(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113614101 B
(45)授权公告日 2024.07.16

(21)申请号 202080015845.1
(22)申请日 2020.02.24
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113614101 A
(43)申请公布日 2021.11.05
(30)优先权数据
62/809,167 2019.02.22 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/019557 2020.02.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/172686 EN 2020.08.27
(73)专利权人 洛约拉马利蒙特大学
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 圣玛丽山大学
(72)发明人 D·莫菲特 L·诺盖
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
专利代理师 李栋修 武胍
(51)Int.Cl.
C07K 14/46(2006.01)
C07K 14/62(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 38/28(2006.01)
A61P 5/50(2006.01)

(56)对比文件
CN 110402308 A,2019.11.01
CN 112225808 A,2021.01.15
CN 112672755 A,2021.04.16
Pollen,A.等.IAPP isoform 5, partial [Pan troglodytes].《Genbank database》.2018,Accession NO. PNI98857.1.
Neşe Kurt等.The Burial of Solvent-Accessible Surface Area Is a Predictor of Polypeptide Folding and Misfolding as a Function of Chain Elongation.《Journal of the American chemical society》.2005,第127卷(第45期),第15690-15691页.
Ayano Fox等.Selection for Nonamyloidogenic Mutants of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Identifies an Extended Region for Amyloidogenicity.《Biochemistry》.2010,第49卷(第36期),第7783-7789页.
Pollen,A.等.IAPP isoform 5, partial [Pan troglodytes].《Genbank database》.2018,Accession NO. PNI98857.1.
Neşe Kurt等.The Burial of Solvent-Accessible Surface Area Is a Predictor of Polypeptide Folding and Misfolding as a Function of Chain Elongation.《Journal of the American chemical society》.2005,第127卷(第45期),第15690-15691页.

审查员 龙添珍

权利要求书1页 说明书12页
序列表21页 附图21页

(54)发明名称

淀粉样肽的变体

(57)摘要

抑制人胰岛淀粉样多肽聚集的IAPP肽,及其在抑制淀粉样原纤维形成中的应用。

CN 113614101 B

1.一种由选自由SEQ ID NO:65-68组成的组的氨基酸序列表示的IAPP肽。

2.一种药物组合物,其包括权利要求1所述的IAPP肽和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

3.权利要求1所述的IAPP肽在制备用于治疗2型糖尿病的药物中的应用。

4.如权利要求3所述的应用,其中,所述IAPP肽选自由SEQ ID NO:66-68组成的组。

淀粉样肽的变体

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2019年2月22日提交的题为用于治疗糖尿病的淀粉样肽变体(AMYLOID PEPTIDE VARIANTS FOR THE TREATMENT OF DIABETES)的美国专利申请62/809,167号的优先权。

背景技术

[0003] 已知许多蛋白质采用替代性的、错误折叠的结构,这可能与各种疾病有关。2型糖尿病中的人胰岛淀粉样多肽(hIAPP,胰淀素(amylin))、阿尔茨海默病中的Aβ42和帕金森病中的α-突触核蛋白等蛋白质都已知会错误折叠并聚集成有毒的低聚物和纤维。虽然已知的是这些错误折叠的蛋白质对细胞是有毒的,但它们在这些疾病的进展中发挥的确切作用仍然是个谜。

[0004] 淀粉样蛋白疾病对人健康构成了严重威胁。在过去十年中,已充分记录与2型糖尿病相关的经济和社会成本。美国糖尿病协会估计,美国有2580万儿童和成人患有糖尿病,约占人口的8.3%,每年有近200万新诊断的病例。由于这种疾病的发病率随着年龄的增长而增加,随着我们人口的老龄化,患2型糖尿病的人数将增加。如果没有找到预防或减缓这种疾病进展的治疗方法,据估计,在接下来40年内,仅患糖尿病的美国人就可能多达1亿人,估计每年花费超过1740亿美元。2008年,美国用于直接医疗费用的支出为1160亿美元,另外用于工作损失、残疾和过早死亡的间接费用估计为580亿美元。

[0005] 虽然肥胖是与2型糖尿病有关的明显因素,但超过70%的肥胖者没有患糖尿病,这表明其他因素影响了这种疾病的进展。与2型糖尿病进展有关的一个可能因素是淀粉样肽-胰岛淀粉样多肽(IAPP)的聚集。这种37个氨基酸的多肽是随胰岛素由胰腺β胰岛细胞共分泌的。在2型糖尿病的发展过程中,IAPP会聚集成各种不同的淀粉样状态。众所周知,IAPP在超过90%的该病患者中被发现为细胞外的淀粉样沉积物。

[0006] IAPP聚集和糖尿病之间的联系似乎也延伸到了非人。像人一样,猫和灵长类动物也会患上糖尿病。同样像人一样,猫和灵长类动物表达的IAPP变体会聚集并形成有毒的淀粉样蛋白。相反,大鼠、小鼠和仓鼠的IAPP变体不会聚集,也不会形成有毒的淀粉样物质。大鼠、小鼠和仓鼠不会自发地发生糖尿病。然而,当小鼠和大鼠被设计成表达人的IAPP时,它们确实会发展成2型糖尿病和与该疾病相关的症状。

[0007] 最近有人提出,IAPP的一种形式可能采用圆柱形折叠。虽然形成聚集体的IAPP分子的结构仍有待确定,但很明显,其中这些聚集体中的一些对细胞具有高度毒性。研究表明,合成的IAPP在添加到人胰岛β细胞以及各种其他哺乳动物细胞系中时,可作为体外的高毒性制剂。IAPP在约90%的2型糖尿病患者体内被发现为淀粉样蛋白的细胞外沉积物的形式。IAPP还显示在加入哺乳动物细胞时是体外毒剂。虽然目前还不清楚IAPP的自组装如何导致疾病的发展,但最近的研究表明,低阶蛋白聚集体(两到十个自组装蛋白)的形成导致细胞毒性,并最终导致疾病的发展。

发明内容

[0008] 我们最近鉴定了一系列的IAPP肽,其抑制人IAPP的聚集,并将哺乳动物细胞从hIAPP的毒性中拯救出来。这些IAPP变体是hIAPP聚集的有效抑制剂,可作为治疗剂和探针使用来了解淀粉蛋白的根本毒性。本发明的IAPP肽具有选自下列序列之一的氨基酸序列:

[0009] a)SEQ ID NO:15-18,

[0010] b)SEQ ID NO:26-37,

[0011] c)SEQ ID NO:42-46,

[0012] d)SEQ ID NO:53-64,和

[0013] e)SEQ ID NO:65-68。

[0014] 这些肽包括从威德尔海豹IAPP(SEQ ID NO:15-18)、浣熊IAPP(SEQ ID NO:26-37和SEQ ID NO:42-46)和鸡IAPP(SEQ ID NO:53-64和SEQ ID NO:65-68)突变的肽。在一些实施方式中,优选序列包括SEQ ID NO:16-17(WS_RL和WS_RP);SEQ ID NO:46(Rac_L26Y);SEQ ID NO:31-34(R1-27至R1-30);SEQ ID NO:66-68(Chv16L、ChI22L、ChY26L);和SEQ ID NO:59-61(C1-27至C1-29)。

[0015] 上述IAPP肽可用于抑制hIAPP在体外或体内的聚集。在一个实施方式中,这些肽可用于治疗淀粉样蛋白疾病,如糖尿病。当用于治疗应用时,所述IAPP肽可与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合,从而形成药物组合物。

[0016] 在猫、犬、鸡、北极熊、浣熊和威德尔海豹中天然存在的IAPP肽也可用于治疗淀粉样蛋白疾病和抑制hIAPP聚集。这些肽可以具有选自SEQ ID NO:2-7的序列。优选浣熊和鸡的IAPP肽。

[0017] 因此,本发明的IAPP肽可用于治疗患有淀粉样蛋白疾病的受试者的方法,该方法包括向需要的受试者施用IAPP肽的步骤,其中所述IAPP肽具有选自SEQ ID NO:2-7、SEQ ID NO:15-18、SEQ ID NO:26-37、SEQ ID NO:42-46、SEQ ID NO:53-64和SEQ ID NO:65-68的氨基酸序列。

附图说明

[0018] 图1是比较人IAPP和各种动物IAPP的表。与hIAPP不同的氨基酸用粗体表示。

[0019] 图2是显示硫黄素T结合测定结果的图表,其中人IAPP与来自其他物种的IAPP混合。图中显示了至少三次试验的平均值,误差条表示试验之间的标准偏差。

[0020] 图3显示了IAPP变体的原子力显微镜(AFM)扫描的结果。37μM的人IAPP与75μM的每种动物IAPP混合,在振荡下使样品在37℃下温育40分钟。所有的扫描显示没有扁平化的原始数据,是10μm x 10μm。

[0021] 图4是显示MTT存活率测定结果的图表。最左边的黑条显示单独的细胞平均存活率。横轴上每个物种标识符(浣熊、鸡等)上方的左侧条表示单独加入12.8μM hIAPP或动物IAPP变体后的平均细胞存活率。横轴上每个物种标识符上方的右侧条显示了hIAPP与每个动物IAPP变体混合后的细胞存活率(1:1的比例的hIAPP与每个指定动物IAPP的混合物12.8μM)。星号显示单独使用hIAPP和hIAPP与浣熊或鸡的IAPP变体混合之间的细胞存活率有明显增加。

[0022] 图5显示了对所述材料进行AFM扫描的结果。标记有hIAPP的样品含有40μM hIAPP。

带有普兰林肽(Pramlintide)和hIAPP的样品含有2:1的摩尔混合物(80μM普兰林肽与40μM hIAPP混合)。单独带有浣熊IAPP和普兰林肽的样品含有40μM的所述肽。每个样品在37℃和已知可促进hIAPP淀粉样物质形成的条件下振荡温育40分钟。所有的扫描显示没有扁平化的原始数据,是10μm x 10μm。

[0023] 图6是显示MTT存活率测定结果的图表。左边的条显示单独的细胞的平均存活率。横轴上每个肽标识符上方的左侧条表示单独加入12.8μM hIAPP或IAPP变体(横轴上表示的变体)后的平均细胞存活率。横轴上每个肽标识符上方的右侧条显示hIAPP与每个IAPP变体混合后的细胞存活率(每个IAPP与12.8μM hIAPP的比例为1:1)。

[0024] 图7是列出就针对hIAPP淀粉样蛋白形成的抑制潜力进行测试的海豹IAPP的变体的氨基酸序列的表格。抑制hIAPP淀粉样蛋白形成的肽在"抑制"栏中用粗体"是"表示,而将细胞从hIAPP毒性中拯救出来的肽在"拯救"栏中用粗体"是"表示。

[0025] 图8是显示了当hIAPP与指定的威德尔海豹IAPP肽变体混合时,硫黄素T结合测定的结果的图表。数据显示了至少三次试验的平均值,误差条显示了试验之间的标准偏差。

[0026] 图9显示了hIAPP与指定的威德尔海豹IAPP变体混合的AFM图像。所有的扫描显示没有扁平化的原始数据,并且是10μm x 10μm。

[0027] 图10是显示MTT存活率测定结果的图表。最左边的黑条显示单独细胞的平均存活率。横轴上每个肽标识符(WS、WS-R等)上方的左侧条表示单独加入12.8μM hIAPP或威德尔海豹IAPP变体肽后的平均细胞存活率。横轴上每个肽标识符上方的右侧条显示了hIAPP与威德尔海豹IAPP变体混合的细胞存活率(1:1的比例的hIAPP与威德尔海豹IAPP的混合物12.8μM)。

[0028] 图11是列出基于全长浣熊IAPP序列截短的几种肽的表。抑制hIAPP淀粉样蛋白形成的肽在"抑制"栏中用粗体"是"表示,而将细胞从hIAPP毒性中拯救出来的肽在"拯救"栏中用粗体"是"表示。

[0029] 图12是显示hIAPP与所示浣熊IAPP变体混合时的硫黄素T结合测试结果的图表。人的IAPP在37℃下与每个指定的肽振荡温育。每个肽的四个竖条从左到右分别表示10分钟、20分钟、25分钟和30分钟后的荧光。数据显示至少两次试验的平均值,误差条显示试验间的标准偏差。

