

(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
2011 年 5 月 12 日 (12.05.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/054315 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/17 (2006.01) A61P 19/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2010/078481

(22) 国际申请日: 2010 年 11 月 5 日 (05.11.2010)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200910198380.3 2009 年 11 月 6 日 (06.11.2009) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 上海市免疫学研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF IMMUNOLOGY) [CN/CN]; 中国上海市卢湾重庆南路 280 号, Shanghai 200025 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李宁丽 (LI, Ningli) [CN/CN]; 中国上海市卢湾重庆南路 280 号, Shang-

hai 200025 (CN)。 王利 (WANG, Li) [CN/CN]; 中国上海市卢湾区重庆南路 280 号, Shanghai 200025 (CN)。 沈佰华 (SHEN, Baihua) [CN/CN]; 中国上海市卢湾区重庆南路 280 号, Shanghai 200025 (CN)。 肖涟波 (XIAO, Lianbo) [CN/CN]; 中国上海市卢湾区重庆南路 280 号, Shanghai 200025 (CN)。 欧阳桂林 (OUYANG, Guilin) [CN/CN]; 中国上海市卢湾重庆南路 280 号, Shanghai 200025 (CN)。

(74) 代理人: 上海东亚专利商标代理有限公司 (SHANGHAI EAST ASIA PATENT & TRADE-MARK AGENCY CO., LTD.); 中国上海市长乐路 672 弄 33 号 A 座 4 层, Shanghai 200040 (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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,

[见续页]

(54) Title: USE OF CYR61 PROTEIN FOR PREPARING MEDICINE

(54) 发明名称: CYR61 蛋白在制药中的应用

(57) Abstract: The present invention provides the use of CYR61 protein and inhibitors thereof for preparing medicine for treating rheumatic disease, wherein the inhibitors are selected from anti-CYR61 antibody or interfering RNA of CYR61 gene.

(57) 摘要:

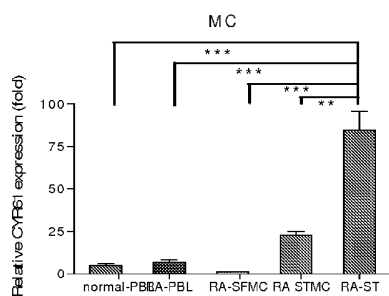


图 1 / Fig. 1

本发明提供了 CYR61 蛋白及其抑制剂在制备治疗风湿性疾病的药物中的应用, 所述抑制剂选自抗 CYR61 抗体或 CYR61 基因干扰 RNA。

WO 2011/054315 A1



SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW。

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)。

- (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, 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,

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

CYR61 蛋白在制药中的应用

【技术领域】

本发明涉及 CYR61 蛋白的用途,尤其涉及 CYR61 蛋白在制药领域中的应用。

【背景技术】

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是最常见的风湿性疾病之一。不同国家和地区的患病率略有差异。全球RA患病率平均为0.5-1%。在我国, RA患病率为0.45%, 患病总人数约为400万左右。RA并不是一种良性病变(benign disease), 与同龄人相比, RA患者平均寿命可缩短10-15年。RA同时是致残率最高的关节炎之一, 未经治疗的患者, 其2年和3年的致残率可达50%和70%。RA 是一种以关节滑膜炎为特征的全身性慢性自身免疫性疾病, 其临床特点为累及外周关节的侵蚀性滑膜炎, 同时具有类似于“局限性恶性肿瘤”的增生性和破坏性的性质, 病程为进行性, 自行缓解罕见。晚期RA患者由于其关节软骨及骨的破坏, 而导致关节畸形和功能障碍。此病发病机制迄今未能完全阐明, 且无特效治疗。自20世纪90年代以来, 采用模仿治疗恶性肿瘤的联合化学疗法, 是该病治疗的一大突破。但目前的药物治疗及滑膜切除、关节置换等手术疗法只能缓解炎症和疼痛, 而对软骨和骨的侵袭性破坏无效。因此深入研究RA的发病机制, 寻找新的治疗靶点具有重要的理论和实际意义。

CYR61 (cysteine-rich 61)是一种由381个氨基酸残基的相对分子质量为42 kDa的分泌蛋白, 最早被克隆的CYR61是1985年Lau等在用血清或血小板衍生生长因子(PDGF)刺激小鼠BALB/c 3T3成纤维细胞时发现的, 因富含半胱氨酸(含10%的半胱氨酸残基)被命名为CYR61。CYR61具有明显的促有丝分裂活性和趋化性, 可诱导成纤维细胞增殖和分泌细胞外基质, 参与调节细胞增生、分化、胚胎发育形成, 是生命活动的基本蛋白。目前, 对于CYR61的研究多集中在肿瘤中, 而在类风湿关节炎中的作用尚无报道。

【发明内容】

本发明的目的是, 提供 CYR61 蛋白的新用途。

为实现上述目的, 本发明采取的技术方案是: 一种 CYR61 蛋白在制备治疗风湿性疾病药物中的应用。

所述的风湿性疾病是类风湿性关节炎。

依据上述技术方案，本发明的具体实施方法是：

1、在基因芯片筛查的基础上，运用实时定量 PCR 方法分析了 CYR61 在 RA 患者不同组织中的表达格局。发现 CYR61 主要表达在 RA 患者的滑膜组织中，其相对含量是 RA 患者外周血单个核细胞的 8.7 倍、是 RA 关节液单个核细胞的 13.3 倍、正常人的外周血单个核细胞的 125 倍。同时用免疫组化的方法比较了 RA、OA、正常人的滑膜组织中 CYR61 的表达情况，发现 CYR61 在 RA 滑膜组织中表达明显高于 OA 患者和正常对照。进一步采用体外培养 RA 滑膜组织来源的 FLS 进行研究：用实时定量 PCR 发现 CYR61 在培养的 FLS 中表达高于滑膜组织；采用 Western Blot 方法比较了培养的 RA、OA、正常人的 FLS 中 CYR61 蛋白的表达格局，明确了 CYR61 在 RA 患者的成纤维样滑膜细胞中的表达显著高于 OA 和正常对照，提示 CYR61 在 RA 滑膜组织病变中可能发挥着重要的作用。

2、采用原代细胞培养的方式研究 RA FLS 在局部炎症环境中的增殖与 CYR61 高表达的关系。用 RA 患者的 SF 刺激培养的 FLS，发现 RA 患者的 SF 可以显著刺激 FLS 的增殖，同时可以刺激 FLS 中 CYR61 的表达。而后探讨 SF 中何种细胞因子能上调 CYR61 的表达，采用纯化的细胞因子分别刺激 RA FLS，发现 IFN- γ 和 TNF- α 可以明显上调 CYR61 的表达。为了进一步研究 CYR61 的功能，我们制备并筛选了能够与天然 CYR61 蛋白相结合的单克隆抗体；并采用 ELISA 的方法检测 RA 滑膜液中 CYR61 的含量，发现 RA 滑膜液中存在高浓度的 CYR61。为了明确 CYR61 蛋白对 FLS 增殖的作用，采用 CYR61 单克隆抗体阻断的方法研究 CYR61 对于 FLS 增殖的影响。结果显示，在中和了 SF 中 CYR61 蛋白后，SF 刺激 FLS 增殖的能力明显下降，表明 CYR61 蛋白在 SF 刺激 FLS 增殖过程中发挥了重要作用。

