Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-208481- -00000-0000

Fecha: 2013-09-03 15:33:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 83

esivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	■ Patente de invención Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/CN2012/071825	**Fecha**	1 MARZO 2012
Publicación Internacional No.	WO/2012/119524	**Fecha**	13 SEPTIEMBRE 2012

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

MÉTODO DE PREPARACIÓN DE NUEVA MEDICINA ANTIBACTERIALDE POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE

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.	BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095	No. TELÉFONO	
CIUDAD	Beijing	CORREO ELECTRÓNICO	amarquez@contextointelectual.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
PAÍS DE RESIDENCIA	República de China		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	QIU	Xiaoqing	Chino
2.	LI	Rongqi	Chino
3.	ZHANG	Xiangli	Chino
4.	ZHANG	Xiaofeng	Chino
5.	WANG	Dongqin	Chino

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.República Popular de China		Beijing	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095
2.República Popular de China		Beijing	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095
3.República Popular de China		Beijing	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095
4.República Popular de China		Beijing	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095
5.República Popular de China		Beijing	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo 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 REPÚBLICA POPULAR DE CHINA			201110052238.5	04 de marzo de 2011

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

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.

☐ 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

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamencanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ 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

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ 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

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

17 ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ■ Descripción — N° de folios
2. ■ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones
3. ■ Dibujos y/o figuras — N° folios
4. ■ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2 **No. 13 - 0087922**
Bogotá D C , Septiembre 03 de 2013 - 15 27 21
RECIBIDO DE CONTEXTO INTELECTUAL S A
CONS BANCO DE BOGOTA 062754387 565282222 03/09/2013 $'500.000
1 50005-01-01 SOLICITUDES
1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE INVENCION 500 (
Valor Recaudo $500.000.00 -******-**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2 **No. 13 - 0087924**
Bogotá D C , Septiembre 03 de 2013 - 15 29 50
RECIBIDO DE CONTEXTO INTELECTUAL S A
CONS BANCO DE BOGOTA 062754387 565282200 03/09/2013 $'175.000
1 50005-01-01 SOLICITUDES
82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NUEVAS CREACIONES
Valor Recaudo $175.000.00 - -

Documentación Jurídica

9. ☐ Poderes, si fuera el caso
10. ■ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	NUMERO DE RADICACIÓN
■ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN

4 (71) SOLICITANTE (S)

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2	BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO , LTD			

5 DATOS DEL SOLICITANTE

PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2 Republica Popular de China		Beijing	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095
TELEFONO	**FAX**	**E-MAIL**	**NACIONALIDAD**
			Chino

6 (72) INVENTOR (ES)

	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
6	QIU	Xiaoqing	Chino
7	LI	Rongqi	Chino
8	ZHANG	Xiangli	Chino
9	ZHANG	Xiaofeng	Chino
10	WANG	Dongqin	Chino

7 DATOS INVENTOR (ES)

	DIRECCIÓN	CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095		Beijing	República Popular de China
7	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095		Beijing	República Popular de China
8	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095		Beijing	República Popular de China
9	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095		Beijing	República Popular de China
10	East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095			Republica Popular de China

9 (30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

	PAIS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NUMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4	República Popular de China		201110052238.5	04 de marzo de 2011
5				

MÉTODO DE PREPARACIÓN DE NUEVA MEDICINA ANTIBACTERIALDE POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el campo de la producción de medicina antibiótica, y más específicamente, con un método de preparación de una nueva medicina antibacterial de polipéptido recombinante.

ANTECEDENTES

Los antibióticos novedosos se han estudiado con grandes esfuerzos, entre los cuales los métodos de matar células al formar canales de ion en la membrana celular de la bacteria parecen ser directamente un acercamiento prometedor. Existen muchas toxinas bacterianas que trabajan en dicho mecanismo en la naturaleza. El ejemplo modelo de dicha toxina es colicina, una toxina bacteriana secretada por *Escherichia coli*. A comienzos de 1946, H. Florey y otros, los inventores de la penicilina, habían evaluado completamente acerca de la colicina en su actividad antibacterial, seguridad y toxicología (Diario Británico de Patología Experimental. 1946(27), 378-390). Ellos encontraron que la colicina es de gran actividad antibacterial, con muy buen efecto antibacterial aún después de diluirse millones de veces. Sin embargo, el espectro antimicrobiano la colicina es muy específico, enfocado únicamente a *Escherichia coli* y algunas bacterias gram-negativas con relaciones cercanas. La Colicina la fue encontrada por Jacob y otros en 1953 con gran actividad antibacterial a un pH de 6-7. En 1978, Finkelstein y otros encontraron una colicina K inducible por canales de iones que podía formar canales de iones dependientes del voltaje en la membrana de lípido bimolecular artificial, fundamentalmente explicando de esta forma el mecanismo antibacterial de la toxina bacteriana, formando canales de iones fatales en la membrana de las células objetivo. En 1996, Qiu y Finkelstein y otros, revelaron la estructura espacial

transmembrana de la colicina Ia cuando los canales de iones se formaron en la membrana de lípido bimolecular artifical abierta o cerrada, y así se suministra una base teorica para el diseño y la preparación de nuevos antibióticos a un nivel molecular. En 2001, Qiu construyó y preparó una medicina artificial de polipéptido antibacterial contra el *Staphylococcus* resistente a los fármacos por medio de la fusión de colicina con feromona de *Staphylococcus aureus*, dicho polipéptido tiene una actividad y selectividad bactericida tanto in vivo como in vitro. Del mismo modo, Qiu construyó polipéptidos artificiales antibacteriales contra *Enterococcus* resistente a vancomicina y *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, dichos polipéptidos exhiben, en experimentos tanto in vivo como in vitro, un efecto bactericida específico, estable y rápido contra esas bacterias patogénicas formidable para los antibióticos disponibles hoy en día, con un efecto farmacéutico de decenas de miles de veces más que los de vancomicina, oxacilina o penicilina, etc. Los resultados relevantes fueron publicados en artículos tales como Biotecnología de la Naturaleza (21(12): 1480-85, 2003), y Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia (49(3): 1184-1189, 2005), etc.

En este proyecto, la nueva idea de investigación y acercamiento se suministra para la construcción de polipéptidos antibacteriales artificiales al fusionar colicina con miméticos de anticuerpos contra los antígenos de bacteria patogénica, y un polipéptido antibacterial artificial, la **medicina de feromona antibiótica de espectro amplio**, se ha preparado de forma exitosa. El inventor suministra ideas únicas e innovación teórica en el campo de los fármacos de polipéptidos antibacteriales, con patentes presentadas y métodos establecidos para construcción artificial de miméticos de anticuerpos miniatura, y los resultados relevantes publicados en Biotecnología de la Naturaleza (25(8): 921-929, 2007). Debido a su mecanismo bactericida especial, la medicina de feromona antibiótica de amplio espectro novedosa y eficiente del proyecto exhibe un buen efecto bactericida contra las bacterias resistentes a los fármacos, más fuerte que los de

los antibióticos disponibles ahora, tal como *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (MDRPA), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), y *enterococcus* resistente a vancomicina (VRE), etc. El desarrollo y preparación de dicha medicina jugará un papel importante en la solución de los problemas causados por el tratamiento de bacterias resistentes a los fármacos así como en el cuidado de la salud.

La medicina de feromona antibiótica de amplio espectro del proyecto es un material completamente diferente de los antibióticos de péptidos pequeños (por ejemplo, perforina humana y péptido antibacterial de gusano de seda) estudiados dentro y fuera del país. Existen varias diferencias entre los dos: (1) Al igual que la colicina, dicho polipéptido antibacterial artificial trabaja en una conformación de monómero, es decir, una única molécula que construye toda una unidad de trabajo; mientras que los antibióticos de péptidos pequeños trabajan en conformaciones de polímero, es decir, decenas de moléculas que construyen toda una unidad de trabajo. (2) Al igual que la colicina, dicho polipéptido antibacterial artificial puede funcionar dentro de la circulación sanguínea e in vivo; mientras que los antibióticos de péptidos pequeños no puede. (3) Al igual que la colicina, dicho polipéptido antibacterial artificial forma canales de iones dependientes del voltaje en la membrana celular de las células objetivo, lo que lleva a un mejor mecanismo bactericida y mayor eficiencia que el canal formado por antibióticos de péptidos pequeños en la membrana celular de las células objetivo. De acuerdo con la literatura del estado del arte buscado hasta 2010, casi todos de dichos antibióticos de péptidos pequeños tienen un defecto fatal en experimentos en animales in vivo, especialmente, se degradan por medio de las proteasas dentro de los animales. Por lo tanto, ninguno de los fármacos desarrollados a partir de precursores de fármacos de antibióticos de péptidos pequeños simples pasó la prueba clínica. Sin embargo, el prototipo del nuevo fármaco de polipéptido antibacterial artificial desarrollado y preparado en el proyecto es per se una bacteriocina producida a

partir de la coexistencia en canales alimenticios humanos y animales con una estructura completamente diferentes y mecanismo de función a partir de péptidos pequeños simples. En los 8 años de las pruebas tanto in vivo como in vitro, la medicina siempre muestra gran actividad bactericida, y desempeña buen efecto bactericida y terapéutico en modeles de animales grandes (por ejemplo, vacas lecheras y cabras) bien sea administrado por inyección local o por inyección intravenosa. Por lo tanto, no existe ninguna limitación para el nuevo fármaco de dicho polipéptido antibacterial artificial para ser utilizado in vivo como aquellos de dichos péptidos pequeños.

Se muestra al buscar la literatura que en el presente, la colicina, los polipéptidos de transducción de señal bacteriana así como las modificaciones de anticuerpo se han estudiado fuera del país respectivamente, pero no hay ninguna investigación llevada a cabo con dicha idea de investigación o ruta de técnica como en el presente proyecto, no se publicó ningún artículo similar. Se muestra al buscar en NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) en Junio de 2010 que había más de 2600 literaturas listadas acerca de la colicina, más de 7300 acerca de feromonas, más de 2100 acerca de reconstitución de anticuerpo, más de 3800 acerca de inmunotoxinas, y más de 94000 acerca de resistencia antibiótica, entre los cuales ninguno de dichos conceptos científicos, ideas de diseño o práctica de investigación se relacionaba con el presente proyecto reportado. En Junio de 2010, se manifestó en una búsqueda de novedad por parte de la estación de trabajo de búsqueda de novedad (No.1) del Ministerio de Educación, República de China que, excepto para los reportes del presente proyecto, no había ningún reporte, tanto en el país como fuera de éste, sobre la construcción de una medicina de polipéptido antibacterial artificial contra la bacteria objetivo que utilice colicina para unirse a la feromona bacteriana objetivo o los miméticos de anticuerpo bacteriano objetivo diseñados artificiales. Mientras tanto, no hubo ningún reporte, tanto en el país como fuera de él, sobre fármacos humanos o

animales o pesticidas preparados de acuerdo con el método de construcción del polipéptido antibacterial artificial objetivo del proyecto.

Dicha **medicina de feromona antibiótica de amplio espectro** se ha desarrollado para animales (un fármaco para el tratamiento de mastitis bovina) y humanos (antibióticos) de acuerdo con la demanda actual. Se ha demostrado por medio de pruebas antibacterianas tanto in vivo como in vitro que, dicha feromona exhibe fuerte efecto antibacterial, especialmente in vivo, lo cual es mucho mejor que in vitro. En Mayo de 2010, se ha probado en una evaluación de seguridad por parte del Centro de Prueba y Supervisión de Fármacos Veterinarios, Ministerio de Agricultura, República de China, que dicha medicina no es tóxica y no causará mutación o teratogénesis. Los resultados de evaluación de seguridad de la medicina terminada son los siguientes:

(1) se mostró por medio de pruebas de toxicidad aguda en ratas y ratones que dicho fármaco no es tóxico (Reporte No. WTPJ20100003);

(2) la mutación reversa de *Salmonella typhimurium* (Ames) salió negativa, indicando la no mutagenicidad de dicho fármaco (Reporte No. WTPJ20100003(2));

(3) el resultado de la prueba micronuclear de osteocitos de médula de rata es negativo, lo cual indica que no hay mutagenicidad de dicho fármaco (Reporte No. WTPJ20100003(3));

(4) el resultado de la prueba de malformación de esperma de ratones es negativo, lo cual indica que no hay efecto que causa teratogénesis en el esperma de ratones (Reporte No. WTPJ20100003(4));

(5) la medicina recombinante de polipéptido antibacterial se probó para la inhibición in vitro y el efecto bactericida en la bacteria patogénica aislada de mastitis bovina. Los resultados muestran que:

A. La medicina recombinante de polipéptido antibacterial tiene un efecto antibiótico de amplio espectro, así como buena inhibición y efecto bactericida en varias bacterias patogénicas de mastitis bovina in vitro.

B. La medicina recombinante de polipéptido antibacterial (Título de Solicitud de Patente: Un nuevo antibiótico y secuencia de nucleótido, método de preparación y aplicación del mismo, Solicitud No. CN200910157564.5) tienen mejor inhibición y efecto bactericida contra *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus*, y *Staphylococcus sciuri*), con MIC_{50} de 0.125 μg/mL, y MBC_{50} de 0.25 μg/mL, lo cual es una diferencia extremadamente significante de los controles de cefalotina (2μg/ml), oxacilina (4 μg/ml), penicilina, ampicilina, lincomicina, y gentamicina (cada una con más de 8 μg/ml). Después de la estandarización de acuerdo con el peso molecular de la medicina, la inhibición y el efecto bactericida del polipéptido (MW 70,000) contra *Staphylococcus* es 2100 veces que la de la cefalotina (MW 523), y 5300 veces la de la oxacilina (MW 423).

C. La medicina recombinante de polipéptido antibacterial muestra inhibición equivalente y efecto bactericida contra *Streptococcus, Arcanobacterium pyogenes*, y *Enterobacteriaceae* (tal como *Escherichia coli,* etc.), con 1.0 μg/mL de MIC_{50} y 2.0 μg/mL de MBC_{50} contra *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis,* y *Streptococcus bovis*), 0.25 μg/mL de MIC_{50} y 1.0 μg/mL de MBC_{50} contra *Arcanobacterium pyogenes*, así como 1.0 μg/mL de MIC_{50} y 1.0 μg/mL de MBC_{50} contra *Enterobacteriaceae* (tal como *Escherichia coli*, etc.).

D. No hay diferencia significativa de inhibición y efecto bactericida para la medicina recombinante de polipéptido antibacterial entre la cepa sensible y la cepa resistente al fármaco de la bacteria, pero la medicina recombinante de polipéptido antibacterial tiene inhibición eficiente alta y efecto bactericida contra varios *Staphylococcus, Streptococcus* y *Escherichia coli* resistentes a los fármacos.

En pruebas previas de tratamiento de animales grandes (terapia experimental de mastitis bovina) 112 se curaron, con una tasa de cura de 95%. Se

detectó por parte del Centro de Valoración de Seguridad de Fármacos Veterinarios del Estado que, la medicina pertenece a los fármacos no tóxicos, y no generarán toxicidad o efecto perjudicial hacia los animales. Mientras tanto, como una sustancia de feromona degradable, dicha medicina evita los residuos de fármacos de antibióticos normales después del tratamiento de enfermedades de animales y aves. Se ilustró por medio de una prueba por parte de la Estación de Inspección y Supervisión de Calidad de Lácteos de Beijing que no se detectó ningún residuo antibiótico a partir de la leche producida por las vacas tratadas con dicha medicina (Reporte de Detección No. A2009-249).

En cuanto a la producción de dicho antibiótico recombinante, la solicitud de patente anterior (Título de Solicitud de Patente: Un nuevo antibiótico y secuencia de nucleótido, método de preparación y aplicación del mismo, Solicitud No. CN200910157564.5) divulga, en el Ejemplo 1 de la descripción, un método de preparación integral de dicho péptido antibacterial, en donde el método de cultivo de rutina se llevó a cabo durante los pasos de expresión de la proteína recombinante inducida por la batería enriquecida después que se obtuvo un plásmido recombinante y se transformó en células competentes. Durante la etapa de experimento, no hay alto requerimiento en la eficiencia de producción y la cantidad de preparación. Sin embargo, después que el valor médico del péptido antibacterial recombinante se verificó por medio de valoración clínica, experimentos animales y seguridad. El costo del proceso de preparación en dicha solicitud de patente es muy alto para ser utilizado y también muy difícil para obtener varios productos de expresión de proteína recombinante con alta pureza. Por lo tanto, cómo llevar a cabo el desarrollo eficiente y la producción a gran escala es un problema el cual se debe resolver en la aplicación práctica para dicha medicina.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Con base en la ausencia de dicho campo y las demandas emergentes, la invención suministra un método de preparación de dicho polipéptido antibacterial recombinante.