[0030] 图13是描述对于浣熊IAPP截短突变体而言图12中所示结果的图表。四种肽中每一个的四个竖条从左到右分别表示10分钟、20分钟、25分钟和30分钟后的荧光(图表左侧的天然浣熊IAPP没有包括30分钟的读数)。

[0031] 图14是列出基于浣熊IAPP序列突变的几种肽的表。抑制hIAPP淀粉样蛋白形成的肽在"抑制"栏中用粗体"是"表示,而将细胞从hIAPP毒性中拯救出来的肽在"拯救"栏中用粗体"是"表示。

[0032] 图15是显示hIAPP与指定的鸡和浣熊IAPP变体混合时的硫黄素T结合测定结果的图表。人IAPP在37℃下与每种指定的肽振荡温育。每种肽的四个竖条从左到右分别表示10分钟、20分钟、25分钟和30分钟后的荧光。数据显示至少两次试验的平均值,误差条显示试验之间的标准偏差。

[0033] 图16是显示比较变种浣熊IAPP肽的MTT存活率测定结果的图表。最左边的黑条显示单独细胞的平均存活率。横轴上每个肽标识符上方的左侧条表示单独添加12.8μM的每种

指定IAPP肽后的平均细胞存活率。横轴上每个肽标识符上方的右侧条显示hIAPP与指定的IAPP肽混合后的细胞存活率(1:1的比例的hIAPP与每种指定IAPP肽的混合物12.8μM)。

[0034] 图17是列出基于鸡IAPP序列截短的几种肽的表。抑制hIAPP淀粉样蛋白形成的肽在"抑制"栏中用粗体"是"表示,而将细胞从hIAPP毒性中拯救出来的肽在"拯救"栏中用粗体"是"表示。

[0035] 图18是显示hIAPP与所示的鸡IAPP变体混合时的硫黄素T结合测定结果的图表。hIAPP在37℃下与每种所示的肽振荡温育。四种肽中每一种的四个竖条从左到右分别表示10分钟、20分钟、25分钟和30分钟后的荧光。数据显示至少两次试验的平均值,误差条显示试验之间的标准偏差。

[0036] 图19显示了对截短的鸡和浣熊IAPP肽的AFM扫描结果。在所描述的扫描中,R1-23、R8-23和R8-30肽不抑制hIAPP的聚集,而R1-29、R1-27、C1-29和C1-27肽有抑制作用。每个样品含有37μM的hIAPP和75μM的指定肽。样品在37℃下振荡温育40分钟。所有的扫描显示没有扁平化的原始数据,是10μm x10μm。

[0037] 图20是列出基于鸡IAPP序列突变的几种肽的表。抑制hIAPP淀粉样蛋白形成的肽在"抑制"栏中用粗体"是"表示,而将细胞从hIAPP毒性中拯救出来的肽在"拯救"栏中用粗体"是"表示。

[0038] 图21是显示比较变异鸡IAPP肽的MTT存活率测定结果的图表。最左边的黑条显示单独细胞的平均存活率。横轴上每个肽标识符上方的左侧条表示单独加入12.8μM hIAPP或鸡IAPP变体后的平均细胞存活率。横轴上每个肽标识符上方的右侧条显示hIAPP与鸡IAPP变体混合后的细胞存活率(1:1比例的hIAPP与每种指定IAPP肽的混合物12.8μM)。

[0039] 图22显示了与hIAPP混合时对浣熊和鸡的IAPP变体的AFM扫描的结果。每个样品包含与37μM的指定肽混合的37μM的hIAPP。样品在37℃下振荡温育30分钟,然后将每个样品沉积在新切割的云母上。

具体实施方式

[0040] 定义

[0041] 在本文中,以下术语及其变体具有以下给出含义,除非使用该术语的上下文要表示不同含义。

[0042] "约"和"大约"指的是参考量的10%以内的数量,除非这种用法的环境表明有不同的含义。例如但不限于,"约10"是指9-11,"约10%"是指9%-11%。

[0043] "淀粉样蛋白病"是指由肽和/或蛋白质的聚集体,特别是具有原纤维形态和β-片状二级结构的胰淀素引起的或与之相关的医学状况。人IAPP可以形成低聚物或斑块,这种聚集体在某些情况下与II型糖尿病和阿尔茨海默病有关。

[0044] "细胞保护"是指减弱、减轻或防止细胞损伤或死亡,特别是暴露于hIAPP的毒性作用的能力。细胞保护可以用本领域已知的方式进行测量,如用细胞存活率和细胞毒性测定。

[0045] "IAPP"是指在各种动物,特别是哺乳动物和鸟类中发现的胰岛淀粉样多肽。

[0046] "IAPP肽"是指与人IAPP(SEQ ID NO:1)相比,具有一个或多个氨基酸取代的肽。与hIAPP相比,IAPP肽可以被截短,并且优选具有至少70%、73%、75%、80%、85%、90%以上的长度。优选的是,IAPP肽与hIAPP有至少80%的序列同一性,例如89%、92%、95%或高达

97％的序列同一性。

[0047] 对淀粉样低聚物、纤维和聚集体而言，"抑制"是与引起这种抑制的物质不存在的情况下这种材料的形成相比，减缓和/或防止这种低聚物、纤维和聚集体的形成。淀粉样蛋白形成可以用本领域已知的方式测量，如用硫黄素T结合测定。优选的是，IAPP肽对IAPP聚集体形成的抑制率约为50％以上。

[0048] "医疗状况"是指引起受试者疾病、不适和/或残疾的状况。

[0049] "药效"和"疗效"是指恢复、纠正或改变受试者生理功能的效果，包括治愈、减轻、治疗或预防受试者的医疗状况。"药物组合物"和"药品"是具有药物效果的组合物。

[0050] "治疗"是指减轻、改善、预防和/或解决医疗状况的作用。治疗可以指预防或需要治疗的医疗状况发展后的治疗。

[0051] 术语"包括"和该术语的变体，如"包含"和"含有"并不意味着排除其他添加剂、成分、整数或步骤。术语"一"、"一个"和"该"以及本文使用的类似指称应理解为涵盖单数和复数，除非其在上下文中的用法另有说明。被描述为"介于"两个数值之间的范围包括所示的数值。

[0052] IAPP肽

[0053] 其他物种的IAPP肽

[0054] 我们比较了来自各种生物体的天然存在的IAPP肽的聚集潜力，并就此评估了这些肽与人IAPP(hIAPP)的相互作用。在这些研究中，我们出乎意料地发现，这些动物的IAPP肽中有几种显示出抑制hIAPP聚集，防止淀粉样蛋白的形成，并保护哺乳动物细胞免受hIAPP的毒性的显著能力。

[0055] 我们评估的天然存在的IAPP肽的氨基酸序列显示在图1中，与人IAPP的序列差异以粗体显示。图中顶部列出了被鉴定为显示出抑制hIAPP聚集的潜力的动物IAPP肽，而那些缺乏抑制潜力的变体则列在底部。尽管牛、八齿鼠、豚鼠、马、猪、大鼠和绵羊来源的IAPP肽未能抑制人IAPP的聚集，但我们惊讶地发现，猫、犬、鸡、北极熊、浣熊和海豹来源的IAPP与hIAPP混合时能够抑制这种聚集。这些抑制性IAPP肽的序列显示在下面的表1中。

[0056] 表1

[0057]

种类	序列	SEQ ID NO.
猫	KCNTATCATQRLANFLIRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	2
犬	KCNTATCATQRLANFLVRTSNNLGAILSPTNVGSNTY	3

[0058]

鸡	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNVGSNTY	4
北极熊	KCNTATCATQRLANFLVRSGNLFGAILSPTNVGSNTY	5
浣熊	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	6
海豹	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	7

[0059] 正如下面实施例1-3所讨论的，这些肽抑制了hIAPP的聚集形成(图1-3)，而且浣熊和鸡的IAPP肽还从hIAPP的毒性作用中拯救活细胞(图4)。

[0060] 威德尔海豹变体

[0061] 为了确定它们抑制hIAPP聚集的能力,制备了威德尔海豹IAPP的变体(突变)。如图7中的表格所示,其中一些被发现能够抑制hIAPP的聚集和/或保护细胞免受hIAPP的毒性。这些序列显示在下面的表2中。

[0062] 表2

[0063]

名称	序列	SEQ ID NO.
WS_R	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNFGAILSSTNVGSNTY	15
WS_RL	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGAILSSTNVGSNTY	16
WS_RP	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNFGAILSPTNVGSNTY	17
WS_LP	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNLGAILSPTNVGSNTY	18

[0064] 图8显示了当hIAPP与所示的威德尔海豹变体混合时的硫黄素T结合测定的结果。WS-RL(SEQ ID NO:16)和WS-LP(SEQ ID NO:18)IAPP肽抑制了hIAPP的聚集。在MTT试验中,WS-RL和WS-RP(SEQ ID NO:17)还将细胞从hIAPP的毒性中拯救出来(图10)。然而,无论是否添加hIAPP,WS-LP(和WS-P)肽都被证明对细胞是有毒的。

[0065] 浣熊变体

[0066] 鉴于浣熊IAPP能够抑制hIAPP的聚集体形成,并且还能拯救活细胞免受hIAPP的毒性影响,合成了一系列基于天然浣熊IAPP肽序列的IAPP肽,并对其抑制人IAPP淀粉样蛋白形成和拯救细胞免受hIAPP毒性的能力进行了表征。如图12、16和19所示,发现从浣熊IAPP肽的C端截短的几种IAPP肽既能抑制hIAPP的聚集,也能保护细胞免受hIAPP的毒性。虽然从全长浣熊IAPP的N端(SEQ ID NO:21和23)和中间(SEQ ID NO:22、24和25)去除氨基酸导致肽未能抑制hIAPP的聚集或减少其细胞毒性,但在全长浣熊IAPP的C端去除多达13个氨基酸得到能够既抑制hIAPP的聚集,也能保护细胞的肽。下面的表3列出了截短的浣熊hIAPP肽,它们具有抑制hIAPP聚集体形成和保护细胞免受hIAPP细胞毒性的能力。

[0067] 表3

[0068]

名称	序列	SEQ ID NO.
R1-35	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVGSN	26
R1-34	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVGS	27
R1-33	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVG	28
R1-32	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNV	29
R1-31	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTN	30
R1-30	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPT	31
R1-29	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSP	32
R1-28	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILS	33
R1-27	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAIL	34
R1-26	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAI	35
R1-25	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGA	36
R1-24	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLG	37

[0069] 虽然相应的天然浣熊IAPP肽在与胰腺细胞温育时显示出一些细胞毒性,而这些截短的肽几乎没有显示出毒性。

[0070] 用从浣熊IAPP修改(突变)的序列创建了额外的肽,并分析了它们对hIAPP聚集的

抑制能力。表4和图12中所示的序列显示了对hIAPP淀粉样蛋白形成的强烈抑制。

[0071] 表4

[0072]

名称	序列	SEQ ID NO.
Rac_V8A	KCNTATCATQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	42
Rac_N13D	KCNTATCVTQRLADFLLRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	43
Rac_L16V	KCNTATCVTQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	44
Rac_L22I	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNIGAILSPTNVGSNTY	45

[0073]

Rac_L26Y	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAIYSPTNVGSNTY	46

[0074] Rac-L26Y(SEQ ID NO:46)因以下原因而脱颖而出:其抑制hIAPP纤维形成和拯救细胞免受hIAPP毒性的能力,同时显示出最小的内在毒性。

[0075] 鸡变体

[0076] 鉴于鸡IAPP能够抑制hIAPP的聚集形成,也能够拯救活细胞免受hIAPP的毒性影响,合成了一系列基于天然鸡IAPP肽序列的IAPP肽,并对其抑制人IAPP淀粉样蛋白形成和拯救细胞免受hIAPP毒性影响的能力进行了表征。如图18、19和21所示,发现从鸡IAPP肽的C端截短的几种IAPP肽能抑制hIAPP的聚集和/或保护细胞免受hIAPP的毒性。从全长的鸡IAPP的N端去除氨基酸得到不能抑制hIAPP的聚集或减少其细胞毒性的肽,而截短到长度为24个氨基酸以下的肽失去了抑制淀粉样蛋白的能力。然而,在全长的鸡IAPP的C端去掉多达13个氨基酸会得到能够抑制hIAPP聚集和/或保护细胞免受hIAPP细胞毒性的肽。这些肽显示在下面的表5中。

