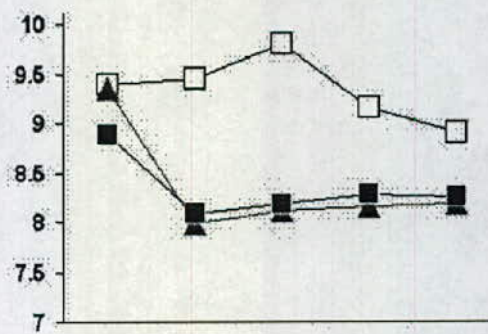


图 10C



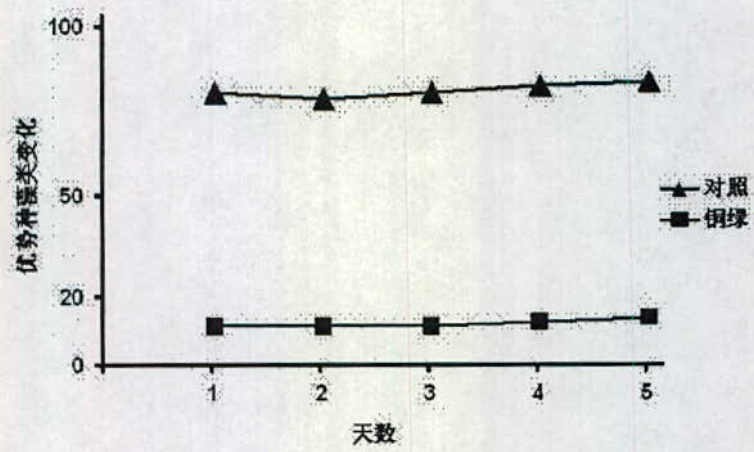


图 10D-1

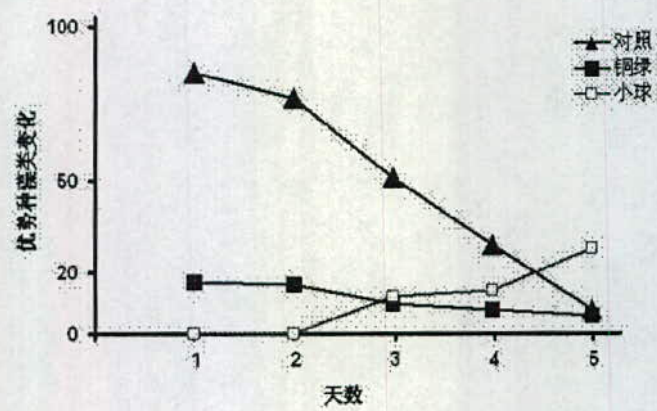


图 10D-2

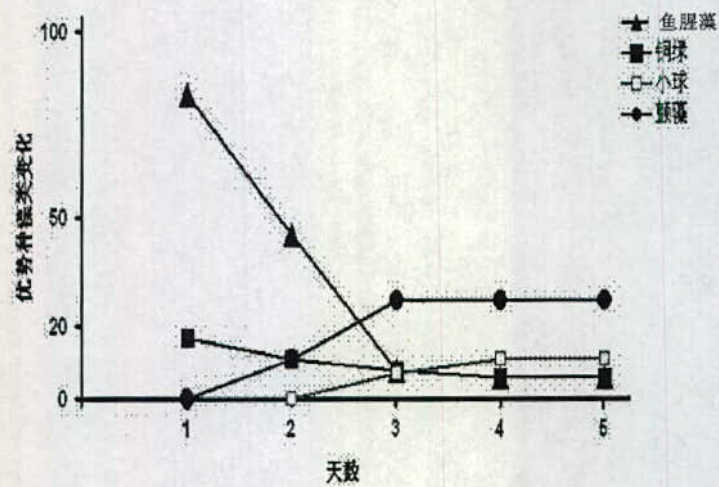


图 10D-3



空白对照组



1 微克/毫升 Ph-MA 处理组

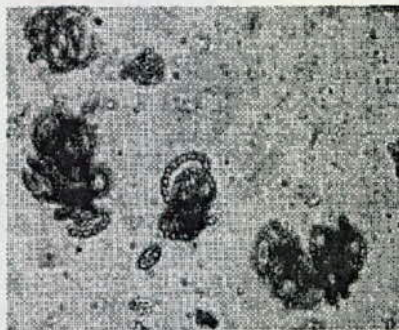


