

# 说明书

## ERK2 结合多肽及其制备

### 技术领域

本发明涉及一种多肽，尤其是涉及一种具备调节细胞增殖与分化功能的多肽及其制备。

### 背景技术

接头蛋白是一组分子调节因子，能募集不同的蛋白形成复合物，将上游信号分子的信息传递下去 (Pawson T, et al. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 19, 2075-80, 1997; Ravichandran KS, et al. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, 20(44), 6322-30, 2001)。在信号转导复合物形成和完成其生物学功能的时候，接头蛋白常经历酪氨酸磷酸化、结构改变和亚细胞定位变化 (Cheng Y, et al. ERK negatively regulates the epidermal growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol Chem*, 277, 19382-19388, 2002; Guri Tzivion, et al. 14-3-3 proteins: Active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J. Biol Chem*, 277, 3061-3064, 2002; Mary N. Teruel, et al. Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction. *Cell*, 103, 181-184, 2000)。成纤维细胞生长因子受体FGFR是受体酪氨酸激酶家族成员，调节细胞对一系列有关于调节细胞增殖、迁移、分化和存活的胞内信号的反应 (Joseph Schlessinger, et al. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211-225, 2000; Kyle A Furge, et al. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 19, 5582-5589, 2000; D. Vaudry, et al. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science*, 296, 1648-1649, 2002)。接头蛋白FRS2 (FGFR底物2)被认为是FGFR信号转导的一个主要的下游介导因子。FRS2通过N端十四烷基化锚定在细胞膜上，通过PTB (Phosphorylated Tyrosine Binding domain) 结构域结合于FGFR。FGF (Fibroblast Growth Factor, 成纤维细胞生长因子) 刺激后，FRS2迅速地酪氨酸磷酸化，并产生至少6个功能性pY (磷酸化酪氨酸残基) 结合位点，从而与蛋白酪氨酸磷酸酶Shp2以及接头蛋白Grb2形成复合物，Grb2又与Ras (Ras GTPase) 通路激活因子Sos (Son of sevenless) 结合。然后FRS2-Grb2-Sos复合物激活Ras/MAP kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) 信号级联通路 (H. Kouhara, et al. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*, 89, 693-702, 1997; Y. R. Hadari, et al. Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol. Cell. Biol*, 18, 3966-3973, 1998; S.

## 说明书

---

H. Ong, et al. FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol*, 20, 979–989, 2000)。除激活Ras/MAPK信号通路外, FRS2酪氨酸磷酸化这一重要事件也被报道其通过形成FRS2-Grb2(Growth receptor bound protein 2)-Gab1

(GRB2-associated binding protein 1)复合物而参与PI3(Phosphatidylinositol-3 Kinases)激酶激活, 并进一步激活PI3K-Akt(Akt, 蛋白激酶B)信号通路。有证据表明FRS2诱导PI3激酶激活, 从而导致细胞迁移(Ong SH, et al. Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *P. N. A. S*, 98(11), 6074–6079, 2001)。目前, FRS2被报道在FGFR(Fibroblast Growth Factor, 成纤维细胞生长因子受体), NGFR(Nerve Growth Factor Receptor, 神经生长因子受体), PDGFR(Platelet Derived Growth Factor Receptor, 血小板衍生生长因子受体), EGFR(Epithelial Growth Factor Receptor, 上皮细胞生长因子受体), BDNFR(Brain Derived Neurotrophic Factor Receptor, 脑衍生神经营养因子受体)和VEGFR(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, 血管内皮生长因子受体)信号转导通路中发挥作用(Y. R. Hadari, et al. Critical role for the docking-protein FRS2a in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *P. N. A. S*, 98(15), 8578–8583, 2001; R. M. Melillo, et al. Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the Mitogen-Activated Protein Kinase signaling cascade. *Mol. Cell. Biol*, 21, 4177–4187, 2001; Yan KS, et al. FRS2 PTB domain conformation regulates interactions with divergent neurotrophic receptors. *J Biol Chem*, 277(19), 17088–17094, 2002; Stoletov KV, Fibroblast growth factor receptor substrate 2 participates in vascular endothelial growth factor-induced signaling. *FASEB. J*, 16(10), 1283–1285, 2002)。

早期研究发现FGF刺激不仅能诱导FRS2酪氨酸磷酸化, 还会导致其电泳位移改变。其他刺激因子包括NGF(Nerve Growth Factor)、EGF(Epithelial Growth Factor)、PDGF(Platelet Derived Growth Factor)、LPA(Lysophosphatidic acid, 溶血磷脂酸)和Thrombin(凝血酶)也引起FRS2的电泳条带上移, 但是这些因子中部分并不能诱导FRS2酪氨酸磷酸化。此现象提示除酪氨酸磷酸化FRS2可能还有其他修饰改变。然而确切的机制还不清楚。

有丝分裂原激活地蛋白激酶(MAPKs)是许多细胞刺激因子如生长因子、细胞因子和GPCR(G-protein coupled receptor, G蛋白偶联受体)配体, 诱导产生的信号转导途径中主要的下游效应分子。MAPK/ERK(Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular signal-regulated kinase,)激活导致许多不同的胞浆内、胞膜上和核内相应底物磷酸化,

## 说明书

---

从而调节一组相关基因的转录(Bijan Roshan, et al. Activated ERK2 interacts with and phosphorylates the docking protein GAB1. *J Biol Chem*, 274, 36362-36368, 1999; Howe AK, et al. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev*, 12(1), 30-35, 2002; Cans C, et al. Nuclear tyrosine phosphorylation: the beginning of a map. *Biochem Pharmacol*, 60(8), 1203-1215, 2000; Treisman. R, et al. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol*, 8, 205-215, 1996)。据报道, 大约50种蛋白是MAPK/ERK底物, 包括下游信号功能蛋白如p90Rsk (90-Kda ribosomal S6 kinase) 和上游信号功能蛋白如Sos, Raf 和 MEK (MAPK/ERK kinase) (Karin. M, et al. The regulation of AP-1 activity by mitogenactivated protein kinases. *J. Biol. Chem*, 270, 16483 - 16486, 1995; Whitmarsh. A. J, et al. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med*, 74, 589 - 607, 1996; Madhani. H. D, et al. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet*, 14, 151 - 155, 1998; Jacobs D, Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev*, 13(2), 163-175, 1998)。基于基因组分析和比对的研究发现包含一个保守序列的广泛存在的ERK2结合位点K/RK/RK/R...I/LXI/L (Tanoue T, et al. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, 2(2), 110-116, 2000; Fantz DA, et al. Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J Biol Chem*. 276(29), 27256-27265, 2001)。

近期研究发现FGF刺激诱导FRS2上至少8个苏氨酸发生了MAPK依赖的磷酸化, FRS2苏氨酸磷酸化同时伴随酪氨酸磷酸化的降低、被募集的Grb2的减少以及MAP激酶激活减弱。因而, FRS2和MAPK之间形成了一个负反馈调节。我们以前的工作发现一些刺激能诱导FRS2丝氨酸-苏氨酸磷酸化。通过研究中使用MEK抑制剂U0126或PD98059 (Sigma公司产品), 我们和其他研究者发现是MAPK/ERK2导致了FRS2的苏氨酸磷酸化。(Irit Lax, et al. The docking protein FRS2 controls a MAP kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *M. C.* 10, 709-719, 2002; Wu Y, et al. EGFR and FGFR signaling through FRS2 is subject to negative feedback control by ERK1/2. *J Biol Chem*, 384, 1215-26, 2003)。但是以往的工作并未发现FRS2上与ERK2确切结合的位点。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种与ERK2结合并可参与调节细胞增殖分化的多肽。