[0077] 表5

[0078]

名称	序列	SEQ ID NO.
C1-35	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNVGSN	53
C1-34	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNVGS	54
C1-33	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNVG	55
C1-32	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNV	56
C1-31	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTN	57
C1-30	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPT	58
C1-29	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSP	59
C1-28	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYS	60
C1-27	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIY	61
C1-26	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAI	62
C1-25	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGA	63
C1-24	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIG	64

[0079] 虽然相应的天然鸡IAPP肽在与胰腺细胞温育时显示出一些细胞毒性,但是这些截短的肽几乎没有显示出毒性。

[0080] 用从鸡IAPP修改的序列创建了额外的肽,并分析了它们对hIAPP聚集的抑制能力。表6中的序列显示了对hIAPP淀粉样物质形成的强烈抑制作用

[0081] 表6

[0082]

名称	序列	SEQ ID NO.
Ch_V8A	KCNTATCATQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNVGSNTY	65
Ch_V16L	KCNTATCVTQRLADFLLRSSSNIGAIYSPTNVGSNTY	66
Ch_I22L	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNLGAIYSPTNVGSNTY	67
Ch_Y26L	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAILSPTNVGSNTY	68

[0083] Ch-I22L(SEQ ID NO:67)能够抑制hIAPP纤维的形成,并将细胞从hIAPP的毒性中拯救出来,同时显示出最小的内在毒性(见图15、21和22)。

[0084] 测量IAPP肽的作用

[0085] 本领域已知的多种检测中的任何一种测定方法分都可用于评估IAPP肽抑制hIAPP聚集和/或保护细胞免受hIAPP毒害的能力。硫黄素T(ThT)结合是一种用于实时鉴定淀粉样蛋白形成的技术。已知人IAPP在聚集和淀粉样蛋白形成过程中与硫黄素T结合,并且当与淀粉样原纤维结合时,ThT在450纳米处被激发,会在约482纳米处发出强烈的荧光信号。ThT荧光与样品中的淀粉样蛋白浓度呈线性相关,因此可用于确定样品中的聚集量。因此,当这些物质与人IAPP在已知会导致hIAPP形成聚集体的条件下混合时,该技术可用于鉴定具有抑制淀粉样蛋白的潜力的物质。确定聚集的程度也可以使用其他技术,如原子力显微镜(AFM),它可以以纳米级的分辨率提供有关颗粒尺寸、形状和亚结构的信息。在上述测定方法和本领域技术人员可以使用的其他测定方法中,通过测量hIAPP和与IAPP肽结合的hIAPP之间的差异,可以使用t检验确定显著的抑制作用。有意义的结果显示t检验值为<0.05。

[0086] 细胞保护同样可以通过本领域已知的多种测定方法来测量。一种这样的测定方法是MTT测定,它是用于评估细胞代谢活性的比色法检测。细胞的胞内区室内的NAD(P)H依赖性细胞氧化还原酶将四氮唑染料MTT 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四氮唑还原成不溶性形式的甲臜,它具有紫色。MTT(和其他四氮唑类染料)的还原依赖于细胞的代谢活动,因此在进行MTT测定的过程中,颜色的消失表明代谢活性低,因此是细胞损伤和死亡的指标。

[0087] 药物制剂

[0088] IAPP肽可以配制成药物组合物(药剂),以本领域已知的方式施用,包括肌肉内、静脉内和皮下施用。根据施用途径,药物组合物可以配制成液体、粉末或其他固体,或凝胶。当组合物为粉末状时,IAPP肽可以是盐的形式,如乙酸盐等。该药物组合物可以包括一种或多种药学上可接受的载体和/或其他药学上可接受的赋形剂,例如用于稳定组合物和/或将组合物递送给受试者。本药物组合物的赋形剂可包括适当的添加剂,如药学上有效的载体(即无菌水、水和盐水等)、缓冲剂、中和剂、稳定剂、保湿剂、增黏剂、化学稳定剂、增稠剂、稀释剂和/或溶剂。一些实施方式的赋形剂的实例包括,但不限于,醇和聚乙二醇、甘油、蜡、水、去离子水、脂肪酸酯等,其混合物和组合。适用于胃肠外施用(例如,通过静脉内、肌肉内、皮内和皮下途径施用)的制剂,包括水性和非水性等渗无菌注射液。

[0089] IAPP肽的应用

[0090] IAPP肽可用于抑制IAPP聚集或保护细胞,例如在下面的实施例中所述。在一个实施方式中,体外对细胞施用IAPP肽,以保护细胞不接触淀粉样纤维,如hIAPP的聚集体,发现淀粉样纤维在外部应用时以及从细胞中分泌时都会诱发细胞毒性。本发明的IAPP肽也可以施用于受试者,以减少IAPP体内的聚集。本发明的IAPP肽可特别用于治疗患有淀粉样疾病,

如糖尿病的人或其他哺乳动物受试者。在本发明的一个实施方式中,既能抑制hIAPP聚集又能保护细胞免受hIAPP毒性影响的本发明的IAPP肽可被施用于受试者,以治疗淀粉样蛋白疾病。

[0091] 例如,可抑制淀粉样纤维的形成并降低细胞毒性,如ANFLVH的源自人IAPP的肽已被证明可改善受试者注射后的空腹血糖水平和葡萄糖耐量(Wijesekara等,Diabetes,Obesity and Metabolism 17:1003-1006,2015)。IAPP肽普兰林肽也已被用于治疗人的糖尿病。这种肽包含在大鼠IAPP中发现的3个氨基酸取代。然而,普兰林肽比本发明的IAPP肽更容易淀粉样变性,而且也没有细胞保护作用。从图5所示的AFM扫描可以看出,单独的浣熊IAPP没有聚集,而普兰林肽在相同条件下形成淀粉样纤维。浣熊IAPP肽也阻止了hIAPP的聚集,而普兰林肽在相同条件下不能做到这一点。与浣熊和鸡IAPP不同,普兰林肽对细胞也有毒性,没有能力保护细胞免受hIAPP的毒性影响(见图6)。

[0092] IAPP肽可以通过本领域已知的方式施用给受试者,如通过胃肠外施用,例如通过肌肉内、静脉内或皮下施用。在一个实施方式中,可将IAPP肽组合物直接施用于发现聚集的IAPP的部位,如胰腺,特别是朗格汉斯的胰岛。在血管、外周血管空间和脑组织(实质)中也发现了胰淀素低聚物和斑块,因此也可以对这些器官或区室注射或应用IAPP肽组合物,以便向受试者施用本发明的IAPP肽。

[0093] 根据所涉及的个体受试者的特殊需要,本发明的肽可以以各种剂量施用,以提供对淀粉样蛋白疾病的有效治疗。优选可以向受试者施用约1微克(mcg)至约500微克的剂量,如约2mcg、5mcg、7mcg、10mcg、15mcg、20mcg、30mcg、40mcg、50mcg、60mcg、70mcg、80mcg、90mcg、100mcg、120mcg、150mcg、170mcg、200mcg、220mcg、250mcg、270mcg、300mcg、320mcg、350mcg、370mcg、400mcg、420mcg、450mcg或470mcg的剂量。本发明的IAPP肽的施用量例如可以是0.1mcg/kg/天、0.15mcg/kg/天、0.2mcg/kg/天、0.25mcg/kg/天、0.3mcg/kg/天、0.4mcg/kg/天、0.5mcg/kg/天、0.7mcg/kg/天、0.9mcg/kg/天、1.0mcg/kg/天、1.2mcg/kg/天、1.5mcg/kg/天、1.7mcg/kg/天、2.0mcg/kg/天、2.2mcg/kg/天、2.5mcg/kg/天、3.0mcg/kg/天、3.5mcg/kg/天、4.0mcg/kg/天、4.5mcg/kg/天或5.0mcg/kg/天。诸如所选肽的聚集抑制活性、肽的半衰期、受试者的生理特征、受试者病情的程度或性质以及施用方法等因素将决定所选肽的有效量,这是本领域的技术人员已知的。一般来说,初始剂量将被修改以确定治疗特定对象的最佳剂量。可能需要在较长的时间内施用重复剂量的本发明肽。

[0094] 本发明的任何实施方式的有效量是用本领域普通技术的药理学家和临床医生已知的方法确定的。例如,可以用动物模型来确定患者的适用剂量。许多糖尿病和其他淀粉样蛋白疾病的模型是已知的。例如,Wijesekara等(Diabetes,Obesity and Metabolism 17:1003-1006,2015)公开了2型糖尿病的转基因小鼠模型,该模型已被用于评估IAPP衍生的肽。

[0095] 如本领域技术人员所知,可以首先对患者施用非常低剂量的肽,即,在动物中发现毒性最小的肽(例如,在小鼠中为1/10×LD10),如果发现该剂量是安全的,则可以用较高剂量治疗患者。然后可以通过向患有这种疾病的患者施用递增量的这种肽来确定用于治疗淀粉样蛋白疾病的本发明肽中的一种的治疗有效量,直到患者的症状被观察到或被患者报告为减弱或消除。

[0096] 本发明的肽的血浓度可以用常规的生物和化学检测方法来确定,这些血浓度可以

与选定的肽的施用途径和半衰期相匹配。然后,血浓度和施用途径可用于建立用于预防和/或治疗淀粉样疾病的包含本发明肽之一的药物组合物的治疗有效量。

[0097] 应该注意的是,发现浣熊和鸡的IAPP在人胰岛素的存在下可以防止hIAPP的聚集,因此与糖尿病的治疗联合使用是安全的。浣熊和鸡的IAPP也都比另一种糖尿病治疗剂普兰林肽更不容易聚集。

[0098] 实施例

[0099] 实施例1:用其他物种的hIAPP抑制剂进行的硫黄素T测定

[0100] 为了鉴定对hIAPP聚集具有抑制潜力的IAPP肽,将来自多个物种(牛、八齿鼠、豚鼠、马、猪、大鼠和绵羊,牛、八齿鼠、豚鼠、马、猪、大鼠和绵羊)的图1所示的肽与hIAPP以动物肽与hIAPP为2:1的摩尔比混合,在已知可促进hIAPP聚集和原纤维形成的条件下进行温育。将单独的IAPP、或与动物IAPP混合的hIAPP移入玻璃管中,在快速真空下除去HFIP。将得到的肽样品溶解在20mM Tris缓冲液中,pH值为7.4。

[0101] 37μM的人IAPP与75μM的每种指定动物IAPP混合。将样品在37℃下以200转/分的速度振荡40分钟,引发聚集。在指定的时间点,将每个样品的17μL等份试样与663μL在20mM Tris缓冲液(pH7.4)中的50.0μM硫黄素T混合。然后用Hitachi F-7000荧光分光光度计在488nm处记录硫黄素T的荧光发射。

[0102] 40分钟后,监测这些样品的结合硫黄素T的能力(见图2),并且用原子力显微镜鉴定其形成纤维的能力。

[0103] 实施例2:用其他物种的hIAPP抑制剂的原子力显微镜检查

[0104] 使用AFM来直接测试图1中所示的每种动物IAPP肽的淀粉样蛋白抑制潜力。如实施例1所述,制备含有或不含动物IAPP的hIAPP样品,然后在37℃下振荡温育40分钟。温育后,将17μL的每个样品沉淀在新切割的云母上。样品在室温下温育5分钟,然后用200μL无菌水清洗。干燥后,使用设置为A/C模式的MFP-3D原子力显微镜(Asylum Research)和240μm的硅悬臂(Olympus)对样品进行扫描。

[0105] 在这些条件下,人IAPP在沉积到云母上并通过AFM扫描时形成高密度的原纤维。已知许多动物的IAPP变体在通过AFM扫描时也同样会形成原纤维并产生淀粉样斑块。当与hIAPP混合时,来自牛、八齿鼠、海豚、豚鼠、马、猪、大鼠和绵羊的动物IAPP肽对hIAPP原纤维的形成没有影响,或者似乎与hIAPP一起促进原纤维的形成。发现六种IAPP变体能抑制hIAPP原纤维的形成,其中鸡、猫、犬、北极熊、浣熊和海豹都显示出防止纤维形成的显著能力。尽管已知所有这些IAPP肽(除了北极熊的IAPP)在这些或类似的条件下都聚集和形成原纤维的事实,也是如此。