0.7 微克/毫升硫酸铜处理组

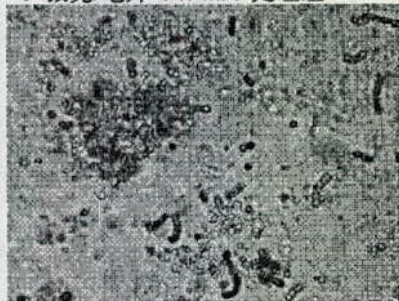


图 11A

空白对照组



1 微克/毫升 Ph-MA 处理组



0.7 微克/毫升硫酸铜处理组



图 11B



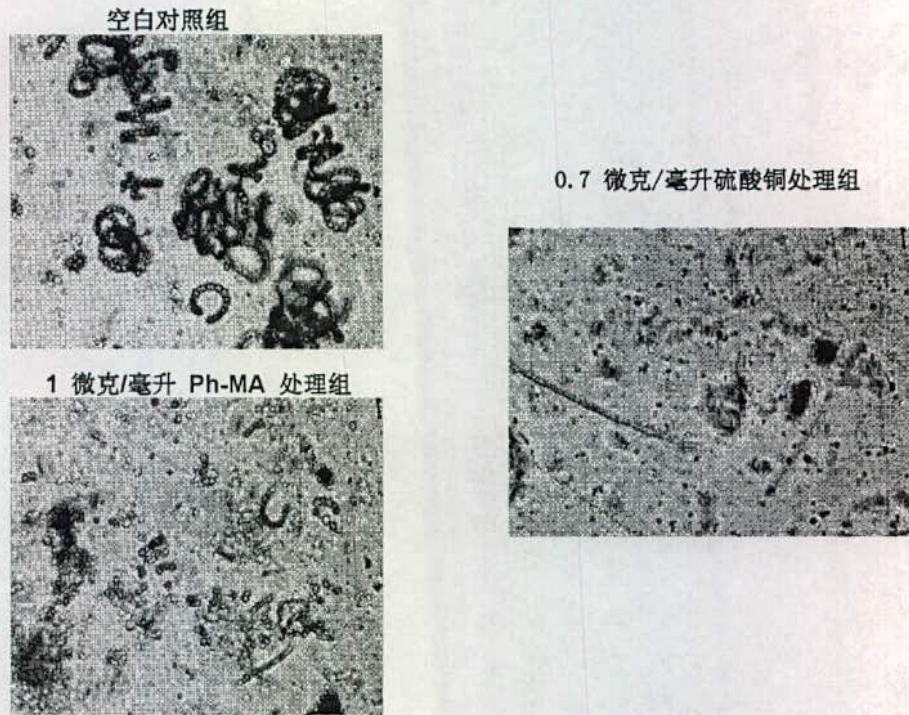


图 11C

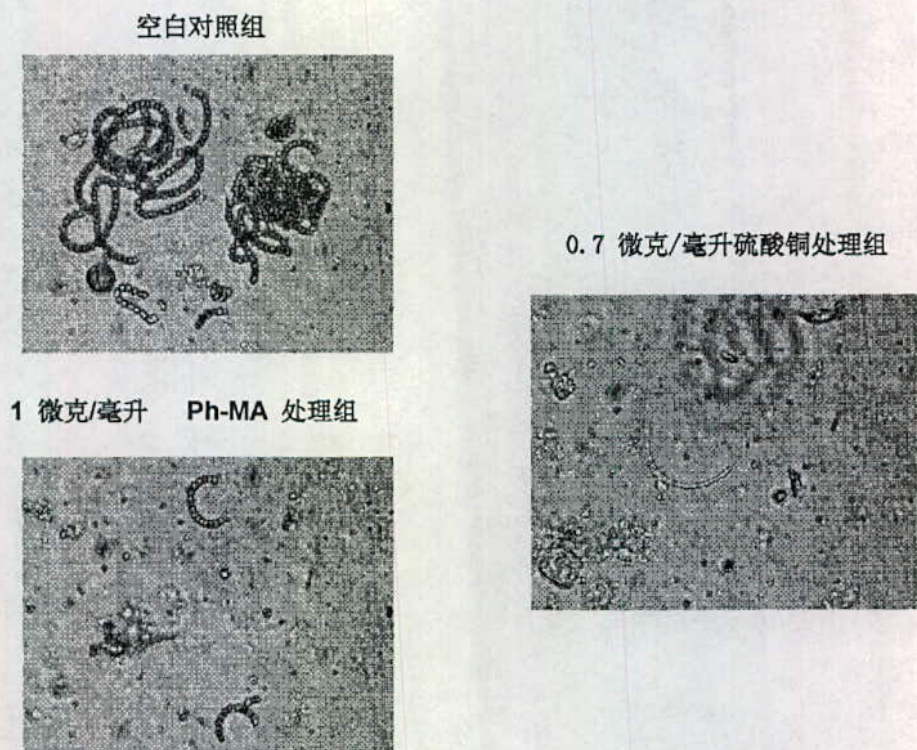
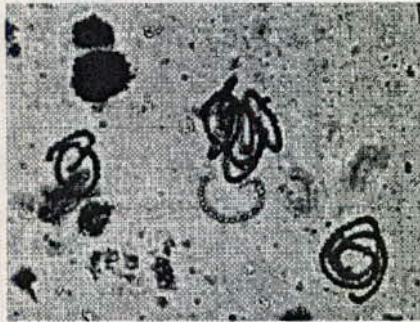