# 说明书

本发明第一方面，提供了一种分离的ERK2结合多肽，它是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽。较佳的，该多肽具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽，或者，该多肽是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽与GST的融合蛋白。

本发明第二方面，提供了一种分离的多核苷酸，它编码上述蛋白。较佳的，该多核苷酸编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白。更佳的，该多核苷酸具有GGAGTCAAATTTGTTTTAGGGCCAACCCCTGTTCAAAGCAGTTAATGGAAAAAGAGAACTGGAGCAACTTGGAAGAGATCAAG (SEQ ID NO:2)的核苷酸序列。

本发明第三方面，提供了一种重组载体，它含上述多核苷酸序列及与该序列操作性相连的表达调控序列。

本发明第四方面，提供了一种宿主细胞，它被上述载体转化。较佳的，宿主细胞为大肠杆菌。

本发明第五方面，提供了一种上述分离的ERK2结合多肽的制备方法，包括下列步骤：

- (a) 在适合表达 ERK2 结合多肽的条件下，培养如权利要求 8 或 9 所述的宿主细胞；
- (b) 从培养物中分离出 ERK2 结合多肽。

本发明的多肽来源于FRS2上可特异与ERK2结合的那部分片段，即FRS2的248~272位氨基酸。发明人经试验证实该多肽可特异性与ERK2结合，删除或突变该片段后，FRS2均丧失了与ERK2结合的功能。已知ERK2与FRS2结合后形成负反馈环路，从而调节FGF引起的细胞的增殖和分化。本发明的多肽则通过对ERK2与FRS2结合的影响，干扰ERK2-FRS2负反馈环路，从而调节细胞的增殖和分化。

本发明的主要优点在于：提供了一个全新的与ERK2结合并调节细胞增殖分化的多肽，该多肽对于加深了解FRS2-ERK2负反馈环路和aFGF诱导的MAPK/ERK和Akt/PKB信号通路，从而了解广泛参与细胞增殖、分化和细胞迁移的FGF诱导的信号通路的分子机制具有重要的意义。另一方面，本发明提供了一个药物靶点。如果针对这一靶点设计取消FRS2与ERK2结合的药物，就可以增强FGF通路的作用，有目的的调控细胞的增殖、分化与迁徙。如果根据本发明找到的新的结合ERK2的结合域设计药物，则可以广泛的抑制MAPK/ERK2的激活。

## 附图说明

附图说明

图 1 FRS2 突变体 GST (Glutathione-S-Transferase, 谷胱甘肽-S-转移酶) 融合蛋白构建图以及 ERK2 的亲合力。

将各种 FRS2 突变体 GST 融合蛋白分别与 ERK2 进行体外结合试验。

WT-GST: 表示 FRS2 野生型 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 1 至 508 位完整氨基酸序列所构建的 GST

## 说明书

---

### 融合蛋白

NT-GST: 表示 FRS2-N 端突变体 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 1 至 240 位氨基酸序列所构建的 GST 融合蛋白

CT-GST: 表示 FRS2-C 端突变体 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 326 至 508 位氨基酸序列所构建的 GST 融合蛋白

CP-GST: 表示 FRS2- CP 突变体 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 238 至 345 位氨基酸序列所构建的 GST 融合蛋白

△ CP-GST: 表示 FRS2-△CP 突变体 GST 融合蛋白, 即去除 FRS2 上 240 至 351 位氨基酸序列后所构建的 GST 融合蛋白

NT-L-GST: 表示 FRS2- NT-L 突变体 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 1 至 247 位氨基酸序列所构建的 GST 融合蛋白

CT-L-GST: 表示 FRS2- CT-L 突变体 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 248 至 508 位氨基酸序列所构建的 GST 融合蛋白

△ 1-GST: 表示 FRS2-△1 突变体 GST 融合蛋白, 即去除 FRS2 上 313 至 349 位氨基酸序列后所构建的 GST 融合蛋白

△ 2-GST: 表示 FRS2-△2 突变体 GST 融合蛋白, 即去除 FRS2 上 448 至 465 位氨基酸序列后所构建的 GST 融合蛋白

△ 3-GST: 表示 FRS2-△3 突变体 GST 融合蛋白, 即去除 FRS2 上 232 至 295 位氨基酸序列后所构建的 GST 融合蛋白

△ 4-GST: 表示 FRS2-△4 突变体 GST 融合蛋白, 即去除 FRS2 上 232 至 272 位氨基酸序列后所构建的 GST 融合蛋白

△ 4COM-GST: 表示 FRS2-△4 COM 突变体 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 232 至 272 位氨基酸序列所构建的 GST 融合蛋白

△ 5-GST: 表示 FRS2-△5 突变体 GST 融合蛋白, 即去除 FRS2 上 261 至 270 位氨基酸序列后所构建的 GST 融合蛋白

△ 6-GST: 表示 FRS2-△6 突变体 GST 融合蛋白, 即去除 FRS2 上 251 至 270 位氨基酸序列后所构建的 GST 融合蛋白

EBR-GST: 表示 FRS2- EBR 突变体 GST 融合蛋白, 即以 FRS2 上 248 至 272 位氨基酸序列所构建的 GST 融合蛋白

以上皆为蛋白代号

+: 表示与 ERK2 有结合 其中“+”、“++”、“+++”分别表示结合从弱到强

-: 表示与 ERK2 无结合

从而确定 FRS2 上与 ERK2 结合的位点位于 248 至 272 位氨基酸。

## 图 2 FRS2 上与 ERK2 结合的区域；据推测新的 ERK2 结合的位点。

- a: 表示 FRS2 野生型的 233-273 氨基酸序列
- b: 表示突变体 FRS2-FPA 的氨基酸序列，即将野生型 FRS2 第 250 位和 260 位的 K 突变为 N，第 253 位和 262 位的 L 突变为 F 后的氨基酸序列 (SEQ ID NO:26)
- c: 表示突变体 FRS2-FPB 的氨基酸序列，即将野生型 FRS2 第 260 位和 267 位的 K 突变为 N，第 262 位的 L 突变为 F，第 268 位的 L 突变为 V 后的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)
- d: 表示突变体 FRS2-3k1 的氨基酸序列，即将野生型 FRS2 第 250 位和 260 位和 267 位的 K 突变为 N，第 253 位和 262 位的 L 突变为 F，第 268 位的 L 突变为 V 后的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)
- e: 表示经典的 FRS2 与 ERK2 结合结构域氨基酸序列
- f: 表示由本发明人预测的 ERK2 结合结构域氨基酸序列

## 图 3 确定 FRS2 上与 ERK2 结合的位点的体外结合试验。

FRS2 突变体 GST 融合蛋白 FPA (SEQ ID NO. 2)、FPB (SEQ ID NO. 3) 和 3k1 (SEQ IN NO. 4) 与转染 ERK 的 293 细胞体外结合实验，经 SDS-PAGE 胶后进行免疫印迹实验。结果 GST-：对应的胶块为转染 ERK 的 293 细胞裂解产物分别用结合在谷胱甘肽琼脂糖珠上的 FRS2 GST、FRS2-3k1 GST、FRS2-FPA GST、FRS2-FPB GST 融合蛋白进行体外结合反应后，经 SDS-PAGE 后通过免疫印记检测的条带情况。显色条带表示含有 ERK 与对应 GST 融合蛋白结合的复合物，显色条带的浓淡则表示结合的强弱程度。

