



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109985230 A
(43)申请公布日 2019.07.09

(21)申请号 201810002808.1

(22)申请日 2018.01.02

(71)申请人 上海清流生物医药科技有限公司
地址 201321 上海市浦东新区康新公路
3399弄26号楼420室

(72)发明人 张英豪 胡楠 付晶鹏 闫桂蕊
宛佳 李小灵 孙荣勋 王耀

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411
代理人 陈剑聪

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

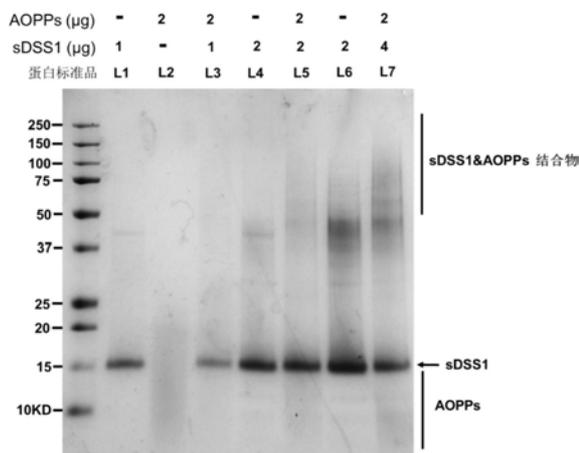
权利要求书3页 说明书9页
序列表7页 附图4页

(54)发明名称

一种蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用,其是sDSS1蛋白用于制备预防和治疗肾病的药物。本发明还进一步涉及在改善肾病护理设备中的应用。sDSS1能够有效的结合晚期氧化蛋白产物并降低由它们引起的细胞毒性,缓解慢性肾病模型动物的疾病症状,极具临床应用价值。



1. 一种蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用,其特征在于,所述的应用是把sDSS1蛋白用于制备预防和治疗肾病的药物。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的肾病包括第1期慢性肾病GFR \geq 90mL/min/1.73m²、第2期慢性肾病GFR为60~89mL/min/1.73m²、第3期慢性肾病GFR为30~59mL/min/1.73m²、第4期慢性肾病GFR为15~29mL/min/1.73m²或第5期慢性肾病GFR<15mL/min/1.73m²。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的肾病具有AOPP增加特征,包括糖尿病肾病、IgA肾病、膜性肾病、急性肾损伤、狼疮肾炎、血管球性肾炎、多囊肾病或慢性肾小球肾炎。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白包括人、黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、白颊长臂猿、川金丝猴、恒河猴、滇金丝猴、东非狒狒、安哥拉疣猴、白顶白眉猴、鬼狒、豚尾猴中的任一sDSS1蛋白序列形成的基础蛋白,其中人sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1,黑猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:2,倭黑猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:3,大猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4,红毛猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5,白颊长臂猿sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:6,川金丝猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7,恒河猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:8,滇金丝猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9,东非狒狒sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:10,安哥拉疣猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:11,白顶白眉猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12,鬼狒sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13,豚尾猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:14。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白是任一与基础蛋白相似度达到70%以上的第一种蛋白。

6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白氮端58个氨基酸为基础,在氮端或碳端融合其他多肽片段,用于融合的多肽片段的结构特征或氨基酸序列特征与所述的基础蛋白碳端31个序列相同或相似的第二种蛋白。

7. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白氮端58个氨基酸为基础,在氮端或碳端融合其他氨基酸片段,融合后的蛋白能实现跨膜转运功能的第三种蛋白。

8. 根据权利要求4-8任一所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白是所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白或第三种蛋白与该种蛋白自身、载体蛋白、抗体或其他任意长度氨基酸片段连接形成的融合蛋白。

9. 根据权利要求4-9任一所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白是基于所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白进行的修饰产生的多肽/蛋白修饰物。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述的多肽/蛋白修饰物是针对氨基酸侧链上的氨基、氨基酸侧链上的羧基、氮末端氨基、碳末端羧基、半胱氨酸、酪氨酸、丝氨酸、色氨酸进行的特异性或非特异性的1-20个位点的化学修饰。

11. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述多肽/蛋白修饰物的修饰方法包括糖基化修饰、脂肪酸修饰、酰基化修饰、Fc片段融合、白蛋白融合、聚乙二醇修饰、右旋糖苷修饰、肝素修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、聚氨基酸修饰、多聚唾液酸修饰、壳聚糖及其衍生物修

饰、凝集素修饰、海藻酸钠修饰、卡波姆修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、羟丙基甲基纤维素修饰、羟丙基纤维素修饰、乙酰化修饰、甲酰化修饰、磷酸化修饰、甲基化修饰、磺酸化修饰以及其他医药上可用的多肽/蛋白药物修饰方法的一种或一种以上。

12. 根据权利要求4-8任一所述的应用,其特征在於,所述的sDSS1蛋白是利用所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的氨基酸序列为基础进行的20种基本氨基酸以外的氨基酸进行的1-31个任意氨基酸位点替换的非天然氨基酸替代蛋白。

13. 根据权利要求12所述的应用,其特征在於,所述非天然氨基酸替代蛋白的氨基酸替换包括替换成羟脯氨酸、羟赖氨酸、硒代半胱氨酸、D-型氨基酸或者人工合成的非天然氨基酸及其衍生物。

14. 根据权利要求4-13任一所述的应用,其特征在於,所述的sDSS1蛋白是把所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或非天然氨基酸替代蛋白与医药上可应用的药物载体形成的部分或全部复合体。

15. 根据权利要求14所述的应用,其特征在於,所述复合体的药物载体包含肠溶衣制剂、胶囊、微球/囊、脂质体、微乳液、复乳液、纳米颗粒、磁颗粒、明胶和凝胶中的一种或一种以上。

16. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述的sDSS1蛋白是以个体自身sDSS1蛋白为靶点,通过外源药物影响个体自身sDSS1蛋白的水平。

17. 根据权利要求16所述的应用,其特征在於,所述的药物是以sDSS1蛋白、sDSS1蛋白的基因、sDSS1的基因的调控元件、sDSS1的基因的转录产物为药物作用靶点。

18. 根据权利要求16所述的应用,其特征在於,所述的药物是通过影响血液中蛋白酶/肽酶活性从而调节sDSS1蛋白在血液中的含量。

19. 根据权利要求16-18任一所述的应用,其特征在於,所述的药物是化学小分子药物、抗体、多肽/蛋白药物、核酸药物或纳米药物形成的第一种药物。

20. 根据权利要求4-19任一所述的应用,其特征在於,所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、复合体、第一种药物中的任一种成分的两种或多种的组合形成的第二种药物。

21. 根据权利要求4-19任一所述的应用,其特征在於,所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、复合体、第一种药物中的任一种成分的一种、两种或多种与医药上可用的赋形剂形成的第三种药物。

22. 根据权利要求4-8任一所述的应用,其特征在於,所述的sDSS1蛋白是通过表达体系把编码所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的核苷酸序列导入体内并表达获得的第四种蛋白。

23. 根据权利要求22所述的应用,其特征在於,所述的表达体系是真核表达质粒载体、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、杆状病毒、疱疹病毒、伪狂犬病毒、ZFN基因编辑技术、TALEN基因编辑技术、CRISPR/Cas基因编辑技术或其他医疗上可用的基因编辑技术或病毒载体。