Se suministra un método de preparación de la medicina de polipéptido antibacterial recombinante, que comprende los siguientes pasos:

(1) Preparar la cepa *Escherichia coil* que comprende plásmido recombinante, y congelarla para preservación,

(2) Alargar la cultivación de la cepa en un medio de producción líquido, y

(3) inducir la cepa para expresar el polipéptido antibacterial recombinante y purificar el polipéptido,

caracterizado porque dicho medio de producción líquido comprende, en peso, fosfato de hidrógeno de disodio de 0.4% - 0.7%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.1% - 0.6%, cloruro de amonio de 0.05% - 0.2%, cloruro de calcio de 0.0005%-0.001%, sulfato de magnesio de 0.5%-2.5%, peptona de 1% - 3%, polvo de extracto de levadura de 0.5% - 1%, glucosa de 0.1% - 0.5%, cloruro de sodio de 0.2% - 0.8% y el resto de agua.

Dicho medio de producción líquido comprende, en % peso, fosfato de hidrógeno de disodio de 0.68%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.3%, cloruro de amonio de 0.1%, cloruro de calcio de 0.001%, sulfato de magnesio de 0.02%, peptona de 2.5%, polvo de extracto de levadura de 0.75%, glucosa de 0.2%, cloruro de sodio de 0.6% y el resto de agua.

Dicho alargamiento de cultivación comprende tres etapas, con parámetros de 220 rpm, 37°C, y de 3-8 horas en cada etapa.

Dicha inducción de la cepa para expresar el polipéptido antibacterial recombinante significa tratar el líquido de bacteria fuera del paso (2) como se muestra a continuación: revolver a una tasa de 220 rpm, con el máximo volumen de flujo de oxígeno, 30°C por 2-4 horas; 42°C por 0.5 horas; y 37°C por 1-2 horas; IPTG con una concentración final de 0.5mM se adiciona cuando se llega a 42°C.

Antes de dicho paso (2), la cepa se trata así:

(1) La cepa se descongela a 4°C, se recupera por toda la noche en un medió líquido LB que contiene 50 μg/ml de AMP a 220 rpm, 37°C, y luego se recubre sobre un medio sólido LB para cultivar colonias simples.

(2) La colonia simple se recoge y se cultiva en 1.5ml de medio líquido LB a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas, y luego se transfiere en 100ml de medio líquido LB para cultivarse a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas;

Las composiciones y sus proporciones en dicho LB, en peso, son cloruro de sodio de 1%, peptona de 1%, extracto de levadura de 0.5%, agar de de 0.8-1%, y el resto de agua.

Dicho *Escherichia coli* se refiere al BL-21 *Escherichia coli* artificial que contiene plásmido recombinante de pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE o pBHC-PA.

Con base en una serie de polipéptidos antibacteriales recombinantes obtenidos por el inventor previamente, un método de preparación de antibióticos recombinantes se suministra en la presente invención especialmente para la preparación a grande escala del polipéptido antibacterial recombinante con alta pureza. Los métodos existentes no son adecuados para la producción a grande escala debido a su pureza o productividad insatisfactoria, lo cual es un problema que se debe resolver mientras dichos polipéptidos antibacteriales recombinantes obtenidos previamente se mueven hacia la aplicación clínica. Una fórmula de medio que es el más adecuado para la expresión de los genes extraños es *Escherichia coli* se suministra en la invención por medio de la selección y la combinación optimizada de componentes del medio. Mientras tanto, la pureza y la productividad del polipéptido antibacterial recombinante en la producción a grande escala se optimizan ambas por medio de la selección de los parámetros óptimos para la cultivación ampliada, lo cual establece la base para la producción industrial y a gran escala de dicho polipéptido antibacterial recombinante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La comparación entre AMP y el péptido antibacterial preparado por el presente método

De izquierda a derecha, CON: túrbido después de 3 horas; AMP: túrbido después de 4 horas; y muestras preparadas en el Ejemplo 1: el lote 194 de proteína y el lote 198 de proteína siguen claros después de 27 horas.

Figura 2: ensayos de pureza de diferentes lotes de polipéptidos antibacteriales artificiales

En donde, la Banda 1 es representada por el Marcador de control, la Banda 2 está representada como el lote 120, la Banda 3 como el lote 122, la Banda 4 como el lote 126, la Banda 5 como el lote 246, la Banda 6 como el lote 247, la Banda 7 como el lote 248, la Banda 8 como el lote 250, y la Banda 9 como el lote 252. En donde, el método de preparación de los lotes 120, 122 y 126 es un método de rutina, mientras que el de los lotes 246, 247, 249, 250 y 252 es el nuevo método de la presente invención.

Figura 3: comparación de productividad en diferentes escalas

De izquierda a derecha es la productividad del frasco de agitación, fermentador 42L, y fermentador 200L con producción continua de 10 lotes.

MODALIDADES

El proceso de preparación de la invención se ejemplifica con varios péptidos específicos antibacteriales recombinantes como se muestra a continuación, pero el proceso de preparación no se limita a estos péptidos antibacteriales recombinantes específicos.

Ejemplo 1. Proceso de preparación de péptidos antibacteriales contra *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis,* y *Pseudomonas aeruginosa.*

Medios usados en la invención:

(1) Medio líquido LB

100ML: cloruro de sodio 1g, peptona 1g, y extracto de levadura 0.5g se adicionar en un frasco de 250 ml con la adición de 100 ml de agua, se disolvieron y se trataron en autoclave a 120°C por 8 min.

(2) Medio sólido LB

100ML: Cloruro de sodio 0.5-1.5g, peptona 0.5-2g, extracto de levadura 0.3-1g, y agar 0.8-3g se adicionar en un frasco de 250 ml con la adición de 100 ml de agua, se disolvieron y se trataron en autoclave a 120°C por 8 min. El medio sólido LD es utilizado para el cultivo en placa de colonias simples después de la recuperación de la cepa.

(3) Medio especial para producción (700 ml, 20 L, 100 L, y 200 L)

La solución de medio contiene, en % de peso, fosfato de hidrógeno de disodio 0.4%-0.7%, fosfato de dihidrógeno de potasio 0.1%-0.6%, cloruro de amonio 0.05%-0.2%, cloruro de calcio 0.0005%-0.001%, sulfato de magnesio 0.5%-2.5%, peptona 1%-3%, polvo de extracto de levadura 0.5%-1%, glucosa 0.1%-0.5%, cloruro de sodio 0.2%-0.8% y el resto de agua.

La fórmula de medio preferida de la invención se muestra en la Tabla 1.

No.	Ingredientes	Cantidad de materia prima en 700 ml de medio (g)	Cantidad de materia prima en 20 L de medio (g)	Cantidad de materia prima en 100 L de medio (g)	Cantidad de materia prima en 200 L de medio (g)
1	Fosfato de hidrógeno de disodio	4.76	136	680	1360
2	Fosfato de dihidrógeno	2.1	60	300	600

	de potasio				
3	Cloruro de amonio	0.7	20	100	200
4	Cloruro de calcio	0.007	0.2	1	2
5	Sulfato de magnesio	0.14	4	20	40
6	Peptona	17.5	500	2500	5000
7	Polvo de extracto de levadura	5.25	150	750	1500
8	Glucosa	1.4	40	200	400
9	Cloruro de sodio	4.2	120	600	1200
10	Agua	700ml	20L	100 L	200L

Después de la adición de la cantidad correspondiente de agua, el medio se trató en autoclave a 121°C por 8 min.

(4) Amortiguador ácido bórico: ácido bórico 0.04 M, NaCl 0.01M, tetraborato de sodio 0.04M, y EDTA 2mM.

Método de preparación: amortiguador de ácido bórico (5L)= solución A (1L) + solución B(4L)

Solución A (1L): ácido bórico 12.368 g (0.2M), NaCl 2.925 g (0.05M)

Solución B (4L): tetraborato de sodio 76.27g (0.05M)

Solución A 1L y solución B 4L se mezclaron con la adición de EDTA 2.9225 g a una concentración final de 2mM.

Paso 1: Preparar los plásmidos mutantes recombinantes

Los plásmidos mutantes recombinantes pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE y pBHC-PA se prepararon de acuerdo con el método en el Ejemplo 1 en la descripción de la patente con solicitud No. CN200910157564.5 y titulada: "Un nuevo antibiótico y secuencia de nucleótido, método de preparación y aplicación del mismo".

Paso 2: Transformación de la célula competente

100 ng de los seis plásmidos mutantes recombinantes se incubaron en hielo con 40 µl de célula competente artificial BL-21 por 5 minutos, se les suministró calor a 42°C por 30 segundos, se incubaron en hielo por 2 minutos, se adicionaron con 160 µl de medio SOC, y se cultivaron en agitador a 220 rpm, 37°C por 1 hora, se recubrieron sobre el medio LB con 1% de agar y 50 µg/ml de ampicilina, y se cultivaron por toda la noche a 37°C. Las colonias simples se recogieron y se cultivaron para obtener la cepa, la cual se conservó a baja temperatura.

Paso 3: Recuperación de la cepa

1. Recuperación de la cepa

La cepa conservada se descongeló a 4°C; 1.5 ml de la cepa se transfirieron en 10 ml del medio LB (que contiene 50µg/ml de AMP) y se cultivaron a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas.

2. Inoculación de la colonia simple

La solución de bacteria recuperada se diluyó por 10^4 o 10^5 veces; 10µl de la solución de bacteria diluida se transfirieron para recubrir sobre la placa de medio sólido LB (que contiene 50µg/ml de AMP), se ubicó en una caja húmeda y se cultivó en incubadora a 37°C por 10-12 horas hasta que las colonias simples han crecido sobre la superficie del medio.

3. Selección y propagación de la bacteria

(1) La colonia simple con forma regular redonda y con borde suave se recogió por medio de un palillo esterilizado o ciclo de inoculación desde la placa, y

se adicionó en 1.5ml del medio LB, y se cultivaron en agitador a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas.

(2) 1.5ml de la solución de bacteria se transfirieron en 100 ml del medio LB, y se cultivaron en agitador a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas.

(3) Propagación principal: 100 ml de la solución de bacteria del último pase se adicionaron en 700ml del medio especial para la producción, y se cultivaron en agitador a 220rpm, 37°C por 5-8 horas.

(4) Propagación secundaria: 700ml de la solución de bacteria del último paso se adicionaron en 6x700 ml del medio especial para producción, y se cultivaron en agitador a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas.

(5) Tercera propagación: 6x700ml de la solución de bacteria del último paso se adicionaron en 20 L del medio especial para producción, y se cultivaron en un fermentador con una tasa de agitación de 220 rpm y volumen máximo de flujo de oxígeno, 37°C por 3-5 horas.

(6) Fermentación de la bacteria artificial y expresión inducida de proteína: 20 L de la solución de bacteria del último paso se adicionaron en 200 L del medio especial para producción, y se cultivaron en un fermentador para expresión inducida de proteína con una tasa de agitación de 220 rpm y volumen máximo de flujo de oxígeno, a 30°C por 2-4 horas; 42°C por 0.5 horas; y 37°C por 1-5 horas, nótese que se adicionó ITPG a 42°C con una concentración final de 0.5 mM.

4. Centrifugación para la recolección de bacteria

6000 g de solución de cultivo se centrifugaron a 4°C por 20 min. El precipitado se recolectó y se adición en 50mM de amortiguador de ácido bórico (pH 9.0) para re-suspender la bacteria, la cual se manipuló a 4°C, nótese que se adicionaron 2mM de PMSF en el amortiguador de ácido bórico.

5. Fragmentación de talos

Después de re-suspender completamente en amortiguador de ácido bórico de pH 9.0, los talos se fragmentaron por medio de un Homogeneizador de Alta Presión a 500-600 bar por 7 veces, con intervalos de 3-5 minutos.

6. Precipitación del ADN del talo

La solución de batería fragmentada se centrifugó a 55000 g, 4°C por 40 min. El flotante se adicionó con sulfato de estreptomicina (16 botellas de 1 millón de unidades de sulfato de estreptomicina se adicionaron en cada 200 ml de líquido), y se agitaron por 1 h en un agitador magnético.

7. Diálisis

La solución de bacteria del último paso se centrifugó a 55000 g, 4°C por 20 min. El flotante se ubicó en una bolsa de diálisis y se dializó por 8-12 horas en amortiguador de ácido bórico, el cual se cambió una vez cada 4 horas.

8. Purificación de medicina de proteína y obtención del fármaco de polipéptido artificial antibacterial

La solución de bacteria dializada se centrifugó a 55000 g, 4°C por 20 min. El flotante se ubicó en un vaso y la proteína se purificó al utilizar el método de intercambio de iones. El flotante se cargó en una columna de intercambio de iones CM, se lavó completamente, y se eluyó con 50mM de amortiguador de ácido bórico que contiene 0.3M de NaCl para obtener el polipéptido artificial antibacterial novedoso.

Ejemplo 2. Ensayo de inhibición de bacteria de la medicina de polipéptido

1. 10 ml del medio BM se llenaron en un frasco cónico y se trataron en autoclave a 121°C por 8 min.

2. la mesa de trabajo limpia se pre-limpió con alcohol, y luego se esterilizó con UV por 30 min.

3. 3µl del *Staphylococcus aureus* cultivado por toda la noche se llenaron en cada 100 ml del frasco cónico.

4. en 100ml de frascos cónicos, 10µl de solución salina estéril, 1µl de 1mg/ml de AMP, y 125µl de 0.8 mg/ml de la muestra de polipéptido pBHC-SA1 preparado por medio del método en el Ejemplo 1 se adicionan y se etiquetan respectivamente.

5. las mezclas se agitan cultivadas a 37°C, 220rpm.

6. se observaron a 3h, 6h, 9h, 12h y 24h.

El control en blanco y AMP fueron túrbidas a 3h, mientras que la muestra no es túrbida a 9h, lo cual muestra que la muestra preparada puede resistir efectivamente el *Staphylococcus aureus*, como se muestra en la Figura 1. En donde, de izquierda a derecha, CON: t´rubido después de 3 horas; AMP: túrbido después de 4 horas; y las muestras preparadas de los lotes 194 y 198 de proteína en el Ejemplo 1: siguen claras después de 27 horas.

Ejemplo 2. Comparación de los péptidos antibacteriales preparados entre el presente método de preparación y el método de rutina.

La pureza de los diferentes lotes de pBHC-SA1 péptido antibacterial preparado por el presente método de preparación y el método original (divulgado en CN200910157564.5) en escala de producción equivalente se compararon por medio de electroforesis y manchado en SDS-PAGE. Los resultados muestran que, a un peso molecular de aproximadamente 75000, las bandas del polipéptido antibacterial artificial preparado a partir del Ejemplo 1 en la Fila 5, 6, 7 y 8 son relativamente unitarias, mientras que las bandas mezcladas que contienen varios pesos moleculares pequeños se muestran en las Filas 2, 3, 4, lo cual ilustra que la pureza del polipéptido preparado por el método de la invención es significantemente mejorado.

Ejemplo 3. Mejora del proceso de producción

El proceso de producción se mejoró y se optimizó continuamente, y la escala de producción se aumentó de un frasco de agitación (8.4L), a un fermentador 42L (25L), hasta el fermentador final 200 L (100L), sin embargo la productividad no se influenció, como se muestra en la figura 3. Así, esto establece la base para la producción a gran escala e industrial del polipéptido antibacterial. Los rendimientos y productividades de 10 lotes de producción continua en el frasco de agitación, el fermentador 42L así como el fermentador 200L se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 3.

Tabla 2. Rendimiento y productividad

	Frasco de agitación	Fermentador 42 L	Fermentador 200 L
Rendimiento	1893.72	6654.82	31940.00
Productividad (mg/L)	22.54	26.61	31.94

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una medicina nueva de polipéptido antibacterial recombinante, que comprende los pasos de:

(a) preparar una cepa de *Escherichia coli* que comprende plásmido recombinante y congelar para conservación,

(b) ampliar el cultivo de la cepa en un medio de producción líquido,

(c) inducir la cepa para expresar el polipéptido antibacterial recombinante y obtener el polipéptido purificado,

caracterizado porque, dicho medio de producción líquido comprende, en % de peso, fosfato de hidrógeno de disodio de 0.4% - 0.7%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.1% - 0.6%, cloruro de amonio de 0.05% - 0.2%, cloruro de calcio de 0.0005%-0.001%, sulfato de magnesio de 0.5%-2.5%, peptona de 1% - 3%, polvo de extracto de levadura de 0.5% - 1%, glucosa de 0.1% - 0.5%, cloruro de sodio de 0.2% - 0.8% y el resto de agua.

2. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho medio de producción líquido comprende, en % de peso, fosfato de hidrógeno de disodio de 0.68%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.3%, cloruro de amonio de 0.1%, cloruro de calcio de 0.001%, sulfato de magnesio de 0.02%, peptona de 2.5%, polvo de extracto de levadura de 0.75%, glucosa de 0.2%, cloruro de sodio de 0.6% y el resto de agua.

3. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha ampliación de cultivo comprende tres etapas, con parámetros de 220 rpm, 37°C, y de 3-8 horas en cada etapa.

4. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha inducción de la cepa para expresar el polipéptido antibacterial recombinante significa tratar el líquido de bacteria fuera del paso (b) así: con una tasa de agitación de 220 rpm, volumen máximo de flujo de oxígeno, 30°C por 2-4 horas; 42°C por 0.5 horas; y 37°C por 1-2 horas, y se adiciona IPTG a una concentración final de 0.5mM a 42°C.

5. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque antes de ampliar el cultivo del paso (b), la cepa se trata así:

(1) La cepa se descongela a 4°C y se recupera por toda la noche en un medio líquido LB que contiene 50 μg/ml de AMP a 220 rpm, 37°C, y luego se recubre sobre el medio sólido LB para cultivas colonias simples;

(2) La colonia simple se recoge y se cultiva en 1.5 ml de medio líquido LB a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas, y luego se transfiere en 100 ml de medio líquido LB y se cultiva a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas;

en donde las composiciones y sus proporciones en dicho LB, en peso, son cloruro de sodio de 1%, peptona de 1%, extracto de levadura de 0.5%, agar de 0.8-1%, y el resto de agua.

6. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho *Escherichia coli* se refiere al *Escherichia coli* BL-21 artificial que contiene plásmido recombinante de pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE o pBHC-PA.

RESUMEN

La invención suministra un método para preparar una nueva medicina de polipéptido antibacterial recombinante, el cual principalmente se relaciona con la fórmula de medio de cultivo líquido adecuada para la producción a gran escala del polipéptido antibacterial, así como la optimización de los parámetros de cultivo agrandados.

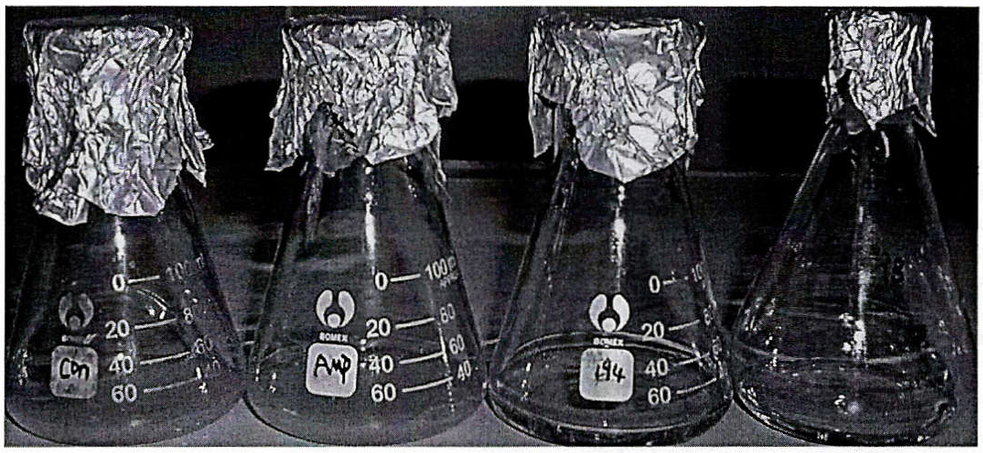


FIG. 1

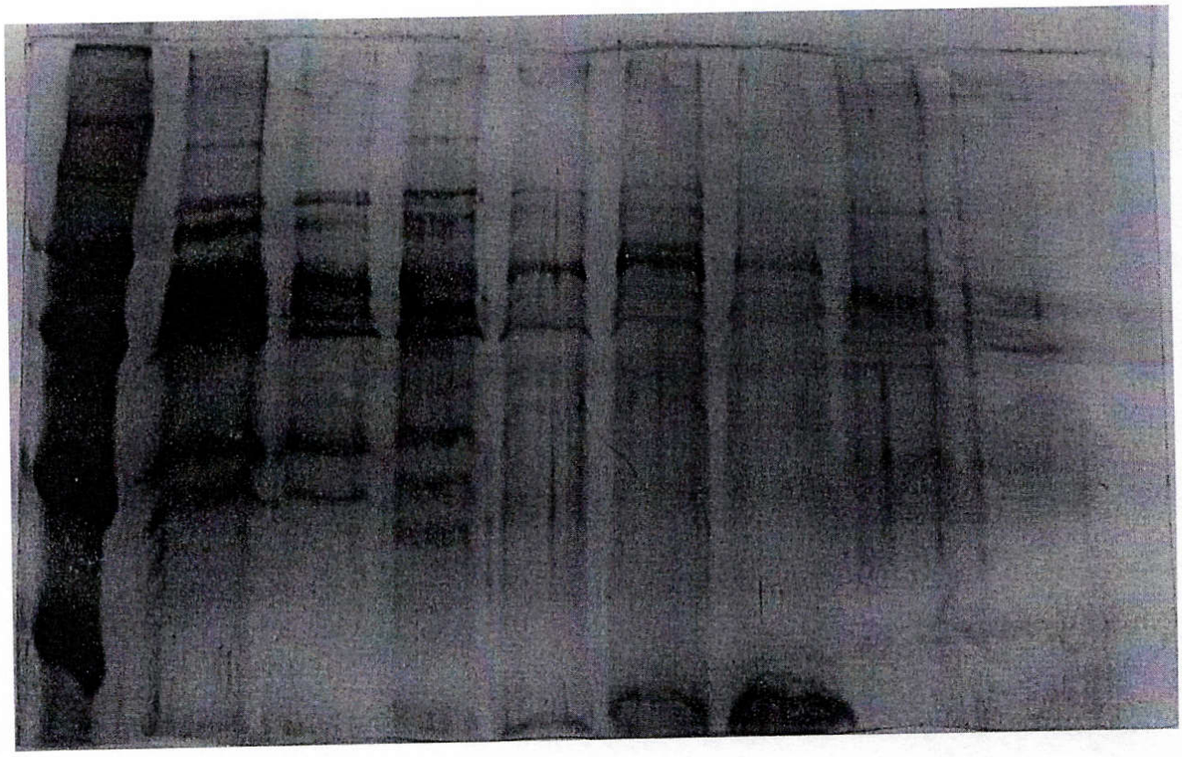


FIG. 2

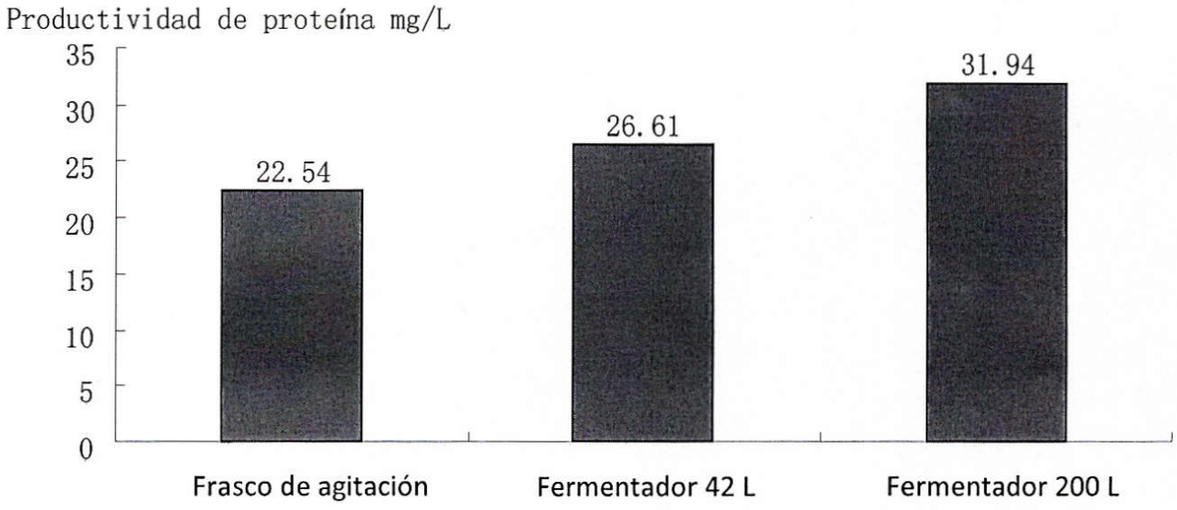

Productividad de proteína mg/L
35
30
25
20
15
10
5
0
22.54
26.61
31.94
Frasco de agitación
Fermentador 42 L
Fermentador 200 L

FIG. 3

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 16 March 2012 (16.03.2012)
Report generated on: 02 August 2013 (02.08.2013)

(10) Publication number:
WO2012/119524

(43) Publication date:
13 September 2012 (13.09.2012)

(26) Publication language:
Chinese (ZH)

(21) Application Number:
PCT/CN2012/071825

(22) Filing Date:
01 March 2012 (01.03 2012)

(25) Filing language:
Chinese (ZH)

(31) Priority number(s):
201110052238.5 (CN)

(31) Priority date(s):
04 March 2011 (04.03.2011)

(31) Priority status:
Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:
C12P 21/00 (2006 01); ***C12R 1/19*** (2006 01)

(71) Applicant(s):
BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD. [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for all designated states)*
QIU, Xiaoqing [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
LI, Rongli [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
ZHANG, Xiangli [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
ZHANG, Xiaofeng [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
WANG, Dongqin [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*

(72) Inventor(s):
QIU, Xiaoqing; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
LI, Rongli; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
ZHANG, Xiangli; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
ZHANG, Xiaofeng; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
WANG, Dongqin; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo 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): PREPARATION METHOD OF NEW RECOMBINANT ANTIBACTERIAL POLYPEPTIDE MEDICINE

(54) Title (FR): PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN NOUVEAU MÉDICAMENT POLYPEPTIDIQUE ANTIBACTÉRIEN RECOMBINANT

(54) Title (ZH): 一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法

(57) Abstract:

(EN): The invention provides a method of preparing a new recombinant antibacterial polypeptide medicine, which primarily relates to liquid culture medium formula suitable for large-scale production of the antibacterial polypeptide, as well as optimization of the enlargedculture parameters.

(FR): L'invention concerne un procédé de préparation d'un nouveau médicament polypeptidique antibactérien recombinant, qui concerne principalement une formule de milieu de culture liquide appropriée pour la production à grande échelle du polypeptide antibactérien, ainsi que l'optimisation des paramètres de culture élargie.

International search report:
Received at International Bureau: 01 June 2012 (01.06.2012) [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

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 16 March 2012 (16.03.2012)
Report generated on: 02 August 2013 (02.08.2013)

(10) Publication number:
WO2012/119524

(43) Publication date:
13 September 2012 (13.09.2012)

(26) Publication language:
Chinese (ZH)

(21) Application Number:
PCT/CN2012/071825

(22) Filing Date:
01 March 2012 (01 03.2012)

(25) Filing language:
Chinese (ZH)

(31) Priority number(s):
201110052238.5 (CN)

(31) Priority date(s):
04 March 2011 (04.03 2011)

(31) Priority status:
Priority document received (in compliance with PCT Rule 17 1)

(51) International Patent Classification:
C12P 21/00 (2006.01); ***C12R 1/19*** (2006.01)

(71) Applicant(s):
BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD. [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for all designated states)*
QIU, Xiaoqing [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
LI, Rongli [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
ZHANG, Xiangli [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
ZHANG, Xiaofeng [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*
WANG, Dongqin [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN) *(for US only)*

(72) Inventor(s):
QIU, Xiaoqing, East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
LI, Rongli; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
ZHANG, Xiangli; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
ZHANG, Xiaofeng; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)
WANG, Dongqin; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo 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): PREPARATION METHOD OF NEW RECOMBINANT ANTIBACTERIAL POLYPEPTIDE MEDICINE

(54) Title (FR): PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN NOUVEAU MÉDICAMENT POLYPEPTIDIQUE ANTIBACTÉRIEN RECOMBINANT

(54) Title (ZH): 一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法

(57) Abstract:
(EN): The invention provides a method of preparing a new recombinant antibacterial polypeptide medicine, which primarily relates to liquid culture medium formula suitable for large-scale production of the antibacterial polypeptide, as well as optimization of the enlargedculture parameters.

(FR): L'invention concerne un procédé de préparation d'un nouveau médicament polypeptidique antibactérien recombinant, qui concerne principalement une formule de milieu de culture liquide appropriée pour la production à grande échelle du polypeptide antibactérien, ainsi que l'optimisation des paramètres de culture élargie

International search report:
Received at International Bureau: 01 June 2012 (01 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

ContextoIntelectual
propiedad industrial, derechos de autor
& nuevas tecnologías

Medellín, 02 de septiembre de 2013

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

REFERENCIA: Patente PCT No. PCT/CN2012/071825
Solicitante: BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., 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 desiganada 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*

ContextoIntelectual
propiedad industrial, derechos de autor
& nuevas tecnologías

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/CN2012/071825, 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

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una medicina nueva de polipéptido antibacterial recombinante, que comprende los pasos de:

(a) preparar una cepa de *Escherichia coli* que comprende plásmido recombinante y congelar para conservación,

(b) ampliar el cultivo de la cepa en un medio de producción líquido,

(c) inducir la cepa para expresar el polipéptido antibacterial recombinante y obtener el polipéptido purificado,

caracterizado porque, dicho medio de producción líquido comprende, en % de peso, fosfato de hidrógeno de disodio de 0.4% - 0.7%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.1% - 0.6%, cloruro de amonio de 0.05% - 0.2%, cloruro de calcio de 0.0005%-0.001%, sulfato de magnesio de 0.5%-2.5%, peptona de 1% - 3%, polvo de extracto de levadura de 0.5% - 1%, glucosa de 0.1% - 0.5%, cloruro de sodio de 0.2% - 0.8% y el resto de agua.

2. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho medio de producción líquido comprende, en % de peso, fosfato de hidrógeno de disodio de 0.68%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.3%, cloruro de amonio de 0.1%, cloruro de calcio de 0.001%, sulfato de magnesio de 0.02%, peptona de 2.5%, polvo de extracto de levadura de 0.75%, glucosa de 0.2%, cloruro de sodio de 0.6% y el resto de agua.

3. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha ampliación de cultivo comprende tres etapas, con parámetros de 220 rpm, 37°C, y de 3-8 horas en cada etapa.

4. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha inducción de la cepa para expresar el polipéptido antibacterial recombinante significa tratar el líquido de bacteria fuera del paso (b) así: con una tasa de agitación de 220 rpm, volumen máximo de flujo de oxígeno, 30°C por 2-4 horas; 42°C por 0.5 horas; y 37°C por 1-2 horas, y se adiciona IPTG a una concentración final de 0.5mM a 42°C.

5. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque antes de ampliar el cultivo del paso (b), la cepa se trata así:

(1) La cepa se descongela a 4°C y se recupera por toda la noche en un medio líquido LB que contiene 50 μg/ml de AMP a 220 rpm, 37°C, y luego se recubre sobre el medio sólido LB para cultivas colonias simples;

(2) La colonia simple se recoge y se cultiva en 1.5 ml de medio líquido LB a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas, y luego se transfiere en 100 ml de medio líquido LB y se cultiva a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas;

en donde las composiciones y sus proporciones en dicho LB, en peso, son cloruro de sodio de 1%, peptona de 1%, extracto de levadura de 0.5%, agar de 0.8-1%, y el resto de agua.

6. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho *Escherichia coli* se refiere al *Escherichia coli* BL-21 artificial que contiene plásmido recombinante de pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE o pBHC-PA.

7. Un medio de cultivo, que comprende las composiciones en % de peso siguientes: fosfato de hidrógeno de disodio de 0.4% - 0.7%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.1% - 0.6%, cloruro de amonio de 0.05% - 0.2%, cloruro de calcio de 0.0005%-0.001%, sulfato de magnesio de 0.5%-2.5%, peptona de 1% - 3%,

polvo de extracto de levadura de 0.5% - 1%, glucosa de 0.1% - 0.5% y cloruro de sodio de 0.2% - 0.8%.