GST fusion proteins: 各融合蛋白经 SDS-PAGE 胶后用氨基黑染色，显色条带为融合蛋白。

Input: 对应的泳道为用作对照的等量转染 ERK 的 293 细胞裂解产物经 SDS-PAGE 后通过免疫印记检测的条带情况。显色条带分别表示细胞内有 ERK2-HA。

IB: anti-HA: 免疫印记中用了抗 HA 的单克隆抗体。

## 图 4 FRS2 中的 ERK2 结合结构域突变破坏体内 FRS2 和 ERK2 的相互作用。

FRS2 野生型和 3k1 基因分别构建于真核表达载体 pRK5-RS，转染 HEK293 细胞，转染 24 小时后细胞经或不经 POV 刺激，裂解液上清同 FRS2 多克隆抗体免疫沉淀，SDS-PAGE 后，用抗 FRS2 和 ERK1/2 抗体免疫印记分析结果。

-: 对应的两列泳道为 HEK293 细胞裂解液

FRS2-WT: 对应的两列泳道为转染了 FRS2 野生型基因的 HEK293 细胞裂解液。

FRS2-3K1: 对应的两列泳道为转染了 FRS2-3K1 基因的 HEK293 细胞裂解液。

POV: -: 代表细胞未经 Pervanadate 刺激，POV: 代表细胞经 Pervanadate 刺激。

IP: anti-FRS2: 用抗 FRS2 的多克隆抗体进行免疫沉淀

IB: anti-FRS2: 免疫印记中用了抗 FRS2 的多克隆抗体

## 说明书

IB:anti-ERK1/2: 免疫印记中用了抗 ERK1/2 的多克隆抗体

上面胶块显色条带: 表示细胞表达了 FRS2 或 3k1 蛋白, 从而验证了免疫沉淀反应的正确性。

中间胶块显色条带: 表示细胞表达了 ERK2 蛋白。表示 FRS2-WT 或是 FRS2-3K1 与 ERK2 在体内的相互作用关系, 条带的浓淡表示作用的大小。

TCL:FRS2-WT 和 FRS2-3K1 分别转染 HEK293 细胞 24 小时后, 经 SDS-PAGE 胶后进行用抗 ERK1/2 的多克隆抗体免疫印迹实验。显色条带表明细胞表达内源性的 ERK1/2 蛋白, 从而证实了整个实验的有效性。即用 FRS2 多克隆抗体免疫沉淀后出现未捕捉到 ERK1/2 蛋白的现象是因为 FRS2-3K1 与 ERK2 在体内不存在相互作用, 而并不是因为细胞不表达 ERK1/2 蛋白。

### 图 5 FRS2-3k1 导致 aFGF 诱导的 ERK 和 Akt 活力改变。

用携带 pMSCV 空质粒或 pMSCV-FRS2-wt 或 pMSCV-FRS2-3k1 的反转录病毒感染 NIH3T3 细胞, 24 小时后, 无血清培养细胞过夜, 100ng/ml aFGF 刺激细胞不同时间长度, 用抗 pERKs 抗体和抗 pAkt 抗体检测这两种酶的活性动力,

pMSCV: 对应的六列均为用携带 pMSCV 空质粒的反转录病毒感染后的 NIH3T3 细胞裂解液。

FRS2-WT: 对应的六列均为用携带 pMSCV-FRS2-wt 基因的反转录病毒感染后的 NIH3T3 细胞裂解液。

FRS2-3K1: 对应的六列均为用携带 pMSCV-FRS2-3k1 基因的反转录病毒感染后的 NIH3T3 细胞裂解液。

FGF: 横向对应的数字表示用 aFGF 刺激的不同时间长度, 时间单位为分钟。

IB:anti-pERK1/2: 免疫印记中用了抗 pERK1/2 的单克隆抗体

IB:anti-ERK1/2: 免疫印记中用了抗 ERK1/2 的多克隆抗体

IB:anti-pAkt: 免疫印记中用了抗 pAkt 的多克隆抗体

IB:anti-Akt: 免疫印记中用了抗 Akt 的多克隆抗体

胶块显色条带代表蛋白印记。

X 光片经 GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad 公司产品) 扫描后, 用随机软件 PDQuest (Bio-Rad 公司产品) 进行蛋白质定量, 得出每个蛋白印记的具体数值。分别将磷酸化抗体的数值除以非磷酸化抗体的数值后, 用 Excel 软件绘制出相对 ERK2 及 Akt 活力的时间变化曲线图。

### 具体实施方式

本发明中, “分离的 ERK2 结合多肽” 是指 ERK2 结合多肽基本上不含天然与其相关的其

# 说明书

它蛋白、脂类、糖类或其它物质，本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 ERK2 结合多肽，基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上产生单一的主带。

在本发明中，术语“其保守性变异蛋白”是指 ERK2 结合多肽活性的 ERK2 结合多肽的变异形式，这些变异形式包括（但并不限于）：若干个（通常为 1—10 个，较佳的 1—5 个，更佳的 1—2 个）氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个（通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内）氨基酸，例如，在本领域中，用性能相近或相似地氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质地功能，又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个和数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。特别指出的是，根据我们的研究结果，这里的缺失、插入和/或取代不包括多肽氨基酸序列中的 K 或 L 被缺失、插入和/或取代。此外，这些变异形式还包括成熟蛋白与另一个化合物（比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇）融合所形成的蛋白，附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的蛋白（如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，比如 GST）。此外，变异形式还包括（但不限于）ERK2 结合多肽及上述蛋白经过修饰后的形式：化学衍生形式如乙酰化或羧基化；糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽，这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶（如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶）而完成；具有磷酸化氨基酸残基（如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸）的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的蛋白。这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟悉技术人员公知的范围。

本发明所述的编码 ERK2 结合多肽的多核苷酸的全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。应用 PCR 法被优选用于获得本发明的基因。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的多核苷酸片段。

本发明中，编码 ERK2 结合多肽的多核苷酸序列可插入到各种载体中，所述载体包括各种表达载体，包括本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于：在细菌中表达的基于 T7 的表达载体 (Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56. 125)、PGEX5x.1 表达载体；在哺乳动物细胞中表达的 pMSXND 表达载体 (Lee and Nathans, J Bio Chem. 263:3521, 1988) 和在



# 说明书

昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。

本发明中，术语“表达调控序列”通常指参与控制核苷酸序列表达的序列。表达调控序列包括与目标核苷酸序列操作性相连的启动子和终止信号。它们通常还包括核苷酸序列适当翻译所需的序列。“操作性相连”是指线性 DNA 序列的某些部分能够影响同一线性 DNA 序列其他部分的活性。例如，如果启动子或增强子增加了编码序列的转录，则它与编码序列是操作性相连的。

本发明中转化重组载体的宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO, COs. 293 细胞、或 Bowes 黑素瘤细胞的动物细胞等。

用重组载体转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用CaCl<sub>2</sub>法或热击法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl<sub>2</sub>。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

本发明所述适合表达 ERK2 结合多肽的条件与表达所用的宿主细胞有关，重组载体转化的宿主细胞获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的 ERK2 结合多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。上述方法中的重组蛋白可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析（HPLC）和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

为了确认FRS2上与ERK2结合的片段，发明人构建了一系列的FRS2突变体，用pull down（体外结合）实验检测这些融合蛋白与ERK2的亲和力（图1）。发现FRS2上248至272位氨基酸

# 说明书

对于它们的结合至关重要，在pull down实验中，仅包含232—272及248—272部分短肽的GST融合蛋白与包含FRS2全长的融和蛋白获得的ERK2蛋白量一样。另一方面，包含FRS2上248至508位氨基酸的融合蛋白也拥有与ERK2结合的能力，但含FRS2上1—247位氨基酸的融合蛋白则不能与ERK2结合，且FRS2上273至508位氨基酸的融合蛋白也不能与ERK2结合。因此，发明人确定FRS2上与ERK2结合的位点位于248至272 位氨基酸。