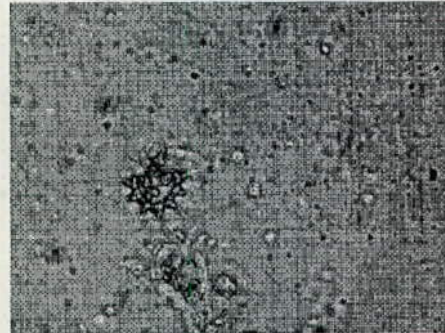
图 11D



空白对照组



0.7 微克/毫升硫酸铜处理组



1 微克/毫升 Ph-MA 处理组

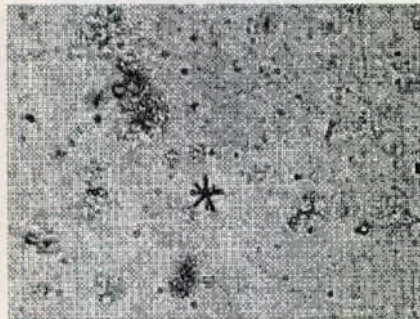


图 11E



Received at International Bureau: 06 April 2012 (06.04.2012)
Report generated on: 17 October 2013 (17.10.2013)

(10) Publication number: WO2012/142899	(43) Publication date: 26 October 2012 (26.10.2012)	(26) Publication language: Chinese (ZH)
(21) Application Number: PCT/CN2012/073120	(22) Filing Date: 27 March 2012 (27.03.2012)	(25) Filing language: Chinese (ZH)
(31) Priority number(s): 201110100775.2 (CN) 201110155221.2 (CN)	(31) Priority date(s): 21 April 2011 (21.04.2011) 10 June 2011 (10.06.2011)	(31) Priority status: Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1) Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:
C12N 5/12 (2006.01); C07K 16/14 (2006.01); C07K 19/00 (2006.01); C12N 15/13 (2006.01); C12N 15/62 (2006.01); C12N 15/63 (2006.01); C12N 15/70 (2006.01); C02F 1/50 (2006.01); C12R 1/89 (2006.01)

(71) Applicant(s):
PROTEIN DESIGN LAB, LTD. [CN/CN]; Qianshajiancun, Sujiatuozhen Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for all designated states except US)*
QIU, Xiaoqing [CN/CN]; Qianshajiancun, Sujiatuozhen Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*

(72) Inventor(s):
QIU, Xiaoqing; Qianshajiancun, Sujiatuozhen Haidian District, Beijing 100095 (CN)

(74) Agent(s):
HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY & PARTNERS; 9th Floor, Tower B, Zhongguancun Intellectual Property Mansion No.21, South Road HaiDian Haidian District, Beijing 100080 (CN)

(54) Title (EN): ANTI-CYANOBACTERIA RECOMBINANT ANTIBODY POLYPEPTIDE, GENE THEREOF, AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) Title (FR): ANTICORPS POLYPEPTIDIQUE RECOMBINÉ ANTI-CYANOBACTÉRIES, GÈNE CODANT POUR CELUI-CI ET PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ASSOCIÉ

(54) Title (ZH): 抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法

(57) Abstract:
(EN): Provided are a hybridoma cell CGMCC No.4783 that secretes a monoclonal antibody of an anti-cyanobacteria cell surface antigen, and the secreted monoclonal antibody thereof. Also provided are an anti-cyanobacteria recombinant antibody polypeptide, encoding gene, preparation method and use thereof. The anti-cyanobacteria recombinant antibody polypeptide is composed of an anti-cyanobacteria antibody mimetic polypeptide operably linearly connecting to the carboxyl terminal of an Escherichia coli polypeptide. The anti-cyanobacteria antibody mimetic polypeptide is a polypeptide with cyanobacteria identifying and binding capability designed based on an antigen binding fragment of the monoclonal antibody secreted by the CGMCC No.4783 hybridoma cell. The anti-cyanobacteria recombinant antibody polypeptide directly form an ion channel on the cell membrane of a cyanobacteria to kill the cyanobacteria, targeted killing the cyanobacteria (prokaryote) without killing other beneficial eukaryotic cell algae.
(FR): La présente invention concerne une cellule d'hybridome CGMCC No. 4 783 sécrétant un anticorps monoclonal d'un anti-antigène de surface cellulaire de cyanobactérie, ainsi que l'anticorps monoclonal sécrété par celle-ci. L'invention concerne également un anticorps polypeptidique recombiné anti-cyanobactéries, un gène codant pour celui-ci, son procédé de préparation et d'utilisation. Ledit anticorps polypeptidique recombiné anti-cyanobactéries est composé d'un anticorps polypeptidique mimétique anti-cyanobactéries lié de manière linéaire et fonctionnelle à l'extrémité carboxy-terminale d'un polypeptide d'*Escherichia coli*. L'anticorps polypeptidique mimétique anti-cyanobactéries est un polypeptide capable d'identifier des cyanobactéries et de se lier à elles grâce à un fragment de liaison à un antigène de l'anticorps monoclonal sécrété par la cellule d'hybridome CGMCC No. 4 783.