8. El medio de cultivo de la reivindicación 7, caracterizado porque comprende las composiciones en % de peso siguientes: fosfato de hidrógeno de disodio de 0.68%, fosfato de dihidrógeno de potasio de 0.3%, cloruro de amonio de 0.1%, cloruro de calcio de 0.001%, sulfato de magnesio de 0.02%, peptona de 2.5%, polvo de extracto de levadura de 0.75%, glucosa de 0.2% y cloruro de sodio de 0.6%.

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2012 年 9 月 13 日 (13.09.2012)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/119524 A1

(51) 国际专利分类号
C12P 21/00 (2006 01) *C12R 1/19* (2006 01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/071825

(22) 国际申请日 2012 年 3 月 1 日 (01 03 2012)

(25) 申请语言 中文

(26) 公布语言 中文

(30) 优先权:
201110052238 5 2011 年 3 月 4 日 (04 03.2011) CN

(71) 申请人 北京科润三联生物技术有限责任公司 (BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN], 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 丘小庆 (QIU, Xiaoqing) [CN/CN]; 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。 李荣旗 (LI, Rongli) [CN/CN], 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。 张向利 (ZHANG, Xiangli) [CN/CN]; 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。 张小凤 (ZHANG, Xiaofeng) [CN/CN], 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。 王东芹 (WANG, Dongqin) [CN/CN], 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。

(74) 代理人 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 (HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY & PARTNERS); 中国北京市海淀区海淀南路 21 号中关村知识产权大厦 B 座 9 层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护) AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护) ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:
— 关于发明人身份(细则 4 17(i))
— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4 17(ii))
— 发明人资格(细则 4 17(iv))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title. PREPARATION METHOD OF NEW RECOMBINANT ANTIBACTERIAL POLYPEPTIDE MEDICINE

(54) 发明名称 一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法

(57) Abstract: The invention provides a method of preparing a new recombinant antibacterial polypeptide medicine, which primarily relates to liquid culture medium formula suitable for large-scale production of the antibacterial polypeptide, as well as optimization of the enlargedculture parameters

(57) 摘要

本发明提供了一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法, 主要涉及适合大规模生产抗菌多肽的液体生产培养基配方和扩大培养参数的优化。

WO 2012/119524 A1

说明书

一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法

技术领域

本发明涉及抗生素药物生产工艺，特别是一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法。

背景技术

人们一直致力于开发新型的抗菌素，在细菌胞膜上直接形成离子通道而致细菌死亡是比较有前途的抗菌素开发方向之一。自然界中，为数不少的细菌毒素就是以这种机制来杀死细菌的，其模式标本就是大肠杆菌（Escherichia coli）分泌一种毒素蛋白一大肠菌素（colicin）。早在 1946 年，青霉素的发明者 H. Florey (British J. of Experimental Pathology.1946（27）, 378～390.)等就已对大肠菌素的抗菌活性以及安全性、毒理等进行了详尽的评价,他们发现大肠菌素抗菌活性极强，提取物被稀释至数百万倍仍有非常有效的抗菌效果。但抗菌谱非常特异，只能针对大肠杆菌和亲缘相近的某些革兰氏阴性菌。1953 年 Jacob 等发现大肠菌素 Ia, 在 pH 6-7 时杀菌功能强大。1978 年 Finkelstein 等发现可形成离子通道的大肠菌素 K，可以在人工脂质双分子膜上形成电压依赖性离子通道，从而在根本上揭示了这一类细菌毒素的抗菌机制，即在靶细胞膜上形成致死性离子通道。1996 年 Qiu 和 Finkelstein 等揭示了大肠菌素 Ia 在人工脂质双分子膜上形成的离子通道开放和关闭时的跨膜立体结构，为在分子水平上设计和制备新型的抗菌素奠定了理论基础。2001 年 Qiu 应用大肠菌素融合金黄色葡萄球菌信息素构建和制备得到抗耐药性金黄色葡萄球菌的抗菌工程多肽药物，体内与体外实验证实该多肽具有杀菌活性和杀菌选择性，依据同样方法，Qiu 构建了分别针对耐万古霉素肠球菌和耐青霉素肺炎链球菌的抗菌工程多肽，在体内和体外实验中，这些多肽对这些现有抗菌素难以对付的致病菌都表现出了特异、稳定、快速的杀菌效应，其药效胜过万古霉素、苯唑西林、青霉素等现用抗菌素数十倍至上千倍。相应研究结果以论文形式发表在 Nature Biotechnology（21(12):1480-85， 2003）、

Antimicrobial Agents and Chemotherapy（49(3):1184-1189, 2005）等国际学术期刊。

在本项目中，我们提出了利用大肠菌素融合致病菌抗原的抗体模拟物构建抗菌工程多肽的全新研究思路及技术路线，并已经成功制备抗菌工程多肽--广谱抗菌信息菌素药物。在抗菌多肽药物领域有独特的思路和理论创新，已申报专利，同时建立了人工构建小型抗体模拟物方法，相关研究结果已发表在 Nature biotechnology（25(8):921-929，2007）。本项目研发的新型高效广谱抗菌信息菌素药物，因其杀菌机制特殊，对耐药菌有良好的杀菌效果，对多重耐药绿脓杆菌（MDRPA）、耐甲氧西林金葡菌（MRSA）、耐万古霉素肠球菌(VRE)等耐药菌都表现出比现有抗生素更强的抗菌效力。该药物的研发和制备，对于解决日益严重的因耐药菌株而导致的一系列治疗问题，保障人民身体健康有重要作用。

本项目所研究的广谱抗菌信息菌素药物与目前国内外研究的小肽类抗生素（人穿孔素、家蚕抗菌肽）是完全不同的两类物质。其区别在于 （1）该抗菌工程多肽与其原型大肠菌素一样，是以单体（monomer）构象工作的，即一个分子就能组成一个完整的工作单位，而小肽类抗生素是以多体（polymer）构象工作的，即需要数十个分子才能组成一个完整的工作单位；（2）该抗菌工程多肽与其原型大肠菌素一样，可以在血循环和体内工作，而小肽类抗生素不能；（3）该抗菌工程多肽与其原型大肠菌素一样，在靶细胞膜上形成的是电压依赖性离子通道，其杀伤机制和效率远远高于小肽类抗生素在靶细胞膜上形成的孔道。根据检索至 2010 年本领域文献，在进行动物体内实验时，上述小肽类抗生素几乎都存在着一个致命的缺陷：会被动物体内蛋白酶降解。因此尚没有一个自小肽类抗生素开发出来的药物前体通过了临床测试。而本项目研发和生产的抗菌工程多肽新药的原型本身就是共生在动物和人类消化道细菌所产生的、结构和作用机理与上述小分子多肽完全不同的细菌素，在长达 8 年的体内外测试中始终表现出强大的杀菌活性；而且在大动物（奶牛、奶山羊等）疾病模型试验中，无论是局部注射和静脉注射均有良好的杀菌效果和治疗作用，因此本抗菌工程多肽新药不存在上述小分子多肽难以在体内使用的局限。

经过文献查阅发现，目前国外对大肠菌素、细菌信号传导多肽、抗体改造等分别进行了相应研究，但尚无任何实验室曾进行过类似本项目研究思路和技术路线的研究，也未见任何类似文章发表。2010 年 6 月经查询美国国家医学图书馆

（www.ncbi.nlm.nih.gov），目前已登录的关于大肠菌素 (Colicin) 的文献有 2600 余篇，关于信息素 (Pheromone) 的文献有 7300 余篇，关于抗体改造(Antibody reconstitution) 的文献有 2100 余篇，关于免疫毒素 (Immunotoxin) 的文献有 3800 余篇，关于抗菌素耐药性 (antibiotic resistance) 的研究文献 94000 余篇，在这些信息来源中均未见到任何类似本项目的科学构思、设计理念和研究实践见诸报导。在 2010 年 6 月，委托教育部查新工作站（No.1）进行的查新表明，除本项目组人员的报道外，国内外未见利用大肠菌素结合靶细菌信息素或人工设计的靶细菌抗体模拟物，构建针对靶细菌的抗菌工程多肽药物的报道。国内外未见基于本项目的靶向工程抗菌多肽构建方法，生产的抗感染性细菌的人用、兽用药物及农药的报道。

我们已将此**广谱抗菌信息菌素药物**按照实际需要，分别进行动物药物（治疗奶牛乳房炎的药物）和人用药物（抗菌素）的开发。体内外抗菌测试表明，该信息菌素呈现出很强的抗菌作用，尤其是其体内抗菌效力明显优于体外抗菌效力。2010 年 5 月委托农业部兽药安全监督检验测试中心进行该药物的安全性评价，证明其无毒、无致突变、无致畸作用。已经完成的药物安全评估结果如下：

①大、小鼠急性毒性试验结论为该药物属实际无毒类（报告编号 WTPJ20100003）；

②鼠伤寒沙门氏菌回复突变（Ames）试验结果为阴性，表明该药物无致突变性（报告编号 WTPJ20100003（2））；

③小鼠骨髓细胞微核试验结果为阴性，无致突变作用（报告编号 WTPJ20100003（3））；

④小鼠精子畸形试验结果为阴性，无致小鼠精子畸形作用（报告编号 WTPJ20100003（4））。

⑤重组抗菌多肽药物对奶牛乳房炎分离病原菌的体外抑杀试验，试验结果证明：

A 重组抗菌多肽药物具广谱抗菌作用，在体外对各种奶牛乳房炎病原菌具有良好的抑杀效应。

B 重组抗菌多肽药物（发明申请名称：一种新型抗生素及其核苷酸序列、制备方法与应用，申请号 200910157564.5）对葡萄球菌（金黄色葡萄球菌、表皮

葡萄球菌、腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌）的抑杀作用最好，MIC_{50} 可达 0.125 μg/mL，MBC_{50} 可达 0.25 μg/mL。与对照之头孢噻吩（2 ug/ml）、苯唑西林 (4 ug/ml)、青霉素、氨苄青霉素、林可霉素、庆大霉素（均为 8 ug/ml 以上）有极显著差异。按药物分子量进行标化，多肽（MW 70,000）对所试葡萄球菌的抑杀作用是头孢噻吩 (MW 523) 作用的 2,100 倍；是苯唑西林 (MW 423) 作用的 5,300 倍。

C 重组抗菌多肽药物对链球菌、化脓隐秘杆菌、大肠杆菌等肠杆菌科细菌的抑杀作用基本相当，对链球菌（无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌、牛链球菌）的 MIC_{50} 为 1.0 μg/mL，MBC_{50} 为 2.0 μg/mL；对化脓隐秘杆菌的 MIC_{50} 为 0.25 μg/mL，MBC_{50} 为 1.0 μg/mL；对大肠杆菌等肠杆菌科细菌的 MIC_{50} 为 1.0 μg/mL，MBC_{50} 为 1.0 μg/mL。

D 重组抗菌多肽药物对细菌敏感株和耐药株的抑杀作用无明显差异，能高效抑杀具各种耐药表型的葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌。

在前期的大动物治疗试验（奶牛乳房炎实验性治疗试验）中，治愈 112 头，治愈率达到 95 %。经过国家兽药安全评价中心检测，本药物属实际无毒类药物，不会对动物产生毒性和不良影响，同时该类药物属可降解信息菌素物质，避免了常规抗菌素在畜禽疾病治疗后产生药物残留的弊病，经北京市乳品质量监督检验站检测，应用该药物治疗后的奶牛所产牛奶中均无抗生素残留（检测报告编号 A2009-249）。

但是上述重组抗菌素的生产，如发明人前期的申请号为 200910157564.5，名称为"一种新型抗生素及其核苷酸序列、制备方法与应用"发明申请说明书实施例 1 中公开了该抗菌肽的完整制备工艺，在获得重组制粒并转化感受态细胞之后的增菌诱导表达重组蛋白的步骤中，采用了较常规的增菌工艺，由于在实验阶段，对生产效率和制备量没有高要求，但随着这些重组抗生素经临床试验、动物试验及安全评估，证明这些重组抗菌肽医用价值之后，采用上述发明申请中的制备工艺，成本太高，且很难获得大量的高纯度重组蛋白表达物，因此，如何进行有效的规模化开发和生产成了上述药物走向实际应用过程中一个必须解决的问题。

发明内容

本发明针对上述领域的空白及急切需求，提供上述重组抗菌多肽的制备方法。

一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法，包括如下步骤：

（1）制备含有重组质粒的大肠杆菌菌种，冷冻保存，

（2）采用液体生产培养基对菌种进行扩大培养，

（3）诱导菌种表达重组抗菌多肽；

其特征在于，所述液体生产培养基的配方如下：各组分在终溶液中的质量体积比为：磷酸氢二钠 0.4%—0.7%，磷酸二氢钾 0.1%-0.6%，氯化铵 0.05%—0.2%，氯化钙 0.0005%-0.001%，硫酸镁 0.5%—2.5%，蛋白胨 1%--3%，酵母粉 0.5%-1%，葡萄糖 0.1%—0.5%，氯化钠 0.2%--0.8%其余为水

所述液体生产培养基的配方如下：各组分在终溶液中的质量体积比为：磷酸氢二钠 0.68%，磷酸二氢钾 0.3%，氯化铵 0.1%，氯化钙 0.001%，硫酸镁 0.02%，蛋白胨 2.5%，酵母粉 0.75%，葡萄糖 0.2%，氯化钠 0.6%，其余为水。

所述对菌种进行扩大培养分为三级扩大培养，各级扩大培养的参数为：220rpm、37℃、3-8 小时。

所述诱导表达重组抗菌多肽指对步骤（2）得到的菌液做如下处理：搅拌速度 220 rpm，最大通氧量，30 ℃， 2～4 小时；42 ℃，0.5 小时；37 ℃，1～2 小时，达到 42 ℃ 时加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG。

所述步骤（2）之前，菌种进行如下处理：

（1）菌种 4℃解冻，在加有终浓度为 50μg/ml AMP 的 LB 液体培养基中，220rpm、37℃培养过夜复苏菌种，然后涂布于 LB 固体培养基上培育单菌落，

（2）挑取单菌落于 1.5mlLB 液体培养基中，220rpm、37℃培养 5-8 小时；然后转至 100mlLB 液体培养基中，220rpm、37℃培养 5-8 小时；

所述 LB 培养基的组分及各组分质量体积比为氯化钠 1%，蛋白胨 1%g，酵母 0.5%，琼脂 0.8～1%，其余为水。

所述大肠杆菌指含有重组质粒 pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3、pBHC-SA4、pBHC-SE 或 pBHC-PA 的 BL-21 工程菌。

基于发明人前期获得的一系列重组抗菌多肽，本发明提供一种制备重组抗菌素的方法，专门用于大量制备高纯度的重组抗菌肽。现有方法不适宜大规模生产，

在大规模生产情况下纯度或产量不理想等缺陷，是将发明人前期获得的重组抗菌多肽推向临床应用过程中必须克服的难题。本发明通过对培养基成分的选择和优化组合，提供了一种最适合大肠杆菌表达外源基因的培养基配方，通过选择最适合的扩大培养参数， 使整个制备过程环环相扣，兼顾大规模生产的情况下制备重组抗菌多肽的纯度与产量的矛盾。为发明人前期获得重组抗菌多肽的规模化、工业化生产奠定了基础。

附图说明

图 1 本发明的方法制备的抗菌肽与 AMP 的对比结果

从左到右： CON: 3 小时开始浑浊；AMP :4 小时开始浑浊；实施例 1 制备得到的样品：194 批次蛋白与 198 批次蛋白第 27 个小时澄清。

图 2 不同批次抗菌工程多肽纯度测试

条带 1 为对照 Marker，条带 2 为 120 批次，条带 3 为 122 批次，条带 4 为 126 批次，条带 5 为 246 批次，条带 6 为 247 批次，条带 7 为 248 批次，条带 8 为 250 批次，条带 9 为 252 批次。其中 120，122，126 批次的生产方法为现有方法，246，247，249，250，252 批次为本发明的新方法生产。

图 3. 不同生产规模下的差率比较

从左到右为：摇瓶、42L 发酵罐、200L 发酵罐连续生产 10 批次的产率。

具体实施方式

以下以一些具体的重组抗菌肽说明本发明的制备工艺，但本发明不限于制备以下重组抗菌肽。

实施例 1. 抗大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、绿脓杆菌抗菌肽的制备工艺

本发明用到的培养基：

（1）LB 液体培养基

100ml 氯化钠 1g，蛋白胨 1g，酵母 0.5g， 将各种试剂称好后 放入 250ml 烧瓶中，加入 100ml 自来水，使其溶解，在高压灭菌锅内 120℃ 8min 灭菌