以往曾报道ERK2的激活子、调节因子和底物都有一个共同的特征，就是拥有通用锚定位点即K/RK/RK/R...I/LXI/L，因此我们在FRS2蛋白上寻找此ERK2的结合位点。虽然没有在此区域发现此特定的结构域序列，但本发明的多肽上确实包含ERK2的通用锚定位点的重要成分例如带正电荷的赖氨酸位点和疏水性亮氨酸(图2)。因此我们推测本发明的多肽上具有新的ERK2结合结构域，即 $KX_{(1-2)}LX_{(4-6)}K(X)L$ 。FRS2的248-272aa部分有两个部分重叠的此结构域，我们构建各种点突变体，以确认哪个结构域更为重要。第一个结构域 $K^{250}FVL^{253}GPTPVQK^{260}QL^{262}$ 被突变为 $N^{250}FVF^{253}GPTPVQN^{260}QF^{262}$ 被称为FPA（意指FRS2点突变体A），第二个结构域 $K^{260}QL^{262}MEKEK^{267}L^{268}$ 被突变为 $N^{260}QF^{262}MEKEN^{267}V^{268}$ 被称为FPB（意指FRS2点突变体B），我们还构建了第三个突变体FRS2-3k1，其中以上两个结构域均被突变(图2)。以上突变体GST融合蛋白分别与ERK2-HA蛋白进行体外结合试验，发现FPA仅具有与ERK2微弱结合的能力，而FPB与ERK2的亲合力只是稍稍减弱了(图3)。当FRS2-3k1与ERK2-HA蛋白进行体外结合试验，发现FRS2-3k1完全丧失了与ERK2结合的能力(图3)。从以上的结果推出 FRS2中 $KX_{(1-2)}LX_{(4-6)}K(X)L$ 结构域是必须的ERK2结合结构域。

为确定破坏FRS2中的ERK2结合结构域能否破坏体内FRS2-ERK2复合物，FRS2-wt（FRS2野生型）或者FRS2-3K1被转入HEK293（Human Embryonic Kidney 293）细胞。血清饥饿后的细胞，用或不用POV（一种酪氨酸磷酸化酶抑制剂）刺激，细胞裂解产物用抗FRS2抗体免疫沉淀反应，结合物经SDS-PAGE后，转醋酸纤维素膜，用抗FRS2抗体和抗ERK1/2（Extracellular signal-regulated kinase 1/2）抗体免疫印记检测，发现POV 刺激后HEK293细胞中的ERK2 能与FRS2结合，但没经过POV 刺激过的HEK293细胞中ERK2 没能与FRS2结合（图4）。因为在体外结合试验中POV刺激前后FRS2均能结合捕获ERK2，结构上ERK2似乎能与FRS2结合但POV刺激后亲合力可能被极大提高了。而且ERK2在与FRS2-wt共转时免疫印记有强大的信号，然而在变异体（3K1）共转中却没有信号，证实了FRS2中的ERK2结合结构域的破坏会破坏体内FRS2和ERK2的相互作用。

FGF诱导的信号通路广泛参与细胞增殖和分化等重要的细胞反应，ERK在其中发挥重要的作用。同时，PI3K-Akt在相关于细胞迁移的FGF诱导的信号转导过程中也发挥重要作用。因此我们用此两种酶的活性动力学评估FGF诱导的信号通路效应强度。用携带pMSCV空质粒或pMSCV-FRS2-wt或pMSCV-FRS2-3k1的反转录病毒感染NIH3T3细胞，24小时后，无血清培养细胞

# 说明书

过夜，100ng/ml aFGF刺激细胞不同时间（如图5）长度，用抗pERKs抗体和抗pAkt抗体检测此两种酶的活性动力，相对于对照而言，FRS2-wt增强了ERK活性，FRS2-3k1与FRS2-wt增强ERK活性程度近似。但FRS2-3k1中Akt活性较FRS2-wt中增强显著增加。综合与其他信号分子的作用情况，总体而言，取消FRS2-ERK2相互作用会导致FGF诱导的信号通路效应增强。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

## 实施例1 FRS2中与ERK2结合的区域为248—272位氨基酸

从人cDNA文库中，使用QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene公司) 或获得两段所需基因读码框克隆至载体pGEX5X-3 (Amersham Pharmacia Biotech公司产品) 等方法，构建pGEX5X-3-FRS2野生型及各种pGEX5X-3-FRS2突变体，结构如图1所示。构建重组质粒时所用引物及酶如下表所列：

重组质粒对应的融合蛋白	5'端引物	3'端引物	限制性内切酶
WT-GST	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5)	ATAAGAATGCGGCCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -NotI
NT-GST	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5)	CCGCTCGAGTTCAGGTTCAAGAAGAATC T (SEQ ID NO:16)	5' -EcoRI 3' -XhoI
CT-GST	GGAATTCGAGTCAAATTTGTTTAG G (SEQ ID NO:17)	ATAAGAATGCGGCCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -NotI
CP-GST	GGAATTCAGGGATCCTCAGATTCTTCT TGA	CCGCTCGAGTGCAGTTCTTCTCTGAGCT GAGTT	5' -EcoRI 3' -XhoI
ΔCP-GST	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5) CCGCTCGAGCCTGCTCAATACTACT TGGTTC	CCGCTCGAGCCATCTTGCCTCTGTTT GGGAA ATAAGAATGCGGCCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -XhoI 5' -XhoI 3' -NotI
NT-L-GST	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5)	CCGCTCGAGGCTAAGAAGAAGCTGGAC TT	5' -EcoRI 3' -XhoI
CT-L-GST	GGAATTCGAGTCAAATTTGTTTAG G (SEQ ID NO:18)	ATAAGAATGCGGCCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -NotI

## 说 明 书

△ 1-GST:	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5); GCAACGCTCGAGAATCTACCATCTTTG CCTC (SEQ ID NO:7)	GCAACGCTCGAGCCCATTATATTTTCA TACA (SEQ ID NO:8); ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -XhoI 5' -XhoI 3' -NotI
△ 2-GST:	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5); GCAACGCTCGAGGCGCACAGAGCTG (SEQ ID NO:9)	GCAACGCTCGAGTCACTGCCACCTT (SEQ ID NO:10); ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -XhoI 5' -XhoI 3' -NotI
△ 3-GST:	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5); GCAACGCTCGAGATCAAGTTAGTGGAA GT (SEQ ID NO:11)	GCAACGCTCGAGGTTCTTCTTTTGGTGT GC (SEQ ID NO:12); ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -XhoI 5' -XhoI 3' -NotI
△ 4-GST:	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5); GCAACGCTCGAGATGCACCCTCTGTTA (SEQ ID NO:13)	GCAACGCTCGAGGTTCTTCTTTTGGTGT GC (SEQ ID NO:12); ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6)	5' -EcoRI 3' -XhoI 5' -XhoI 3' -NotI
△ 4COM-GST	GGAATTCCTCAAGTAGTATTGAGGACA (SEQ ID NO:14)	CCGCTCGAGTCCAAGTTGCTCCAGTTTC (SEQ ID NO:15)	5' -EcoRI 3' -XhoI
△ 5-GST	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5); CCCAAGCTTTTGAACAGGGGTTGG (SEQ ID NO:19)	ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6); CCCAAGCTTGAAGAGATCAAGTTAG (SEQ ID NO:20)	5' -EcoRI 3' -XhoI 5' -XhoI 3' -NotI
△ 6-GST	GGAATTCATGGGTAGCTGTTGTAGC (SEQ ID NO:5); CCCAAGCTTGACTCCTTCAGGTCAA (SEQ ID NO:21)	ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCAGATC AGTACTA (SEQ ID NO:6); CCCAAGCTTGAAGAGATCAAGTTAG (SEQ ID NO:20)	5' -EcoRI 3' -XhoI 5' -XhoI 3' -NotI
EBR-GST	GGAATTCGAGTCAAATTTGTTTTAG G (SEQ ID NO:18)	CCGCTCGAGTCCAAGTTGCTCCAGTTTC (SEQ ID NO:15)	5' -EcoRI 3' -XhoI