3、用 siRNA 干扰的方法研究 CYR61 调控滑膜细胞增殖的机制。用筛选得到的 CYR61 特异性 siRNA 沉默 FLS 中 CYR61 基因的表达，发现干扰后 FLS 的增殖能力下降同时凋亡增加，证实 CYR61 可通过抑制其凋亡而发挥促进增殖的作用。为了探讨凋亡家族分子是否参与 CYR61 抑制 FLS 凋亡，采用实时定量 PCR 的方法检测了 CYR61 干扰后 Bcl-2 家族基因表达的变化，发现随着 CYR61 基因的抑制，凋亡抑制基因 Bcl-2 mRNA 表达水平明显下调；而其它 Bcl-2 家族基因则没有明显变化，这一结果提示 CYR61 可通过上调抑凋亡基因 Bcl-2 而抑制 FLS 的凋亡，

从而促进了 FLS 的增殖。

本发明优点在于：

1、本发明发掘了 CYR61 蛋白的医疗用途，开拓了一个新的应用领域。

2、本发明结果表明 CYR61 具有促进成纤维样滑膜细胞（FLS）增殖的作用，其作用途径之一是抑制滑膜细胞的凋亡和上调金属蛋白酶而参与关节软骨和骨组织破坏，这一结果为寻找生物和小分子药物治疗靶点提供实验依据，具有临床应用价值。

【附图说明】

图 1： RA 患者组织及细胞中 CYR61 基因的相对含量表达格局（ $P < 0.0001$ ***
 $P = 0.0054$ **）。

图 2：滑膜组织切片 HE 染色和免疫组化结果，A：正常滑膜组织 HE 染色（20 \times ），B：OA 滑膜组织 HE 染色（20 \times ），C：RA 滑膜组织 HE 染色（20 \times ），D：正常滑膜组织 CYR61 组织化学染色（40 \times ），E：OA 滑膜组织 CYR61 组织化学染色（40 \times ），F：RA 滑膜组织 CYR61 组织化学染色（40 \times ）。

图 3A：FLS 的体外培养和鉴定，第三代 FLS（400 \times ）。

图 3B：FLS 的体外培养和鉴定，FLS 的鉴定（ $< 2\%$ CD11b， $< 2\%$ CD14 $^{+}$ ， $< 1\%$ CD3 $^{+}$ ，and $< 5\%$ CD19 $^{+}$ ，流式细胞仪检测）。CYR61 在 RA 滑膜组织和体外培养的滑膜纤维母细胞中的表达。

图 4A：体外培养的 RA FLS 中高表达 CYR61，RA FLS 中 CYR61 的表达明显高于 RA 滑膜组织。

图 4B：体外培养的 RA FLS 中高表达 CYR61，CYR61 mRNA 在 RA FLS 中的表达明显高于 OA 和正常人 FLS。

图 4C：体外培养的 RA FLS 中高表达 CYR61，Western-blot：RA，OA 和正常人 FLS 中 CYR61 蛋白的表达。

图 5A：不同浓度滑膜液对 FLS 增殖的影响。

图 5B：不同浓度滑液对 FLS CYR61 mRNA 表达的影响。

图 5C：不同浓度滑液对 FLS CYR61 蛋白水平表达的影响。

图 6 A：IFN- γ 和 TNF- α 均可上调 RA FLS 中 CYR61 的表达，不同细胞因子刺激 RA FLS 后检测 CYR61 的表达，细胞因子浓度分别为：IL-10 0.1ng/ml，IL-12

0.5ng/ml, IFN- γ 0.05ng/ml, TNF- α 0.05ng/ml。

图6 B: IFN- γ 和TNF- α 均可上调RA FLS中CYR61的表达, 阻断抗体anti-IFN- γ (10 μ g/ml) 和 anti-TNF- α 对IFN- γ , TNF- α 和SF刺激作用的影响。

图7: ELISA检测RA和OA滑膜液以及RA外周血中CYR61蛋白的含量: RA SF中CYR61蛋白的含量明显高于对照OA SF、RA患者外周血。

图8 : RA SF中的CYR61蛋白可以刺激FLS的增殖。特异性CYR61单克隆抗体与SF分别以1:25、1:50、1:100、1:200的比例混合后加入FLS中(见X轴下标注), 无关抗体加入在M+SF组中(黑色柱表示); FLS的增殖用³H参入的方法检测。

图9A: 筛选针对CYR61基因的特异性siRNA, 光学显微镜观察转染荧光标记小RNA到细胞内的情况, 以观察脂质体的转染效率。

图9B: 筛选针对CYR61基因的特异性siRNA, 荧光显微镜观察转染荧光标记小RNA到细胞内的情况, 以观察脂质体的转染效率。

图9C: 筛选针对CYR61基因的特异性siRNA, 使用CYR61基因的特异性小RNA干扰人293T细胞株24小时, 用realtimePCR检测CYR61基因的情况, 其中以第三条(H-3)效率最高。

图10: 特异性siRNA干扰人CYR61基因的时相分析。使用CYR61基因的特异性小RNA干扰RA FLS24小时, 用realtimePCR检测CYR61基因的情况。

图11A: CYR61干扰后RA FLS增殖减少。

图11B: CYR61干扰后RA FLS凋亡增加。

图12 A : siRNA干扰后FLS后Bcl-2家族mRNA的表达。

图12B: siRNA干扰后FLS后Bcl-2蛋白的表达。

【具体实施方式】

下面结合附图对本发明提供的CYR61蛋白在制药中的应用的具体实施方式做详细说明。

实施例1: CYR61在类风湿关节炎滑膜组织中的表达格局

一、材料与方法

1 实验材料

1.1 临床样本:

研究中所有样本均来自于临床骨科行膝关节置换或滑膜切除术的 RA 病人和 OA 患者，所有病例的诊断符合国际诊断标准。正常对照 2 例来自与创伤患者。患者滑膜组织用于细胞的体外培养，部分组织 4% 多聚甲醛固定后留作免疫组化，血清和滑膜液 (SF) 高速离心后获得上清，-80℃ 储存。本研究中所用临床样本，均对患者进行知情告知。

2 实验方法

2.1 细胞制备

2.1.1 外周血单个核细胞的制备:

肝素抗凝全血采用淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离单个核细胞，PBS 洗涤 2 次，细胞备用。

2.1.2 滑膜液单个核细胞的制备

肝素抗凝滑膜液采用淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离单个核细胞，PBS 洗涤 2 次，细胞备用。

2.2 FLS 的制备及原代培养:

无菌获取滑膜组织，PBS 清洗后用无菌手术剪刀剪切成约 1mm*1mm*1mm 的碎块；用 2—3 倍体积 0.5mg/ml 的胶原酶 I 或胶原酶 II，37℃，消化 2 小时；经 200 目纱网过滤后，离心去上清后，将细胞重悬于 DMEM 培养液，置于培养皿中，37℃，5% CO₂ 培养。之后待 FLS 生长成片>80% 时，消化传代。并取传至第 3 代 FLS 进行表面标记染色（鼠抗人 CD₃、CD₁₄、CD₁₉、CD_{11b}）鉴定。