24. 根据权利要求4-8任一所述的应用,其特征在於,所述的sDSS1蛋白是通过移植细胞在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第五种蛋白。

25. 根据权利要求24所述的应用,其特征在于,所述的细胞是任意一种人的干细胞、前体细胞或成体细胞。

26. 根据权利要求25所述的应用,其特征在于,所述的干细胞是胚胎干细胞、诱导多能干细胞、转分化得到的细胞,或者来源于原代培养的干细胞、由母细胞分化得到的多能或单能干细胞。

27. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白是通过血清、组织间液输注引入个体体内的第六种蛋白。

28. 根据权利要求4-8任一所述的应用,其特征在于,所述的sDSS1蛋白是通过移植组织或器官在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第七种蛋白。

29. 根据权利要求28所述的应用,其特征在于,所述的组织是脑、肝、肾、脾、胰岛的完整器官或部分组织块,或血液、脂肪、肌肉、骨髓、皮肤。

30. 根据权利要求1-29任一所述的应用,其特征在于,所述的预防药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、药物组合、表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

31. 根据权利要求1-29任一所述的应用,其特征在于,所述的治疗药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物、第二种药物、第三种药物、在表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

32. 一种蛋白在改善肾病护理设备中的应用,其特征在于,其是利用权利要求4-15任一所述的蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用,再将制备的药物用于提高肾病护理相关的医疗器械的性能。

33. 根据权利要求32所述的蛋白在改善肾病护理设备中的应用,其特征在于,所述的医疗器械包括包括输采血设备和耗材、血液净化设备和耗材、血液净化设备辅助装置和耗材、体液处理设备和耗材、肾透析设备和耗材、腹膜透析设备和耗材、输液器具、注射器具、缓释器具、人工肾脏中的一种或多种。

一种蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及sDSS1蛋白在制备预防和治疗肾病的药物中的应用,以及在改善肾病护理设备中的应用。

背景技术

[0002] 慢性肾病(Chronic kidney disease,CKD)是长期进行性肾结构以及肾功能改变的疾病,其中肾结构的病变一般包括囊肿、癌变、畸形以及萎缩等;而肾功能的异常主要表现为水肿、高血压、尿液组份异常等现象[1,2]。越来越多的研究发现,在慢性肾病患者的血液中肌酐、尿素氮以及晚期氧化蛋白产物(Advanced oxidation protein products, AOPPs)异常升高[3]。AOPPs被认为是导致慢性肾病的重要因素之一[4-6]。

[0003] AOPPs是一类具有双酪氨酸结构特征的氧化蛋白产物,是公认的反映体内氧化应激水平的生物标志物之一[7]。血液中AOPPs主要来自于白蛋白的氧化。肾功能衰竭、肾透析、糖尿病、动脉粥样硬化以及一些炎症性疾病患者中血液或组织中AOPPs水平均显著升高[8,9]。血液AOPPs水平增加与肾小球滤过率的损伤成正比[10]。AOPPs可通过作用于受体激活下游信号通路,增加活性氧及炎症因子的产生,进而损伤血管内皮细胞、肾小管上皮细胞、足细胞等的活力和功能。AOPPs还可激活肾素血管紧张素系统[11]。大鼠静脉给予AOPPs会导致尿蛋白增加及肾脏炎症[12]。因此AOPPs与慢性肾病的发生发展密切相关。通过清除或干扰AOPPs及其下游信号可成为预防或治疗慢性肾病的潜在途径。

[0004] Shfml(split hand/split foot malformation type 1)基因是人蟹爪病中的关键基因之一,进化上高度保守,它所编码的蛋白DSS1参与到稳定基因组、同源基因重组、DNA损伤修复、蛋白降解和细胞增殖等过程[13-17]。本专利发明人的研究结果显示DSS1蛋白作为标签可以通过耗能的酶促反应添加到氧化蛋白上,帮助细胞清除氧化蛋白[18]。这些结果显示DSS1蛋白在生物活动中的重要作用。

[0005] 以上内容的引文如下:

[0006] 1.Kidney Disease:Improving Glabal Outcomes(KDIGO)CKD Work Group(2013) KDIGO 2012clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease.Kidney Int.Suppl.3,1-150.

[0007] 2.Zaccali C.et al.(2017)The systemic nature of CKD.Nat Rev Nephrol.13(6):344-358.

[0008] 3.Tucker PS,Dalbo VJ,Han T,Kingsley MI(2013)Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease.Biomarkers 18:103-115.

[0009] 4.Liang M,Li A,Lou A,Zhang X,Chen Y,Yang L,Li Y,Yang S,Hou FF(2017)Advanced oxidation protein products promote NADPH oxidase-dependent β -cell destruction and dysfunction through the Bcl-2/Bax apoptotic pathway.Lab Invest 97(7):792-805.

[0010] 5.Li HY,Hou FF,Zhang X,Chen PY,Liu SX,Feng JX,Liu ZQ,Shan YX,Wang GB,

Zhou ZM, Tian JW, Xie D (2007) Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol*. 18 (2) :528-38.

[0011] 6. Cao W, Hou FF, Nie J (2011) AOPPs and the progression of kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 4(1) :102-106.

[0012] 7. Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Stempak B, Cwiklińska A, **Ziętkiewicz M**, Renke M, Rutkowski B (2011) Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*. 34(1) :12-9.

[0013] 8. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 49 (5) :1304-13.

[0014] 9. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *The Journal of Immunology* 161 (5) : 2524-32.

[0015] 10. **Šebeková K**, Klenovicsová K, Ferenczová J, Hedvig J, Podracká Lu, Heidland A (2012) Advanced oxidation protein products and advanced glycation end products in children and adolescents with chronic renal insufficiency. *Journal of Renal Nutrition* 22 (1) :143-8.

[0016] 11. Cao W, Xu J, Zhou ZM, Wang GB, Hou FF, Nie J (2013) Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. *Antioxidants & redox signaling* 18 (1) :19-35.

[0017] 12. Li HY, Hou FF, Zhang X, Chen PY, Liu SX, Feng JX, Liu ZQ, Shan YX, Wang GB, Zhou ZM, Tian JW, Xie D (2007) Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol*. 18 (2) :528-38.

[0018] 13. Van Silfhout AT, van den Akker PC, Dijkhuizen T, Verheij JB, Olderode-Berends MJ, Kok K, Sikkema-Raddatz B, van Ravenswaaij-Arts CM (2009) Split hand/foot malformation due to chromosome 7q aberrations (SHFM1): additional support for functional haploinsufficiency as the causative mechanism. *Eur J Hum Genet* 17 (11) :1432-8.

[0019] 14. Li J, Zou C, Bai Y, Wazer DE, Band V, Gao Q (2006) DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene* 25:1186-1194.

[0020] 15. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer WD (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17:1260-1262.

[0021] 16. Zhou Q, Kojic M, Cao Z, Lisby M, Mazloun NA, Holloman WK (2007) Dss1 interaction with Brh2 as a regulatory mechanism for recombinational

repair.Mol Cell Biol 2:2512-2526.