PCR体系 (50 $\mu$ l): 去离子水 34.7 $\mu$ l, 10 $\times$ PCR缓冲液 5 $\mu$ l, dNTP 4 $\mu$ l (2.5mmol each), 引物 2 $\mu$ l (10pmol), 模板 2 $\mu$ l (5ng/ $\mu$ l), rTaq酶 0.3 $\mu$ l (5u/ $\mu$ l)。所有试剂均为Takara公司产品。PCR条件: 94 $^{\circ}$ C 5分钟; 94 $^{\circ}$ C 1分钟, 44 $^{\circ}$ C 1分钟, 72 $^{\circ}$ C 2分钟, 共30个循环; 72

## 说明书

℃ 5分钟；4℃ 保温。酶切 (20 $\mu$ l)：待切片断 4 $\mu$ l，内切酶各 0.5 $\mu$ l (15u/ $\mu$ l)，10 $\times$ 缓冲液 2 $\mu$ l，BSA牛血清白蛋白 0.2 $\mu$ l，去离子水补至总体积20 $\mu$ l；37℃水浴3小时。所有试剂均为NEB公司产品。载体pGEX5X-3也用相应的酶进行酶切。酶连 (10 $\mu$ l)：载体 30fmol，片断 100fmol，10 $\times$ T4连接酶缓冲液 1 $\mu$ l，T4连接酶 0.4 $\mu$ l (350u/ $\mu$ l)，去离子水 6.6 $\mu$ l。所有试剂均为Takara公司产品。质粒经赛百盛公司进行DNA测序，符合序列顺序。

重组突变体质粒热击法转化大肠杆菌(Invitrogen公司产品)BL21，涂板 (LB培养基)，选择阳性克隆的大肠杆菌BL21接种于LB培养基 (含有氨苄青霉素50ug/ml)，37℃振荡过夜，1:100稀释到LB培养基，在37℃培养至OD600约0.6-0.8，经1mM异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷IPTG诱导。细胞采用超声裂解，-20℃保存。采用Glutathione sepharose 4B (谷胱甘肽树脂4B，Amphamacia公司产品)纯化重组蛋白 (分子克隆实验指南, 第三版)。SDS-PAGE分析纯化产物可看到单一的纯化条带。确定符合预期的分子量。

FRS2突变体GST融合蛋白体外结合胞内ERK的实验。小鼠ERK2蛋白基因开放读码框从小鼠cDNA文库中扩增获得，用于扩增的引物序列为：5'-CCCAAGCTTATGGTCCGCGGGCAGGTGTT-3' 和 5'-GCTCTAGAAGATCTGTATCCTGGCTGG-3'，产物经HindIII和XbaI双酶切，在T4DNA连接酶作用下，定向插入经相同双酶切的蛋白表达载体pcDNA3-HA (Invitrogen公司产品)，从而构建成pcDNA3-ERK2-HA质粒。将HEK293细胞在含10%胎牛血清 (Sigma) DMEM (Gibco) 中培养。使用转染试剂LipofectAMINE 2000 (Invitrogen公司产品)按使用说明将pcDNA3-ERK2-HA质粒瞬时转染293细胞。24小时后，用1ml细胞裂解液 (50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 10% glycerol, 10mM sodium pyrophosphate, 2mM sodium orthovanadate, 10mM sodium fluoride, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 10 $\mu$ g/ml aprotinin) 裂解密度80%的10mm培养皿 (Corning, NY, USA) 的转染后293细胞，细胞裂解产物与结合于Glutathione 4B琼脂糖珠的3 $\mu$ g FRS2突变体GST融合蛋白进行体外结合反应，用HNTG (20mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.1%Triton-X-100, 10% Glycerol)洗琼脂糖珠三次后，SDS 样品缓冲液 (0.0625% Tris-Cl pH6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 0.003% Bromphenolblue, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)洗脱琼脂糖珠上蛋白，SDS-PAGE (分子克隆实验指南, 第三版)后，用抗HA抗体 (Upstate Biotech) 免疫印记分析通过不同FRS2突变体GST融合蛋白体外结合ERK的量, 如图1所示，+表示结合，+多少表示结合的量的多少，-表示无结合。从图上可以看出，包含232-272及248-272部分短肽的GST融合蛋白与包含FRS2全长的融合蛋白获得的ERK2蛋白量一样。另一方面，包含FRS2上248至508位氨基酸的融合蛋白也拥有与ERK2结合的能力，但含FRS2上1-247位氨基酸的融合蛋白则不能与ERK2结合，且FRS2上273至508位氨基酸的融合蛋白也不能与ERK2结合。因此，发明人确定FRS2上与ERK2结合的位点位于248至272 位氨基酸。

# 说明书

## 实施例2 突变FRS2中248—272位氨基酸会破坏FRS2与ERK2的结合

以人pGEX5X-3-FRS2质粒为模板，设计引物序列如下：

### FRS2-FPA

5'GAAGGAGTCAATTTTGT TTTTGGGCCAACCCCTGTTCAAATCAGTTTATGGAAAAAG3'

(SEQ ID NO:22)

5'CTTTTCCATAAACTGATTTTGAACAGGGGTTGGCCCAAAAACAAAATTGACTCCTTC3'

(SEQ ID NO: 23)

### FRS2-FPB

5'CAACCCCTGTTCAAATCAGTTTATGGAAAAAGAGAATGTGGAGCAACTTGGAAG3'

(SEQ ID NO: 24)

5'CTTCCAAGTTGCTCCACATTCTTTTTCCATAAACTGATTTTGAACAGGGGTTG3' (SEQ

ID NO: 25)

选用QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene公司产品)，按使用说明构建突变体。按实施例1中相同方法获得FRS2突变体GST融合蛋白FPA (SEQ ID NO:26)、FPB (SEQ ID NO:3)。以GST-FRS2-FPA质粒为模板，用构建GST-FRS2-FPB的引物按实施例1中相同方法构建GST-FRS2-3k1 (SEQ IN NO:4)质粒。将这三种质粒与转染ERK的293细胞 (ATCC (American Type Culture Collection)) 进行体外结合实验 (方法同实施例1)，结果见图3。结果发现FPA仅具有与ERK2微弱结合的能力，FPB与ERK2的亲合力只是稍稍减弱了，而FRS2-3k1完全丧失了与ERK2结合的能力。由此可见，FRS2中248—272位氨基酸是必须的ERK2结合结构域。

取1mgFRS2—GST纯化蛋白与等体积完全弗式佐剂 (Sigma公司产品) 混合后皮下免疫兔子，一月后用1mgFRS2—GST纯化蛋白与等体积不完全弗式佐剂再次免疫兔子每月一次共两次后，取兔血清。获得FRS2多克隆抗体。