2.3 实时定量 PCR: 采用 ABI 公司提供的软件 prism2.0 设计 CYR61 和 GADPH（作为内参）引物，序列如下:

表 1. 定量 PCR 检测基因及引物序列

Gene	Sequence	5' → 3'
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGA (forward)	(Seq ID NO. 1)
	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT (reverse)	(Seq ID NO. 2)
CYR61	TCCAGCCCAACTGTAAACATCA (forward)	(Seq ID NO. 3)
	GGACACAGAGGAATGCAGCC (reverse)	(Seq ID NO. 4)

按照 QIAGEN 试剂盒提供的说明抽提 RNA 并进行逆转录。按照 ABI 操作说明书进

行实时定量 PCR。

2.4 滑膜样本组织病理性和免疫组织化学检查：

将获得的滑膜样本按照常规病理切片要求制备标本，经脱水、固定、包埋、切片、染色。进行 HE 染色和 CYR61 特异性组织化学染色。

2.5 滑膜组织免疫组化图像分析：

将图像输入图像分析仪，经去除原图中各种噪声和畸变后进行图像二值化处理后将所获得的测量参数转换到 Excel 进行分析，获得蛋白表达的相对量。

2.6 Westernblot 检测 FLS 细胞 CYR61 蛋白表达：按照常规方法进行 CYR61 蛋白的电泳、转膜、抗体杂交与显色(采用 ECL 压片法)。

二、 结果：

1. RA 病人滑膜组织 CYR61mRNA 表达增高

本实验室前期运用基因芯片检测发现 CYR61 基因在 RA 滑膜组织中表达增高，为明确 RA 病人 FLS 中 CYR61 的表达情况，我们应用实时定量 PCR 分析了 10 例 RA 患者外周血、关节液和滑膜组织来源的单个核细胞，以及 10 例患者完整滑膜组织中 CYR61mRNA 的表达水平，图 1 中可见 CYR61 和内部参照 GAPDH 均得到了特异性 S 型扩增曲线，各复孔曲线一致，结果可靠。分析实时定量 PCR 结果，在 RA 患者的滑膜组织 CYR61 基因的相对含量比患者的外周血、关节液和滑膜组织来源的单个核细胞以及正常人的外周血单个核细胞分别高 8.7 倍、125 倍及 13.3 倍($p < 0.05$)，证实了基因芯片的结果。

2. RA 病人滑膜组织中的 CYR61 表达增高

为了进一步验证上述用分子生物学手段检测的结果，我们进一步通过 HE 染色和免疫组化观察了 CYR61 在滑膜组织不同细胞中的分布及蛋白表达水平。结果发现，与 OA 及正常滑膜组织（图 2A、B 箭头指示血管周围无炎症细胞浸润）相比，可见 RA 患者滑膜衬里层和衬里下层巨噬细胞样滑膜细胞浸润，血管增生，大量淋巴细胞，浆细胞和单核细胞浸润，淋巴滤泡形成伴纤维素样坏死，FLS 增生（图 2C 箭头指示炎性细胞浸润）。

在 HE 染色的基础上，应用免疫组织化学技术对 RA 患者手术切除的滑膜组织进行连续切片、ABC 染色发现，类风湿关节炎的滑膜衬里层细胞及衬里下层血管内皮细胞、以及 FLS 中均有 CYR61 蛋白表达(图 2F 箭头指示棕褐色颗粒为 CYR61

蛋白), 主要分布于细胞浆, 在滑膜绒毛的近关节腔端尤其多见。而 OA 患者和正常人的滑膜组织则极少见 CYR61 蛋白表达(图 2D、E 箭头指示棕褐色颗粒 CYR61 蛋白)。

3. RA 患者滑膜成纤维细胞体外生长和鉴定

为了验证免疫组化的结果, 我们建立了 FLS 的体外培养体系。将 RA、OA 和正常人手术得到的滑膜组织进行消化, 37℃ 培养, 待长成片状后进行传代, 显微镜下观察, 3-5 代的 RA FLS 生长迅速, 细胞形态趋向于长梭形, 排列整齐, 取向一致(图 3A)。用特异性淋巴细胞分化抗原如 CD3, CD14, CD19, CD11C 等标记后用流式细胞仪检测发现上述分子表达为阴性(< 2% CD11b, <2% CD14+, <1%CD3+, and <5% CD19+), 表明所培养的细胞为较为均一的 FLS, 极少有淋巴细胞污染(图 3B)。

4. RA 病人滑膜成纤维细胞 CYR61 表达增高

为明确 RA 病人 FLS CYR61 的表达情况, 我们应用实时定量 PCR 分析了滑膜组织和体外培养的 FLS 中 CYR61 mRNA 的表达格局。如图 4A 所示, 在 RA 患者的 FLS 中 CYR61 基因的相对含量明显高于滑膜组织($p < 0.01$), 说明 CYR61 主要在 RA 滑膜组织的成纤维样滑膜细胞中表达增高; 同时我们还比较了 RA、OA 和正常人培养至第 3 代的 FLS 中 CYR61 mRNA 的表达水平。如图 4B 所示, 在 RA 患者的 FLS 中 CYR61 基因的相对表达量比 OA 患者和正常人的 FLS 分别高 3.5 倍、20 倍 ($p < 0.05$), 从 mRNA 水平上证实了 CYR61 在 RA 病人 FLS 表达增高。

进一步用 Western-blot 的方法对 RA、OA 和正常人的 FLS 进行 CYR61 蛋白表达水平检测。我们收集了体外培养的 RA、OA、正常人的 FLS, 加入蛋白裂解液。12%SDS-PAGE 电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭过夜、一抗 CYR61 多克隆抗体(1:200 稀释)杂交过夜、HRP 标记二抗(1:2000 稀释)孵育 2h, 增强化学发光混合液中自显影。结果可见, RA FLS 中 CYR61 表达水平明显高于 OA 和正常人 FLS, 从而验证免疫组化的结果, 更加证明 CYR61 主要表达在滑膜的成纤维样细胞中。这样系统的建立为进一步分析 CYR61 在 FLS 生长和在 RA 的滑膜炎症中的生物学功能奠定了基础。

实施例 2: 类风湿关节炎滑液中 CYR61 促进 FLS 的增殖

一、材料与方法

1.1 滑膜液刺激实验: 将 3-5 份滑膜液混匀后加入呈对数生长期的 FLS 继

续培养 24h 后检测 CYR61 的 mRNA 及蛋白表达水平, 或者 FLS 增殖 (详见下)。

1.2 细胞增殖和抗体阻断实验: 取对数生长期的 FLS, 经 0.25% 的胰蛋白酶消化后调整细胞浓度 1×10^4 cells/ml, 接种于 96 孔细胞培养板中, 加入不同浓度的 SF (SF 与培养液的比例分别为 1:32、1:16、1:8、1:4、1:2) 或细胞因子 (IL-10, IL12, IFN γ , TNFa 和 IL-17), 或纯 CYR61 蛋白与 FLS 共同培养。在培养结束前 16 个小时加入 1μ Ci 的 3 H (每孔), 收集细胞, β 液闪仪检测增殖。抗体阻断实验: 即在上述 SF、或者 CYR61 蛋白及细胞因子作用 FLS 之前, 先用相应中和抗体进行孵育 2 小时 (同时用无关单抗作为对照), 然后再加入 FLS 的培养中, 其余操作同前。