（2）LB 固体培养基

100ml 氯化钠 0.5~1.5g，蛋白胨 0.5~2g，酵母 0.3~1g，琼脂 0.8~3g，LB

固体培养基用于菌种复苏后划平板培养单克隆菌落用。将各种试剂称好后 放入250ml 烧瓶中，加入 100ml 自来水，使其溶解，在高压灭菌锅内 120℃ 8min 灭菌

（3）生产专用培养基 （700ml 20L 100L 200L）

各成分在终溶液中的质量体积比为：磷酸氢二钠 0.4%—0.7%，磷酸二氢钾 0.1%-0.6%，氯化铵 0.05%—0.2%，氯化钙 0.0005%-0.001%，硫酸镁 0.5%—2.5%，蛋白胨 1%--3%，酵母粉 0.5%-1%，葡萄糖 0.1%—0.5%，氯化钠 0.2%--0.8%其余为水。

本发明优选配方如表 1：

序号	原料名称	700ml 培养基原料量（g）	20L 培养基原料量（g）	100 L 培养基原料量（g）	200L 培养基原料量（g）
1	磷酸氢二钠	4.76	136	680	1360
2	磷酸二氢钾	2.1	60	300	600
3	氯化铵	0.7	20	100	200
4	氯化钙	0.007	0.2	1	2
5	硫酸镁	0.14	4	20	40
6	蛋白胨	17.5	500	2500	5000
7	酵母粉	5.25	150	750	1500
8	葡萄糖	1.4	40	200	400
9	氯化钠	4.2	120	600	1200
10	水	700ml	20L	100 L	200L

培养基加入相应量的自来水后，高压灭菌，121℃ 8min 灭菌。

（4）**硼酸缓冲液**：硼酸 0.04M， NaCl0.01M，四硼酸钠 0.04M，EDTA 2mM

配制方法：硼酸缓冲液 5L= A 液 1L + B 液 4L

A 液（1L）：硼酸 12.368g（0.2M），NaCl2.925g（0.05M）

B 液（4L）：四硼酸钠 76.27g（0.05M），

A 液 1L + B 液 4L 混合，加入 EDTA2.9225g 终浓度为 2mM

步骤 1.制备重组突变质粒

参照申请号为"200910157564.5"，名称为"一种新型抗生素及其核苷酸序列、制备方法与应用"的发明申请说明书中实施例 1 的记载，制备得到重组突变质粒 pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3 pBHC-SA4、pBHC-SE、pBHC-PA。

步骤 2.转化感受态细胞

将 6 种重组突变质粒 100 ng 分别与制备的 BL-21 工程菌感受态细胞 40 ul 冰孵 5 分钟，热冲击 42℃，30 秒，再置入冰中 2 分钟，加入 SOC 培养基 160 ul, 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℃过夜），挑取单克隆菌落增菌，获得菌种，低温保存菌种；

步骤 3.菌种复苏

1.菌种复苏

取出保存菌种 4℃解冻，取 1.5ml 倒入 10ml LB 培养基中（含 AMP 50μg/ml），220rpm、37℃培养 5—8 小时。

2.接种单克隆菌

复苏后的菌液稀释 10^4 或 10^5 倍，取 10ul 稀释后的菌液加入到制备好的 LB 固体培养基（AMP 50μg/ml）平板上，涂平板。放湿盒中，37℃恒温培养箱培养 10-12 小时，培养基表面长出圆形单菌落。

3.挑菌和扩菌

(1)用已灭菌牙签或接菌环从长好的平板上挑选规则圆形，边缘光滑的单菌落，放入 1.5mlLB 培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

(2)1.5mlLB 菌液翻至 100ml LB 培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

(3)一级扩大培养：将上步的 100ml 菌液加入到 700ml 生产专用培养基中培养，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

(4) 二级扩大培养：将上步 700ml 菌液分别加入到 6×700ml 生产专用培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（5）三级扩大培养：将上步 6×700ml 菌液加入到 20L 生产专用培养基中，在发酵罐中培养：搅拌速度 220rpm、最大通氧量，37℃培养 3—5 小时。

（6）工程菌发酵和诱导表达蛋白：将上步 20L 菌液加入到 200L 生产专用培

养基中，在发酵罐中培养和诱导表达蛋白：搅拌速度 220 rpm，最大通氧量，30℃，2～4 小时；42℃，0.5 小时；37℃，1～2 小时，注：达到 42℃时加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG

4、离心收菌

培养液 6000g，4℃离心 20min。收取离心后的沉淀，放入 50mM 的硼酸缓冲液（pH9.0）中，使菌体重悬浮于硼酸缓冲液中，注：硼酸缓冲液中加入 2mM 的 PMSF（中文名：苯甲基磺酰氟丝氨酸蛋白酶抑制剂，自菌体重悬浮之后的操作须在 4℃进行。

5、破碎菌体

待菌体完全悬浮于 pH9.0 硼酸缓冲液后，用高压匀质机 500～600bar 高压破碎菌体，反复破碎 7 次，每次破菌间隔 3～5 分钟。

6、沉淀菌体 DNA

将破碎后的菌液，55000g，4℃离心 40min。取上清液，加入硫酸链霉素（每 200ml 液体加入 16 瓶 100 万单位的硫酸链霉素），在磁力搅拌器上搅拌 1h。

7、透析

将上步的菌液 55000g，4℃离心 20min，取上清液，装入透析袋中，置硼酸缓冲液中透析 8h~12 小时，每 4h 换透析液一次。

8、蛋白药物纯化和得到抗菌工程多肽药物

将透析后的菌液 55000g，4℃离心 20min，取上清液放入烧杯中，采用离子交换法纯化蛋白。取上清上样于 CM 离子交换柱，充分冲洗后，用含 0.3 M NaCl 的 50 mM 硼酸缓冲液洗脱即可得到新型抗菌工程多肽。

实施例 2. 多肽药物的抑菌测试

1、在 100ml 锥形瓶中装入 10ml BM 培养基（未灭菌），高压蒸汽灭菌锅 121℃，8min 灭菌。

2、超净工作台提前用酒精擦干净，开紫外灯灭菌 30min 。

3、在每个 100ml 锥形瓶中加入 3μl 过夜培养的金黄色葡萄球菌。

4、在 100ml 锥形瓶中分别加入 10μl 无菌生理盐水、1μl 1mg/ml 的 AMP、以及本发明实施例 1 的方法制备得到的 0.8mg/ml 的 pBHC-SA1 多肽样品 125μl，

作好标记。

5、放入振动培养箱中，37℃、220rmp 培养。

6、在 3h、6h、9h、12h、24h 时观察混浊情况。

空白对照和 AMP 在 3h 时混浊，样品在 9h 未混浊，说明制备的样品能够有效抗金黄色葡萄球菌，如图 1。从左到右： CON: 3 小时开始浑浊；AMP :4 小时开始浑浊；实施例 1 制备得到的样品：194 批次蛋白与 198 批次蛋白至第 27 个小时澄清。

实施例 2 本发明的制备方法与现有方法制备的抗菌肽比较

将本发明实施例 1 的方法与原有方法（200910157564.5 中公开的方法） 以相等的生产规模制备得到的不同批次的抗菌肽 pBHC-SA1 在聚丙烯酰胺凝胶中电泳、染色，以比较产物的纯度， 结果显示，抗菌工程多肽的分子量在 75000 左右，实施例 1 的方法生产的多肽所在的泳道 5、6、7，8 的条带相对单一，而泳道 2、3、4 内含有大量较小分子量的杂带，即本发明的方法生产的多肽在纯度上得到了明显的提高。

实施例 3. 生产工艺流程的改进

经过不断的改进和优化生产工艺，生产规模也在不断地扩大，由试验性摇瓶生产(8.4L)，到 42L 发酵罐生产（25L），再到现在的 200L 发酵罐生产（100L），且随着生产规模的扩大，差率并没有受到影响，见图 3，为抗菌多肽的规模化、工业化生产奠定了基础。摇瓶连续生产 10 批次、42L 发酵罐连续生产 10 批次与 200L 发酵罐连续生产 10 批次产量和产率的对比情况，见表 2、图 3

表 2. 产量和差率

	摇瓶	42L 发酵罐	200L 发酵罐
产量	1893.72	6654.82	31940.00
产率（mg/L）	22.54	26.61	31.94

权利要求书

1．一种新型重组抗菌多肽药物的制备方法，包括如下步骤：

（1）制备含有重组质粒的大肠杆菌菌种，冷冻保存，

（2）采用液体生产培养基中对菌种进行扩大培养，

（3）诱导表达重组抗菌多肽，分离纯化重组抗菌多肽；

其特征在于，所述液体生产培养基的配方如下：各组分在终溶液中的质量体积比为：磷酸氢二钠 0.4%—0.7%，磷酸二氢钾 0.1%-0.6%，氯化铵 0.05%—0.2%，氯化钙 0.0005%-0.001%，硫酸镁 0.5%—2.5%，蛋白胨 1%-3%，酵母粉 0.5%-1%，葡萄糖 0.1%—0.5%，氯化钠 0.2%--0.8%其余为水

2．根据权利要求 1 所述的制备方法，所述液体生产培养基的配方如下：各组分在终溶液中的质量体积比为：磷酸氢二钠 0.68%，磷酸二氢钾 0.3%，氯化铵 0.1%，氯化钙 0.001%，硫酸镁 0.02%，蛋白胨 2.5%，酵母粉 0.75%，葡萄糖 0.2%，氯化钠 0.6%，其余为水。

3．根据权利要求 1 所述的制备方法，所述对菌种进行扩大培养分为三级扩大培养，各级扩大培养的参数为：220rpm、37℃、3-8 小时。

4．根据权利要求 1 所述的制备方法，所述诱导表达重组多肽指对步骤（2）得到的菌液 做如下处理：搅拌速度 220 rpm，最大通氧量，30 ℃ 2～4 小时；42 ℃ 0.5 小时；37 ℃ 1～2 小时，达到 42 ℃ 时加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG。

5．根据权利要求 1 所述的制备方法，所述步骤（2）扩大培养前，对冷冻保存的菌种进行如下处理：

（1）菌种 4℃解冻，在加有终浓度为 50μg/ml AMP 的 LB 液体培养基中，220rpm、37℃培养过夜复苏菌种，然后涂布于 LB 固体培养基上培育单菌落，

（2）挑取单菌落于 1.5mlLB 液体培养基中，220rpm、37℃培养 5-8 小时；然后转至 100mlLB 液体培养基中，220rpm、37℃培养 5-8 小时；

所述 LB 固体培养基的组分及各组分质量体积比为氯化钠 1%，蛋白胨 1%g，酵母 0.5%，琼脂 0.8～1%，其余为水。

6．根据权利要求 1 所述的制备方法，所述大肠杆菌指含有重组质粒 pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3、pBHC-SA4、pBHC-SE 或 pBHC-PA 的 BL-21 工程菌。

说明书附图

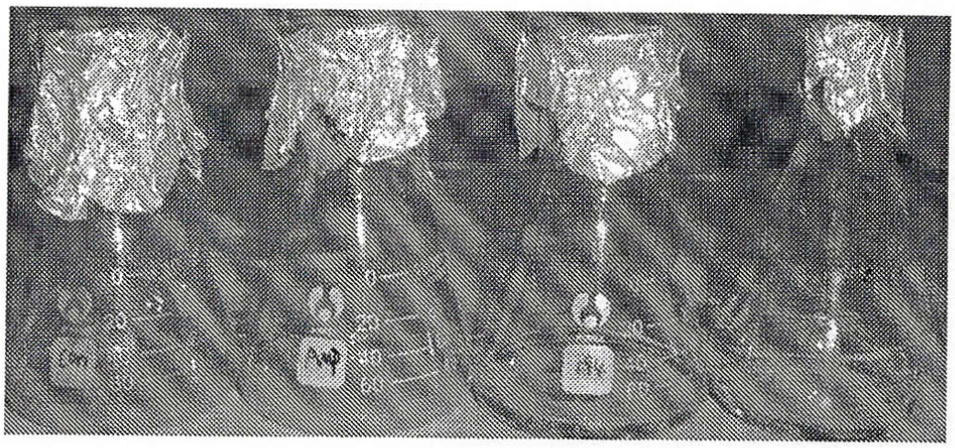


图 1

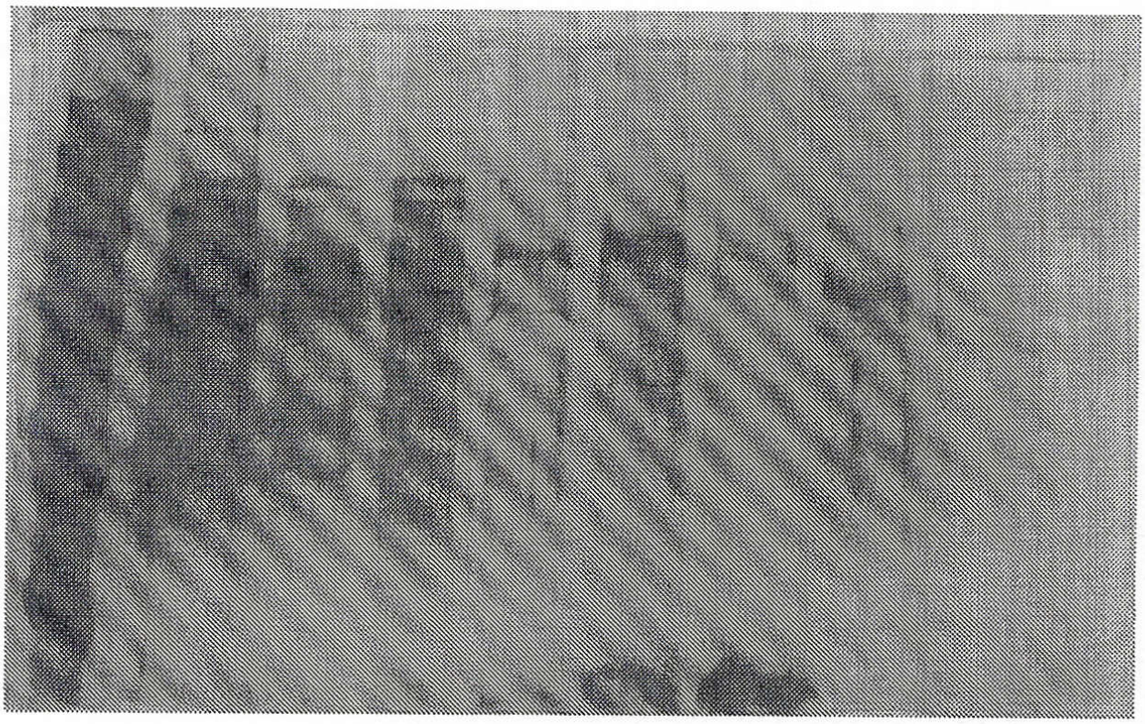


图 2

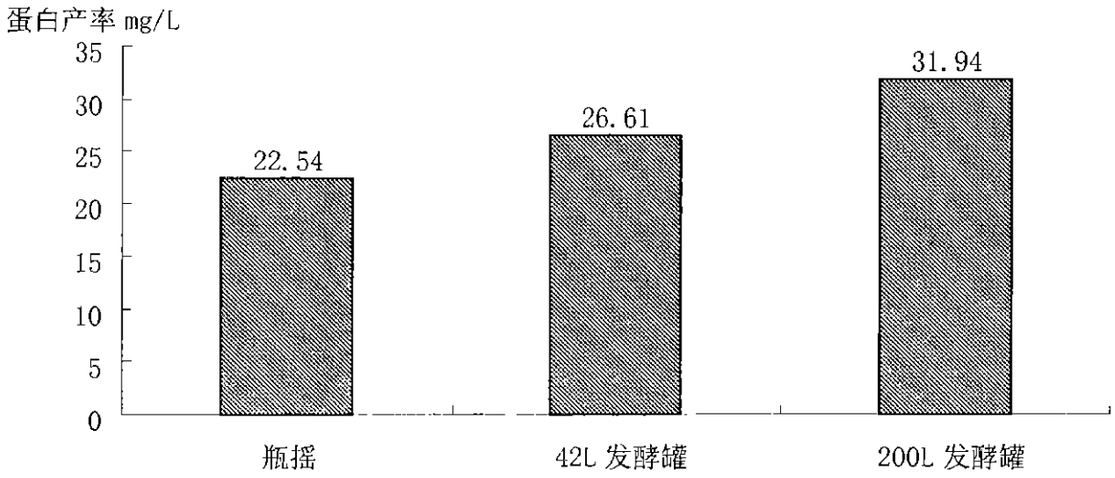


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2012/071825

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: C12P, 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)

CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, TWTXT, CATXT, CNKI, ISI web of Knowledge, EMBASE Escherichia coli, colibacillus, polypeptide, recombin+, disodium hydrogen phosphate,Na2HPO4. potassium dihydrogen phosphate, KH2PO4, ammonium chloride, NH4C1, calcium chloride, CaC12, magnesium sulfate, MgSO4, peptone, yeast, glucose, sodium chloride, NaC1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1712534 A (FENG CHIA UNIVERSITY), 28 December 2005 (28.12.2005), see the whole document	1-6
A	CN 101643501 A (PROTEIN DESIGN LAB, LTD.), 10 February 2010 (10.02.2010), see the whole document	1-6
A	CN 101914603 A (JINAN UNIVERSITY), 15 December 2010 (15.12.2010), see the whole document	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 May 2012 (04.05.2012)	**31 May 2012 (31.05.2012)**
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 **XING, Ying** Telephone No.: (86-10) **62411044**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2012/071825

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO 2009/126890 A2 (MICROBIA, INC [US]), 15 October 2009 (15.10.2009), see the whole document	1-6
A	RUIZ, T *et al* Cloning of the *Pichia anomala SEC61* Gene and Its Expression in a *Saccharomyces cerevisiae sec61* Mutant. CURRENT MICROBIOLOGY. 2003, vol 46, pages 340-344	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/071825

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1712534 A	28 12 2005	EP 1609867 A1	28.12 2005
		CN 100406563 C	30.07 2008
		EP 1609867 B1	29.09 2010
		DE 602005023811 E	11.11 2010
CN 101643501 A	10.02 2010	None	
CN 101914603 A	15.12 2010	None	
WO 2009126890 A2	15 10 2009	WO 2009126890 A3	04 03.2010
		EP 2294193 A2	16.03 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2012/071825

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/00 (2006 01) i

C12R 1/19 (2006 01) i

国际检索报告

国际申请号 **PCT/CN2012/071825**

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC. C12P, 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））

CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, TWTXT, CATXT, CNKI, ISI web of Knowledge, EMBASE 大肠杆菌, 多肽, 重组, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钾, 氯化铵, 氯化钙, 硫酸镁, 蛋白胨, 酵母, 葡萄糖, 氯化钠, Escherichia coli, colibacillus, polypeptide, recombin+, disodium hydrogen phosphate, Na2HPO4, potassium dihydrogen phosphate, KH2PO4, ammonium chloride, NH4Cl, calcium chloride, CaCl2, magnesium sulfate, MgSO4, peptone, yeast, glucose, sodium chloride, NaCl

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1712534 A (私立逢甲大学) 28 12 月 2005 (28 12.2005) 参见全文	1-6
A	CN 101643501 A (畿晋庆三联(北京)生物技术有限公司) 10.2 月 2010 (10.02.2010) 参见全文	1-6
A	CN 101914603 A (暨南大学) 15 12 月 2010 (15 12 2010) 参见全文	1-6

☒ 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	国际检索报告邮寄日期
04.5 月 2012(04 05 2012)	**31.5 月 2012 (31.05.2012)**
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 幸颖 电话号码：(86-10) **62411044**

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/071825

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	WO 2009/126890 A2 (MICROBIA, INC. [US]) 15 10 月 2009 (15 10 2009) 参见全文	1-6
A	Teresa Ruiz, *et al.* Cloning of the *Pichia anomala SEC61* Gene and Its Expression in a *Saccharomyces cerevisiae sec61* Mutant CURRENT MICROBIOLOGY 2003, 第 46 卷, 第 340-344 页	1-6

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/071825

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1712534 A	28.12.2005	EP 1609867 A1	28 12 2005
		CN 100406563 C	30.07 2008
		EP 1609867 B1	29 09 2010
		DE 602005023811 E	11 11 2010
CN 101643501 A	10 02 2010	无	
CN 101914603 A	15 12 2010	无	
WO 2009126890 A2	15 10.2009	WO 2009126890 A3	04 03 2010
		EP 2294193 A2	16.03.2011

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/071825

主题的分类

C12P 21/00 (2006 01) i

C12R 1/19 (2006.01) i

Pub. No.: WO/2012/119524 **International Application No.:** PCT/CN2012/071825
Publication Date: 13.09.2012 **International Filing Date:** 01 03.2012
IPC: ***C12P 21/00*** (2006.01), ***C12R 1/19*** (2006.01)

Applicants: **QIU, Xiaoqing** [CN/CN]; (CN) *(For US Only).*
LI, Rongli [CN/CN]; (CN) *(For US Only).*
ZHANG, Xiangli [CN/CN]; (CN) *(For US Only).*
ZHANG, Xiaofeng [CN/CN]; (CN) *(For US Only).*
WANG, Dongqin [CN/CN], (CN) *(For US Only).*
BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD. [CN/CN]; East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo Haidian District, Beijing 100095 (CN)

Inventors: **QIU, Xiaoqing**; (CN).
LI, Rongli; (CN).
ZHANG, Xiangli; (CN).
ZHANG, Xiaofeng; (CN).
WANG, Dongqin; (CN)

Priority Data: 201110052238.5 04.03 2011 CN

Title **(EN)** PREPARATION METHOD OF NEW RECOMBINANT ANTIBACTERIAL POLYPEPTIDE MEDICINE

ABSTRACT

The invention provides a method of preparing a new recombinant antibacterial polypeptide medicine, which primarily relates to liquid culture medium formula suitable for large-scale production of the antibacterial polypeptide, as well as optimization of the enlarged culture parameters.

CLAIMS

1. A preparation method of a novel recombinant antibacterial polypeptide medicine comprises the steps as follows:

(1) Preparing Escherichia coli strain comprising recombinant plasmid and freezing for conserving,

(2) Enlarging cultivation of the strain in liquid production medium,

(3) Inducing the strain to express the recombinant antibacterial polypeptide and getting purified polypeptide,

characterized in that, said liquid production medium comprises, in w/v%, disodium hydrogen phosphate 0.4%-0.7%, potassium dihydrogen phosphate 0.1%-0.6%, ammonium chloride 0.05%-0.2%, calcium chloride 0.0005%-0.001%, magnesium sulfate 0.5%-2.5%, peptone 1%-3%, yeast extract powder 0.5%-1%, glucose 0.1%-0.5%, sodium chloride 0.2%-0.8% and water of the rest.

2. The preparation method of claim 1, wherein said liquid production medium comprises, in w/v%, disodium hydrogen phosphate 0.68%, potassium dihydrogen phosphate 0.3%, ammonium chloride 0.1%, calcium chloride 0.001%, magnesium sulfate 0.02%, peptone 2.5%, yeast extract powder 0.75%, glucose 0.2%, sodium chloride 0.6%, and water of the rest..

3. The preparation method of claim 1, wherein said enlarging cultivation comprises three stages, with parameters of 220 rpm, 37□, and 3-8 hours in each stage.

4. The preparation method of claim 1, wherein said inducing the strain to express the recombinant antibacterial polypeptide means treating bacteria liquid out of step (2) as follows: with stirring rate at 220 rpm, maximum oxygen flow volume, 30 □ for 2~4 hours; 42℃for 0.5 hours; and 37℃for 1~2 hours, and IPTG at a final concentration of 0.5mM is added at 42℃.

5. The preparation method of claim 1, wherein before enlarging cultivationof step (2), the strain is treated as follows:

(1) The strain is thawed at 4□ and recovered overnight in an LB liquid medium containing 50 μg/ml of AMP at 220 rpm, 37□, and then coated onto LB solid medium to cultivate single colonies.

(2) Single colony is picked and cultivated in 1.5 ml of LB liquid medium at 220 rpm, 37□ for 5-8 hours, and then transferred into 100 ml of LB liquid medium and cultivated at 220 rpm, 37□ for 5-8 hours;

the compositions and their ratios in said LB, in w/v, are sodium chloride of 1%, peptone of 1%, yeast extract of 0.5%, agar of 0.8~1%, and water of the rest.

6. The preparation method of claim 1, wherein said Escherichia coli refer to engineered Escherichia coli BL-21 containing recombinant plasmid of pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE or pBHC-PA.

Description

PREPARATION METHOD OF NEW RECOMBINANT ANTIBACTERIAL POLYPEPTIDE MEDICINE

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to production art of antibiotic medicine, and more specifically, to preparation method of a novel recombinant antibacterial polypeptide medicine.

RELATED ART

Novel antibiotics have been studied with great efforts, among which the method of killing cells by forming ion channels on the cellular membrane of bacteria directly turns to be a promising approach. There are a lot of bacterial toxins working in said mechanism in the nature. The model example of such toxin is colicin, a bacterium toxin secreted by Escherichia coli. Early in 1946, H. Florey et al., the inventor of penicillin, had evaluated thoroughly about colicin on its antibacterial activity, safety and toxicology (British J. of Experimental Pathology. 1946(27), 378~390). They found that colicin is of great antibacterial activity, with very good antibacterial effect even after being diluted by millions of times. However, the antimicrobial spectrum of colicin is very specific, aiming only at Escherichia coli and some gram-negative bacteria with near relationships. Colicin Ia was found by Jacob et al. in 1953 with

great antibacterial activity at pH 6-7. In 1978, Finkelstein et al. found an ion channel inducible colicin K that could form voltage dependent ion channels on artificial bimolecular lipid membrane, thus fundamentally explaining the antibacterial mechanism of the bacterial toxin, namely, forming fatal ion channels at the membrane of target cells. In 1996, Qiu and Finkelstein et al. revealed the transmembrane spatial structure of colicin Ia when the ion channels formed at the artificial bimolecular lipid membrane open or close, and thus provides a theoretical basis for the design and preparation of new antibiotics at a molecular level. In 2001, Qiu constructed and prepared an engineered antibacterial polypeptide medicine against drug-resistant Staphylococcus aureus by fusing colicin with Staphylococcus aureus pheromone, said polypeptide having bactericidal activity and selectivity both in vivo and in vitro. Likewise, Qiu constructed engineered antibacterial polypeptides against vancomycin-resistant Enterococcus and penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae, said polypeptides exhibiting, in experiments both in vivo and in vitro, a specific, stable and rapid bactericidal effect against those pathogenic bacteria formidable to antibiotics now available, with pharmaceutical effect of tens to thousands times more than those of vancomycin, oxacillin, or penicillin, etc. Relevant results were published in papers such as Nature Biotechnology (21(12): 1480-85, 2003), and Antimicrobial Agents and Chemotherapy (49(3): 1184-1189, 2005), etc.

In this project, new research idea and approach is provided for the construction of engineered antibacterial polypeptides by fusing colicin with antibody mimics against pathogenic bacteria antigens, and an engineered antibacterial polypeptide, the **broad-spectrum antibiotic pheromone medicine**, has been successfully prepared. The inventor provides unique ideas and theoretical innovation in the field of antibacterial polypeptide drugs, with patents filed and methods established for the artificial construction of miniature antibody mimics, and relevant results published in Nature biotechnology (25(8): 921-929, 2007). Owing to its special bactericidal mechanism, the novel efficient and broad-spectrum antibiotic pheromone medicine of the project exhibits a good bactericidal effect against drug-resistant bacteria, stronger than those of antibiotics now available, such as multiple drug-resistant Pseudomonas

aeruginosa (MDRPA), methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA), and vancomycin resistant enterococcus (VRE), etc. The development and preparation of said medicine will play an important role in solving problems caused by treatment of drug-resistant bacteria as well as health care.

The broad-spectrum antibiotic pheromone medicine of the project is an entirely different material from small peptide antibiotics (e.g., human perforin and silkworm antibacterial peptide) studied home and abroad. There are several differences between the two: (1) Same as colicin, said antibacterial engineered polypeptide works in a monomer conformation, i.e., one single molecule constructing a whole working unit; whereas small peptide antibiotics work in polymer conformations, i.e., tens of molecules constructing a whole working unit. (2) Same as colicin, said antibacterial engineered polypeptide may function inside of blood circulation and in vivo; whereas small peptide antibiotics cannot. (3) Same as colicin, said antibacterial engineered polypeptide forms voltage dependent ion channels on the cellular membrane of target cells, leading to a better bactericidal mechanism and higher efficiency than the channel formed by small peptide antibiotics on the cellular membrane of target cells. According to literatures of the art searched till 2010, almost all of said small peptide antibiotics have a fatal defect in animal experiments in vivo, namely, being degraded by proteases inside of animals. Therefore, none of drugs developed from single small peptide antibiotics drug precursor had passed clinical test. However, the prototype of the new antibacterial engineered polypeptide drug developed and prepared in the project is per se a bacteriocin produced from bacteria coexisting in human and animal alimentary canals with entirely different structure and function mechanism from single small peptide. In the 8 years of tests both in vivo and in vitro, the medicine always shows great bactericidal activity, and performs good bactericidal and therapeutic effect in large animal (e.g., milk cows and goats) models either administrated by local injections or by intravenous injections. Thus, there is no limitation for the new drug of said antibacterial engineered polypeptide to be used in vivo as those for said small peptides.

It's shown by searching literature that at present, colicin, bacterial signal

transduction polypeptides as well as antibody modifications are studied respectively abroad, but there is no research conducted with such research idea or technique route as in the present project, and no similar paper published. It`s shown by searching at NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) in June, 2010 that there were over 2600 literatures listed about colicin, over 7300 about pheromone, over 2100 about antibody reconstitution, over 3800 about immunotoxin, and over 94000 about antibiotic resistance, among which none such scientific conception, design idea or research practice as in the present project reported. In June, 2010, it`s manifested in a novelty search by the novelty search workstation (No.1) of the Ministry of Education, P.R. China that, except for the present project reports, there was no report, both at home and abroad, on the construction of antibacterial engineered polypeptide medicine against target bacteria that utilizes colicin to bind to the target bacterial pheromone or artificial designed target bacterial antibody mimics. Meanwhile, there was no report, both at home and abroad, on human or animal drugs or pesticides prepared according to construction method of the targeted antibacterial engineered polypeptide of the project.

Said **broad-spectrum antibiotic pheromone medicine** has been developed for animal (a drug for the treatment of bovine mastitis) and human (antibiotics) in accordance with actual demands. It`s demonstrated by antibacterial tests both in vivo and in vitro that, said pheromone exhibits strong antibacterial effect, especially in vivo, which is much better than that in vitro. In May, 2010, it`s proven in a safety evaluation by the Veterinary Drug Supervision & Test Center, Ministry of Agriculture, P. R. China that said medicine is non-toxic and will not cause mutation or teratogenesis. The finished medicine safety evaluation results are as follows:

□ it`s shown by acute toxicity test on rats and mice that said drug is non-toxic (Report No. WTPJ20100003);

□ Salmonella typhimurium reverse mutation (Ames) turns to be negative, indicating non-mutagenicity of said drug (Report No. WTPJ20100003 (2));

□ Rat marrow osteocyte micronuclear test result is negative, which indicates there is no mutagenicity of said medicine (Report No. WTPJ20100003 (3));

□ Mice sperm malformation test result is negative, which indicates there is no teratogenesis-causing effect on mice sperm (Report No. WTPJ20100003 (4)).

□ the recombinant antibacterial polypeptide medicine was tested for the in vitro inhibition and bactericidal effect on bovine mastitis isolated pathogenic bacteria. Results show that:

A. The recombinant antibacterial polypeptide medicine has broad-spectrum antibiotic effect, as well as good inhibition and bactericidal effect on various bovine mastitis pathogenic bacteria in vitro.

B. The recombinant antibacterial polypeptide medicine (Patent Application Title: A novel antibiotic and nucleotide sequence, preparation method and application thereof, Application No. CN200910157564.5) has best inhibition and bactericidal effect against Staphylococcus (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, and Staphylococcus sciuri), with MIC_{50} of 0.125μg/mL, and MBC_{50} of 0.25μg/mL, which is extremely significant difference from controls of cephalothin (2ug/ml), oxacillin (4ug/ml), penicillin, ampicillin, lincomycin, and gentamicin (each with over 8ug/ml). After standardization according to the medicine molecular weight, the inhibition and bactericidal effect of polypeptide (MW 70,000) against Staphylococcus is 2100 times as that of cephalothin (MW 523), and 5,300 times as that of oxacillin (MW 423).