FRS2和3k1基因分别构建于真核表达载体pRK5-RS (详细构建方法见Stratagene公司QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits产品说明书)。同实施例1所述方法分别转染HEK293细胞，转染24小时后细胞经或不经POV刺激，细胞裂解方法同实施例1，裂解液上清同FRS2多克隆抗体和20 $\mu$ l protein A-Sepharose于4 $^{\circ}$  C免疫沉淀4小时。用HNTG (20mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Triton-X-100, 10% Glycerol)洗琼脂糖珠三次后，SDS 样品缓冲液 (0.0625% Tris-Cl pH6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 0.003% Bromphenolblue, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)洗提琼脂糖珠上蛋白，SDS-PAGE (分子克隆实验指南，第三版)后，用抗ERK1/2抗体 (Santa Cruz公司产品) 免疫印记分析外源性表达的FRS2与内源性ERK的结合情况，结果如图4。结果表明破坏FRS2中的ERK2结合结构域，从而破坏了体内FRS2和ERK2的相互

作用。

### 实施例3 FRS2-wt 和 FRS2-3k1 过表达导致 aFGF 诱导的 MAPK/ERK 和 Akt/PKB 信号通路不同的表现

以pGEX5X-3-FRS2为模版，设计引物序列如下：5' -CCGCTCGAGATGGGTAGCTGTTGTAGC-3' 和5' -ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCAGATCAGTACTA-3'，使用实施例1中相同方法，经XhoI和NotI双酶切，在T4DNA连接酶作用下，定向插入经相同双酶切的蛋白表达载体pMSCV（Clontech公司产品）。用pMSCV 质粒或 pMSCV-FRS2-wt或pMSCV-FRS2-3k1的反转录病毒感染（在900 $\mu$ l培养液中加入100 $\mu$ l病毒与终浓度4mg/ml的Polybrene）NIH3T3细胞，两天后，无血清培养细胞过夜，100ng/ml aFGF刺激细胞不同时间长度，细胞裂解总产物SDS-PAGE后，免疫印记方法用抗pERKs（磷酸化ERK抗体，Cell Signaling Technology公司产品）和抗pAkt（磷酸化Akt抗体，Cell Signaling Technology公司产品）检测此两种酶的活性动力。结果如图5。相对于对照而言，FRS2-wt增强了ERK活性，FRS2-3k1与 FRS2-wt增强ERK活性程度近似。但FRS2-3k1中Akt活性较FRS2-wt中增强显著。综合与其他信号分子的作用情况，总体而言，取消FRS2-ERK2相互作用会导致FGF诱导的信号通路效应增强。

### 实施例4 具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽的合成

用常规多肽合成方法合成，按 SEQ ID NO:1 序列由上海生工生物工程技术有限公司完成制备。

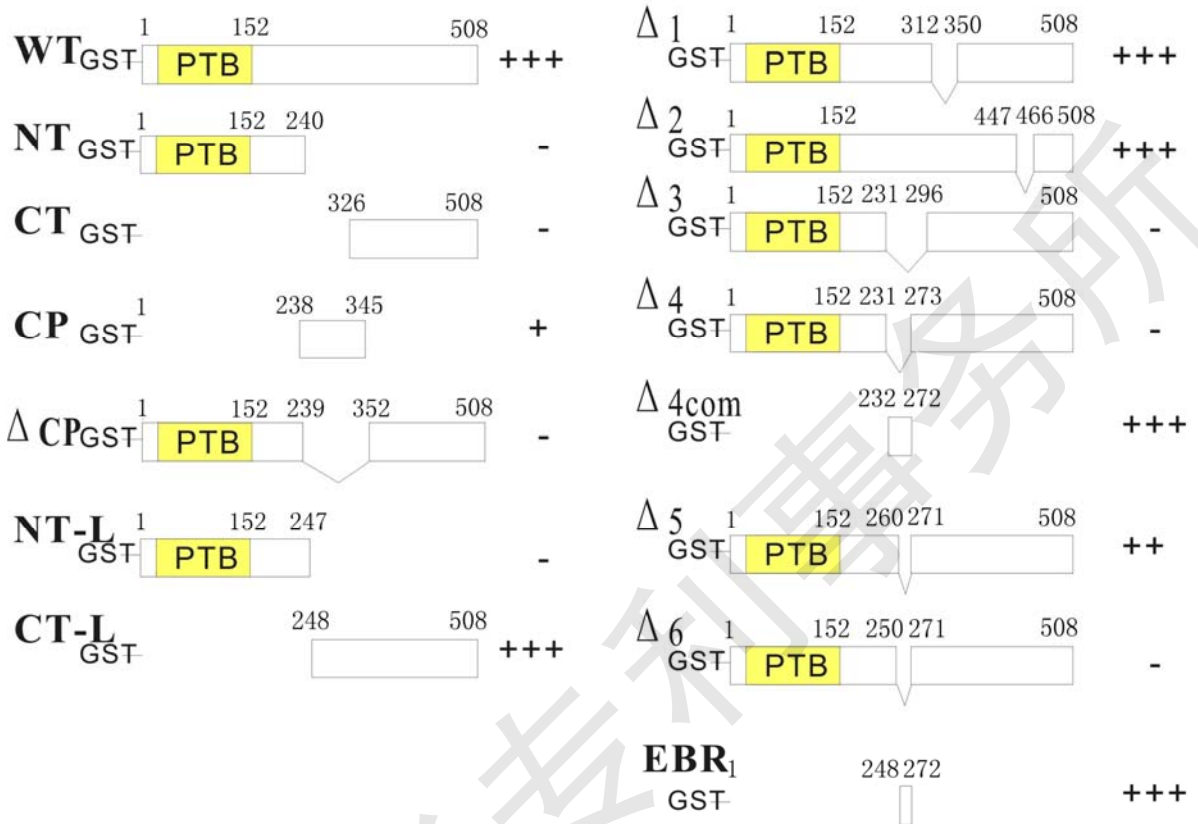


图 1





- a SSIEDRDPQILLEPEGVKFV  
LGPTPVQKQLMEKEKLEQLG
- b GVNFVFGPTPVQNQFMEKEKLEQLG
- c GVKFVLGPTPVQNQFMEKENVEQLG
- d GVNFVFGPTPVQNQFMEKENVEQLG
- e K/RK/RK/R...I/LXI/L
- f  $KX_{(1-2)}LX_{(2-6)}K(X)L$