[0022] 17.Kragelund,B.B.,**Schenstrøm**,S.M.,Rebula,C.A.,Panse,V.G.,&Hartmann-Petersen,R(2016)DSS1/Sem1,a multifunctional and intrinsically disordered protein.Trends in biochemical sciences41:446-459.

[0023] 18.Zhang Y,Chang FM,Huang J,Junco JJ,Maffi SK,Pridgen HI,Catano G,Dang H,Ding X,Yang F,Kim DJ,Slaga TJ,He R,Wei S J(2014)DSSylation,a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress,and facilitates their degradation in cells.Protein Cell 5(2):124-40.

发明内容

[0024] 在本发明中,我们(发明人)提供的sDSS1蛋白可以与AOPPs结合,降低AOPPs引起的细胞毒性及活性氧的产生。sDSS1蛋白可降低AOPPs的水平,显著改善肾脏功能。因此,sDSS1蛋白具备临床上制备预防和治疗肾病的药物,以及改善肾病护理设备的潜力。

[0025] 具体的技术方案如下:

[0026] 一种蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用,所述的应用是把sDSS1蛋白用于制备预防和治疗肾病的药物。

[0027] 优选地,所述的肾病包括第1期慢性肾病 $GFR \geq 90\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 、第2期慢性肾病 GFR 为 $60 \sim 89\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 、第3期慢性肾病 GFR 为 $30 \sim 59\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 、第4期慢性肾病 GFR 为 $15 \sim 29\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 或第5期慢性肾病 $GFR < 15\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 。

[0028] 优选地,所述的肾病具有AOPP增加特征,包括糖尿病肾病、IgA肾病、膜性肾病、急性肾损伤、狼疮肾炎、血管球性肾炎、多囊肾病或慢性肾小球肾炎。

[0029] 优选地,所述的sDSS1蛋白包括人、黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、白颊长臂猿、川金丝猴、恒河猴、滇金丝猴、东非狒狒、安哥拉疣猴、白顶白眉猴、鬼狒、豚尾猴中的任一sDSS1蛋白序列形成的基础蛋白,其中人sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1,黑猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:2,倭黑猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:3,大猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4,红毛猩猩sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5,白颊长臂猿sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:6,川金丝猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7,恒河猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:8,滇金丝猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9,东非狒狒sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:10,安哥拉疣猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:11,白顶白眉猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12,鬼狒sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13,豚尾猴sDSS1的氨基酸序列如SEQ ID NO:14。

[0030] 优选地,所述的sDSS1蛋白是任一与基础蛋白相似度达到70%以上的第一种蛋白。

[0031] 优选地,所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白氮端58个氨基酸为基础,在氮端或碳端融合其他多肽片段,用于融合的多肽片段的结构特征或氨基酸序列特征与所述的基础蛋白碳端31个序列相同或相似的第二种蛋白。

[0032] 优选地,所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白氮端58个氨基酸为基础,在氮端或碳端融合其他氨基酸片段,融合后的蛋白能实现跨膜转运功能的第三种蛋白。

[0033] 优选地,所述的sDSS1蛋白是所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白或第三种蛋白与该种蛋白自身、载体蛋白、抗体或其他任意长度氨基酸片段连接形成的融合蛋白。

[0034] 优选地,所述sDSS1蛋白是基于所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白进行的修饰产生的多肽/蛋白修饰物。

[0035] 优选地,所述的多肽/蛋白修饰物是针对氨基酸侧链上的氨基、氨基酸侧链上的羰基、氮末端氨基、碳末端羰基、半胱氨酸、酪氨酸、丝氨酸、色氨酸进行的特异性或非特异性的1-20个位点的化学修饰。

[0036] 优选地,所述多肽/蛋白修饰物的修饰方法包括糖基化修饰、脂肪酸修饰、酰基化修饰、Fc片段融合、白蛋白融合、聚乙二醇修饰、右旋糖苷修饰、肝素修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、聚氨基酸修饰、多聚唾液酸修饰、壳聚糖及其衍生物修饰、凝集素修饰、海藻酸钠修饰、卡波姆修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、羟丙基甲基纤维素修饰、羟丙基纤维素修饰、乙酰化修饰、甲酰化修饰、磷酸化修饰、甲基化修饰、磺酸化修饰以及其他医药上可用的多肽/蛋白药物修饰方法的一种或一种以上。

[0037] 优选地,所述sDSS1蛋白是利用所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的氨基酸序列为基础进行的20种基本氨基酸以外的氨基酸进行的1-31个任意氨基酸位点替换的非天然氨基酸替代蛋白。

[0038] 优选地,所述非天然氨基酸替代蛋白的氨基酸替换包括替换成羟脯氨酸、羟赖氨酸、硒代半胱氨酸、D-型氨基酸或者人工合成的非天然氨基酸及其衍生物。

[0039] 优选地,所述sDSS1蛋白是把所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或非天然氨基酸替代蛋白与医药上可应用的药物载体形成的部分或全部复合体。

[0040] 优选地,所述复合体的药物载体包含肠溶衣制剂、胶囊、微球/囊、脂质体、微乳液、复乳液、纳米颗粒、磁颗粒、明胶和凝胶中的一种或一种以上。

[0041] 优选地,所述sDSS1蛋白是以个体自身sDSS1蛋白为靶点,通过外源药物影响个体自身sDSS1蛋白的水平。

[0042] 优选地,所述的药物是以sDSS1蛋白、sDSS1蛋白的基因、sDSS1的基因的调控元件、sDSS1的基因的转录产物为药物作用靶点。

[0043] 优选地,所述的药物是通过影响血液中蛋白酶/肽酶活性从而调节sDSS1蛋白在血液中的含量。

[0044] 优选地,所述的药物是化学小分子药物、抗体、多肽/蛋白药物、核酸药物或纳米药物形成的第一种药物。

[0045] 优选地,所述sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、复合体、第一种药物中的任一种成分的两种或多种的组合形成的第二种药物。

[0046] 优选地,所述sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、复合体、第一种药物中的任一种成分的一种、两种或多种与医药上可用的赋形剂形成的第三种药物。

[0047] 优选地,所述sDSS1蛋白是通过表达体系把编码所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的核苷酸序列导入体内并表达获得的第四种蛋白。

[0048] 优选地,所述的表达体系是真核表达质粒载体、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、杆状病毒、疱疹病毒、伪狂犬病毒、ZFN基因编辑技术、TALEN基因编辑技术、CRISPR/

Cas基因编辑技术或其他医疗上可用的基因编辑技术或病毒载体。

[0049] 优选地,所述的sDSS1蛋白是通过移植细胞在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第五种蛋白。

[0050] 优选地,所述的细胞是任意一种人的干细胞、前体细胞或成体细胞。

[0051] 优选地,所述的干细胞是胚胎干细胞、诱导多能干细胞、转分化得到的细胞,或者来源于原代培养的干细胞、由母细胞分化得到的多能或单能干细胞。

[0052] 优选地,所述的sDSS1蛋白是通过血清、组织间液输注引入个体体内的第六种蛋白。

[0053] 优选地,所述的sDSS1蛋白是通过移植组织或器官在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第七种蛋白。

[0054] 优选地,所述的组织是脑、肝、肾、脾、胰岛的完整器官或部分组织块,或血液、脂肪、肌肉、骨髓、皮肤。

[0055] 优选地,所述的预防药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、药物组合、表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