C The recombinant antibacterial polypeptide medicine shows equivalent inhibition and bactericidal effect against Streptococcus, Arcanobacterium pyogenes, and Enterobacteriaceae (such as Escherichia coli, etc.), with 1.0μg/mL of MIC_{50} and 2.0μg/mL of MBC_{50} against Streptococcus (Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis, and Streptococcus bovis), 0.25μg/mL of MIC_{50} and 1.0μg/mL of MBC_{50} against Arcanobacterium pyogenes, as well as 1.0μg/mL of MIC_{50} and 1.0μg/mL of MBC_{50} against Enterobacteriaceae (such as Escherichia coli, etc.).

D There is no significant difference of inhibition and bactericidal effect for recombinant antibacterial polypeptide medicine between sensitive strain and the drug-resistant strain of bacteria, but the recombinant antibacterial polypeptide

medicine has high-efficient inhibition and bactericidal effect against various drug-resistant Staphylococcus, Streptococcus and Escherichia coli.

In previous large animal treatment test (bovine mastitis experimental therapy), 112 was cured, with a cure rate of 95%. It's detected by the State Veterinary Drug Safety Assessment Center that, the medicine belongs to non-toxic drugs, and will not generate toxicity or harmful effect towards animals. Meanwhile, as a degradable pheromone substance, said medicine avoids drug residues of normal antibiotics after the treatment of diseases of beasts and birds. It's illustrated by a test by the Beijing Dairy Quality Supervision & Inspection Station that there is no antibiotic residue detected from the milk produced by cows treated with said medicine (Detection Report No. A2009-249).

As for the production of said recombinant antibiotic, the previous patent application (Patent Application Title: A novel antibiotic and nucleotide sequence, preparation method and application thereof, Application No. CN200910157564.5) discloses, in Example 1 of the description, an integrate preparation method of said antibacterial peptide, wherein routine culturing method was performed during the steps of expression of the recombinant protein induced by enriched bacteria after a recombinant plasmid was obtained and transformed into competent cells. During the experiment stage, there is no high requirement on production efficiency and preparation quantity. However, after the medical value of the recombinant antibacterial peptide is verified by clinical, animal experiments and safety assessment. The cost of preparation process in said patent application is too high to be used and also hardly to obtain plenty of recombinant protein expression products with high purity. Therefore, how to conduct efficient development and production in large scale is an problem which must be solved in practical application for said medicine.

SUMMARY OF THE INVENTION

Aimed at the absence of said field and the emergent demands, the invention provides preparation method of said recombinant antibacterial polypeptide.

Provided is a preparation method of the novel recombinant antibacterial polypeptide medicine, comprising the following steps:

(1) Preparing Escherichia coli strain comprising recombinant plasmid, and freezing for conserving,

(2) Enlarging cultivation of the strain in liquid production medium, and

(3) inducing the strain to express the recombinant antibacterial polypeptide and purifying the polypeptide,

characterized in that, said liquid production medium comprises, in w/v, disodium hydrogen phosphate of 0.4%—0.7%, potassium dihydrogen phosphate of 0.1%-0.6%, ammonium chloride of 0.05%-0.2%, calcium chloride of 0.0005%-0.001%, magnesium sulfate of 0.5%-2.5%, peptone of 1%-3%, yeast extract powder of 0.5%-1%, glucose of 0.1%-0.5%, sodium chloride of 0.2%-0.8% and water of the rest.

Said liquid production medium comprises, in w/v%, disodium hydrogen phosphate of 0.68%, potassium dihydrogen phosphate of 0.3%, ammonium chloride of 0.1%, calcium chloride of 0.001%, magnesium sulfate of 0.02%, peptone of 2.5%, yeast extract powder of 0.75%, glucose of 0.2%, sodium chloride of 0.6%, and water of the rest.

Said enlarging cultivation comprises three stages, with parameters of 220 rpm, 37□, and 3-8 hours in each stage.

Said inducing the strain to express the recombinant antibacterial polypeptide means treating bacteria liquid out of the step (2) as follows: stirring rate at 220 rpm, with maximum oxygen flow volume, 30℃for 2~4 hours; 42 ℃for 0.5 hours; and 37℃for 1~2 hours; IPTG with a final concentration of 0.5mM is added when getting 42℃.

Before said step (2), the strain is treated as follows:

(1) The strain is thawed at 4□, recovered overnight in an LB liquid medium containing 50 μg/ml of AMP at 220 rpm, 37□, and then coated onto LB solid medium to cultivate single colonies.

(2) Single colony is picked and cultivate in 1.5ml of LB liquid medium at 220 rpm, 37□ for 5-8 hours, and then transferred into 100ml of LB liquid medium to cultivate

at 220 rpm, 37□ for 5-8 hours;

The compositions and their ratios in said LB, in w/v, are sodium chloride of 1%, peptone of 1%, yeast extract of 0.5%, agar of 0.8~1%, and water of the rest.

Said Escherichia coli refer to engineered Escherichia coli BL-21 containing recombinant plasmid of pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE or pBHC-PA.

Based on a series of recombinant antibacterial polypeptide obtained by the inventor previously, a preparation method of recombinant antibiotics is provided in present invention, especially for the large-scale preparation of recombinant antibacterial polypeptide with high purity. The existing methods are not suitable for large-scale production as its unsatisfactory purity or productivity, which is a problem must to be solved during said the recombinant antibacterial polypeptides obtained previously move towards clinical application. A medium formula that is most suitable for the expression of foreign genes in Escherichia coli is provided in the invention via selection and optimized combination of medium components. Meanwhile, purity and productivity of the recombinant antibacterial polypeptide in large-scale production are both optimized via selection of optimum parameters for enlarged cultivation, which establishes the basis for the large-scale and industrial production of said recombinant antibacterial polypeptide.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 The comparison between AMP and antibacterial peptide prepared by the present method

From left to right, CON: turbid after 3 hours; AMP: turbid after 4 hours; and samples prepared in Example 1: the 194th batch of protein and the 198th batch of protein are still clear after 27 hours.

Fig. 2 purity assays of different batches of antibacterial engineered polypeptides

Wherein, Band 1 is represented as the control Marker, Band 2 is represented as 120th batch, Band 3 as 122nd batch, Band 4 as 126th batch, Band 5 as 246th batch, Band 6 as 247th batch, Band 7 as 248th batch, Band 8 as 250th batch, and Band 9 as 252nd

batch. Wherein, the preparation method of 120th, 122nd, and 126th batches is routine method, while that of 246th, 247th, 249th, 250th, and 252nd batches is the new method of the present invention.

Fig. 3 productivity comparison in different scales

From left to right is the productivity of shake flask, 42L fermenter, and 200L fermenter with continuous production of 10 batches.

EMBODIMENTS

The preparation process of the invention is exemplified with several specific recombinant antibacterial peptides as follows, but the preparation process is not limited to these specific recombinant antibacterial peptides.

Example 1 Preparation process of antibacterial peptides against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa

Mediums used in the invention:

(1) LB liquid medium

100ML: Sodium chloride 1g, peptone 1g, and yeast extract 0.5g were added in a 250 ml flask with the addition of 100 ml water, dissolved and autoclaved at 120□ for 8min.

(2) LB solid medium

100ML: Sodium chloride 0.5-1.5g, peptone 0.5-2g, yeast extract 0.3-1g, and agar 0.8-3g were added in a 250 ml flask with the addition of 100 ml water, dissolved and autoclaved at 120□ for 8min. The LB solid medium is used for plate culture of single colony after the strain recovery.

(3) Special medium for production (700 ml, 20 L, 100 L, and 200 L)

The medium solution contains, in w/v%, disodium hydrogen phosphate 0.4%-0.7%, potassium dihydrogen phosphate 0.1%-0.6%, ammonium chloride 0.05%-0.2%, calcium chloride 0.0005%-0.001%, magnesium sulfate 0.5%-2.5%, peptone 1%-3%, yeast extract powder 0.5%-1%, glucose 0.1%-0.5%, sodium chloride 0.2%-0.8% and water of the rest.

Preferred medium formula of the invention is shown in Table 1.

NO.	Ingredients	Raw material amount in 700 ml medium (g)	Raw material amount in 20 L medium (g)	Raw material amount in 100 L medium (g)	Raw material amount in 200 L medium (g)
1	Disodium hydrogen phosphate	4.76	136	680	1360
2	Potassium dihydrogen phosphate	2.1	60	300	600
3	Ammonium chloride	0.7	20	100	200
4	Calcium chloride	0.007	0.2	1	2
5	Magnesium sulfate	0.14	4	20	40
6	Peptone	17.5	500	2500	5000
7	Yeast extract powder	5.25	150	750	1500
8	Glucose	1.4	40	200	400
9	Sodium chloride	4.2	120	600	1200
10	Water	700ml	20L	100 L	200L

After the addition of corresponding amount of water, the medium is autoclaved at 121□ for 8min.

(4) **Boric acid buffer**: boric acid 0.04 M, NaCl 0.01M, sodium tetraborate 0.04M, and EDTA 2mM

Preparation method: boric acid buffer (5L)= solution A (1L) + solution B(4L)

Solution A (1L): boric acid 12.368 g (0.2M), NaCl 2.925 g (0.05M)

Solution B (4L): sodium tetraborate 76.27g (0.05M)

Solution A 1L and solution B 4L are mixed with the addition of EDTA 2.9225 g at a final concentration of 2mM.

Step 1 Preparing recombinant mutant plasmids

Recombinant mutant plasmids pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3 pBHC-SA4, pBHC-SE and pBHC-PA are prepared according to the method in Example 1 in the description of Patent with application No. CN200910157564.5 and title: "A novel antibiotic and nucleotide sequence, preparation method and application thereof".

Step 2 Transformation of competent cell

100 ng of the six recombinant mutant plasmids is ice-incubated with 40 ul of BL-21 engineered competent cell for 5 minutes, heat-shocked at 42℃for 30 seconds, ice-incubated for 2 minutes, added with 160 ul of SOC medium, and shake-cultivated at 220 rpm, 37□for 1 hour, coated on LB medium with 1% agar and 50ug/ml ampicillin, and cultured overnight at 37℃. Single colonies are picked and cultivated to obtain the strain, which is conserved at a low temperature.

Step 3 Recovery of the strain

1. Recovery of the strain

The conserved strain is thawed at 4□; 1.5 ml of the strain is transferred into 10 ml LB medium (containing 50μg/ml of AMP) and cultivated at 220 rpm, 37□ for 5-8 hours.

2. Inoculation of single colony

The recovered bacteria solution is diluted by 10^4 or 10^5 times; 10μl of the diluted bacteria solution is transferred to coat onto LB solid medium plate (containing 50μg/ml of AMP), placed in a humid box and cultivated in incubator at 37□ for 10-12 hours till round single colonies have grown on the surface of the medium.

3. Picking and propagation of bacteria

(1) Single colony with regular round shape and smooth edge is picked up by

sterilized toothpick or inoculation loop from the plate, added into 1.5ml of LB medium, and shaking cultivated at 220 rpm, 37□ for 5-8 hours.

(2) 1.5ml of LB bacteria solution is transferred into 100 ml of LB medium, and shaking cultivated at 220 rpm, 37℃ for 5-8 hours.

(3) Primary propagation: 100ml of bacteria solution from the last step is added into 700ml of special medium for production, and shaking cultivated at 220rpm, 37℃ for 5-8 hours.

(4) Secondary propagation: 700ml of bacteria solution from the last step is added into 6×700 ml of special medium for production, and shaking cultivated at 220 rpm, 37℃ for 5-8 hours.

(5) Third propagation: 6×700ml of bacteria solution from the last step is added into 20 L of special medium for production, and cultivated in a fermenter with stirring rate of 220 rpm and maximum oxygen flow volume, 37□ for 3-5 hours.

(6) Fermentation of engineered bacteria and induced expression of protein: 20 L of bacteria solution from the last step is added into 200 L of special medium for production, and cultivated in a fermenter for induced expression of protein with stirring rate of 220 rpm and maximum oxygen flow volume, at 30℃for 2~4 hours; 42□ for 0.5 hours; and 37℃for 1~2 hours, note that IPTG is added at 42℃with a final concentration of 0.5 mM.

4, Centrifugation for collecting bacteria

6000 g culture solution is centrifuged at 4□ for 20min. The precipitate is collected and added into 50mM boric acid buffer (pH9.0) to re-suspend the bacterium, which is manipulated at 4□, note that 2mM of PMSF is added into the boric acid buffer.

5, thalli fragmentation

After re-suspended in pH9.0 boric acid buffer completely, thalli was fragmented by a High Pressure Homogenizer at 500~600 bar for 7 times, with intervals of 3~5 minutes.

6, precipitation of thalli DNA

The fragmented bacteria solution is centrifuged at 55000 g, 4□ for 40 min. The

supernatant is added with streptomycin sulfate (16 bottles of 1 million unit streptomycin sulfate are added into every 200 ml liquid), and stirred for 1 h on a magnetic stirrer.

7, Dialysis

The bacteria solution from the last step is centrifuged at 55000 g, 4℃ for 20 min. The supernatant is placed into a dialysis bag and dialyzed for 8~12 hours in boric acid buffer, which is changed once every 4 hours.

8, Protein medicine purification and obtaining of antibacterial engineered polypeptide drug

The dialyzed bacteria solution is centrifuged at 55000 g, 4℃ for 20 min. The supernatant is placed into a beaker and the protein is purified by using ion exchange method. The supernatant is uploaded onto a CM ion exchange column, washed completely, and eluted with 50mM boric acid buffer containing 0.3M NaCl to obtain the novel antibacterial engineered polypeptide.

Example 2 Bacteria inhibition assay of the polypeptide medicine

1, 10 ml of BM medium is filled into a 100 ml conical flask and autoclaved at 121□ for 8min.

2, the clean bench is pre-cleaned with alcohol, and then UV sterilized for 30 min.

3, 3μl of overnight cultured Staphylococcus aureus is filled into each 100 ml conical flasks.

4, in 100ml conical flasks, 10μl of sterile saline solution, 1μl of 1mg/ml AMP, and 125μl of 0.8mg/ml pBHC-SA1 polypeptide sample prepared by method in Example 1 are added and labeled respectively.

5, the mixtures are shaking cultivated at 37□, 220rmp.

6, they are observed at 3h, 6h, 9h, 12h and 24h.

The blank control and AMP are turbid at 3 h, while the sample is not turbid at 9 h, which shows that the prepared sample may effectively resist Staphylococcus aureus, as shown in Fig. 1. Wherein, from left to right, CON: turbid after 3 hours; AMP:

turbid after 4 hours; and the prepared samples of 194th and 198th batches of protein in Example 1: still clear after 27hours.

Example 2 Comparison of the prepared antibacterial peptides between the present preparation method and routine method

Purity of different batches of antibacterial peptide pBHC-SA1 prepared by the present preparation method and the original method (disclosed in CN200910157564.5) in equivalent production scale are compared by electrophoresis and staining in SDS-PAGE. The result shows that, at a molecular weight of about 75000, the bands of antibacterial engineered polypeptide prepared from Example 1 at Lane 5, 6, 7, and 8 are relatively unitary, whereas mixed bands containing numerous smaller molecular weight are shown at Lane 2, 3, 4, which illustrates that purity of the polypeptide prepared by the method of the invention is significantly improved.

Example 3 Improvement of the production process

The production process is continuously improved and optimized, and the production scale is enlarged from a shake flask (8.4L), to a 42L fermenter (25L), till the final 200 L fermenter (100L), however the productivity is not influenced, as shown Fig. 3. Thus, it establishes the basis for the large-scale and industrial production of the antibacterial polypeptide. The yields and productivities of 10 batches of continuous production in shake flask, 42L fermenter as well as 200L fermenter are shown in Table 2 and Fig. 3.