1.3 ELISA 检测滑膜液和外周血中 CYR61 蛋白: 收集 RA、OA 的 SF (各 30 份) 和正常人外周血 (30 份, 作为对照), -80°C 保存。检测时在 ELISA 板中加入 100μ l 上述待检样品后置 37°C , 120 分钟包被。经充分洗涤后加入制备的抗 CYR61 抗体 (用购买的标准抗 CYR61 多抗作为校正和阳性对照), 孵育后洗涤再加二抗和底物, 中止反应后在 ELISA 读板机 492nm 处读取吸光度, 根据检测样品和标准品吸光度值计算检测样品中各种细胞因子的含量。

2.8 CYR61 单克隆抗体制备: 用基因以重组表达的 CYR61 蛋白按照常规方法与等体积的福氏完全佐剂混匀乳化后, 皮下多点注射免疫小鼠。将免疫完成的小鼠脾脏细胞取出与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合。然后进行有限稀释和筛选出能够特异性和 CYR61 基因工程蛋白结合的细胞克隆, 获取上清用 ELISA 方法检测其特异性和效价。其中 3 号单抗为 2006 年 6 月 22 日制得, 另一株为 2007 年 12 月 7 日制得。

2.9 CYR61 单克隆抗体腹水制备和纯化:

取 CYR61 杂交瘤细胞注射至 6~8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠腹腔一侧, 8~10d 左右后, 待小鼠腹腔明显胀大时, 无菌下抽取腹水分装于 -80°C 保存。

二、 结果

1. RA 的滑膜液 (SF) 刺激 FLS 增殖与 CYR61 表达

为了观察局部炎症环境对于 FLS 的生物学效应和 CYR61 表达的影响, 我们将 RA 患者的滑膜液 (SF) 加入培养的细胞中, 利用 H^3 -TdR 掺入法, 在 DNA 合成水平上, 观察不同浓度滑液对于 RA-FLS 增殖的影响。如图 5A 所示, 滑膜液呈剂

量依赖性促进 RA FLS 的 DNA 合成, 与对照组相比, 各剂量组滑膜液均明显促进 RA FLS 的 DNA 合成 ($P < 0.01$)。我们在体外培养中, 用 RA 病人的滑液刺激 RA 病人的 FLS。用不同浓度的 RA-SF 刺激 FLS, 随着浓度增高, 其刺激 CYR61 表达的作用也增强。RA 的 SF 的刺激作用呈剂量依赖性。RA-SF 稀释到 1:32, 刺激作用基本消失。本试验分别在 mRNA 水平和蛋白水平进行了 real-time PCR 检测 (图 5B) 和 western blot (图 5C) 分析。

2. RASF 中 IFN- γ 和 TNF- α 可上调 CYR61 表达:

由于 SF 中含有高浓度的细胞因子, 为了明确这些细胞因子是否与 CYR61 上调有关, 本研究中用纯化的细胞因子分别刺激 RA FLS, 观察其 CYR61 的表达情况。为了模拟其在体内的作用, 细胞因子的浓度选择为在 SF 中能够检测到的浓度。结果表明: IFN- γ 和 TNF- α 能够上调 CYR61 的表达。为了明确该两种细胞因子的作用, 进而采用阻断抗体 anti-IFN- γ (10 μ g/ml) 和 anti-TNF- α (200ng/ml) 分别与 SF 混匀, 在刺激 8 小时后收集培养的细胞, 使用 real time PCR 的方法检测其 CYR61 的表达水平。结果显示: 细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 均有上调 CYR61 表达的作用, 混合的细胞因子作用最强, 与 SF 相似 (图 6A)。而用 IFN- γ 和 TNF- α 抗体阻断后, SF 的刺激作用也明显下降, 联合阻断的作用更明显 (图 6B)。

3. RA 患者 SF 中含有高浓度 CYR61:

由于 CYR61 是一种分泌性蛋白, 具有明显的促有丝分裂活性, 可诱导成纤维细胞增殖。而我们的实验也证实 RA 病人滑膜细胞中高表达 CYR61 蛋白, 为此我们采用本室制备的具有结合天然 CYR61 蛋白的 3 号单克隆抗体 (3 号单克隆抗体制备方法: 见上述 2.8 CYR61 单克隆抗体制备), 检测 RA SF ($n=30$) 中 CYR61 蛋白的含量, 并与 OA SF 和 RA 患者外周血清相对比。结果显示: RA SF 中 CYR61 蛋白明显高于对照 OA SF, RA 患者外周血 ($P < 0.0001$, 图 7)。

4. RA SF 中的 CYR61 蛋白可以刺激 FLS 的增殖

为了研究 SF 中的 CYR61 蛋白是否具有刺激滑膜细胞增殖的作用, 我们上述 3 号单抗中和 SF 中的 CYR61 蛋白, 观察对滑膜细胞增殖的影响。取对数生长期的 FLS, 接种至 96 孔培养板中, 将抗人 CYR61 单抗与 SF 混合, 按照 1:25、1:50、1:100、1:200 比例加入 SF 中, 同时设无关单抗 (1:25) 为对照。经与滑膜细胞培养 24 小时后 Thymidine 掺入检测 FLS 的增殖作用。结果发现: CYR61 单克隆

抗体能够中和 RA-SF 刺激滑膜细胞增殖的作用，并且呈剂量依赖性。当 RA-SF 稀释到 1:200，阻断作用基本消失（图 8）。表明 CYR61 蛋白具有刺激滑膜细胞增殖作用。

实施例 3: CYR61 促进类风湿关节炎 FLS 增殖的机理研究

一、 材料与方法

1、临床样本、CYR61 基因和蛋白表达检测均同“实施例 1: CYR61 在类风湿关节炎滑膜组织中的表达格局”的材料与方法中所述。

2、FLS 培养及增殖刺激实验，同“实施例 2: 类风湿关节炎滑液中 CYR61 促进 FLS 的增殖”的材料与方法中所述。

3、SiRNA 干扰实验:

3.1: SiRNA 序列与合成: 根据 siRNA 设计原理合成 3 条 SiRNA，序列如下:

S1: 5' -CCA GAA AUG UAU UGU UCA ATT-3- (Seq ID NO.5)

5' -UUG AAC AAU ACA UUU CUG GCC-3- (Seq ID NO.6)

S2: 5' -UCA AGG UAU CAA UGU UUA ATT-3- (Seq ID NO.7)

5' -UUG CUC GCA ACA AAU CUG CTC -3- (Seq ID NO.8)

S3: 5' -CAA CGA GGA CUG CAG CAA ATT-3- (Seq ID NO.9)

5' -UUU GCU GCA GUC CUC GUU GAG -3- (Seq ID NO.10)