[0106] 实施例3:用其他物种的hIAPP抑制剂进行细胞存活率测定

[0107] 为了测试动物IAPP变体拯救活细胞免受hIAPP毒性影响的能力,进行了存活率和细胞毒性试验。为了测试细胞存活率,使用了MTT比色法,该MTT比色法测量黄色四氮唑盐在线粒体还原酶的催化下转化为紫色的甲臜晶体。细胞存活率研究是用RIN-m细胞(ATCC,CRL-2057)进行的。将同等数量的RIN-m细胞一式三份铺板,在96孔板中温育过夜。第二天,在细胞中加入补充有10%的FBS的具有酚红的新鲜的RPMI-1640。使用centrivap浓缩器(LabOnco)从每个人和动物IAPP中去除六氟异丙醇(HFIP)。所有的IAPP肽样品被重新悬浮在含有10%FBS的RPMI-1640中。为了确保均匀的重新悬浮,含有每一个所得IAPP的小瓶都

用吸头刮了六次,并涡旋(Vortex Genie混合器)15秒。从干燥每个IAPP肽到向细胞添加每个IAPP肽的整个过程都是统一的,以确保每个样品与每个IAPP肽温育相等时间。将IAPP肽添加到细胞中,并在37℃下温育46小时。温育后,每个孔中的培养基更换为不含酚红的新鲜DMEM/F-12。将MTT(3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-溴化四氮唑)加入每个孔中,并在37℃下温育2小时。将在孔底形成的甲臜晶体重新悬浮于增溶缓冲液(20%SDS和50%二甲基甲酰胺)中。使用Multiskan FC微孔板光度计(Thermos Fisher Scientific)在570nm处测定每个孔中的吸光度。培养基从ATCC获得。所有的温育都是在37℃、5%二氧化碳的水套温育箱(Shell Lab)中进行的。

[0108] 使用MTT存活率测定法来测量RIN-m细胞在单独加入hIAPP、单独加入每种动物IAPP肽、以及与每种动物IAPP肽混合的hIAPP后的细胞存活率(结果见图5)。单独的RIN-m细胞被用作对照,并设定为100%的细胞存活率。加入12.8μM的人IAPP一直导致细胞存活率下降到55+/-5%。单独加入12.8μM的浣熊、猫、海豹、北极熊和猪的IAPP变体导致细胞存活率平均下降20-25%,而加入鸡和大鼠IAPP则对细胞存活率有改善作用。以1:1的比例混合hIAPP和浣熊IAPP变体(每种IAPP的浓度为12.8μM)可保护RIN-m细胞免受hIAPP的毒性影响。在hIAPP中加入浣熊IAPP,将细胞存活率从55%提高到平均72%(p=0.005705)。在hIAPP中加入鸡的IAPP变体,将细胞存活率增加到平均76%(p=0.013556)。在hIAPP中加入猫和海豹的IAPP变体也增加了细胞的存活率,达到约62%,但结果更加不同。北极熊、大鼠和猪的IAPP变体不能保护RIN-m细胞免受hIAPP的毒性影响。

[0109] 实施例4:威德尔海豹IAPP肽变体

[0110] 用图7所示的威德尔海豹IAPP的变体进行硫黄素T结合测定。将人IAPP(37μM)与每个指定的威德尔海豹变体(75μM)混合,并在37℃下以200rpm的速度振荡温育30分钟。结果显示在图8中。威德尔海豹IAPP肽也同样进行了如实施例2所述的原子力显微镜检查。这些结果,如图9所示,表明WS_RL和WS_LP变体是hIAPP纤维形成的强抑制剂。

[0111] 实施例5:截短的浣熊IAPP肽变体

[0112] 硫黄素T结合测定是用图11所示的浣熊IAPP变体进行的。将人IAPP与所述的浣熊变体混合,在37℃下振荡温育。结果显示在图12和13。R1-27、R1-29和R1-30变体抑制了hIAPP的聚集,并且在MTT存活率试验中也从hIAPP诱导的细胞毒性中拯救了细胞(见图16)。

[0113] 实施例6:突变的浣熊IAPP肽变体

[0114] 硫黄素T结合测定是用图10所示的浣熊IAPP的变体进行的。将人IAPP与所示浣熊变体中每一种混合,在37℃下振荡温育。结果显示在图15中。Rac_V8A、Rac_N13D、Rac_L16V、Rac_L22I和Rac_L26Y变体抑制了hIAPP的聚集,而且Rac_L26Y也在hIAPP存在下,在MTT存活率测定中提高了细胞存活率,如图16所示。

[0115] 实施例7:截短的鸡IAPP肽变体

[0116] 硫黄素T结合测定是用图17中所示的鸡IAPP变体进行的。将人IAPP与所述鸡的变体中每一种混合,在37℃下振荡温育。结果显示在图18中。C1-27和C1-29变体抑制了hIAPP的聚集,并且在MTT存活率测定中也拯救了细胞免受hIAPP诱导的细胞毒性(见图21)。虽然C1-29肽阻止了ThT的结合,但用此肽进行AFM扫描(如实施例2所述)时形成了淀粉样纤维,所以图13中表示此肽不能抑制hIAPP的聚集。然而,它能够在MTT试验中保护细胞,所以认为其能够抑制有毒低聚物的形成,同时对抑制纤维的形成(其毒性较小,且不易与ThT结合)影

响较小。

[0117] 实施例8:突变的鸡IAPP肽变体

[0118] 硫黄素T结合测定是用图14中所示的鸡IAPP变体进行的。将人IAPP与所述鸡的变体中每一种混合,在37℃下振荡温育。结果显示在图15中。Ch_V16L、Ch_I22L和Ch_Y26L抑制了hIAPP的聚集,并且在MTT存活率测定中也拯救细胞免受hIAPP诱导的细胞毒性影响(见图21)。

[0119] 术语"包括"和该术语的变体,如"包含"和"含有"并不意味着排除其他添加剂、成分、整数或步骤。术语"一"、"一个"和"该"以及本文使用的类似指称应理解为涵盖单数和复数,除非其在上下文中的用法另有说明。被描述为"介于"两个数值之间的范围包括所示的数值。

[0120] 尽管已经参考某些优选实施方式相当详细地描述了本发明,但其他实施方式也是可行的。例如,针对本方法公开的步骤不旨在限制也不旨在表明每个步骤对于该方法是必要的,而仅仅是示例性步骤。因此,所附权利要求的范围不应限于本公开中包含的优选实施方式的描述。

[0121] 此处对值范围的引用仅旨在用作单独引用落入该范围内的每个单独值的速记方法。除非在本文中另有说明,否则每个单独的值都被并入说明书中,就好像它在本文中被单独公开一样。例如,“约10”包括对10的确切公开。本文引用的所有参考文献均通过引用整体并入。

[0001] 序列表

[0002] <110> 洛约拉马利蒙特大学

[0003] 圣玛丽山大学

[0004] <120> 淀粉样肽的变体

[0005] <130> LMU1002PCT

[0006] <150> US 62/809,167

[0007] <151> 2019-02-22

[0008] <160> 69

[0009] <170> PatentIn version 3.5

[0010] <210> 1

[0011] <211> 37

[0012] <212> PRT

[0013] <213> 智人(Homo sapiens)

[0014] <400> 1

[0015] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0016] 1 5 10 15

[0017] Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val

[0018] 20 25 30

[0019] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0020] 35

[0021] <210> 2

[0022] <211> 37

[0023] <212> PRT

[0024] <213> 猫(Felis catus)

[0025] <400> 2

[0026] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0027] 1 5 10 15

[0028] Ile Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0029] 20 25 30

[0030] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0031] 35

[0032] <210> 3

[0033] <211> 37

[0034] <212> PRT

[0035] <213> 家犬亚种(Canis lupus familiaris)

[0036] <400> 3

[0037] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0038] 1 5 10 15

[0039] Val Arg Thr Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
[0040] 20 25 30
[0041] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0042] 35
[0043] <210> 4
[0044] <211> 37
[0045] <212> PRT
[0046] <213> 鸡(Gallus gallus)
[0047] <400> 4
[0048] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0049] 1 5 10 15
[0050] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val
[0051] 20 25 30
[0052] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0053] 35
[0054] <210> 5
[0055] <211> 37
[0056] <212> PRT
[0057] <213> 北极熊(Ursus maritimus)
[0058] <400> 5
[0059] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0060] 1 5 10 15
[0061] Val Arg Ser Gly Asn Leu Phe Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
[0062] 20 25 30
[0063] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0064] 35
[0065] <210> 6
[0066] <211> 37
[0067] <212> PRT
[0068] <213> 浣熊(Procyon lotor)
[0069] <400> 6
[0070] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0071] 1 5 10 15
[0072] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
[0073] 20 25 30
[0074] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0075] 35
[0076] <210> 7
[0077] <211> 37

[0078] <212> PRT

[0079] <213> 威德尔海豹(Leptonychotes weddellii)

[0080] <400> 7

[0081] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0082] 1 5 10 15

[0083] Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0084] 20 25 30

[0085] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0086] 35

[0087] <210> 8

[0088] <211> 37

[0089] <212> PRT

[0090] <213> 牛(Bos taurus)

[0091] <400> 8

[0092] Lys Cys Gly Thr Ala Thr Cys Glu Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0093] 1 5 10 15

[0094] Ala Pro Ser Ser Asn Lys Leu Gly Ala Ile Phe Ser Pro Thr Lys Met

[0095] 20 25 30

[0096] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0097] 35

[0098] <210> 9

[0099] <211> 37

[0100] <212> PRT

[0101] <213> 八齿鼠(Octodon degus)

[0102] <400> 9

[0103] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu

[0104] 1 5 10 15

[0105] Val Arg Ser Ser His Asn Leu Gly Ala Ala Leu Pro Pro Thr Lys Val

[0106] 20 25 30

[0107] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0108] 35

[0109] <210> 10

[0110] <211> 37

[0111] <212> PRT

[0112] <213> 豚鼠(Cavia porcellus)

[0113] <400> 10

[0114] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu

[0115] 1 5 10 15

[0116] Val Arg Ser Ser His Asn Leu Gly Ala Ala Leu Leu Pro Thr Asp Val

[0117] 20 25 30

[0118] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0119] 35

[0120] <210> 11

[0121] <211> 37

[0122] <212> PRT

[0123] <213> 马(Equus ferus)

[0124] <400> 11

[0125] Lys Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0126] 1 5 10 15

[0127] Val His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Ser Val

[0128] 20 25 30

[0129] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0130] 35

[0131] <210> 12

[0132] <211> 37

[0133] <212> PRT

[0134] <213> 猪(Sus scrofa domesticus)

[0135] <400> 12

[0136] Lys Cys Asn Met Ala Thr Cys Ala Thr Gln His Leu Ala Asn Phe Leu

[0137] 1 5 10 15

[0138] Asp Arg Ser Arg Asn Asn Phe Gly Ala Ile Phe Ser Pro Thr Lys Val

[0139] 20 25 30

[0140] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0141] 35

[0142] <210> 13

[0143] <211> 37

[0144] <212> PRT

[0145] <213> 大鼠(Rattus rattus)

[0146] <400> 13

[0147] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0148] 1 5 10 15

[0149] Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val

[0150] 20 25 30

[0151] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0152] 35

[0153] <210> 14

[0154] <211> 37

[0155] <212> PRT

[0156] <213> 绵羊(Ovis aries)

[0157] <400> 14

[0158] Lys Cys Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0159] 1 5 10 15

[0160] Ala Pro Ser Gly Asn Lys Leu Gly Ala Val Phe Ser Pro Arg Lys Met

[0161] 20 25 30

[0162] Gly Ser Asn Thr His

[0163] 35

[0164] <210> 15

[0165] <211> 37

[0166] <212> PRT

[0167] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0168] <220>

[0169] <223> 威德尔海豹(Leptonychotes weddellii)突变

[0170] <400> 15

[0171] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0172] 1 5 10 15

[0173] Val Arg Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val

[0174] 20 25 30

[0175] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0176] 35

[0177] <210> 16

[0178] <211> 37

[0179] <212> PRT

[0180] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0181] <220>

[0182] <223> 威德尔海豹(Leptonychotes weddellii)突变

[0183] <400> 16

[0184] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0185] 1 5 10 15

[0186] Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val

[0187] 20 25 30

[0188] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0189] 35

[0190] <210> 17

[0191] <211> 37

[0192] <212> PRT

[0193] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0194] <220>

[0195] <223> 威德尔海豹(Leptonychotes weddellii)突变

[0196] <400> 17

[0197] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0198] 1 5 10 15

[0199] Val Arg Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0200] 20 25 30