L'anticorps polypeptidique recombiné anti-cyanobactéries forme un canal ionique directement dans la membrane cellulaire d'une cyanobactérie dans le but de la tuer, en ciblant spécifiquement cette dernière (procaryote), et sans tuer d'autres algues cellulaires eucaryotes bénéfiques.

131

International search report:

Received at International Bureau: 28 June 2012 (28.06.2012) [CN]

International Report on Patentability (IPRP) Chapter II of the PCT:

Not available

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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

European Patent Office (EPO) : 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

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

Declarations:

Declaration made as to the identity of the inventor (PCT Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))

Declaration made as applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America

专 利 合 作 条 约

PCT

国际检索报告

(PCT 第 18 条和细则 43 和 44)

申请人或代理人的档案号 PC11853-JJQ	关于后续 行 为	见 PCT/ISA/220 表和 适用时, 见下面第 5 项
国际申请号 PCT/CN2012/073120	国际申请日 (日/月/年) 27.3 月 2012(27.03.2012)	(最早的)优先权日 (日/月/年) 21.4 月 2011(21.04.2011)
申请人 畿晋庆三联 (北京) 生物技术有限公司 等		

按照条约第 18 条, 本国际检索报告由本国际检索单位做出并送交申请人。报告副本送交国际局。

本国际检索报告总计 8 页。

☐ 它还附有本报告所引用的各现有技术文件的副本。

1. 报告的基础

a. 关于语言, 进行国际检索基于:

☒ 国际申请提交时使用的语言。

☐ 该国际申请的____语言译文, 为了国际检索的目的提供该种语言的译文(细则 12.3(a)和 23.1(b))。

b. ☐ 本国际检索报告考虑了本单位许可或被通知的根据细则91所做出的明显错误更正。(细则43.6之二(a))。

c. ☒ 关于国际申请中公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 见第 I 栏。

2. ☐ 某些权利要求被认为是不能检索的(见第II 栏)。

3. ☒ 缺乏发明的单一性(见第III 栏)。

4. 关于发明名称,

☒ 同意申请人提出的发明名称。

☐ 发明名称由本单位确定如下:

5. 关于摘要,

☐ 同意申请人提出的摘要。

☒ 根据细则 38.2(b), 摘要由本单位制定, 如第 IV 栏中所示。自本国际检索报告发文日起一个月内, 申请人可以向本单位提出意见。

6. 关于附图,

a.随摘要一起公布的附图是: _____

☐ 按照申请人建议的。

☐ 由本单位选择的, 因为申请人没有建议一幅图。

☐ 由本单位选择的, 因为该图能更好地表示发明的特征。

b. ☒ 没有与摘要一起公布的附图

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/073120

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

- 1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

- 2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

- 3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

参见附加页

- 1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
- 2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
- 3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
- 4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

第 IV 栏 摘要正文(续第 1 页第 5 项)

提供一株分泌抗蓝藻细胞表面抗原的单克隆抗体的杂交瘤细胞 CGMCC No.4783 及其所分泌的单克隆抗体。还提供一种抗蓝藻重组抗体多肽、其编码基因、制备方法及其应用，其中所述抗蓝藻重组抗体多肽由抗蓝藻的抗体模拟物多肽可操作地线性连接到大肠杆菌多肽的羧基端构成，所述抗蓝藻的抗体模拟物多肽是基于 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体的抗原结合片段设计的具有蓝藻识别结合能力的多肽。该抗蓝藻重组抗体多肽直接在蓝藻细胞膜上形成离子通道来杀伤蓝藻，对蓝藻（原核细胞）是靶向性杀伤，不会杀伤其他有益的真核细胞藻类。

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2012/073120
A. 主题的分类		
参见附加页		
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: C12N, C07K, C02F, C12R		
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))		
数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ		
检索词: 蓝藻, 蓝细菌, 蓝绿藻, 粘藻, 蓝球藻, 颤藻, 念珠藻, 发菜, 微囊藻, 鱼腥藻, 小球藻, 栅藻, 藻, 杂交瘤, 单克隆抗体, 抗体, 多肽, 抗原, CGMCC 478, cyanophyta, cyanobacteria, blue algae, blue green algae, blue-green algae, blue green bacteria, blue-green bacteria, blue bacteria, hybridoma, chroococaceae, chroococaceaeus, oscillatoria, nostoc, fractionation, microcystis, anabaena, chlorella, scenedesmus, monoclonal antibody, antibody, antibodies, antigen, 对序列 SEQ ID NO: 2、3、6、7 的检索		
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
X	刘中柱等, “满江红鱼腥藻单克隆抗体的制备和应用研究”, 中国科学 B 辑, 31.1 月 1989(31.01.1989), 第 1 期, 第 44-52 页, ISSN: 1674-7224, 参见摘要、材料和方法及结果	1-3,5
X	刘中柱等, “红萍鱼腥藻单克隆抗体的研究”, 福建农业学报, 31.12 月 1986(31.12.1986), 第 1 卷, 第 2 期, 第 1-7 页, ISSN: 1008-0384, 参见摘要、材料和方法及结果	1-3,5
A	D.S. RENNIS, “Differences in antigenic reactivity of six types of phycoerythrin to monoclonal anti-R-phycoerythrin”, PHYCOLOGIA, 31.7 月 1991(31.07.1991), 第 30 卷, 第 4 期, 第 329-338 页, ISSN: 0031-8884, 参见全文	1-13
☒ 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 14.6 月 2012 (14.06.2012)		国际检索报告邮寄日期 28.6 月 2012 (28.06.2012)
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 于娜 电话号码: (86-10) 62411084