Table 2 Yield and productivity

	Shake flask	42 L fermenter	200 L fermenter
Yield	1893.72	6654.82	31940.00
Productivity (mg/L)	22.54	26.61	31.94

Drawings

Fig. 1

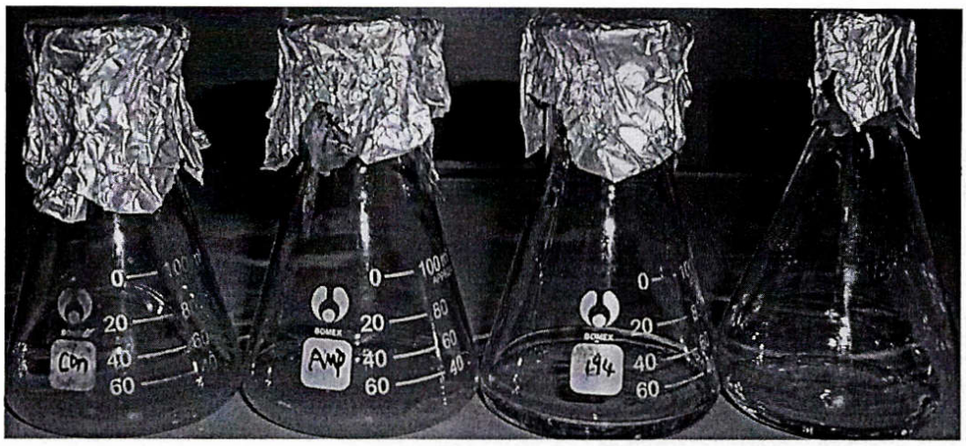


Fig. 2

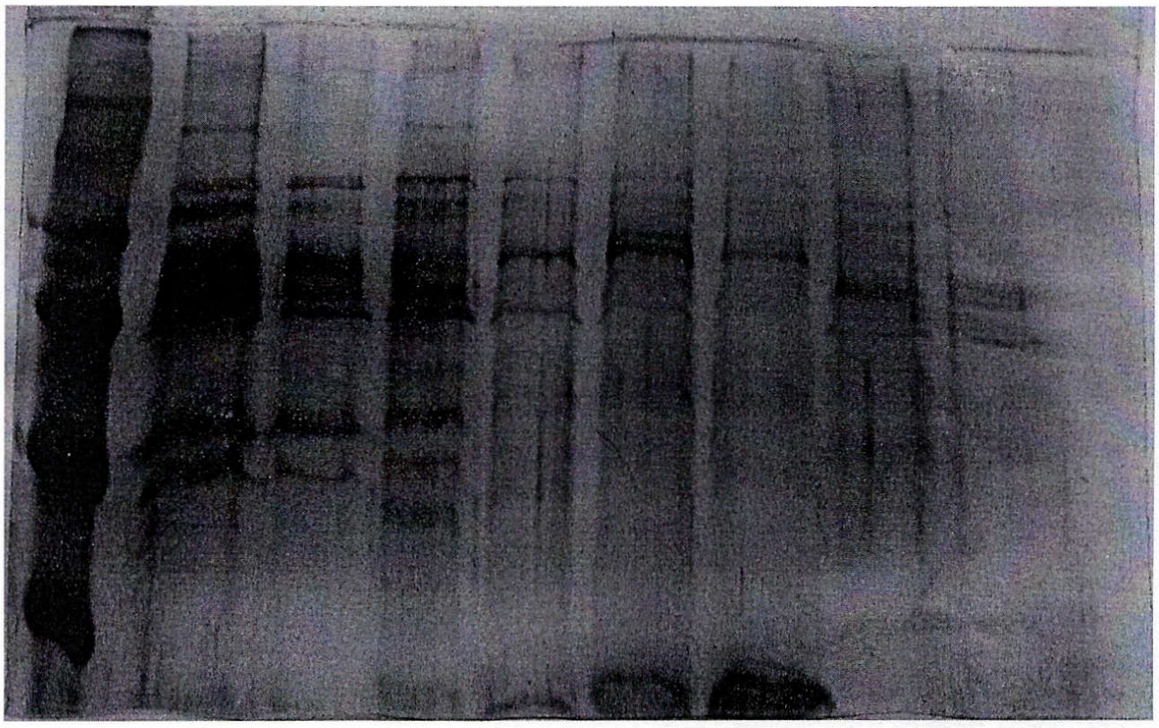
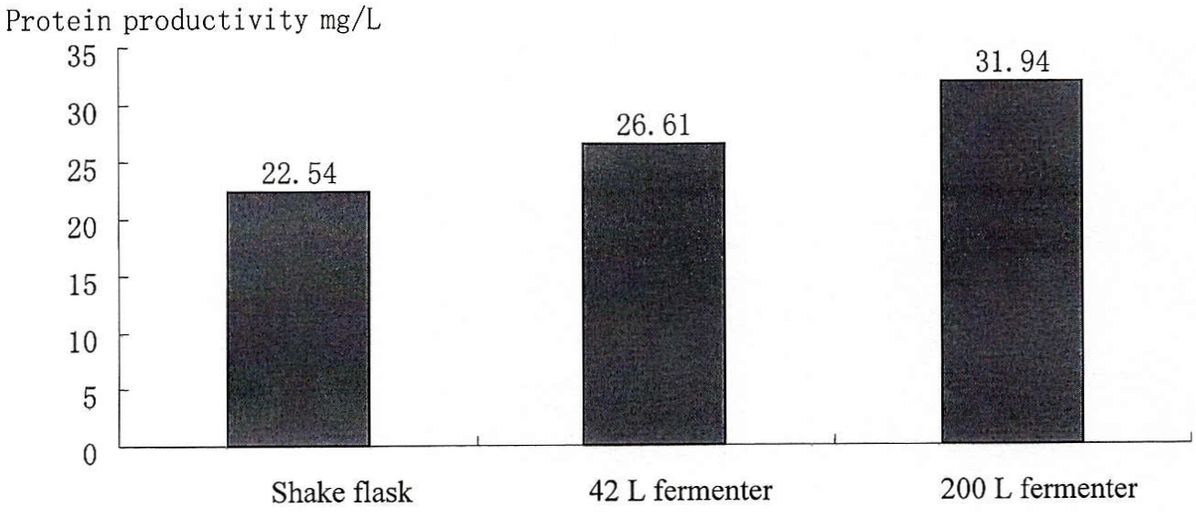


Fig. 3


Protein productivity mg/L
35
30
25
20
15
10
5
0
22.54
26.61
31.94
Shake flask
42 L fermenter
200 L fermenter

VIII-2-1	声明：有权申请和被授予专利 当根据细则4 17(iv)的声明不适用时，关于申请人在国际申请日有权申请 和被授予专利的声明(4 17(ii)和51之二 1(a)(iii))： 姓名	关于 本国际申请 北京科润三联生物技术有限责任公司 基于下列事项有权申请和被授予专利： 北京科润三联生物技术有限责任公司 作为发明人 丘小庆 的雇主是有权的 北京科润三联生物技术有限责任公司 作为发明人 李荣旗 的雇主是有权的 北京科润三联生物技术有限责任公司 作为发明人 张向利 的雇主是有权的 北京科润三联生物技术有限责任公司 作为发明人 张小凤 的雇主是有权的 北京科润三联生物技术有限责任公司 作为发明人 王东芹 的雇主是有权的
VIII-2-1(ii)		
VIII-2-1(ii)		
VIII-2-1(ii)		
VIII-2-1(ii)		
VIII-2-1(ii)		

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之三.1(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/CN2012/071825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	201110052238.5, CN, 2011年 3月 04日 (04.03.2011)
		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。

PCT请求书

打印件(原件为电子形式)

VIII-4-1-1-1	姓名	丘 小庆
	Name (LAST, First)	QIU, Xiaoqing
VIII-4-1-1-2	居所: (城市和美国的州(适用时), 或国家)	北京市, 中国
VIII-4-1-1-3	邮寄地址.	海淀区 苏家坨镇 前沙涧村东1000米
	Mailing Address:	East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, 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 23日 (23.03.2012)
VIII-4-1-2-1	姓名:	李 荣旗
	Name (LAST, First)	LI, Rongqi
VIII-4-1-2-2	居所. (城市和美国的州(适用时), 或国家)	北京市, 中国
VIII-4-1-2-3	邮寄地址	海淀区 苏家坨镇 前沙涧村东1000米
	Mailing Address	East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China
VIII-4-1-2-4	国籍.	CN
VIII-4-1-2-5	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)	/李荣旗/
VIII-4-1-2-6	日期	2012年 3月 23日 (23.03.2012)
VIII-4-1-3-1	姓名	张 向利
	Name (LAST, First).	ZHANG, Xiangli
VIII-4-1-3-2	居所. (城市和美国的州(适用时), 或国家)	北京市, 中国
VIII-4-1-3-3	邮寄地址.	海淀区 苏家坨镇 前沙涧村东1000米
	Mailing Address:	East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China
VIII-4-1-3-4	国籍.	CN
VIII-4-1-3-5	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)	/张向利/
VIII-4-1-3-6	日期	2012年 3月 23日 (23.03.2012)

PCT/CN2012/071825
PCT/CN 2012/0 7 1 8 25
28.3月.2012 (28.03.2012)

PCT请求书

打印件(原件为电子形式)

VIII-4-1-4-1	姓名:	张 小凤
	Name (LAST, First):	ZHANG, Xiaofeng
VIII-4-1-4-2	居所: (城市和美国的州(适用时), 或国家)	北京市, 中国
VIII-4-1-4-3	邮寄地址:	海淀区 苏家坨镇 前沙涧村东1000米
	Mailing Address:	East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China
VIII-4-1-4-4	国籍:	CN
VIII-4-1-4-5	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)	张小凤 /张小凤/
VIII-4-1-4-6	日期	2012年 3月 23日 (23.03.2012)
VIII-4-1-5-1	姓名:	王 东芹
	Name (LAST, First)	WANG, Dongqin
VIII-4-1-5-2	居所: (城市和美国的州(适用时), 或国家)	北京市, 中国
VIII-4-1-5-3	邮寄地址:	海淀区 苏家坨镇 前沙涧村东1000米
	Mailing Address:	East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China
VIII-4-1-5-4	国籍	CN
VIII-4-1-5-5	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)	王东芹 /王东芹/
VIII-4-1-5-6	日期	2012年 3月 23日 (23.03.2012)

PCT请求书

打印件(原件为电子形式)

VIII-1-1	声明：发明人身份 关于发明人身份的声明(细则4.17(i)和51之二 1(a)(i))	关于 本国际申请
	姓名. 地址	丘 小庆(QIU, Xiaoqing) 住在 中国 北京市 海淀区苏家坨镇前沙涧村 东1000米(East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China) 100095 是本国际申请要求保护的主题的发明人
	姓名. 地址	李 荣旗(LI, Rongqi) 住在 中国 北京市 海淀苏家坨镇前沙涧村东1000米(East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China) 100095 是本国际申请要求保护的主题的发明人
	姓名 地址.	张 向利(ZHANG, Xiangli) 住在 中国 北京市 海淀苏家坨镇前沙涧村东1000米(East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China) 100095 是本国际申请要求保护的主题的发明人
	姓名. 地址	张 小凤(ZHANG, Xiaofeng) 住在 中国 北京市 海淀区苏家坨镇前沙涧村东1000米(East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China) 100095 是本国际申请要求保护的主题的发明人
	姓名. 地址	王 东芹(WANG, Dongqin) 住在 中国 北京市 海淀苏家坨镇前沙涧村东1000米(East1000Meters, Qianshajiancun, Sujiatuozhen, Haidian District, Beijing, 100095, China) 100095 是本国际申请要求保护的主题的发明人

PCT/CN2012/071825
PCT/CN 2012/071825
28.3月.2012 (28.03.2012)

打印件(原件为电子形式)

VIII-2-1	声明：有权申请和被授予专利 当根据细则4.17(iv)的声明不适用时，关于申请人在国际申请号有权申请和被授予专利的声明(4.17(ii)和51之1(a)(ii))： 如名	关于 本国际申请 北京科润三联生物技术有限责任公司（BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD） 基于下列事项有权申请和被授予专利.
VIII-2-1(iii)		北京科润三联生物技术有限责任公司（BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD） 与 丘小庆（QIU, Xiaoqing） 于 2009年 6月 30日 (30.06.2009) 签订的协议
VIII-2-1(ii)		北京科润三联生物技术有限责任公司(BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 作为发明人 李荣旗(LI, Rongqi) 的雇主是有权的
VIII-2-1(ii)		北京科润三联生物技术有限责任公司(BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 作为发明人 张向利(ZHANG, Xiangli) 的雇主是有权的
VIII-2-1(ii)		北京科润三联生物技术有限责任公司(BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 作为发明人 张小凤(ZHANG, Xiaofeng) 的雇主是有权的
VIII-2-1(ii)		北京科润三联生物技术有限责任公司(BEIJING CREATED TRIBIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 作为发明人 王东芹(WANG, Dongqin) 的雇主是有权的

82

Banco de Bogotá
NIT. 860.002.964-4

Sistema Nacional de Recaudos Comprobante de Pago Universal Individual **No.** 56528222-2

ESPACIO PARA EL TIMBRE

Fecha: Año 2013 Mes 09 Día 03

Código de Convenio:

Cuenta Corriente [X] Número
Cuenta de Ahorros [ ]
Crédito Rotativo [ ] 062751431817

Nombre Convenio ó Empresa Recaudadora: Superintendencia de Industria y Comercio

Referencia 1: COD 04

Referencia 2: 9001030131-3

FORMA DE PAGO

Efectivo	$ 500.000 -
Cheque	$
TOTAL A PAGAR	$ 500.000 -

ANEXO
[ ] Sin Anexo [ ] Papel
[ ] Disquete [ ] Otro

Código Banco	No. de cuenta del cheque	Número del cheque	Ciudad o plaza

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).

Banco de Bogota 433 El Poblado
Srv 2160 AQW743302 Usu2971 T897
CC*****4387 03/09/13 14:23 H.NO
SUPERINTENDENCIA DE INDU CEO 785
Us:9001030133
Valor Efectivo:500,000.00
Valor Cheque:0.00 0
Valor TC:0.00
Valor ND:0.00
Valor Total:500,000.00

Nombre del depositante: Peyling Created

Teléfono: 6040450

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

Esta transacción esta 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) cheques son pagado(s) por el(los) banco(s) librados. En caso de que el(los) cheque(s) sea devuelto(s) por cualquier motivo, el(los) cheque(s) se entregado(s) por parte del Banco al titular de la cuenta en la que se depositaron. En consecuencia, el recibo del comprobante de pago por parte del 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 -

OPTAPRES S.A. NIT 800.159.830-1 TEL. 743 1888 10028471S

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2 **No. 13 - 0087922**
Bogotá D.C., Septiembre 03 de 2013 - 15:27:21

RECIBIDO DE : CONTEXTO INTELECTUAL S.A
CONS. BANCO DE BOGOTA 062754387 565282222 03/09/2013 $ 500.000

1 50005-01-01 SOLICITUDES

1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION 500.(

Valor Recaudo $500.000.00 -*****-**

83

Banco de Bogotá
NIT. 860.002.964-4

Sistema Nacional de Recaudos Comprobante de Pago Universal Individual No. 56528220-0

ESPACIO PARA EL TIMBRE

Fecha Año 2013 Mes 04 Día 03

Código de Convenio

Cuenta Corriente [X] Cuenta de Ahorros [ ] Crédito Rotativo [ ] Número 061217514387

Nombre Convenio ó Empresa Recaudadora: Superintendencia de Industria y Comercio

Referencia 1: Cod 01

Referencia 2: 9001013013 1-3

Banco de Bogota 433 El Poblado
Srv 2160 A0W743302 Usu2971 T894
CC*****4387 03/09/13 14:22 H.NO
SUPERINTENDENCIA DE INDU CEO 785
Us:9001030133
Valor Efectivo:175,000.00
Valor Cheque:0.00 0
Valor TC:0.00
Valor ND:0.00
Valor Total:175,000.00

FORMA DE PAGO

Efectivo	$ 175.000-
Cheque	$
TOTAL A PAGAR	$ 175.000-

ANEXO

[ ] Sin Anexo [ ] Papel [ ] Disquete [ ] Otro

Código Banco	No. de cuenta del cheque	Número del cheque	Ciudad o plaza

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: Beiying Ciudad

Teléfono: 6049430

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

Esta transacción esta sujeta a verificación posterior. El(los) cheque(s) depositado(s) se reciben "Salvo buen cobro" de manera que la operación sólo se entiende efectiva si el(los) cheques son pagado(s) por el(los) banco(s) librados. En caso de que el(los) cheques sean devueltos sin pago, esta operación se reversará y el(los) título(s) se entregará(n) por parte del Banco al titular de la cuenta en la que se depositó(aron). 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 -

OTAXRES3XX NIT 860.034.594-1 TEL. (NA) 1688 100284115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2 **No. 13 - 0087924**
Bogotá D.C., Septiembre 03 de 2013 - 15:29:50
RECIBIDO DE : CONTEXTO INTELECTUAL S.A
CONS . BANCO DE BOGOTA 062754387 565282200 03/09/2013 $*175.000
1 50005-01-01 SOLICITUDES
82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NUEVAS CREACIONES
Valor Recaudo $175.000.00 - -