[0201] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0202] 35

[0203] <210> 18

[0204] <211> 37

[0205] <212> PRT

[0206] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0207] <220>

[0208] <223> 威德尔海豹(Leptonychotes weddellii)突变

[0209] <400> 18

[0210] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0211] 1 5 10 15

[0212] Val His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0213] 20 25 30

[0214] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0215] 35

[0216] <210> 19

[0217] <211> 37

[0218] <212> PRT

[0219] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0220] <220>

[0221] <223> 威德尔海豹(Leptonychotes weddellii)突变

[0222] <400> 19

[0223] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0224] 1 5 10 15

[0225] Val His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val

[0226] 20 25 30

[0227] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0228] 35

[0229] <210> 20

[0230] <211> 37

[0231] <212> PRT

[0232] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0233] <220>

[0234] <223> 威德尔海豹(Leptonychotes weddellii)突变

[0235] <400> 20

[0236] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0237] 1 5 10 15

[0238] Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0239] 20 25 30

[0240] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0241] 35

[0242] <210> 21

[0243] <211> 23

[0244] <212> PRT

[0245] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0246] <220>

[0247] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0248] <400> 21

[0249] Phe Leu Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr

[0250] 1 5 10 15

[0251] Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr

[0252] 20

[0253] <210> 22

[0254] <211> 17

[0255] <212> PRT

[0256] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0257] <220>

[0258] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0259] <400> 22

[0260] Phe Leu Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr

[0261] 1 5 10 15

[0262] Asn

[0263] <210> 23

[0264] <211> 30

[0265] <212> PRT

[0266] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0267] <220>

[0268] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0269] <400> 23

[0270] Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu

[0271] 1 5 10 15

[0272] Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr

[0273] 20 25 30

[0274] <210> 24

[0275] <211> 23

[0276] <212> PRT

[0277] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0278] <220>

[0279] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0280] <400> 24

[0281] Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu

[0282] 1 5 10 15

[0283] Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr

[0284] 20

[0285] <210> 25

[0286] <211> 16

[0287] <212> PRT

[0288] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0289] <220>

[0290] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0291] <400> 25

[0292] Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu

[0293] 1 5 10 15

[0294] <210> 26

[0295] <211> 35

[0296] <212> PRT

[0297] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0298] <220>

[0299] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0300] <400> 26

[0301] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0302] 1 5 10 15

[0303] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0304] 20 25 30

[0305] Gly Ser Asn

[0306] 35

[0307] <210> 27

[0308] <211> 34

[0309] <212> PRT

[0310] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0311] <220>

[0312] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0313] <400> 27

[0314] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0315] 1 5 10 15

[0316] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0317] 20 25 30

[0318] Gly Ser

[0319] <210> 28

[0320] <211> 33

[0321] <212> PRT

[0322] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0323] <220>

[0324] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0325] <400> 28

[0326] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0327] 1 5 10 15

[0328] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0329] 20 25 30

[0330] Gly

[0331] <210> 29

[0332] <211> 32

[0333] <212> PRT

[0334] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0335] <220>

[0336] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0337] <400> 29

[0338] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0339] 1 5 10 15

[0340] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0341] 20 25 30

[0342] <210> 30

[0343] <211> 31

[0344] <212> PRT

[0345] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0346] <220>

[0347] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0348] <400> 30

[0349] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0350] 1 5 10 15

[0351] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn
[0352] 20 25 30
[0353] <210> 31
[0354] <211> 30
[0355] <212> PRT
[0356] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0357] <220>
[0358] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短
[0359] <400> 31
[0360] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0361] 1 5 10 15
[0362] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr
[0363] 20 25 30
[0364] <210> 32
[0365] <211> 29
[0366] <212> PRT
[0367] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0368] <220>
[0369] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短
[0370] <400> 32
[0371] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0372] 1 5 10 15
[0373] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro
[0374] 20 25
[0375] <210> 33
[0376] <211> 28
[0377] <212> PRT
[0378] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0379] <220>
[0380] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短
[0381] <400> 33
[0382] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0383] 1 5 10 15
[0384] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser
[0385] 20 25
[0386] <210> 34
[0387] <211> 27
[0388] <212> PRT
[0389] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0390] <220>

[0391] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0392] <400> 34

[0393] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0394] 1 5 10 15

[0395] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu

[0396] 20 25

[0397] <210> 35

[0398] <211> 26

[0399] <212> PRT

[0400] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0401] <220>

[0402] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0403] <400> 35

[0404] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0405] 1 5 10 15

[0406] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile

[0407] 20 25

[0408] <210> 36

[0409] <211> 25

[0410] <212> PRT

[0411] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0412] <220>

[0413] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0414] <400> 36

[0415] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0416] 1 5 10 15

[0417] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala

[0418] 20 25

[0419] <210> 37

[0420] <211> 24

[0421] <212> PRT

[0422] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0423] <220>

[0424] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0425] <400> 37

[0426] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0427] 1 5 10 15

[0428] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly

[0429] 20

[0430] <210> 38

[0431] <211> 23

[0432] <212> PRT

[0433] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0434] <220>

[0435] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0436] <400> 38

[0437] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0438] 1 5 10 15

[0439] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu

[0440] 20

[0441] <210> 39

[0442] <211> 20

[0443] <212> PRT

[0444] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0445] <220>

[0446] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0447] <400> 39

[0448] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0449] 1 5 10 15

[0450] Leu Arg Ser Ser

[0451] 20

[0452] <210> 40

[0453] <211> 16

[0454] <212> PRT

[0455] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0456] <220>

[0457] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0458] <400> 40

[0459] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

[0460] 1 5 10 15

[0461] <210> 41

[0462] <211> 14

[0463] <212> PRT

[0464] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0465] <220>

[0466] <223> 浣熊(Procyon lotor)截短

[0467] <400> 41

[0468] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn
[0469] 1 5 10
[0470] <210> 42
[0471] <211> 37
[0472] <212> PRT
[0473] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0474] <220>
[0475] <223> 浣熊(Procyon lotor)突变
[0476] <400> 42
[0477] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0478] 1 5 10 15
[0479] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
[0480] 20 25 30
[0481] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0482] 35
[0483] <210> 43
[0484] <211> 37
[0485] <212> PRT
[0486] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0487] <220>
[0488] <223> 浣熊(Procyon lotor)突变
[0489] <400> 43
[0490] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0491] 1 5 10 15
[0492] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
[0493] 20 25 30
[0494] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0495] 35
[0496] <210> 44
[0497] <211> 37
[0498] <212> PRT
[0499] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0500] <220>
[0501] <223> 浣熊(Procyon lotor)突变
[0502] <400> 44
[0503] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0504] 1 5 10 15
[0505] Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
[0506] 20 25 30

[0507] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0508] 35
[0509] <210> 45
[0510] <211> 37
[0511] <212> PRT
[0512] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0513] <220>
[0514] <223> 浣熊(Procyon lotor)突变
[0515] <400> 45
[0516] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0517] 1 5 10 15
[0518] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Ile Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
[0519] 20 25 30
[0520] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0521] 35
[0522] <210> 46
[0523] <211> 37
[0524] <212> PRT
[0525] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0526] <220>
[0527] <223> 浣熊(Procyon lotor)突变
[0528] <400> 46
[0529] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
[0530] 1 5 10 15
[0531] Leu Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val
[0532] 20 25 30
[0533] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0534] 35
[0535] <210> 47
[0536] <211> 30
[0537] <212> PRT
[0538] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0539] <220>
[0540] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0541] <400> 47
[0542] Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile
[0543] 1 5 10 15
[0544] Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr
[0545] 20 25 30

[0546] <210> 48
[0547] <211> 23
[0548] <212> PRT
[0549] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0550] <220>
[0551] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0552] <400> 48
[0553] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0554] 1 5 10 15
[0555] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile
[0556] 20
[0557] <210> 49
[0558] <211> 20
[0559] <212> PRT
[0560] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0561] <220>
[0562] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0563] <400> 49
[0564] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0565] 1 5 10 15
[0566] Val Arg Ser Ser
[0567] 20
[0568] <210> 50
[0569] <211> 18
[0570] <212> PRT
[0571] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0572] <220>
[0573] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0574] <400> 50
[0575] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0576] 1 5 10 15
[0577] Val Arg
[0578] <210> 51
[0579] <211> 16
[0580] <212> PRT
[0581] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0582] <220>
[0583] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0584] <400> 51

[0585] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0586] 1 5 10 15
[0587] <210> 52
[0588] <211> 14
[0589] <212> PRT
[0590] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0591] <220>
[0592] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0593] <400> 52
[0594] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp
[0595] 1 5 10
[0596] <210> 53
[0597] <211> 35
[0598] <212> PRT
[0599] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0600] <220>
[0601] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0602] <400> 53
[0603] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0604] 1 5 10 15
[0605] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val
[0606] 20 25 30
[0607] Gly Ser Asn
[0608] 35
[0609] <210> 54
[0610] <211> 34
[0611] <212> PRT
[0612] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0613] <220>
[0614] <223> 鸡(Gallus gallus)截短
[0615] <400> 54
[0616] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0617] 1 5 10 15
[0618] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val
[0619] 20 25 30
[0620] Gly Ser
[0621] <210> 55
[0622] <211> 33
[0623] <212> PRT

[0624] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0625] <220>

[0626] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0627] <400> 55

[0628] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0629] 1 5 10 15

[0630] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val

[0631] 20 25 30

[0632] Gly

[0633] <210> 56

[0634] <211> 32

[0635] <212> PRT

[0636] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0637] <220>

[0638] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0639] <400> 56

[0640] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0641] 1 5 10 15

[0642] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val

[0643] 20 25 30

[0644] <210> 57

[0645] <211> 31

[0646] <212> PRT

[0647] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0648] <220>

[0649] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0650] <400> 57

[0651] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0652] 1 5 10 15

[0653] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn

[0654] 20 25 30

[0655] <210> 58

[0656] <211> 30

[0657] <212> PRT

[0658] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0659] <220>

[0660] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0661] <400> 58

[0662] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0663] 1 5 10 15

[0664] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr

[0665] 20 25 30

[0666] <210> 59

[0667] <211> 29

[0668] <212> PRT

[0669] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0670] <220>

[0671] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0672] <400> 59

[0673] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0674] 1 5 10 15

[0675] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro

[0676] 20 25

[0677] <210> 60

[0678] <211> 28

[0679] <212> PRT

[0680] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0681] <220>

[0682] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0683] <400> 60

[0684] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0685] 1 5 10 15

[0686] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser

[0687] 20 25

[0688] <210> 61

[0689] <211> 27

[0690] <212> PRT

[0691] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0692] <220>

[0693] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0694] <400> 61

[0695] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0696] 1 5 10 15

[0697] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr

[0698] 20 25

[0699] <210> 62

[0700] <211> 26

[0701] <212> PRT

[0702] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0703] <220>

[0704] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0705] <400> 62

[0706] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0707] 1 5 10 15

[0708] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile

[0709] 20 25

[0710] <210> 63

[0711] <211> 25

[0712] <212> PRT

[0713] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0714] <220>

[0715] <223> 人工序列(Artificial sequence)