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
A	CN101429507A (中国农业科学院原子能利用研究所), 13.5 月 2009(13.05.2009), 参见全文	1-13
A	KR20040097406A (BODITECHMED INC), 18.11 月 2004(18.11.2004), 参见全文	1-13
A	JP7089998A (MITSUBISHI YUKA BCL KK), 04.4 月 1995(04.04.1995), 参见全文	1-13
A	宋丽敏等, “抗微囊藻毒素单链抗体基因的构建、表达及初步鉴定”, 高技术通讯, 31.3 月 2010(31.03.2010), 第 20 卷, 第 3 期, 第 327-330 页, ISSN: 1002-0470, 参见全文	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/073120

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101429507A	13.05.2009	无	
KR20040097406A	18.11.2004	无	
JP7089998A	04.04.1995	无	

A. 主题的分类

- C12N 5/12 (2006.01) i
- C07K 16/14 (2006.01) i
- C07K 19/00 (2006.01) i
- C12N 15/13 (2006.01) i
- C12N 15/62 (2006.01) i
- C12N 15/63 (2006.01) i
- C12N 15/70 (2006.01) i
- C02F 1/50 (2006.01) i
- C12R 1/89 (2006.01) n

第III 栏 关于缺乏发明单一性时的意见

本国际检索单位发现权利要求书中包括两项发明，如下所示：

1、权利要求：1-8、10 和 12-13

涉及保藏号为 CGMCC No. 4783 的杂交瘤细胞及其分泌的单克隆抗体；具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽及其编码基因，其中所述模拟抗体多肽是所述单克隆抗体的抗原结合片段，或根据所述抗原结合片段上的功能区域设计的小分子多肽；抗蓝藻重组抗体多肽、其编码基因、制备方法及其应用，其中所述抗蓝藻重组抗体多肽由上述具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽可操作连接到大肠菌素多肽的羧基端构成；

2、权利要求：9 和 11

涉及编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因及含有编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因的重组表达载体；

发明 1 和 2 所要求保护的抗蓝藻重组抗体多肽完全不同，并且它们之间也没有相同的结构单元。也就是说，发明 1 和 2 之间没有相同或相应的特定技术特征，这些发明不能相互关联，从而不能形成一个总的发明构思。因此，不符合 PCT 实施细则 13.1、13.2 和 13.3 的规定。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/073120

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished: a. (means) ☐ on paper ☒ in electronic form b. (time) ☒ in the international application as filed ☐ together with the international application in electronic form ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/073120

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/073120

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: C12N, C07K, C02F, C12R		
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)		
DATABASE: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ		
KEYWORDS: CGMCC 478, cyanophyta, cyanobacteria, blue algae, blue green algae, blue-green algae, blue green bacteria, blue-green bacteria, blue bacteria, hybridoma, chroococaceae, chroococaceaeus, oscillatoria, nostoc, fractionation, microcystis, anabaena, chlorella, scenedesmus, monoclonal antibody, antibody, antibodies, antigen, sequence search on the sequences of SEQ ID NOS: 2、3、6、7		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, Zhongzhu et al., "Preparing Monoclonal Antibodies against <i>Anabaena azollae</i> and Applied Research", SCIENCE IN CHINA, SER.B, 31 Jan.1989(31.01.1989), no.1, pages 44-52, ISSN:1674-7224, see abstract, materials and methods, results	1-3,5
X	LIU, Zhongzhu et al., "Studies on Monoclonal Antibodies against <i>Anabaena azollae</i> ", FUJIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES, 31 DEC.1986(31.12.1986), vol.1, no.2, pages 1-7, ISSN: 1008-0384, see the abstract, materials and methods, results	1-3,5
☒ 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	"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	
"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	"&"document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 14 June 2012(14.06.2012)	Date of mailing of the international search report 28 June 2012(28.06.2012)	
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 YU, Na Telephone No. (86-10)62411084	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/073120

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D.S. RENNIS, "Differences in antigenic reactivity of six types of phycoerythrin to monoclonal anti-R-phycoerythrin", Phycologia, 31 July 1991(31.07.1991), Vol.30, No.4, pages 329-338, ISSN: 0031-8884, see the whole document	1-13
A	CN101429507A (ATOMIC ENERGY USE INST CHINESE ACAD AGRIC SCI), 13 May 2009(13.05.2009), see the whole document	1-13
A	KR20040097406A (BODITECHMED INC), 18 Nov. 2004(18.11.2004), see the whole document	1-13
A	JP7089998A (MITSUBISHI YUKA BCL KK), 04 April 1995(04.04.1995) , see the whole document	1-13
A	SONG, Limin et al., "Construction, expression and identification of scFv against microcystin-LR", CHINESE HIGH TECHNOLOGY LETTERS, 31 March 2010(31.03.2010), Vol.20, No.3, pages327-330, ISSN: 1002-0470, see the whole document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/073120