图2



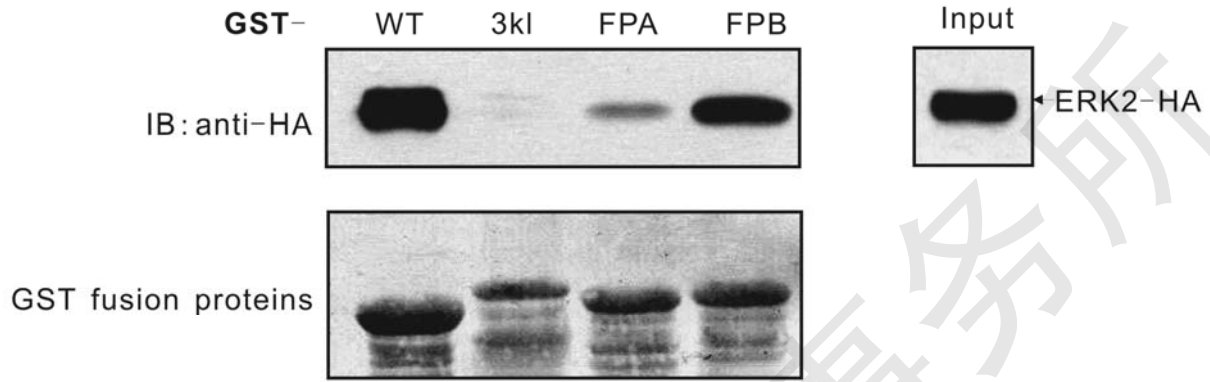


图3



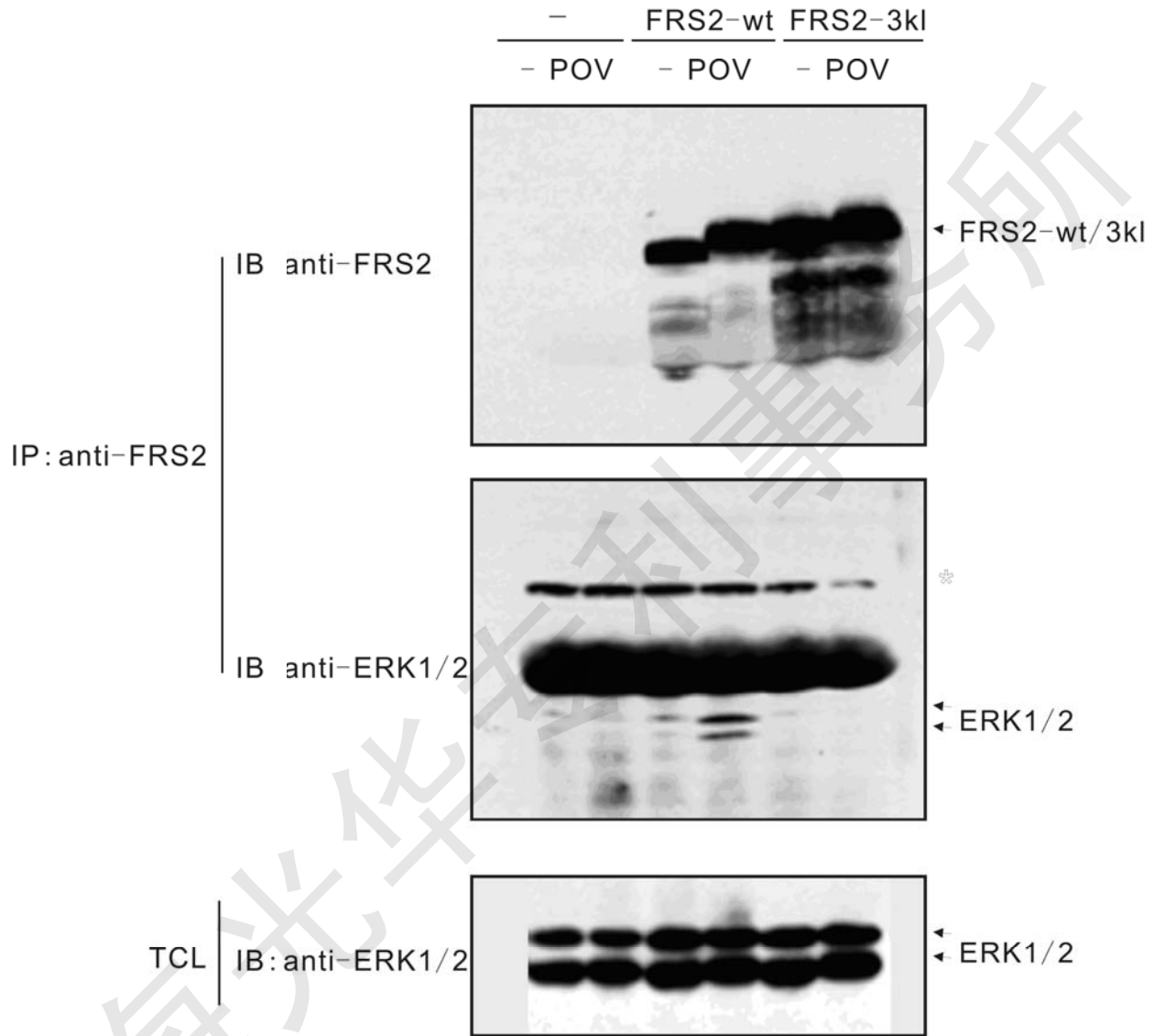


图 4



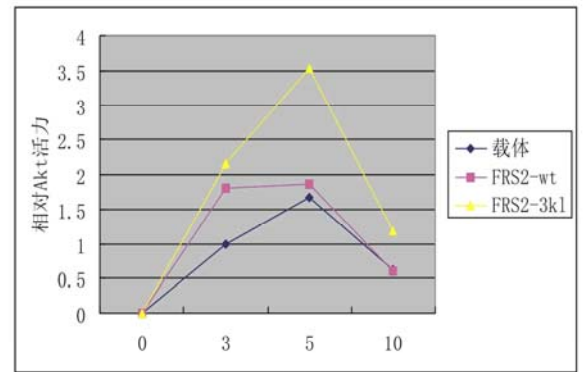
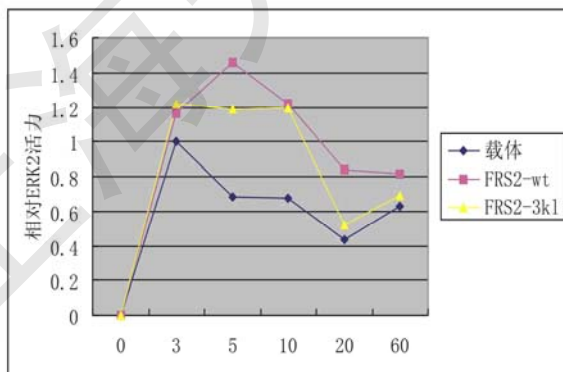
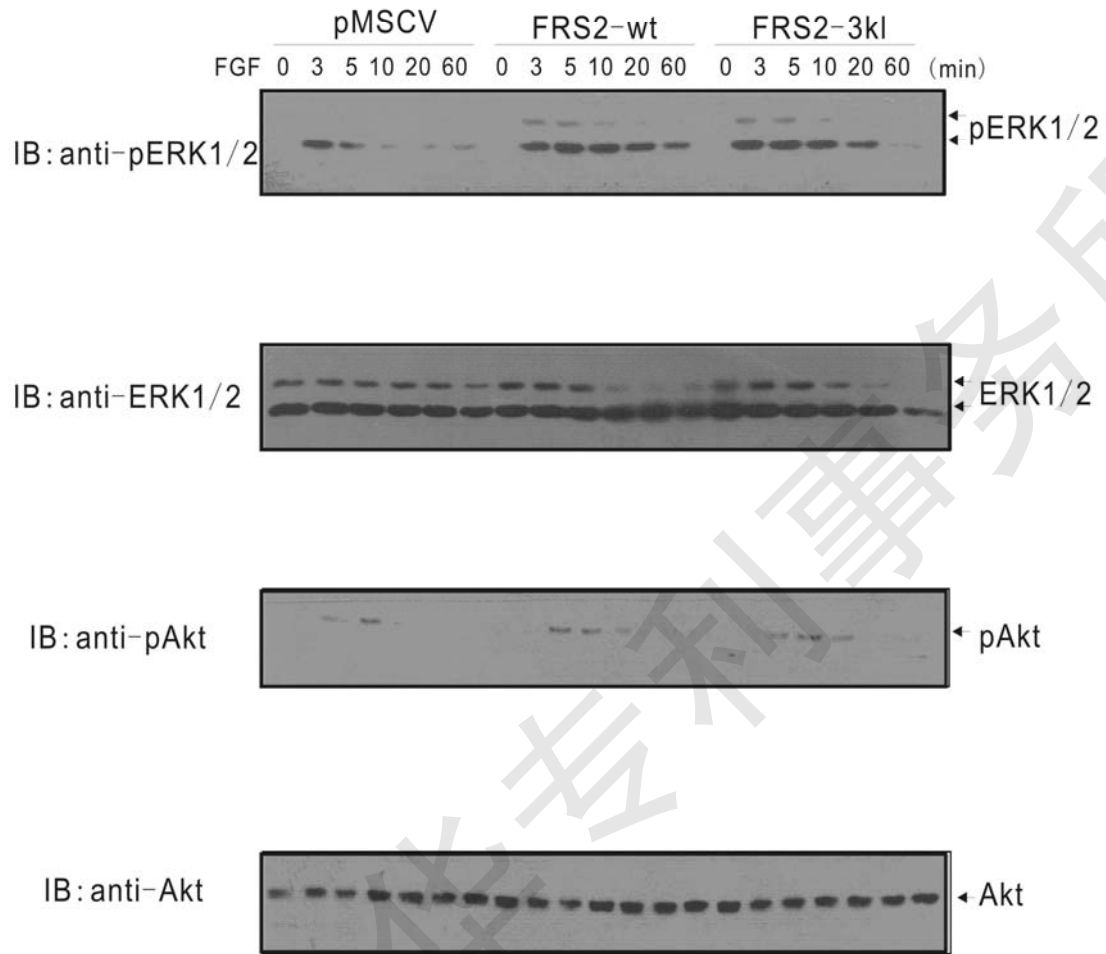