[0056] 优选地,所述的治疗药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物、第二种药物、第三种药物、在表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

[0057] 一种蛋白在改善肾病护理设备中的应用,其是利用上述任一方案所述的蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用,再将制备的药物用于提高肾病护理相关的医疗器械的性能。

[0058] 优选地,所述的医疗器械包括包括输采血设备和耗材、血液净化设备和耗材、血液净化设备辅助装置和耗材、体液处理设备和耗材、肾透析设备和耗材、腹膜透析设备和耗材、输液器具、注射器具、缓释器具、人工肾脏中的一种或多种。

[0059] 本发明的特点和/或有益效果有:

[0060] 1. 本发明提供的sDSS1蛋白与AOPPs蛋白结合,抑制AOPPs蛋白与其受体蛋白(晚期糖化蛋白受体,RAGE)的结合能力,有效缓解AOPPs蛋白引起的细胞毒性。

[0061] 2. 本发明提供的sDSS1蛋白在慢性肾病SD大鼠模型上显著改善降低尿微量白蛋白排泄量,改善肾功能。

[0062] 3. 本发明提供的sDSS1蛋白是人和其他灵长类动物所具有的蛋白,分子量相对较小,免疫原性低,并且体内存在天然的蛋白降解机制,因此,临床应用不会引起明显的免疫反应或其他的毒副效应,安全可靠。

[0063] 综上,本发明提供了一种用于慢性肾病治疗的sDSS1蛋白药物,通过分子水平、细胞水平和动物水平的实验验证,sDSS1蛋白可以与AOPPs蛋白结合,降低AOPPs蛋白与受体的结合效率。在动物实验中,sDSS1蛋白可有效降低慢性肾病大鼠尿微量白蛋白的排泄,改善肾功能,缓解疾病症状。sDSS1蛋白免疫原性较低,药效显著,具备用于临床上制备预防和治疗肾病的潜力,或者用于改善肾病护理设备的性能。

附图说明

[0064] 下面结合附图,对本发明做进一步详细的阐述,以使本发明能够清楚、完整,但不是为了限制本发明的保护范围。

[0065] 图1.分子实验显示sDSS1可以与AOPPs发生相互作用。AOPPs蛋白或AOPPs蛋白与sDSS1孵育产物经SDS-PAGE分离并用考马斯亮蓝染色,结果显示AOPPs可以与sDSS1蛋白发生相互作用,形成的复合物分子量大于25KD,在50KD-250KD之间非常明显(L3、L5、L7),并且,复合物的形成与sDSS1蛋白浓度成正比,呈现明显的浓度依赖。与单独sDSS1蛋白相比,AOPPs反应体系中的sDSS1蛋白的条带(分子量约15KD)显著变浅。

[0066] 图2.sDSS1蛋白可以屏蔽AOPPs与其受体蛋白的相互作用。AOPPs与sDSS1蛋白孵育后,再与糖基化蛋白受体蛋白(RAGE)孵育,孵育产物用SDS-PAGE分离并用考马斯亮蓝染色。结果显示,sDSS1蛋白与RAGE混合物形成两个清晰的条带,分别是RAGE(48KD)和sDSS1(13.88KD),提示没有明显的相互作用(L4)。AOPPs与sDSS1蛋白发生相互作用,形成弥散的拖尾(L5)。AOPPs与RAGE存在相互作用,显示RAGE条带变浅,出现明显的拖尾效应(L6)。反应体系中加入sDSS1蛋白后,RAGE条带随着sDSS1蛋白浓度增加逐渐加深,弥散性拖尾逐渐加深(L7、L8、L9)。

[0067] 图3A-图3B.sDSS1蛋白降低AOPPs导致的细胞毒性。

[0068] 图3A,在大鼠肾细胞培养物中添加10 μ M AOPPs可以显著降低细胞活力水平,添加不同浓度的sDSS1蛋白后,细胞活力被挽回,随着sDSS1蛋白浓度增加,细胞活力逐渐上升。30 μ M sDSS1蛋白可以完全屏蔽10 μ M AOPPs导致的细胞活力水平下降。

[0069] 图3B,检测细胞的毒性反应水平发现,sDSS1蛋白可以降低AOPPs引起的细胞毒性水平,且该效应呈现典型的剂量依赖效应。每组N=6。数据经ANOVA分析,#,含sDSS1的AOPPs组vs单独AOPPs组,* ,所有含AOPPs组vs不含AOPPs组;#,p-value<0.05;##、**,p-value<0.01;###、***,p-value<0.001。

[0070] 图4.sDSS1蛋白降低对AOPPs引起的细胞氧化应激反应。在培养液中添加AOPPs可以刺激细胞ROS水平显著增加,加入sDSS1蛋白后,细胞ROS水平下降。随着sDSS1浓度增加,下降越来越显著。

[0071] 图5A-图5B.sDSS1蛋白长时间注射缓解慢性肾病模型大鼠的疾病症状。

[0072] 图5A,慢性肾病模型大鼠尿液由于肾脏损伤,尿液白蛋白含量显著高于对照组。经过3周连续sDSS1蛋白注射,蛋白给药组动物的尿蛋白含量显著降低,而生理盐水对照组的尿蛋白含量保持较高水平。

[0073] 图5B,处死大鼠,检查大鼠的肾脏指数,结果发现蛋白给药组大鼠的肾脏指数有显著的恢复,与对照组大鼠没有显著差别,而生理盐水注射组大鼠的肾脏指数明显偏高。每组N=5。数据经ANOVA分析,* ,p-value<0.05;##、**,p-value<0.01。

具体实施方式

[0074] 以下内容将结合实例对本发明中的优选方案进行说明和验证,不是对本发明的范围进行限定。本发明的所有范围限定以权利要求书中的限定为准。

[0075] 下述实施案例中所用的实验方法如无特殊说明,均为常规实验方法。

[0076] 下述实施案例中所用的sDSS1蛋白为本公司自行生产并进行质量控制,经检测蛋白纯度大于95%,内毒素(内毒素含量小于3EU/mg蛋白)和其他杂质残留符合标准,可用于动物实验而不引起明显的动物毒性反应。

[0077] 下述实施案例中材料和试剂,除了sDSS1蛋白其他均可以通过商业途径获取。

[0078] 实施例1.sDSS1蛋白与AOPPs存在相互作用。

[0079] 1.1.实验材料与方法

[0080] 材料:牛血清白蛋白(阿拉丁,A104912),次氯酸钠(阿拉丁,S01636)。

[0081] 方法:将牛血清白蛋白和次氯酸钠避光反应30分钟,反应产物在PBS溶液中透析过夜,制备得到AOPPs蛋白。AOPPs蛋白用BCA试剂盒(ThermoFisher Scientific,23252)进行蛋白定量。然后分别将2 μ g的AOPPs、1 μ g的sDSS1、1 μ g的sDSS1与2 μ g的AOPPs、2 μ g的sDSS1、2 μ g的sDSS1与2 μ g的AOPPs、4 μ g的sDSS1、4 μ g的sDSS1与2 μ g的AOPPs加入1.5mL EP管,4 $^{\circ}$ C反应过夜。孵育产物加入上样缓冲液后,混匀,100 $^{\circ}$ C变性处理10分钟制成上样样品。样品用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,PAGE胶进行考马斯亮蓝染色显示蛋白条带。