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101429507A	13.05.2009	NONE	
KR20040097406A	18.11.2004	NONE	
JP7089998A	04.04.1995	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/073120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/12 (2006.01) i
C07K 16/14 (2006.01) i
C07K 19/00 (2006.01) i
C12N 15/13 (2006.01) i
C12N 15/62 (2006.01) i
C12N 15/63 (2006.01) i
C12N 15/70 (2006.01) i
C02F 1/50 (2006.01) i
C12R 1/89 (2006.01) n

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

This International Searching Authority found two groups of inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8, 10 and 12-13

related to a hybridoma cell deposited as CGMCC No.4783 and the monoclonal antibodies secreted by the hybridoma cell; a mimetic antibody polypeptide which has an ability to recognize and bind to blue algae and its encoding gene, wherein the said mimetic antibody polypeptide is the antigen-binding fragment of the said monoclonal antibody, or the small molecular polypeptide designed according to the functional region of the said antigen-binding fragment; the recombinant antibody polypeptide against blue algae, its encoding gene, the preparing method thereof and the application, wherein the said recombinant antibody polypeptide against blue algae is constructed by the above mimetic antibody polypeptide having an ability to recognize and bind to blue algae operably linked to the carboxyl terminus of colicine polypeptide;

2. claims: 9 and 11

related to the gene encoding the recombinant antibody polypeptide against blue algae, and the recombinant expression vector comprising the gene encoding the recombinant antibody polypeptide against blue algae;

The recombinant antibody polypeptides against blue algae of groups 1 and 2 are different, and do not have same structural unit between them. That is to say, groups 1 and 2 do not have the same or corresponding special technical feature, and do not linked by a single general inventive concept. Therefore, they do not meet the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3.

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY &
PARTNERS
9th Floor, Tower B, Zhongguancun Intellectual Property
Mansion
No.21, South Road HaiDian
Haidian District, Beijing 100080
CHINEDate of mailing (day/month/year)
26 October 2012 (26.10.2012)Applicant's or agent's file reference
PC11853-JJQ

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/CN2012/073120International filing date (day/month/year)
27 March 2012 (27.03.2012)Priority date (day/month/year)
21 April 2011 (21.04.2011)

Applicant

PROTEIN DESIGN LAB, LTD. et al

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:☒ has **published** the above-indicated international application on 26 October 2012 (26.10.2012) under
No. WO 2012/142899☐ has **republished** the above-indicated international application on under
No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes
(15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the published international application.A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address:
www.wipo.int/pctdb (in the appropriate field of the structured search, enter the PCT or WO number).The applicant may also obtain a paper copy of the published international application from the International Bureau by sending an e-mail
to patentscope@wipo.int or by submitting a written request to the contact details provided below.The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Lingfei Bai

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt02.pct@wipo.int

WIPO



PATENTSCOPE

Search International and National Patent Collections

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

Search | Browse | Translate | Options | News | Login | Help

Home IP Services PATENTSCOPE

↑



1. (WO2012142899) ANTI-CYANOBACTERIA RECOMBINANT ANTIBODY POLYPEPTIDE, GENE THEREOF, AND PREPARATION METHOD THEREOF

PCT Biblio. Data

Description

Claims

National Phase

Notices

Drawings

Documents

Latest bibliographic data on file with the International Bureau

PermaLink

Pub. No.: WO/2012/142899

International Application No.: PCT/CN2012/073120

Publication Date: 26.10.2012

International Filing Date: 27.03.2012

IPC:

C12N 5/12 (2006.01), C02F 1/50 (2006.01), C07K 16/14 (2006.01), C07K 19/00 (2006.01), C12N 15/13 (2006.01), C12N 15/62 (2006.01), C12N 15/63 (2006.01), C12N 15/70 (2006.01), C12R 1/89 (2006.01)

Applicants:

PROTEIN DESIGN LAB, LTD. [CN/CN]; Qianshajiancun, Sujiatuozhen Haidian District, Beijing 100095 (CN) (For All Designated States Except US).
QIU, Xiaoqing [CN/CN]; (CN) (For US Only)

Inventors:

QIU, Xiaoqing; (CN)

Agent:

HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY & PARTNERS; 9th Floor, Tower B, Zhongguancun Intellectual Property Mansion No.21, South Road HaiDian Haidian District, Beijing 100080 (CN)

Priority Data:

201110100775.2 21.04.2011 CN
201110155221.2 10.06.2011 CN

Title

(EN) ANTI-CYANOBACTERIA RECOMBINANT ANTIBODY POLYPEPTIDE, GENE THEREOF, AND PREPARATION METHOD THEREOF
(FR) ANTICORPS POLYPEPTIDIQUE RECOMBINÉ ANTI-CYANOBACTÉRIES, GÈNE CODANT POUR CELUI-CI ET PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ASSOCIÉ
(ZH) 抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法

Abstract:

(EN) Provided are a hybridoma cell CGMCC No.4783 that secretes a monoclonal antibody of an anti-cyanobacteria cell surface antigen, and the secreted monoclonal antibody thereof. Also provided are an anti-cyanobacteria recombinant antibody polypeptide, encoding gene, preparation method and use thereof. The anti-cyanobacteria recombinant antibody polypeptide is composed of an anti-cyanobacteria antibody mimetic polypeptide operably linearly connecting to the carboxyl terminal of an Escherichia coli polypeptide. The anti-cyanobacteria antibody mimetic polypeptide is a polypeptide with cyanobacteria identifying and binding capability designed based on an antigen binding fragment of the monoclonal antibody secreted by the CGMCC No.4783 hybridoma cell. The anti-cyanobacteria recombinant antibody polypeptide directly form an ion channel on the cell membrane of a cyanobacteria to kill the cyanobacteria, targeted killing the cyanobacteria (prokaryote) without killing other beneficial eukaryotic cell algae.
(FR) La présente invention concerne une cellule d'hybridome CGMCC No. 4 783 sécrétant un anticorps monoclonal d'un anti-antigène de surface cellulaire de cyanobactérie, ainsi que l'anticorps monoclonal sécrété par celle-ci. L'invention concerne également un anticorps polypeptidique recombiné anti-cyanobactéries, un gène codant pour celui-ci, son procédé de préparation et d'utilisation. Ledit anticorps polypeptidique recombiné anti-cyanobactéries est composé d'un anticorps polypeptidique mimétique anti-cyanobactéries lié de manière linéaire et fonctionnelle à l'extrémité carboxy-terminale d'un polypeptide d'Escherichia coli. L'anticorps polypeptidique mimétique anti-cyanobactéries est un polypeptide capable d'identifier des cyanobactéries et de se lier à elles grâce à un fragment de liaison à un antigène de l'anticorps monoclonal sécrété par la cellule d'hybridome CGMCC No. 4 783. L'anticorps polypeptidique recombiné anti-cyanobactéries forme un canal ionique directement dans la membrane cellulaire d'une cyanobactérie dans le but de la tuer, en ciblant spécifiquement cette dernière (procaryote), et sans tuer d'autres algues cellulaires eucaryotes bénéfiques.

Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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.
African Regional Intellectual Property Org. (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW)
Eurasian Patent Organization (EAPO) (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
European Patent Office (EPO) (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)
African Intellectual Property Organization (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publication Language:

Chinese (ZH)

Filing Language:

Chinese (ZH)

Fecha	Código de	Cuenta Corriente	☒	Número
Año Mes Día	Convenio	Cuenta de Ahorros	☐	
2013 10 21		Crédito Rotativo	☐	10678 54381

Nome Convenio e Empresa Recaudadora
Sindicato de Impos e Cia

Referencia 1

Referencia 2

FORMA DE PAGO

Efectivo	\$ 175.000 -		
Cheque	\$		
TOTAL A PAGAR	\$ 175.000 -		
Código Banco	No. de cuenta del cheque	Número del cheque	Ciudad o plaza

ANEXO

☐ Sin Anexo ☐ Papel
☐ Disquete ☐ Otro

Banco de Bogotá 430 Maracaibo
 Srv 2160 A0XP43003 Usul994 T364
 CXXXXX4387 21/10/13 10:31 H.NO
 SUPERINTENDENCIA DE INDO CEO 785
 Bs:9001030133
 Valor Efectivo:175,000.00
 Valor Cheque:0.00 0
 Valor IC:0.00
 Valor NO:0.00
 Valor Total:175,000.00

Nombre del depositante:

| Teléfono:

Nota: antes de presentar este comprobante, sírvase diligenciarlo completamente con base en la información que le suministra la empresa. Si paga con cheque, favor anotar al respaldo del mismo. El número de este comprobante, el nombre y número de la cuenta de la empresa y sus datos personales (Nombre, dirección y teléfono).