3.2 siRNA 转染: 采用转染试剂脂质体 (genepor) 和含抗生素的无血清成分 DMEM 溶液，转染体系 (以 24 孔板为例) 为 250 μ l。将 5×10^3 -5 代 FLS 种于 24 孔板中，于 37℃，5%CO₂ 培养箱过夜培养；然后在 12 μ l genepor 与 113 μ l 的 DMEM 混匀物中加入 2 μ l siRNA 并轻轻混匀，室温静置 25min。将上述混匀的转染液体加到培养的细胞悬液中 (同时设无关 SiRNA 作为对照)，置 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养 5-7 小时后，加含等体积的 20%FBS 和含抗生素的 DMEM 营养液继续培养，24-48 小时后，取培养的细胞做实时定量 PCR 和 Western Blot，检测干扰的效果。

4.0 CYR61 抑制 FLS 凋亡机理研究: 将上述经干扰 CYR61 的细胞分为三组，

即转染 100nM NC siRNA 组；转染 100nM S3 siRNA 组；正常细胞组。转染 siRNA 后 24h 收集细胞，检测细胞增殖，凋亡细胞比例已经凋亡相关基因 Bcl-2、Bcl-x1、Bax、Bad、Bim 的表达格局。

二、 结果

1. CYR61 基因的特异性小 RNA 筛选试验：

我们分别设计了 3 条针对人 CYR61 基因的双链小 RNA (siRNA)，同时用与哺乳动物无关的 siRNA 作为阴性对照 (siRNA of Negative control, siNC)。用脂质体 (genepor) 将 siRNA 转染到细胞中，光学显微镜图 (见图 9A) 和荧光显微镜和 (见图 9B) 观察转染了荧光标记 siRNA 的细胞情况，显示转染率约为 80—90%。用 RealtimePCR 检测干扰 24 小时后 CYR61 的表达水平，其中 H-3 是针对人 CYR61 的特异性 siRNA，抑制率约为 70—80% (见图 9C)。

2. siRNA 干扰人 CYR61 基因表达的时相分析：

使用特异性 siRNA 干扰 RA FLS 中 CYR61 基因的表达，同时使用无关 siRNA 作为对照，使用 Realtime PCR 检测不同时间 CYR61 基因的表达变化情况：对于 RA FLS 干扰试验，24 小时的细胞中 CYR61 基因的表达是对照的 20—30%，48 小时抑制率略有下降，在 40% 左右 ($p < 0.05$ ，图 10)。

3. 特异性 siRNA 干扰滑膜细胞 CYR61 表达后，滑膜细胞增殖减低，凋亡增加：

前面的试验发现 SF 可以刺激 FLS 的增殖，并且呈剂量依赖性；而用 CYR61 中和抗体可以明显阻断 SF 刺激 FLS 增殖的作用，说明 CYR61 与滑膜细胞的增殖密切相关。为了进一步验证两者间的关系，我们采用 siRNA 的方法，特异性干扰 RA FLS 中 CYR61 基因的表达，同时使用无关 siRNA 作为对照，使用 ^3H 参入的方法检测 RA FLS 的增殖能力：发现抑制 CYR61 基因后 RA FLS 的增殖能力下降 ($p < 0.0001$ ，图 11A)。为了深入研究 CYR61 与 RA FLS 增殖的关系，我们采用 FACS 的方法检测了 RA FLS siRNA 干扰后凋亡细胞的比率 (Annexin-V+PI)：发现 siRNA 干扰后 RA FLS 凋亡细胞的比率增加 ($p < 0.0001$ ，图 11B)。

4. 特异性 siRNA 干扰滑膜细胞 CYR61 表达后，细胞凋亡增加的机理：

前面的试验发现 siRNA 干扰后 RA FLS 凋亡增加，说明 CYR61 与滑膜细胞的凋亡密切相关。为了深入研究 CYR61 与凋亡相关基因表达的关系，我们采用 siRNA

干扰的方法，在体外干扰 FLS CYR61 基因的表达，抑制率大于 60%，用实时定量 PCR 检测凋亡线粒体途径相关基因 bcl-2, bcl-x1, bax, bim, bad；发现抑凋亡相关基因 Bcl-2 mRNA 水平下调 ($p < 0.001$ ，图 12A)，促凋亡相关基因 Bim 略增加，而促凋亡基因 Bad、Bax 和抑凋亡基因 Bcl-x1 没有明显变化。提示 CYR61 促进滑膜细胞增殖可能与抑凋亡相关基因 Bcl-2 表达下调有关。为了验证 mRNA 水平的结果，我们采用 FACS 的方法检测 Bcl-2 的蛋白水平，发现抑制 CYR61 表达的同时 FLS 中 Bcl-2 蛋白表达水平也明显下降 ($p < 0.01$ ，图 12B)。从而证实 CYR61 是通过抑制线粒体途径的 Bcl-2 家族（主要通过下调 Bcl-2 蛋白）来发挥抑制 FLS 细胞凋亡作用的。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员，在不脱离本发明方法的前提下，还可以做出若干改进和补充，这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求

1. 一种 CYR61 蛋白在制备治疗风湿性疾病药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述的风湿性疾病是类风湿性关节炎。
3. CYR61 蛋白抑制剂在制备治疗风湿性疾病的药物中的用途。
4. 根据权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述的风湿性疾病选自类风湿性关节炎。
5. 根据权利要求 3 或 4 所述的用途，其特征在于，所述的 CYR61 蛋白抑制剂选自抗 CYR61 抗体、CYR61 基因干扰 RNA。
6. 根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述的抗 CYR61 抗体选自抗 CYR61 单克隆抗体。
7. 根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述的 CYR61 基因干扰 RNA 选自如下 siRNA 中的一种或其变异体：
S1 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 5, 反义链为 SEQ ID No. 6,
S2 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 7, 反义链为 SEQ ID No. 8, 和,
S3 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 9, 反义链为 SEQ ID No. 10。
8. 根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述的 CYR61 基因干扰 RNA 选自：S1 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 5, 反义链为 SEQ ID No. 6,
S2 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 7, 反义链为 SEQ ID No. 8, 和,
S3 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 9, 反义链为 SEQ ID No. 10。
9. 干扰 CYR61 基因表达的 siRNA, 选自：

S1 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 5, 反义链为 SEQ ID No. 6,
S2 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 7, 反义链为 SEQ ID No. 8, 和,
S3 siRNA 正义链为 SEQ ID No. 9, 反义链为 SEQ ID No. 10。