[0082] 1.2.实验结果

[0083] 在染色后的PAGE胶上可以看到,制得的AOPPs蛋白分子量1KD-37KD不等,形成弥散的条带(L2),sDSS1蛋白分子量在13.88KD(L1、L4、L6)。当把AOPPs与sDSS1蛋白进行混合孵育时,可以看到AOPPs蛋白的弥散条带基本消失,而在50KD-250KD之间形成大分子量的弥散条带(L3、L5、L7),说明AOPPs与sDSS1蛋白发生了相互作用形成了复合物。而且,随着sDSS1比例增高,大分子量复合物的逐渐增加,显示条带颜色越来越深(图1)。这些结果说明,sDSS1蛋白可以与AOPPs发生相互作用并形成复合物,这些复合物不能被SDS-PAGE分开。

[0084] 实施例2.sDSS1蛋白降低AOPPs与受体蛋白的相互作用。

[0085] 2.1.实验材料与方法

[0086] 材料:AOPPs(根据实施例1方法制备)、终末糖基化蛋白受体蛋白(Advanced glycation end-product receptor,RAGE)(义翘神州;货号:50489-M08H-100)、sDSS1蛋白。

[0087] 方法:首先将一定质量的AOPPs与不同浓度的sDSS1蛋白混合,4 $^{\circ}$ C条件下孵育24小时。孵育后的产物中加入RAGE蛋白,继续在4 $^{\circ}$ C条件下孵育24小时。反应结束后,在产物中加入5 \times loading buffer(非变性上样缓冲液)制成上样样品。将25 μ l的样品加入SDS-PAGE中进行电泳分离,电泳条件即200V,90分钟。PAGE胶用考马斯亮蓝染色显示蛋白条带。

[0088] 2.2.实验结果

[0089] 在PAGE胶上,sDSS1蛋白与受体蛋白RAGE不能发生相互作用,在胶上显示两个清晰的条带,分别是sDSS1蛋白(13.88KD)和RAGE(48KD),没有其他的弥散条带(L4)。当AOPPs与RAGE混合时,二者可以发生相互作用,结果RAGE条带明显变浅,而AOPPs条带基本消失(L6)。但是,当反应体系中存在sDSS1蛋白时,可以看到随着sDSS1蛋白浓度增加,RAGE条带浓度越来越强,说明sDSS1蛋白抑制了AOPPs与RAGE的相互作用(L7、L8、L9)。而相应的,sDSS1蛋白与AOPPs形成的复合物的浓度越来越高,显示弥散条带颜色越来越浓(图2)。这些结果说明,sDSS1蛋白与AOPPs反应形成复合物,可以降低AOPPs与其受体蛋白的相互作用。

[0090] 实施例3.sDSS1蛋白屏蔽AOPPs引起的细胞毒性。

[0091] 3.1.实验材料与方法

[0092] 材料:NRK-52E细胞株(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,目录号:GNR

8), DMEM培养基 (HyClone, AC10210629), 二氧化碳细胞培养箱 (ThermoFisher), SpectraMax Plus384多功能酶标仪 (Molecular Devices公司), 细胞增殖/毒性检测试剂盒 (Dojindo, CK04), 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, C0017)。

[0093] 方法: NRK-52E细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM完全培养基中, 每两天传代一次。种细胞时, 首先用胰酶将细胞消化成单细胞, 按照 2×10^4 细胞每孔接种到96孔板。细胞贴壁过夜, 完成后换成无血清培养基, 饥饿处理24小时。细胞按照实验需要分成7组, 每组6个复孔, 各组分别加入空白培养基、10 μ M AOPPs、10 μ M AOPPs和0.3 μ M sDSS1、10 μ M AOPPs和1 μ M sDSS1、10 μ M AOPPs和3 μ M sDSS1、10 μ M AOPPs和10 μ M sDSS1、10 μ M AOPPs和30 μ M sDSS1。完成后, 细胞继续放在二氧化碳细胞培养箱处理48小时。处理完成的细胞使用细胞增殖毒性检测试剂盒进行细胞活力水平检测。收集培养基, 100g离心后收集上清液用于乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒进行细胞毒性水平检测。

[0094] 3.2. 实验结果

[0095] 细胞活力检测结果显示, 当NRK-52E细胞中只加入10 μ M AOPPs时, 细胞活性水平显著降低, 只有对照细胞的25%左右。当sDSS1蛋白加入培养基之后, 细胞活力逐渐提高。在0.3 μ M-30 μ M范围内, 随着sDSS1蛋白浓度增加, 细胞活性增强愈加显著, 呈现浓度依赖性。30 μ M sDSS1蛋白添加到培养基中不仅能完全屏蔽AOPPs引起的细胞活力下降, 甚至能促进细胞活力增加, 高于对照组细胞 (图3A)。利用乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒检测细胞毒性反应水平, 10 μ M AOPPs可以引起细胞明显的细胞毒性, 表现为培养液中乳酸脱氢酶含量显著增加。随着sDSS1蛋白加入培养基之后, 乳酸脱氢酶释放量逐渐降低, sDSS1蛋白的效应呈现浓度依赖性 (图3B)。这些结果说明, sDSS1蛋白可以屏蔽AOPPs引起的细胞毒性, 保护细胞活力。

[0096] 实施例4. sDSS1蛋白降低AOPPs引起的细胞氧化应激反应。

[0097] 4.1. 实验材料与方法

[0098] 实验材料: NRK-52E细胞; 活性氧检测试剂盒 (碧云天, 货号S0033); 牛血清白蛋白组分V (阿拉丁A104912-100g); DMEM培养基 (HyClone, AC10210629); 流式细胞仪 (Millipore, Guava easycyto)

[0099] 方法: 将NRK-52E细胞消化成单细胞就按照 1×10^5 个/孔的密度铺于细胞培养6孔板, 细胞贴壁过夜。细胞贴壁完成后, 换成无血清的培养基 (含有0.1%牛血清白蛋白) 饥饿处理24小时; 饥饿之后, 加入浓度分别为3 μ M、30 μ M、100 μ M的sDSS1于6孔板中, 同时加入终浓度为10 μ M的AOPPs, 另外设置Control、AOPPs (10 μ M) 和BSA (10 μ M) 孔作为对照, 处理48小时; 48小时之后每孔加入1mL稀释好的DCFH-DA (10 μ M), 37 $^{\circ}$ C细胞培养箱内孵育20分钟; 用无血清细胞培养液洗涤细胞2次, 以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA; 流式细胞仪检测, 使用488nm激发波长, 525nm发射波长, 检测DCFH的荧光强度, 反应细胞ROS水平;

[0100] 4.2. 实验结果

[0101] AOPPs加入细胞培养基中能显著刺激细胞的氧化应激反应, 结果细胞ROS水平显著增加, 表现为DCFH荧光强度比对照组和含10 μ M BSA组的更高。在培养液中加入sDSS1蛋白后, AOPPs引起的细胞氧化应激反应逐渐下降, 30 μ M sDSS1蛋白组的细胞ROS水平与10 μ M BSA水平基本相同, 低于对照组细胞 (图4)。这些结果说明, sDSS1蛋白可以降低AOPPs引起的细胞氧化应激反应。