[0716] <400> 63

[0717] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0718] 1 5 10 15

[0719] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala

[0720] 20 25

[0721] <210> 64

[0722] <211> 24

[0723] <212> PRT

[0724] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0725] <220>

[0726] <223> 鸡(Gallus gallus)截短

[0727] <400> 64

[0728] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0729] 1 5 10 15

[0730] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly

[0731] 20

[0732] <210> 65

[0733] <211> 37

[0734] <212> PRT

[0735] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0736] <220>

[0737] <223> 鸡(Gallus gallus)突变

[0738] <400> 65

[0739] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu

[0740] 1 5 10 15

[0741] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val
[0742] 20 25 30
[0743] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0744] 35
[0745] <210> 66
[0746] <211> 37
[0747] <212> PRT
[0748] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0749] <220>
[0750] <223> 鸡(Gallus gallus)突变
[0751] <400> 66
[0752] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0753] 1 5 10 15
[0754] Leu Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val
[0755] 20 25 30
[0756] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0757] 35
[0758] <210> 67
[0759] <211> 37
[0760] <212> PRT
[0761] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0762] <220>
[0763] <223> 鸡(Gallus gallus)突变
[0764] <400> 67
[0765] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0766] 1 5 10 15
[0767] Val Arg Ser Ser Ser Asn Leu Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val
[0768] 20 25 30
[0769] Gly Ser Asn Thr Tyr
[0770] 35
[0771] <210> 68
[0772] <211> 37
[0773] <212> PRT
[0774] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0775] <220>
[0776] <223> 鸡(Gallus gallus)突变
[0777] <400> 68
[0778] Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
[0779] 1 5 10 15

[0780] Val Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val

[0781] 20 25 30

[0782] Gly Ser Asn Thr Tyr

[0783] 35

[0784] <210> 69

[0785] <211> 36

[0786] <212> PRT

[0787] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0788] <220>

[0789] <223> 鸡(Gallus gallus)突变

[0790] <400> 69

[0791] Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val

[0792] 1 5 10 15

[0793] Arg Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Pro Thr Asn Val Gly

[0794] 20 25 30

[0795] Ser Asn Thr Tyr

[0796] 35

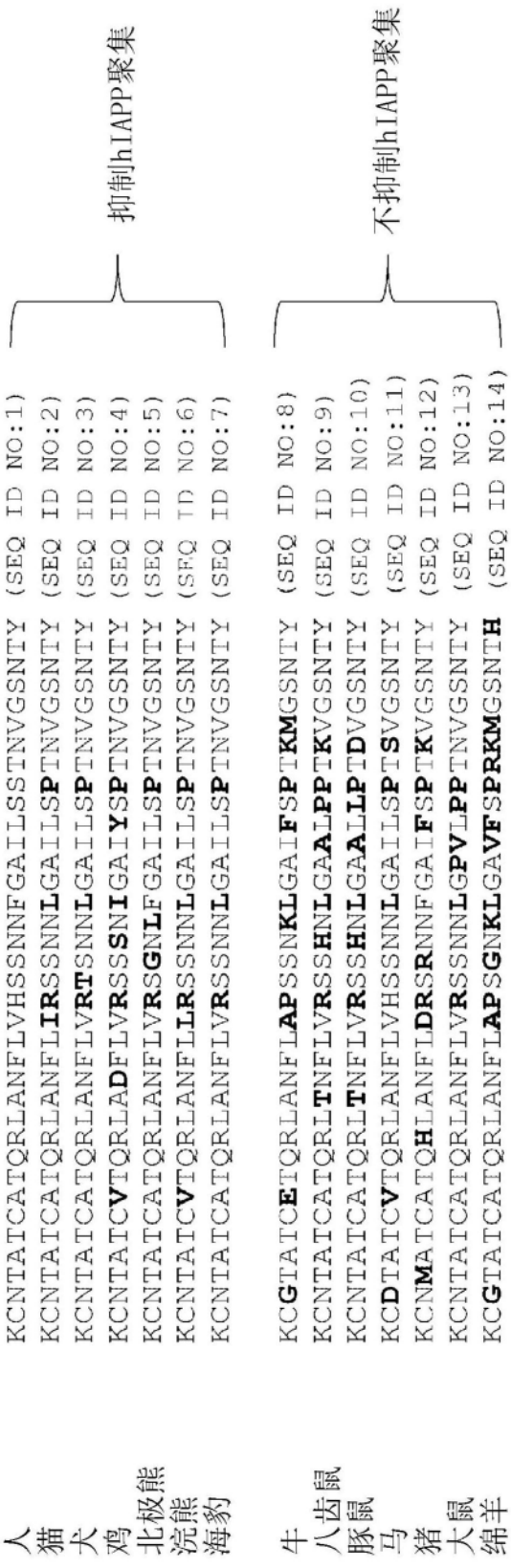

抑制hIAPP聚集
不抑制hIAPP聚集
人 KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY (SEQ ID NO:1)
猫 KCNTATCATQRLANFLIRSSNNLGAILSPTNVGSNTY (SEQ ID NO:2)
犬 KCNTATCATQRLANFLVRTSNNLGAILSPTNVGSNTY (SEQ ID NO:3)
鸡 KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNVGSNTY (SEQ ID NO:4)
北极熊 KCNTATCATQRLANFLVRSGNLFGAILSPTNVGSNTY (SEQ ID NO:5)
浣熊 KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVGSNTY (SEQ ID NO:6)
海豹 KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNVGSNTY (SEQ ID NO:7)
牛 KCGTATCETQRLANFLAPSSNKLGAIFSPTKMGSNTY (SEQ ID NO:8)
八齿鼠 KCNTATCATQRLTNFLVRSSHNLGAALPPTKVGSNTY (SEQ ID NO:9)
豚鼠 KCNTATCATQRLTNFLVRSSHNLGAALLPTDVGSNTY (SEQ ID NO:10)
马 KCDTATCVTQRLANFLVHSSNNLGAILSPTSVGSNTY (SEQ ID NO:11)
猪 KCNMATCATQHLANFLDRSRNNFGAIFSPTKVGSNTY (SEQ ID NO:12)
大鼠 KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY (SEQ ID NO:13)
绵羊 KCGTATCATQRLANFLAPSGNKLGAVFSPRKMGSNTH (SEQ ID NO:14)

图1

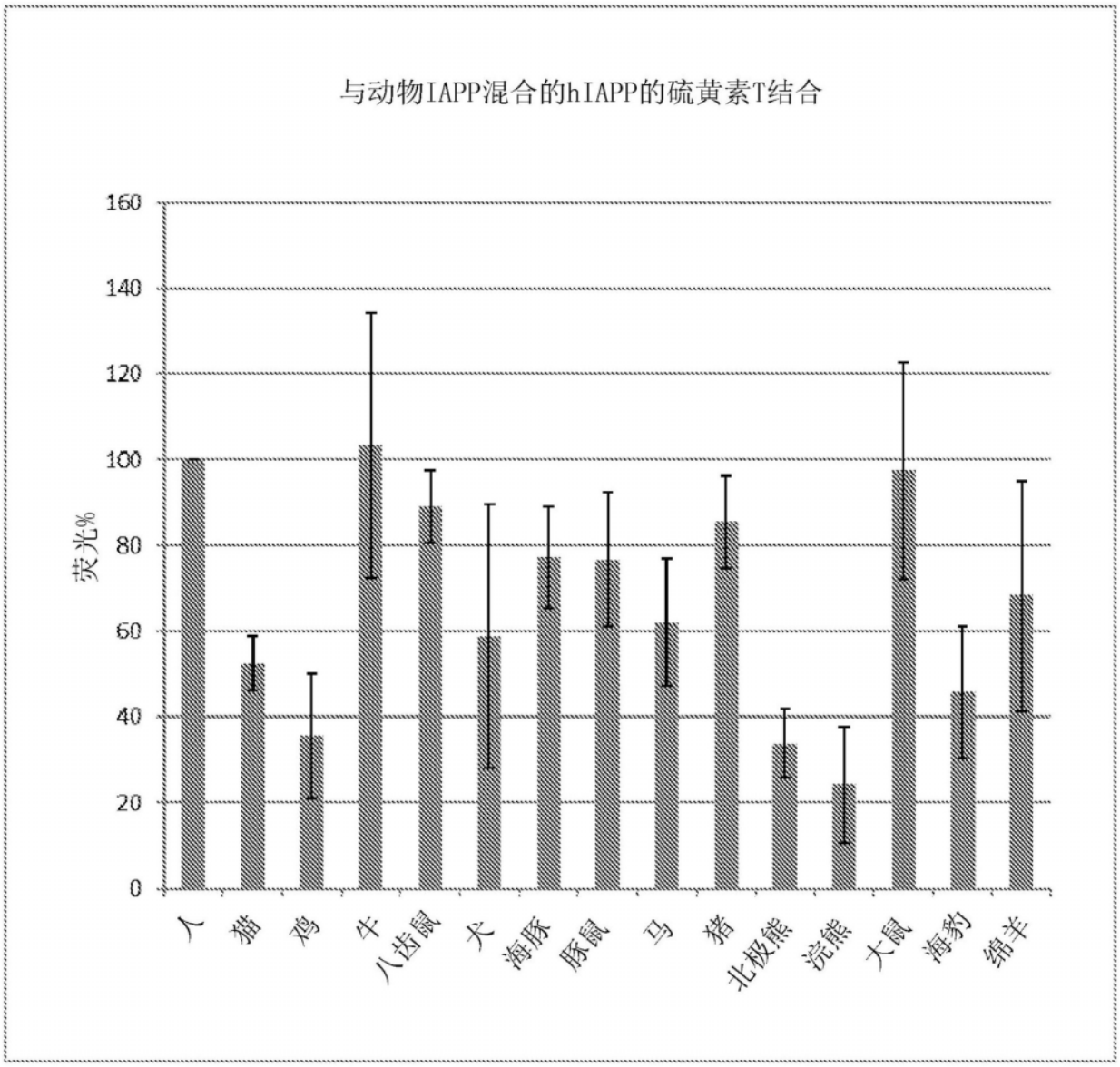

与动物IAPP混合的hIAPP的硫黄素T结合
荧光%
160
140
120
100
80
60
40
20
0
人
猫
鸡
牛
八齿鼠
犬
海豚
豚鼠
马
猪
北极熊
浣熊
大鼠
海豹
绵羊

图2

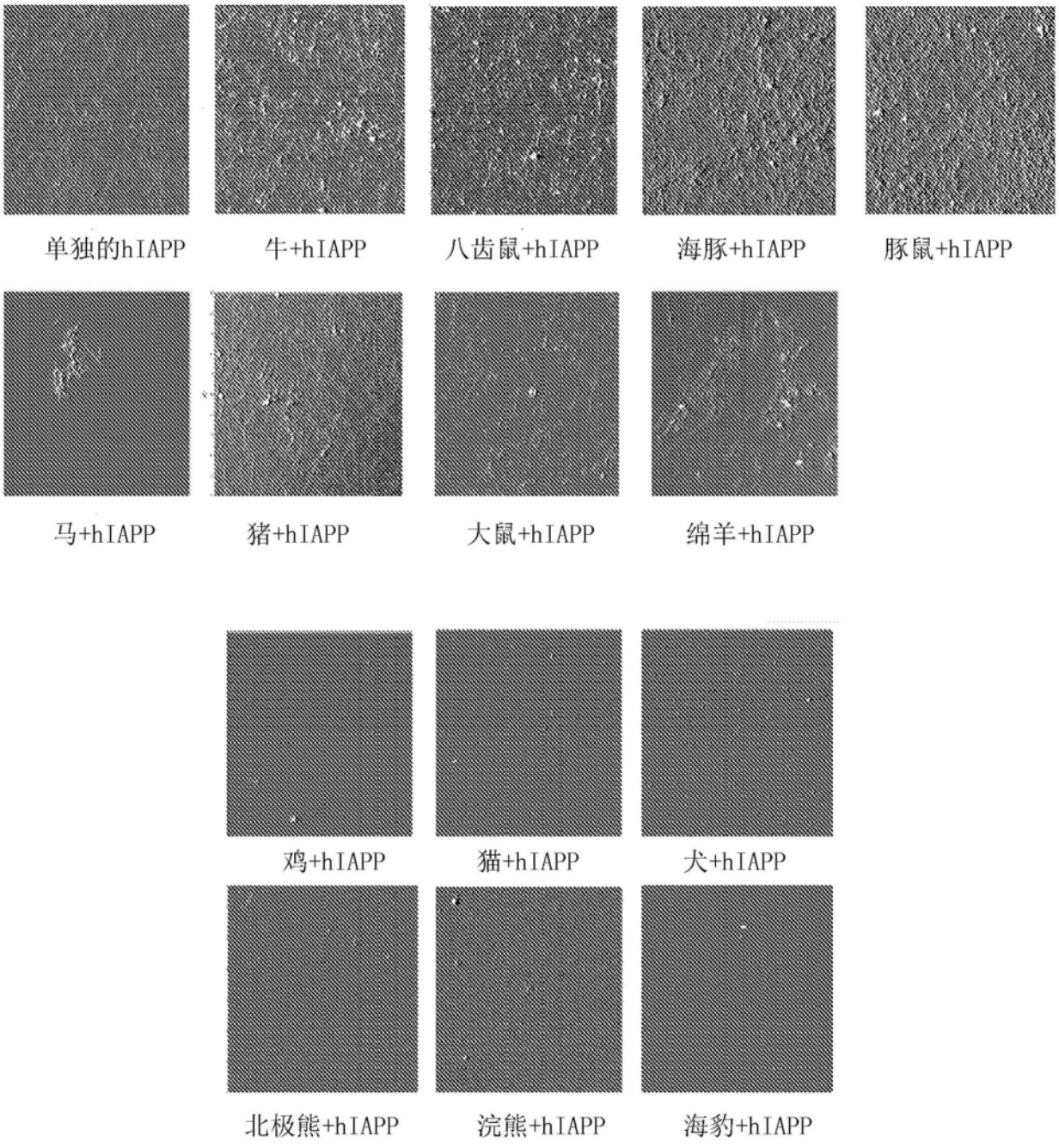

单独的hIAPP
牛+hIAPP
八齿鼠+hIAPP
海豚+hIAPP
豚鼠+hIAPP
马+hIAPP
猪+hIAPP
大鼠+hIAPP
绵羊+hIAPP
鸡+hIAPP
猫+hIAPP
犬+hIAPP
北极熊+hIAPP
浣熊+hIAPP
海豹+hIAPP