1/7

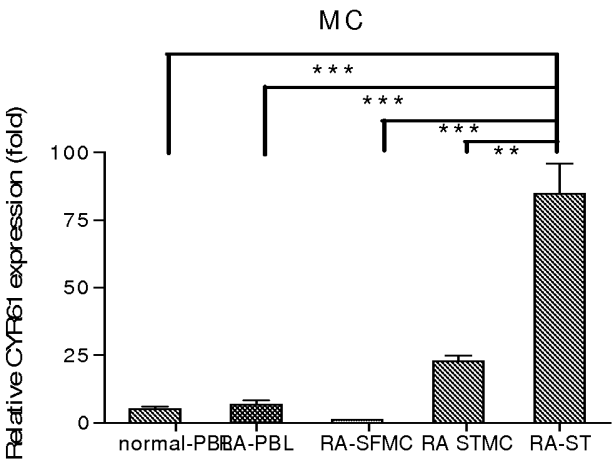


图 1

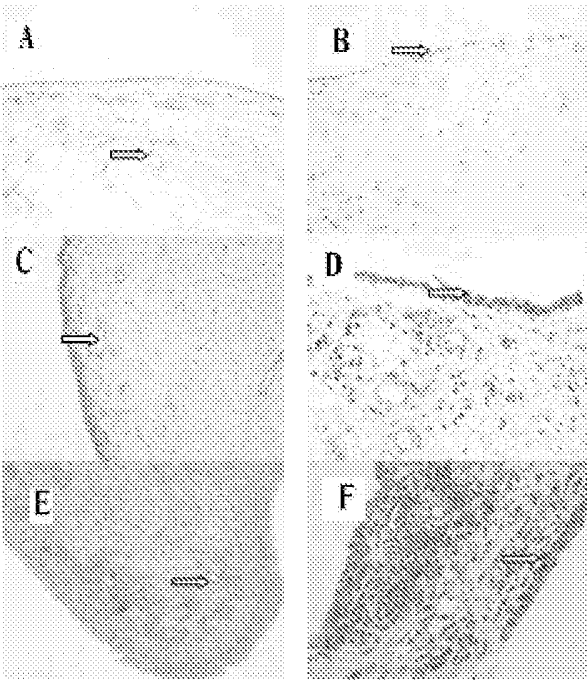


图 2

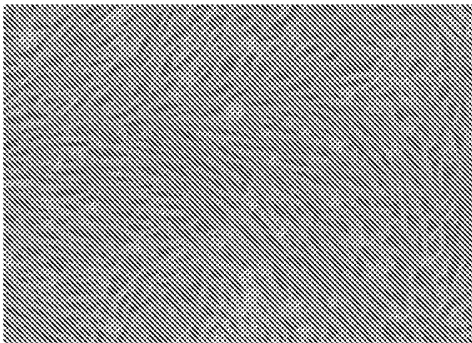


图 3A

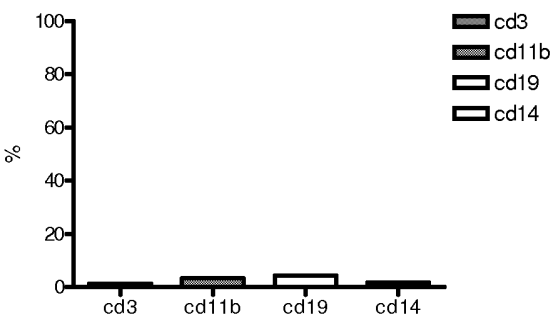


图 3B

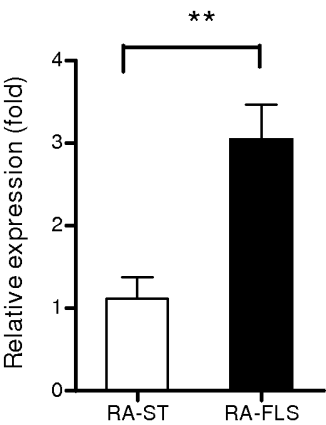


图 4A

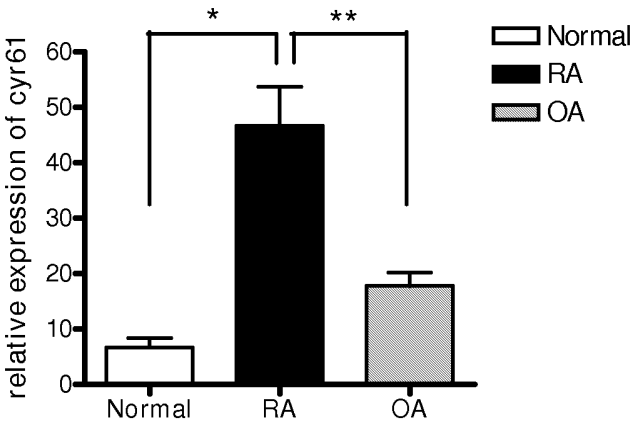


图 4B

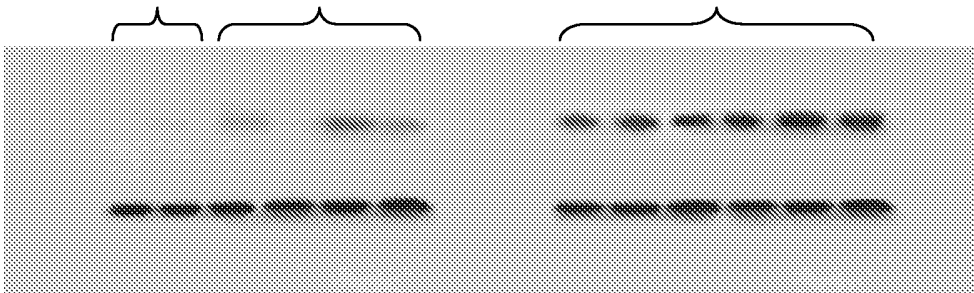


图 4C

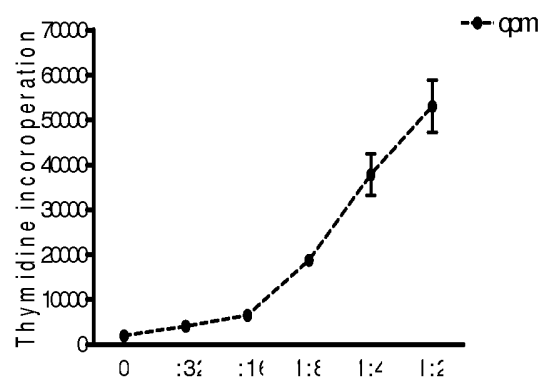


图 5A

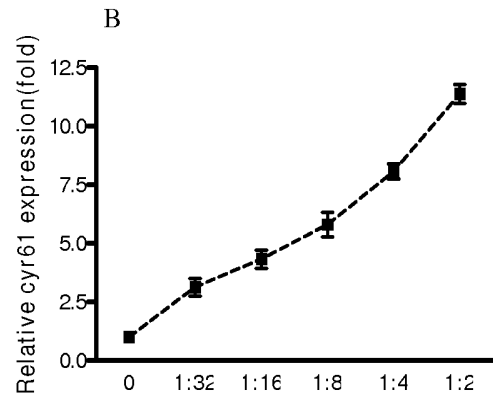


图 5B

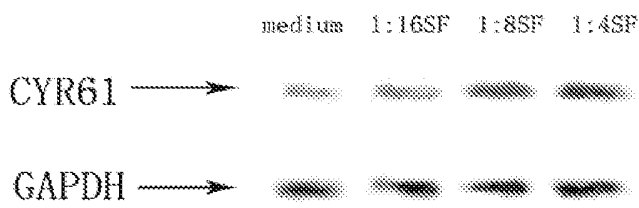


图 5C

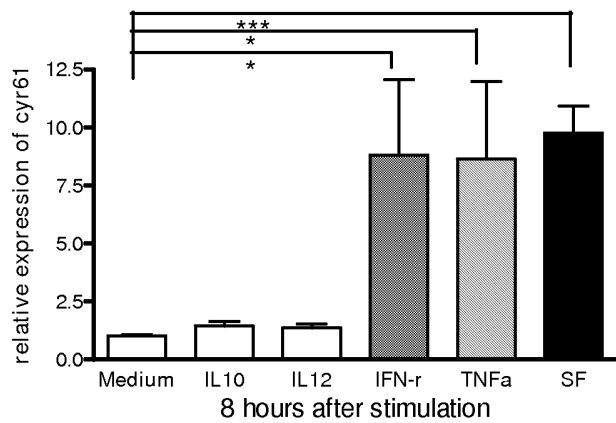


图 6A

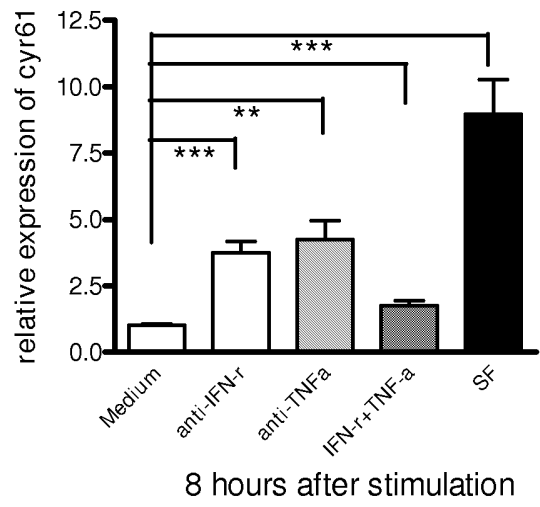


图 6B

4/7

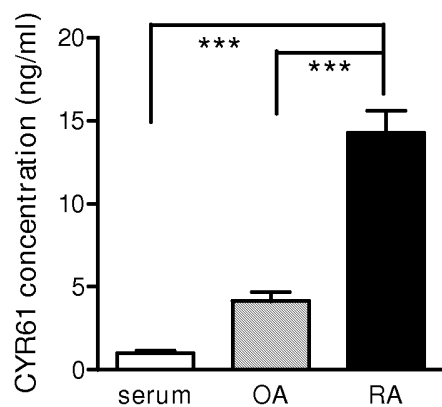


图 7

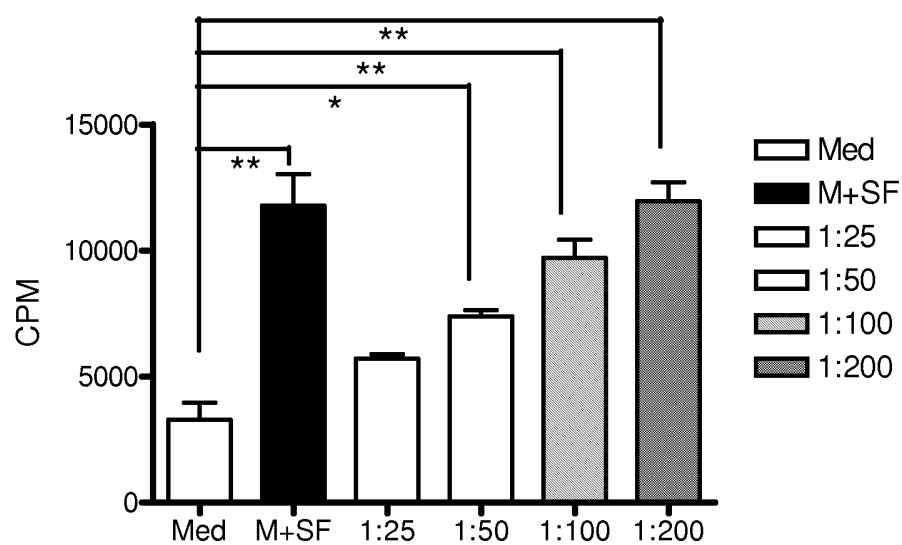


图 8

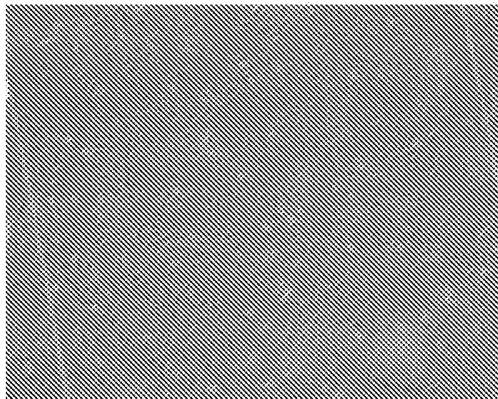


图 9A

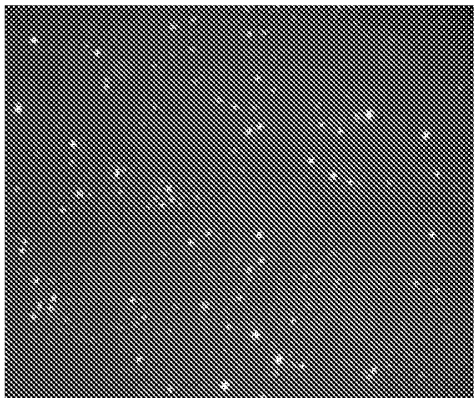


图 9B

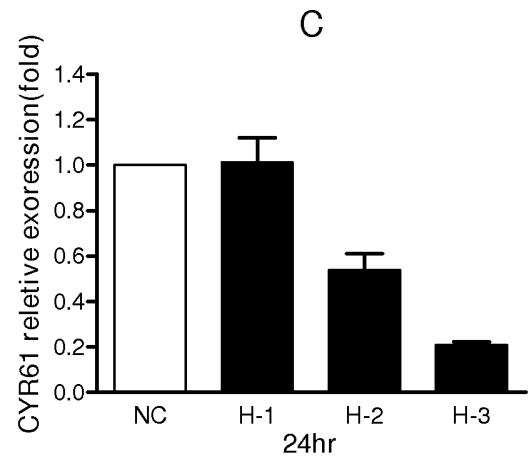


图 9C

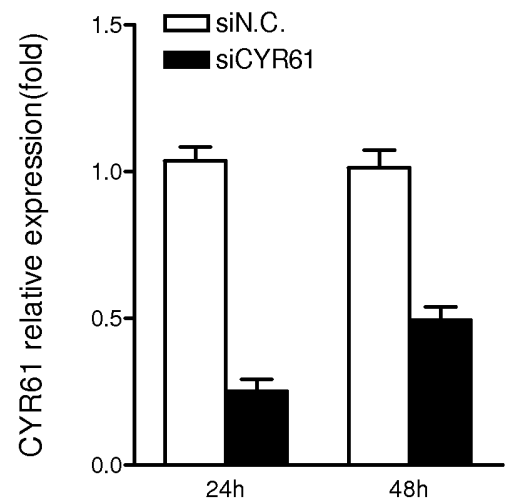


图 10

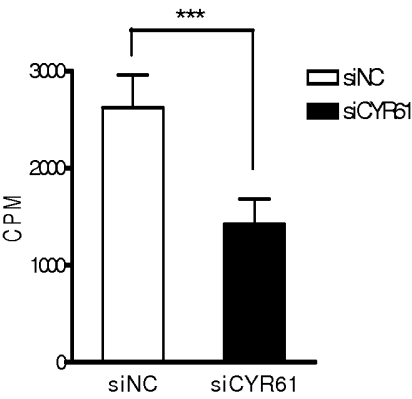


图 11A

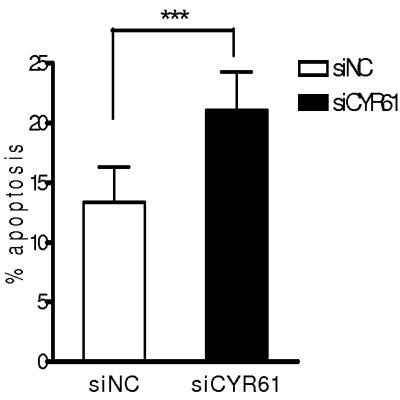


图 11B

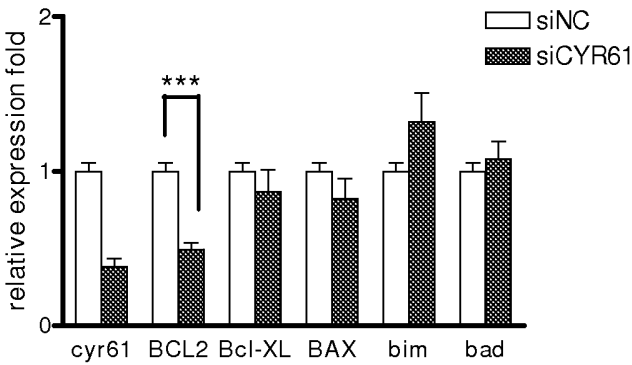


图 12A

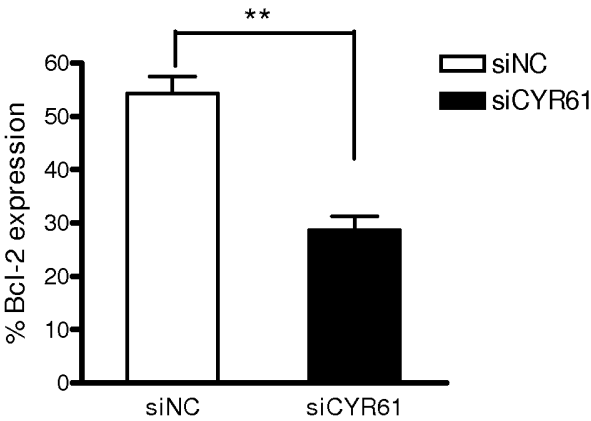


图 12B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/078481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K; A61P; C07K; C07H

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

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

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI web of Knowledge, EMBASE, NCBI: CYR61, CCN1, RA, rheumatic arthritis, siRNA, cysteine rich protein 61, sequence search based on SEQ ID NOs: 5-10.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN101708328A(SHAN-N), 19 May 2010(19.05.2010), see claims 1-2, paragraphs 8-10 of description, example 3.	1-10
PX	CN101747435A(SHAN-N), 23 Jun. 2010(23.06.2010), see abstract, claims 1-3, example 3.	1-10
PX	CN101709088A(SHAN-N), 19 May 2010(19.05.2010), see claims 1-10, example 4..	1-6