[0102] 实施例5. sDSS1蛋白缓解CKD模型SD大鼠的疾病症状

[0103] 5.1. 实验材料与方法

[0104] 5.1.1. 实验动物

[0105] SD雄性大鼠, 体重180-220g, 购于上海斯莱克实验动物中心, 实验前动物置于动物房适应一周。

[0106] 5.1.2. 实验试剂

[0107] 实验药品: sDSS1蛋白

[0108] 试剂: 大鼠尿微量白蛋白 (MAU) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, E-EL-R0025c); 注射用阿霉素 (Pfizer); 高蛋白饲料 (上海普路腾生物科技股份有限公司)。

[0109] 5.2. 动物分组、造模和给药

[0110] 造模: CKD模型大鼠是慢性肾病疾病模型。采用尾静脉注射阿霉素, 同时辅助高蛋白饮食, 连续进行高蛋白饮食3周后, 采集大鼠尿液, 进行尿蛋白水平检测, 确认大鼠的尿蛋白水平显著提高, 证明诱导大鼠的CKD模型成功, 剔除尿蛋白水平没有显著提高的大鼠。

[0111] 分组: 造模成果的大鼠分为2组, 包括CKD模型组和sDSS1给药组, 每组5只。没有进行造模的同笼大鼠作为阴性对照组, 供5只。

[0112] 给药: sDSS1组给药按照50mg/kg每天腹腔注射sDSS1蛋白溶液1次, 给药体积3mL, 连续注射3周。CKD模型组和阴性对照组每天注射等体积生理盐水。

[0113] 5.3. 检测指标及检测方法

[0114] 给药前和给药结束后4小时各收集一次大鼠尿液, 并使用酶联免疫吸附测定试剂盒测定24小时尿微量白蛋白量。

[0115] Elisa检测尿蛋白水平: 在各孔中加入标准品或样品各100 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育90分钟; 倒去孔内液体, 加入100 μ L生物素化抗体工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育60分钟; 洗涤3次; 加入100 μ L酶结合工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育30分钟; 洗涤5次; 加入90 μ L底物溶液, 37 $^{\circ}$ C孵育15分钟; 加入50 μ L终止液, 立即在450nm波长处测量OD值; 计算结果。

[0116] 肾脏指数: 给药完成后, 取出肾脏, 称重并计算肾脏指数 (肾脏指数 = 肾脏重量 (g) / 体重 (g) \times 100%), 相关结果见图5B。

[0117] 5.4. 实验结果

[0118] 根据尿蛋白检测结果, 在开始给药前, 测定CKD模型小鼠的尿蛋白含量显著提高, 平均高于阴性对照小鼠2倍以上, 证明制作CKD模型成功。连续注射sDSS1蛋白3周以后, 发现给药组的尿蛋白水平显著下降, 低于CKD模型组 (图5A), 说明sDSS1蛋白有效恢复了CKD模型大鼠的肾脏功能。继续检测大鼠的肾脏指数, 结果显示, sDSS1蛋白给药组大鼠的肾脏指数基本恢复到对照组大鼠的水平, 显著好于CKD模型组大鼠 (图5B)。这些结果说明, sDSS1可以有效改善CKD模型大鼠的疾病症状。

序列表

<110> 上海清流生物医药科技有限公司

<120> 一种蛋白在制备预防和治疗肾病药物中的应用

<160> 14

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 89

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1           5           10           15
Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
           20           25           30
Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
           35           40           45
Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
           50           55           60
Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
65           70           75           80
Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
           85

```

<210> 2

<211> 89

<212> PRT

<213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)

<400> 2

```

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1           5           10           15
Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
           20           25           30
Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
           35           40           45
Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
           50           55           60
Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
65           70           75           80
Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys

```

85

<210> 3

<211> 89

<212> PRT

<213> 倭黑猩猩 (Panpaniscus)

<400> 3

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45
 Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
 50 55 60
 Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys

85

<210> 4

<211> 89

<212> PRT

<213> 大猩猩 (Nomascusleucogenys)

<400> 4

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45
 Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Val
 50 55 60
 Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Glu
 65 70 75 80
 Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys

85

<210> 5

<211> 89

<212> PRT

<213> 红毛猩猩 (Gorillagorilla)

<400> 5

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45
 Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Val Thr Val Leu Leu Met Ile
 50 55 60
 Leu Val Cys Glu Thr Leu Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
 85

<210> 6

<211> 89

<212> PRT

<213> 白颊长臂猿 (*Pongoabelii*)

<400> 6

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45
 Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Ile Leu Leu Met Ile
 50 55 60
 Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
 85

<210> 7

<211> 89

<212> PRT

<213> 川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*)

<400> 7

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45
 Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
 50 55 60
 Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
 85

<210> 8

<211> 89

<212> PRT

<213> 恒河猴 (Macacamulatta)

<400> 8

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45
 Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
 50 55 60
 Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
 85

<210> 9

<211> 89

<212> PRT

<213> 滇金丝猴 (Rhinopithecusbieti)

<400> 9

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45
 Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
 50 55 60
 Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly

65	70	75	80
Arg Met Cys Ile	Ala Phe Leu Cys Cys		
	85		
<210> 10			
<211> 89			
<212> PRT			
<213> 东非狒狒 (Colobus angolensis)			
<400> 10			
Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp			
1	5	10	15
Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu			
	20	25	30
Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val			
	35	40	45
Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Lys			
	50	55	60
Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly			
65	70	75	80
Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys			
	85		
<210> 11			
<211> 89			
<212> PRT			
<213> 安哥拉疣猴 (Cercocebus atys)			
<400> 11			
Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp			
1	5	10	15
Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu			
	20	25	30
Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val			
	35	40	45
Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile			
	50	55	60
Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly			
65	70	75	80
Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys			
	85		
<210> 12			
<211> 89			

<212> PRT

<213> 白顶白眉猴 (*M. leucophaeus*)

<400> 12

```

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1           5           10           15
Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
           20           25           30
Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
           35           40           45
Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
           50           55           60
Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65           70           75           80
Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
           85

```

<210> 13

<211> 89

<212> PRT

<213> 鬼狒 (*Macacanemestrina*)

<400> 13

```

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1           5           10           15
Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
           20           25           30
Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
           35           40           45
Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
           50           55           60
Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65           70           75           80
Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
           85

```

<210> 14

<211> 89

<212> PRT

<213> 豚尾猴 (*Papioanubis*)

<400> 14