Nombre del depositante:
Beijing Credit

6040450

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2 **No. 13 - 106025**
 Bogotá D.C., Octubre 21 de 2013 - 13:52:51
RECIBIDO DE: CONTEXTO INTELECTUAL S.A
CONS. BANCO DE BOGOTA 062754387 587433173 21/10/2013 \$1175.000
1.50005-01-01 SOLICITUDES
82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NUEVAS CREACIONES
Valor Recaudo \$175.000.00 -**-**

Fecha	Código de Convenio	Cuenta Corriente	Número
Año Mes Día		Cuenta de Ahorros	
2013 10 21		Crédito Rotativo	062954303

ESPACIO PARA EL TIMBRE

Nombre Convenio o Empresa Recaudadora

Superintendencia de Industria y Comercio

Referencia

Pod 01

Referencia 2

9100103013-3

FORMA DE PAGO

Efectivo	\$ 90.000 -		
Cheque	\$		
TOTAL A PAGAR	\$ 90.000 -		
Código Banco	No. de cuenta del cheque	Número del cheque	Ciudad o plaza

ANEXO

☐ Sin Anexo ☐ Papel

☐ Disquete ☐ Otro

Banco de Bogotá 430 Maracaibo
Srv 2160 A0XP43003 Usu1994 1367
CC*****4387 21/10/13 10:33 H.NO
SUPERINTENDENCIA DE INDU CED 785
Us:Y00U1030133
Valor Efectivo:90,000.00
Valor Cheque:0.00
Valor IC:0.00
Valor MU:0.00
Valor total:90,000.00

Nota: antes de presentar este comprobante, sírvase diligenciarlo completamente con base en la información que le suministra la empresa. Si paga con cheque, favor anotar al respaldo del mismo. El número de este comprobante, el nombre y número de la cuenta de la empresa y sus datos personales (Nombre, dirección y teléfono).

Nombre del depositante: Beijing Cárter

Teléfono: 6040430

2-1-303-353 (CC-035/Febrero 2013)

149

- 2a COPIA : PARA EL DEPOSITANTE -

Esta transacción está sujeta a verificación posterior. El/los cheque(s) depositado(s) se reciben "Salvo buen cobro" de manera que la operación solo se entiende efectiva si el/los cheque(s) son pagados por el/los bancos librados. En caso de que el/los cheque(s) sean devueltos sin pago, esta operación se revocará y el/los título(s) se entregará(n) por parte del Banco al titular de la cuenta en la que se depositaron. En consecuencia, la copia del comprobante de pago que se entrega al depositante se cancela o invalida por el Banco. No implica constancia de pago respecto a las sumas no consignadas en efectivo.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2 **No. 13 - 106024**

Bogotá D.C., Octubre 21 de 2013 - 13:50:18

RECIBIDO DE : CONTEXTO INTELLECTUAL S.A
CONS. BANCO DE BOGOTÁ 062754387 567433162 21/10/2013 \$'90.000

3 50005-01-01 SOLICITUDES

1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10

Valor Recaudo \$90.000.00 -*.**

Fecha
Año Mes Día
2013 10 21

Código de Convenio
Cuenta Corriente ☒ ☐ Número
Cuenta de Ahorros ☐
Crédito Rotativo ☐

ESPACIO PARA EL TIMBRE

Nombre, Convenio ó Empresa Recaudadora
Superintendencia de Industria y Comercio

Referencia 1
800 01

Referencia 2
900103013-3

FORMA DE PAGO

Efectivo	\$ 500.000 -		
Cheque	\$		
TOTAL A PAGAR	\$ 500.000 -		
Código Banco	No. de cuenta del cheque	Número del cheque	Ciudad o plaza

ANEXO

☐ Sin Anexo ☐ Papel
☐ Disquete ☐ Otro

Banco de Bogotá 430 Maracaibo
Srv 2160 AXP43003 Usu1994 1369
CC*****4387 21/10/13 10:33 H.NO
SUPERINTENDENCIA DE INDU CEO 785
06:9001030133
Valor Efectivo:500,000.00
Valor Cheque:0.00 0
Valor ID:0.00
Valor ND:0.00
Valor total:500,000.00

Nota: antes de presentar este comprobante, sírvase diligenciarlo completamente con base en la información que le suministra la empresa.
Si paga con cheque, favor anotar al respaldo del mismo. El número de este comprobante, el nombre y número de la cuenta de la empresa y sus datos personales (Nombre, dirección y teléfono).

Nombre del depositante: Beijing. Cruzado
Teléfono: 6040450

Esta transacción está sujeta a verificación posterior. El(los) cheque(s) depositado(s) se notificarán "Salvo buen cobro" de manera que la operación sólo se entienda efectiva si el(los) cheque(s) son pagados por el(los) banco(s) librados. En caso de que el(los) cheque(s) sean devueltos sin pago, esta operación se revocará y el(los) título(s) se entregará(n) por parte del Banco al titular de la cuenta en la que se depositaron. En consecuencia, la copia del comprobante de pago que se entrega al depositario sellada o timbrada por el Banco, no implica constancia de pago respecto a las sumas no consignadas en efectivo.
- 2a COPIA : PARA EL DEPOSITANTE -

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
Bogotá D.C., Octubre 21 de 2013 - 13:47:01

No. 13 - 106023

RECIBIDO DE : CONTEXTO INTELLECTUAL SA
CONS. BANCO DE BOGOTA 062754387 587433151 21/10/2013 \$500.000

1 50005-01-01 SOLICITUDES

1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION

Valor Recaudado \$500.000.00 .**.

500.0

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-248865- -00000-0000

P102-F03 (2009-11-16)

Fecha: 2013-10-21 13:55:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150