PX	CN101709089A(SHAN-N), 19 May 2010(19.05.2010), see claims 1-10, example 4..	1-6
X	JP2003177126A(KACH-D), 27 Jun. 2003(27.06.2003), see abstract.	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 25 Jan.2011(25.01.2011)	Date of mailing of the international search report 10 Feb. 2011 (10.02.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer WU, Li Telephone No. (86-10)62411046

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/078481

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN Yu, Effect of Low Molecular Weight Sinomenine on Collage Induced Arthritis Model in Rat. Journal of TCM Univ. of Hunan. September 2009, vol.29, No. 9, pages 51-55.	1-6
A	FU Peng, Inhibition of Hyperplasia of Vascular Smooth Muscle Cell by RNA Interference of The Plasmids of Cysteine-rich61. Chin J Hypertension. April 2008, vol.16, No. 4, pages 344-348.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/078481

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 7(partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The term “variants” used in claim 7 is unclear, and leaves the skilled in the art in doubt that which siRNAs fall into the scope of the “variants”, thereby rendering the scope of the technical solutions relate to variants unclear, and no meaningful search can be carried out.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/078481

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101708328A	19.05.2010	None	
CN101747435A	23.06.2010	None	
CN101709088A	19.05.2010	None	
CN101709089A	19.05.2010	None	
JP2003177126A	27.06.2003	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/078481

Continuation of CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

A61K 38/17 (2006.01)i
A61K 31/713 (2006.01)i
A61P 29/00 (2006.01)i
A61P 19/02 (2006.01)i
A61P 19/04 (2006.01)i
A61P 37/06 (2006.01)i
C07K 16/18 (2006.01)i
C07H 21/04 (2006.01)i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2010/078481