图 5



## 一、化工领域技术资料准备的说明

**(一) 以产品为主：**技术/产品创新主要是基于化学产品，则申请时应考虑提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）；
- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的技术/产品，需要说明已有技术/产品的结构式/分子量/配方等，以及已知功能及应用，尤其指出该已有技术/产品存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。如果应当描述产品的结构/配方，制备方法，应用，原理。说明技术优化的思路。
- 5、本专利的效果：即新化学产品的用途。
- 6、附图与说明：与发明有关的试验结果，方法流程图等等图解，附图中如涉及多个产品同时检验的情况，请用中文说明各个条带表示什么内容。
- 7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，及具体实验条件，如是产品，则需要产品的制备、鉴定、应用实施例，要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

**(二) 以方法或工艺为主：**技术/产品创新主要是基于方法或工艺，则申请时应考虑提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）；
- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的方法/工艺。对于方法，需要说明已有方法的主要思路、步骤、效果，尤其指出该方法在解决本专利目的上的缺点或不足之处。对于工艺，需要说明已有工艺的主要原理及工艺步骤、工艺条件、原料，尤其指出该工艺存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参照产品，指出其规格、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。对于方法，应当说明本方法的主要思路、步骤。对于工艺，应当说明工艺步骤、工艺条件、使用原料，如可能需说明工艺原理。说明技术优化的思路。

5、本专利的效果：有益效果可以由运算效率提高、降低能耗、产率提高、精度提高、工序简化、控制方便，以及有用性能的出现等方面反映出来。

6、附图与说明：如有必要可以给出工艺流程图。

7、本专利的具体实施例：说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据。数据说明可以采用图表形式。说明有益效果，以提供对比数据为好。

**(三) 以装置或设备为主：**技术/产品创新主要是基于装置或设备，则申请时应提供：

1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：

2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？

3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的技术/产品，需要说明已有技术/产品的主要结构及原理，尤其指出该已有技术/产品存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参考产品，指出其型号、厂家。

4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。如果涉及装置或设备，应当描述装置或设备的机械构成，尤其说明各组成部分之间的相互关系，例如形状、位置、连接关系、相互作用原理，创新点对于装置或设备的作用。说明技术优化的思路。

5、本专利的效果：有益效果可以由产率、质量、精度和效率的提高，能耗、原材料、工序的节省，加工、操作、控制、使用的简便，环境污染的治理或者根治，以及有用性能的出现等方面反映出来。

6、附图与说明：装置或设备的图解，图应以机械制图的标准绘制，实用新型申请必须带附图。

7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，如需要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

## 二、生物医药领域技术资料准备的提纲

**(一) 专利申请以药物产品和用途为主：**产品创新主要是基于药物的活性成分或配方，则申请时应考虑提供：

1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：

- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的产品，需要说明已有药物产品的结构式/分子量/序列等，以及已知的功能及应用，尤其指出该已有药物产品存在的缺点或不足之处。对于药物配方，需要说明已有配方的组成成份、比例、成份性能、用途，尤其指出该配方在用途方面的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参照产品，指出其规格、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。对于药物活性成分：应当描述该活性成分的名称及结构式/序列（包括各种官能基团、分子立体构型等），制备方法，应用，原理；并应当记载与发明要解决的技术问题相关的化学、物理性能参数（如各种定性或者定量数据和图谱等）。对于配方：应当说明配方组份、各组分可选择的范围、各组分的含量范围、各组份的性质，配方用途，如可能需说明配方制作工艺。说明技术优化的思路。  
对于新的药物化合物或者药物组合物，应当记载其具体的医药用途或者药理作用，同时还应当记载其有效量及使用方法。如果本领域技术人员无法根据现有技术预测发明能够实现所述医药用途、药理作用，则应当记载对于本领域技术人员来说，足以证明发明的技术方案可以解决预期要解决的技术问题或者达到预期的技术效果的实验室试验（包括动物实验）或者临床试验的定性或者定量数据。
- 5、本专利的效果：即新药物产品的用途，如用作制备治疗某类疾病的药或者诊断某类疾病等等。
- 6、附图与说明：与发明有关的试验结果，方法流程图等等图解，附图中如涉及多个产品同时检验的情况，请用中文说明各个条带表示什么内容。
- 7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，及具体实验条件。如是药物化合物，则需要化合物的制备、鉴定、应用实施例，要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

**（二）以方法或工艺为主：**技术/产品创新主要是基于药物产品的制备方法或工艺，则申请时应考虑提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：
- 2 本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？



- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的方法/工艺。对于方法，需要说明已有方法的主要思路、步骤、效果，尤其指出该方法在解决本专利目的上的缺点或不足之处。对于工艺，需要说明已有工艺的主要原理及工艺步骤、工艺条件、原料，尤其指出该工艺存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参照产品，指出其规格、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。对于方法，应当说明本方法的主要思路、步骤。对于工艺，应当说明工艺步骤、工艺条件、使用原料，如可能需说明工艺原理。说明技术优化的思路。
- 5、本专利的效果：有益效果可以由运算效率提高、降低能耗、产率提高、精度提高、工序简化、控制方便，以及有用性能的出现等方面反映出来。
- 6、附图与说明：如有必要可以给出工艺流程图。
- 7、本专利的具体实施例：说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据。数据说明可以采用图表形式。说明有益效果，以提供对比数据为好。

**(三) 以医疗器具为主：**技术/产品创新主要是基于医疗器具，则申请时应提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：
- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的产品，需要说明已有产品的主要结构及原理，尤其指出该已有产品存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参考产品，指出其型号、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。如果涉及器械或设备，应当描述器械或设备的机械构成，尤其说明各组成部分之间的相互关系，例如形状、位置、连接关系、相互作用原理，创新点对于装置或设备的作用。说明技术优化的思路。
- 5、本专利的效果：有益效果可以由质量、精度和效率的提高，原材料、工序的节省，加工、操作、控制、使用的简便，以及有用性能的出现等方面反映出来。
- 6、附图与说明：器械或设备的图解，图应以机械制图的标准绘制，实用新型申请必须带附图。



7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，如需要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

更详细的信息，您可以咨询上海光华专利事务所化工医药部经理，许律师，  
021-51096606\*829; email:xyl@iprtop.com。

关于我们的情况，您可以浏览网页：<http://www.iprtop.com>