图3

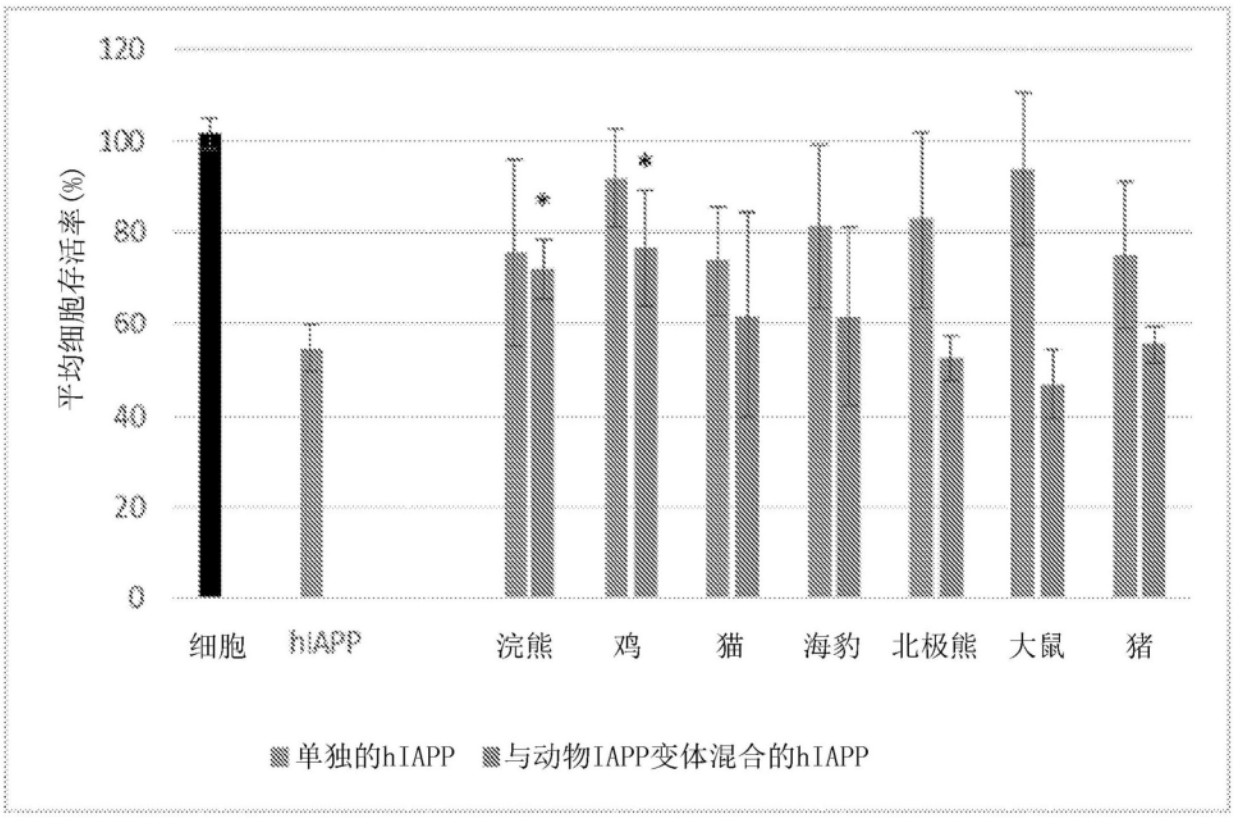

120
100
80
60
40
20
0
平均细胞存活率(%)
细胞
hIAPP
浣熊
鸡
猫
海豹
北极熊
大鼠
猪
*
*
单独的hIAPP
与动物IAPP变体混合的hIAPP

图4

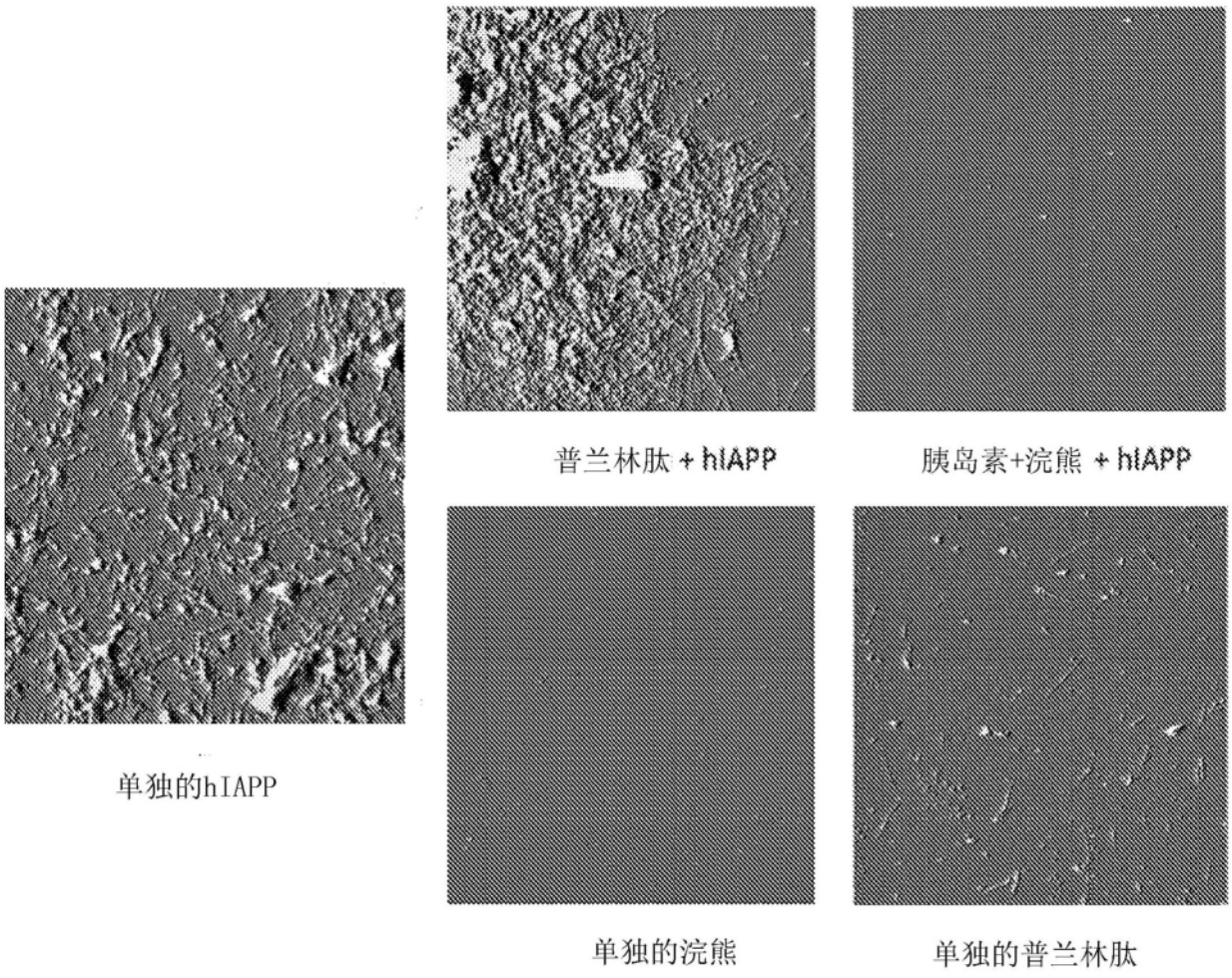


图5

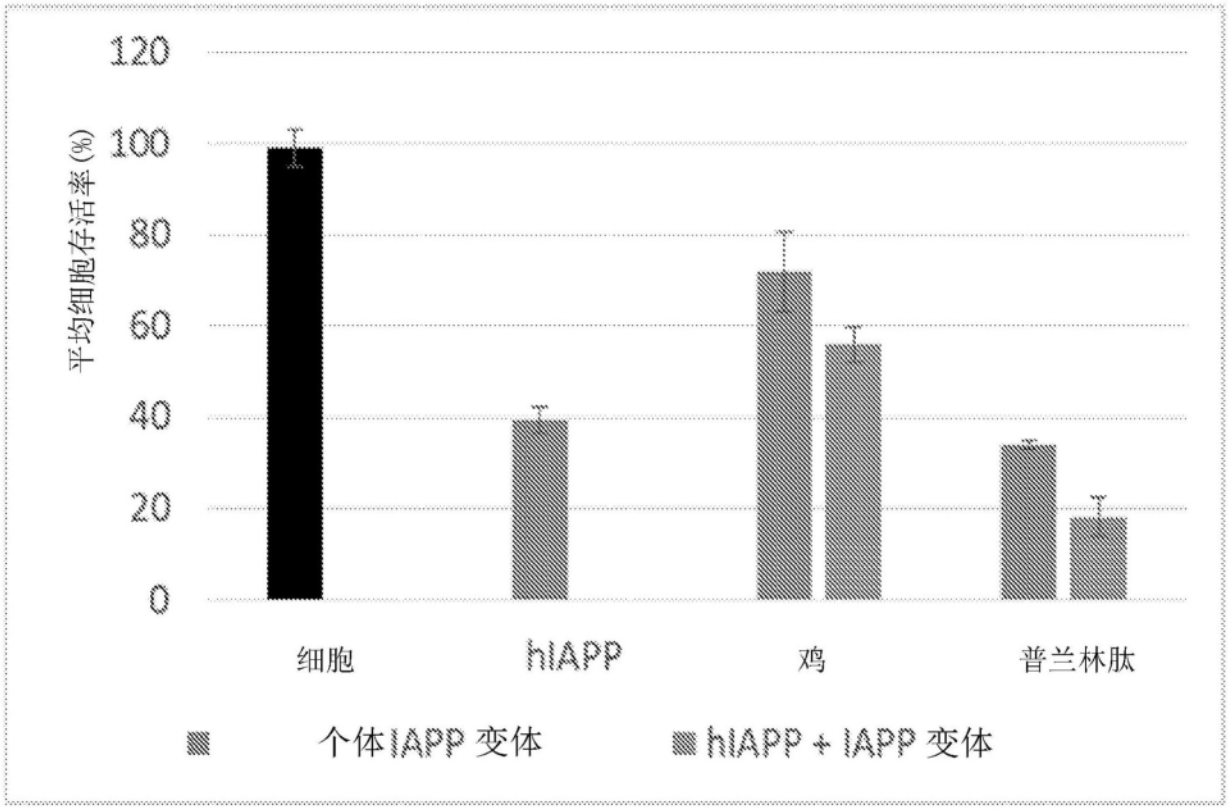

120
100
80
60
40
20
0
平均细胞存活率(%)
细胞
hIAPP
鸡
普兰林肽
个体IAPP 变体
hIAPP + IAPP 变体

图6

名称	序列	序列编号	抑制	拯救
人	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	(SEQ ID NO:1)		
WS	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:7)	是	是
WS_R	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNFGAILSSTNVGSNTY	(SEQ ID NO:15)	否	是
WS_L	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNLGAILSSTNVGSNTY	(SEQ ID NO:19)	否	否
WS_P	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:20)	否	否
WS_RL	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGAILSSTNVGSNTY	(SEQ ID NO:16)	是	是
WS_RP	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNFGAILSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:17)	否	是
WS_LP	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNLGAILSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:18)	是	否