```

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1           5           10           15

```

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30
Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45
Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60
Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80
Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

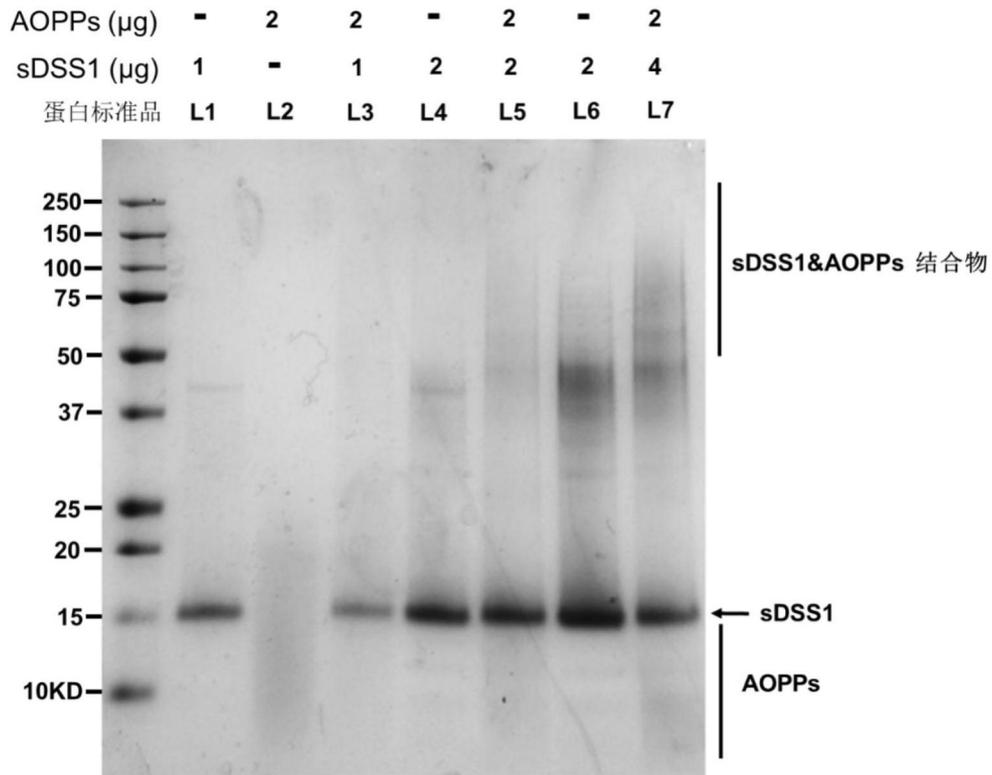


图1

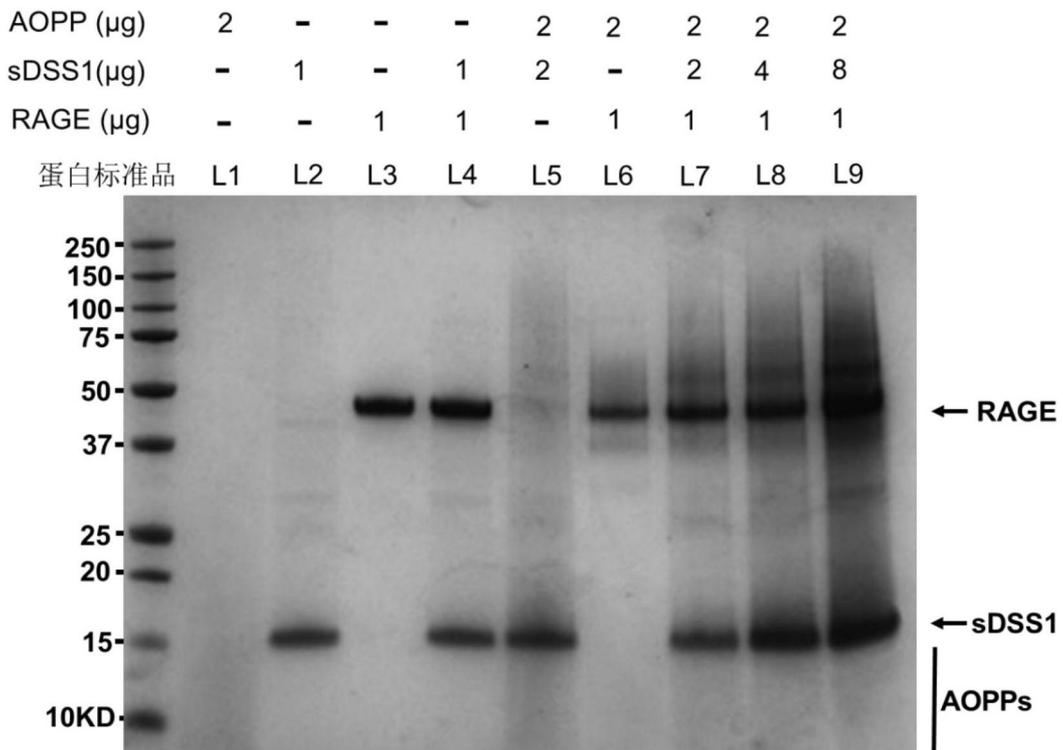


图2

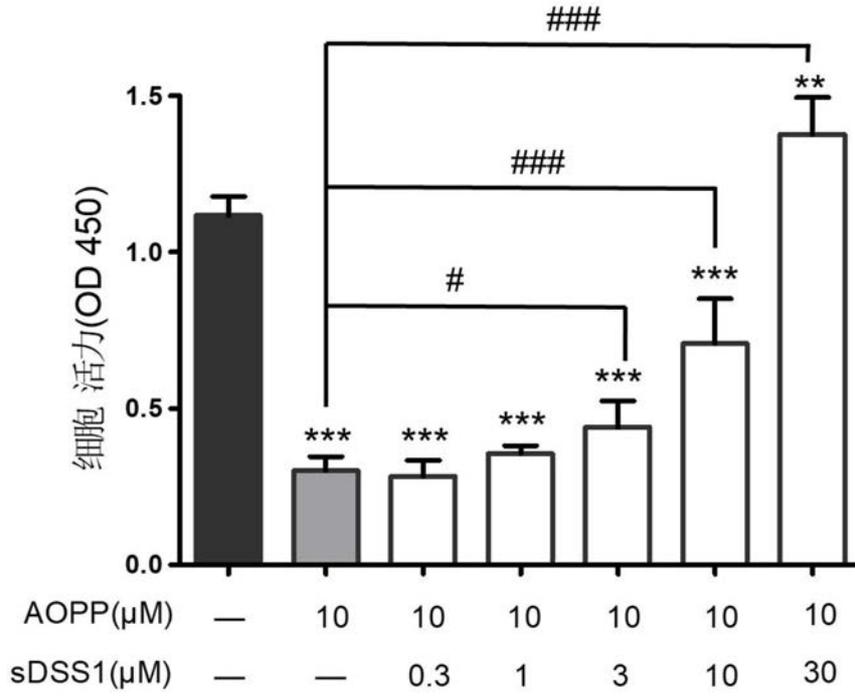


图3A

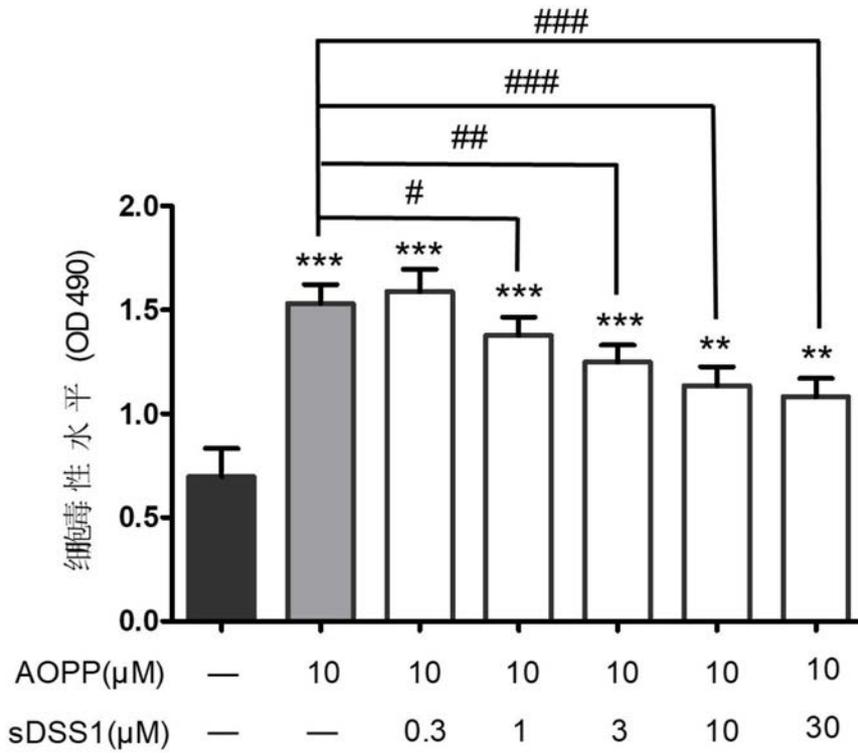


图3B

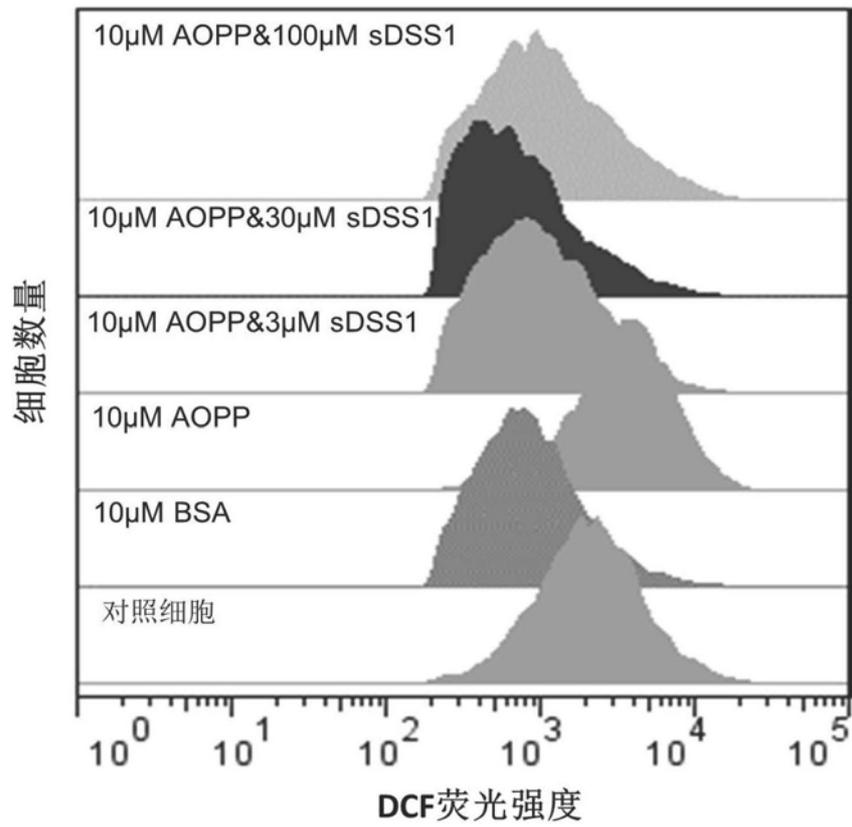


图4

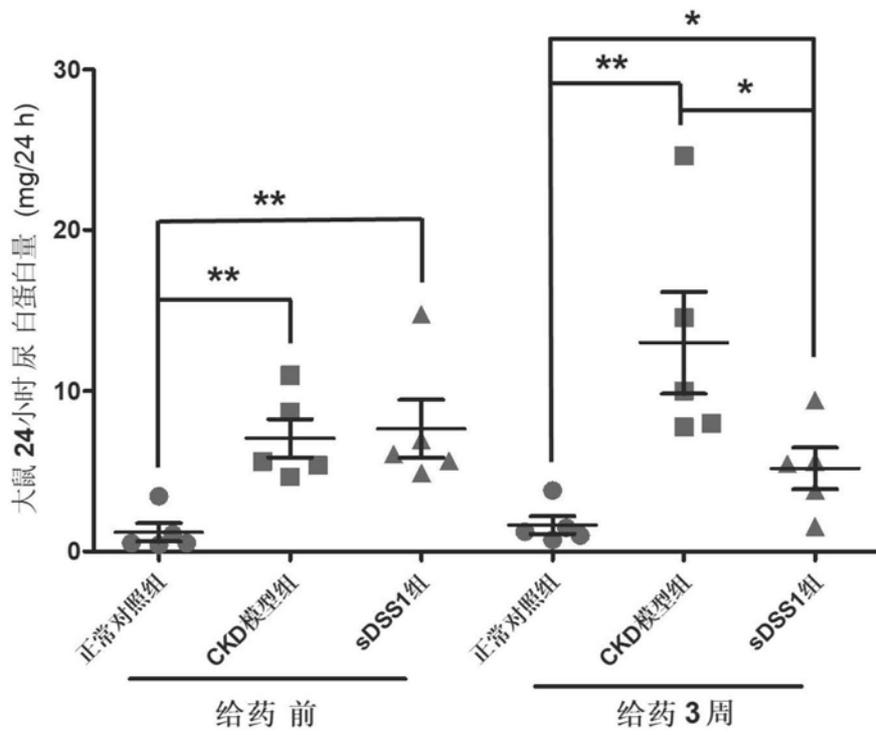


图5A

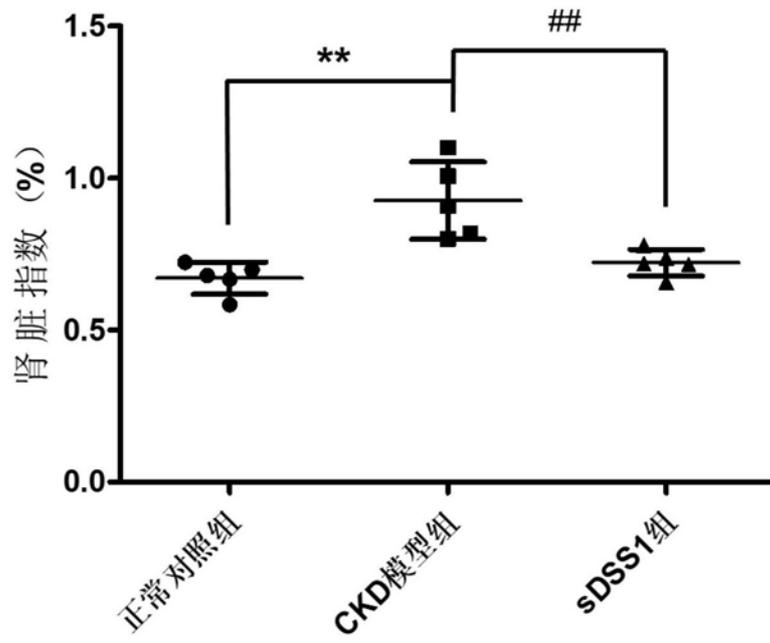


图5B