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: A61K; A61P; C07K; C07H

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI web of Knowledge, EMBASE, NCBI: CYR61, CCN1, RA, 风湿性关节炎, rheumatic arthritis, 干扰 RNA, siRNA, 抗体, antibody, cysteine rich protein 61, 富含半胱氨酸蛋白 61, 针对 SEQ ID NOs: 5-10 的序列检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN101708328A(上海市免疫学研究所), 19.5 月 2010(19.05.2010), 参见权利要求 1-2, 说明书第 8-10 段, 实施例 3。	1-10
PX	CN101747435A(上海市免疫学研究所), 23.6 月 2010(23.06.2010), 参见摘要, 权利要求 1-3, 实施例 3。	1-10
PX	CN101709088A(上海市免疫学研究所), 19.5 月 2010(19.05.2010), 参见权利要求 1-10, 实施例 4。	1-6
PX	CN101709089A(上海市免疫学研究所), 19.5 月 2010(19.05.2010), 参见权利要求 1-10, 实施例 4。	1-6
X	JP2003177126A(KACH-I), 27.6 月 2003(27.06.2003), 参见摘要。	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

25.1 月 2011(25.01.2011)

国际检索报告邮寄日期

10.2 月 2011 (10.02.2011)

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

吴立

电话号码: (86-10) 62411046

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
X	孙钰，青藤碱对胶原诱导性大鼠关节炎症的影响及其作用机制，湖南中医药大学学报，9月2009，第29卷第9期，第51-55页。	1-6
A	付鹏，富含半胱氨酸61RNA干扰质粒抑制平滑肌细胞的增殖，中华高血压杂志，4月2008，第16卷第4期，第344-348页。	1-10

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☒ 权利要求：7(部分)

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，

具体地说：权利要求7中使用的术语“变异体”是不清楚的，本领域技术人员不能明确该技术特征包括哪些 siRNA，因此涉及变异体的技术方案的保护范围不清楚，从而不能进行检索。

3. ☐ 权利要求：

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

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/078481

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101708328A	19.05.2010	无	
CN101747435A	23.06.2010	无	
CN101709088A	19.05.2010	无	
CN101709089A	19.05.2010	无	
JP2003177126A	27.06.2003	无	

续主题的分类:

A61K 38/17 (2006.01)i

A61K 31/713 (2006.01)i

A61P 29/00 (2006.01)i

A61P 19/02 (2006.01)i

A61P 19/04 (2006.01)i

A61P 37/06 (2006.01)i

C07K 16/18 (2006.01)i

C07H 21/04 (2006.01)i