图7

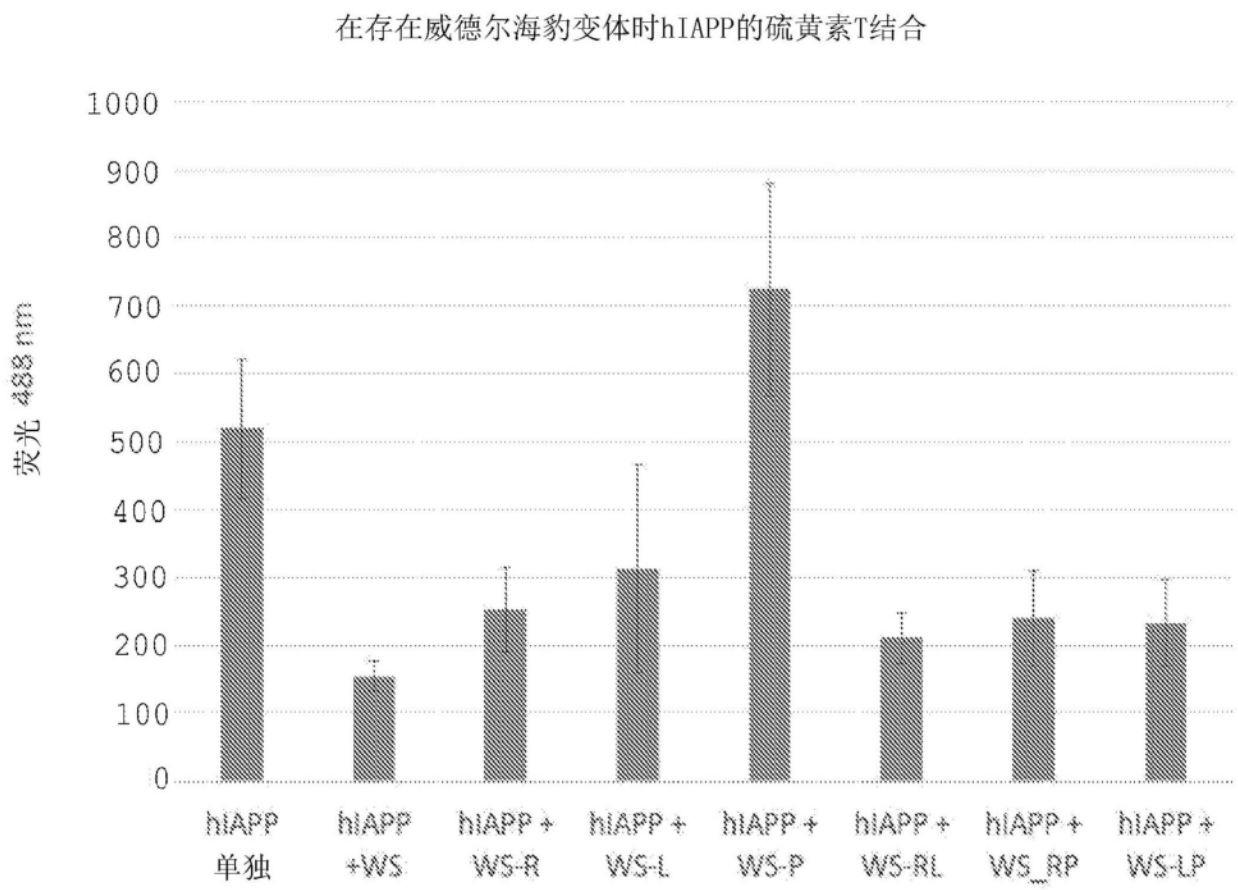

在存在威德尔海豹变体时hIAPP的硫黄素T结合
荧光 488 nm
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
hIAPP 单独
hIAPP +WS
hIAPP + WS-R
hIAPP + WS-L
hIAPP + WS-P
hIAPP + WS-RL
hIAPP + WS_RP
hIAPP + WS-LP

图8

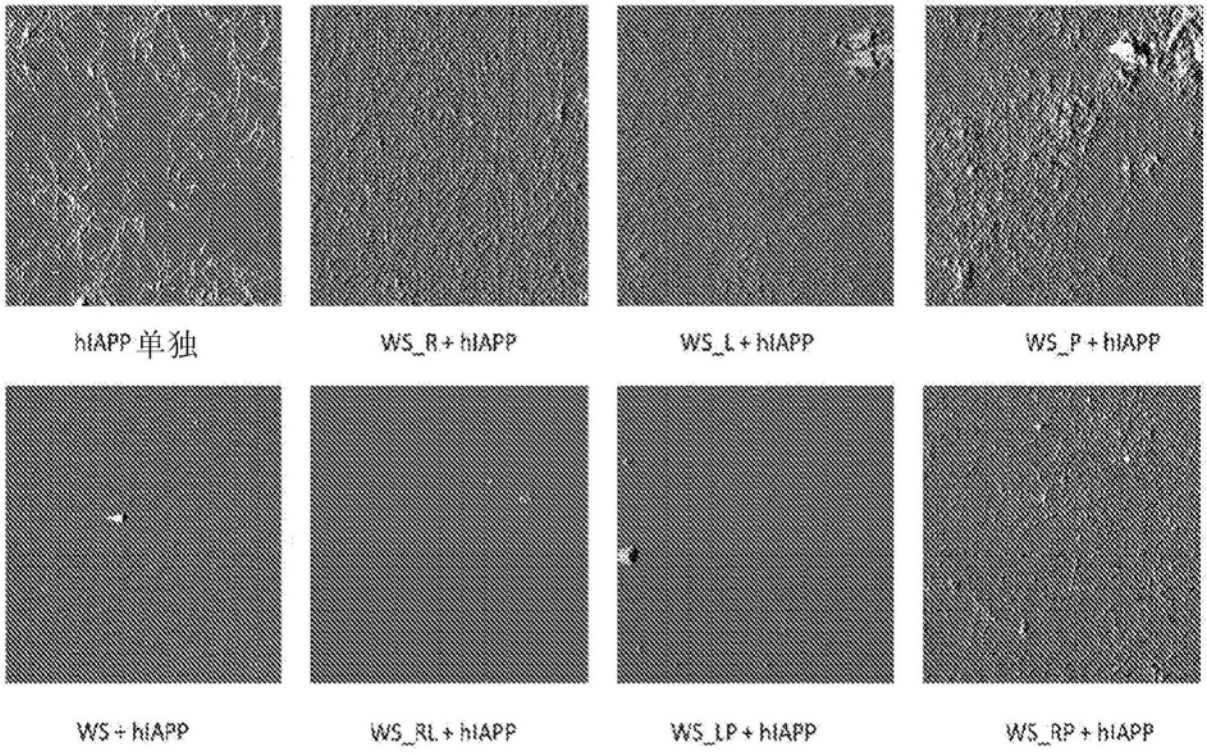

hIAPP 单独
WS_R + hIAPP
WS_L + hIAPP
WS_P + hIAPP
WS + hIAPP
WS_RL + hIAPP
WS_LP + hIAPP
WS_RP + hIAPP

图9

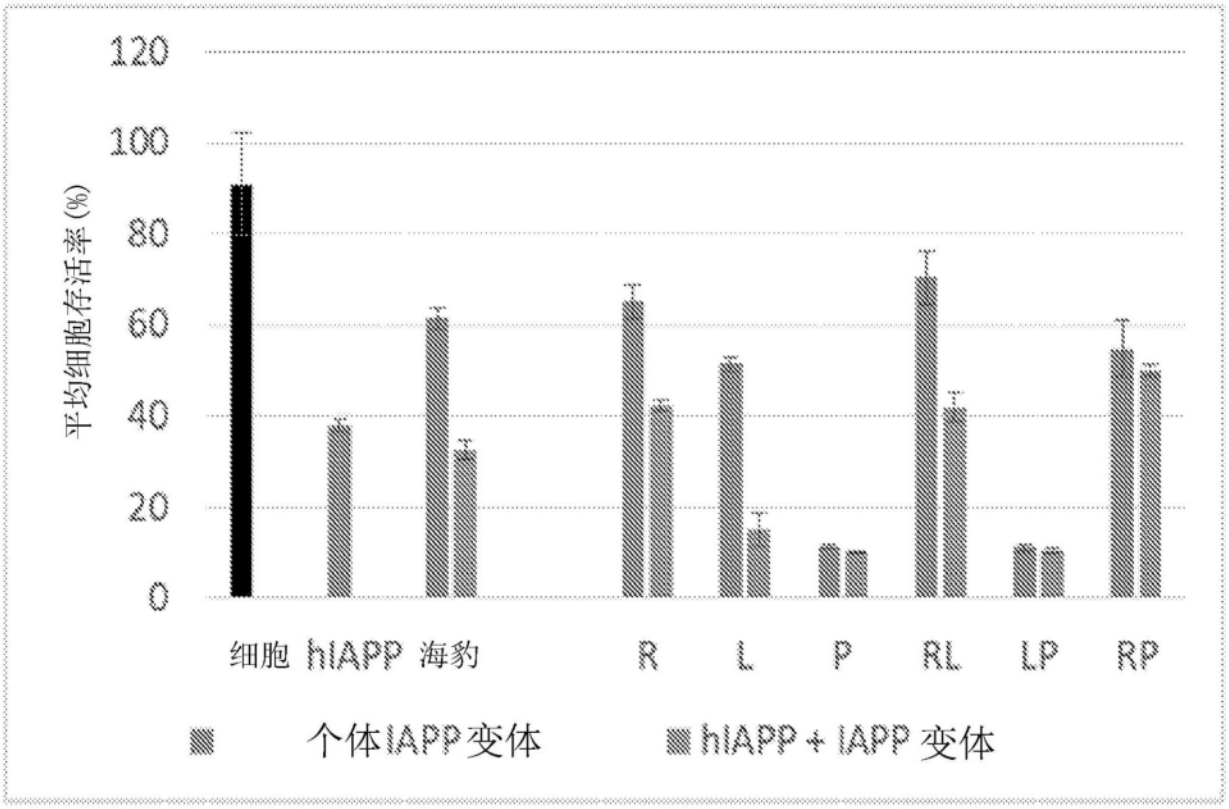

120
100
80
60
40
20
0
平均细胞存活率(%)
细胞
hIAPP
海豹
R
L
P
RL
LP
RP
个体IAPP变体
hIAPP + IAPP 变体

图10

名称	序列	序列编号	抑制	拯救
浣熊	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILS-PTNVGSNTY	(SEQ ID NO:6)	**是**	**是**
R-N(15-37)	FLLRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:21)	否	否
R-Mid(15-31)	FLLRSSNNLGAILSPTN	(SEQ ID NO:22)	否	否
R-N12(8-37)	ATQRLANFLLRSSNNLGAILSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:23)	否	否
R8-30;	VTQRLANFLLRSSNNLGAILSPT	(SEQ ID NO:24)	否	否
R8-23	VTQRLANFLLRSSNNL	(SEQ ID NO:25)	否	否
R-C(1-30)	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSPT	(SEQ ID NO:31)	**是**	**是**
R1-29	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAILSP	(SEQ ID NO:32)	**是**	**是**
R1-27	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAIL	(SEQ ID NO:34)	**是**	**是**
R1-23	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNL	(SEQ ID NO:38)	否	否
R1-20	KCNTATCVTQRLANFLLRSS	(SEQ ID NO:39)	否	否
R1-16	KCNTATCVTQRLANFL	(SEQ ID NO:40)	否	否
R1-14	KCNTATCVTQRLAN	(SEQ ID NO:41)	否	否

图11

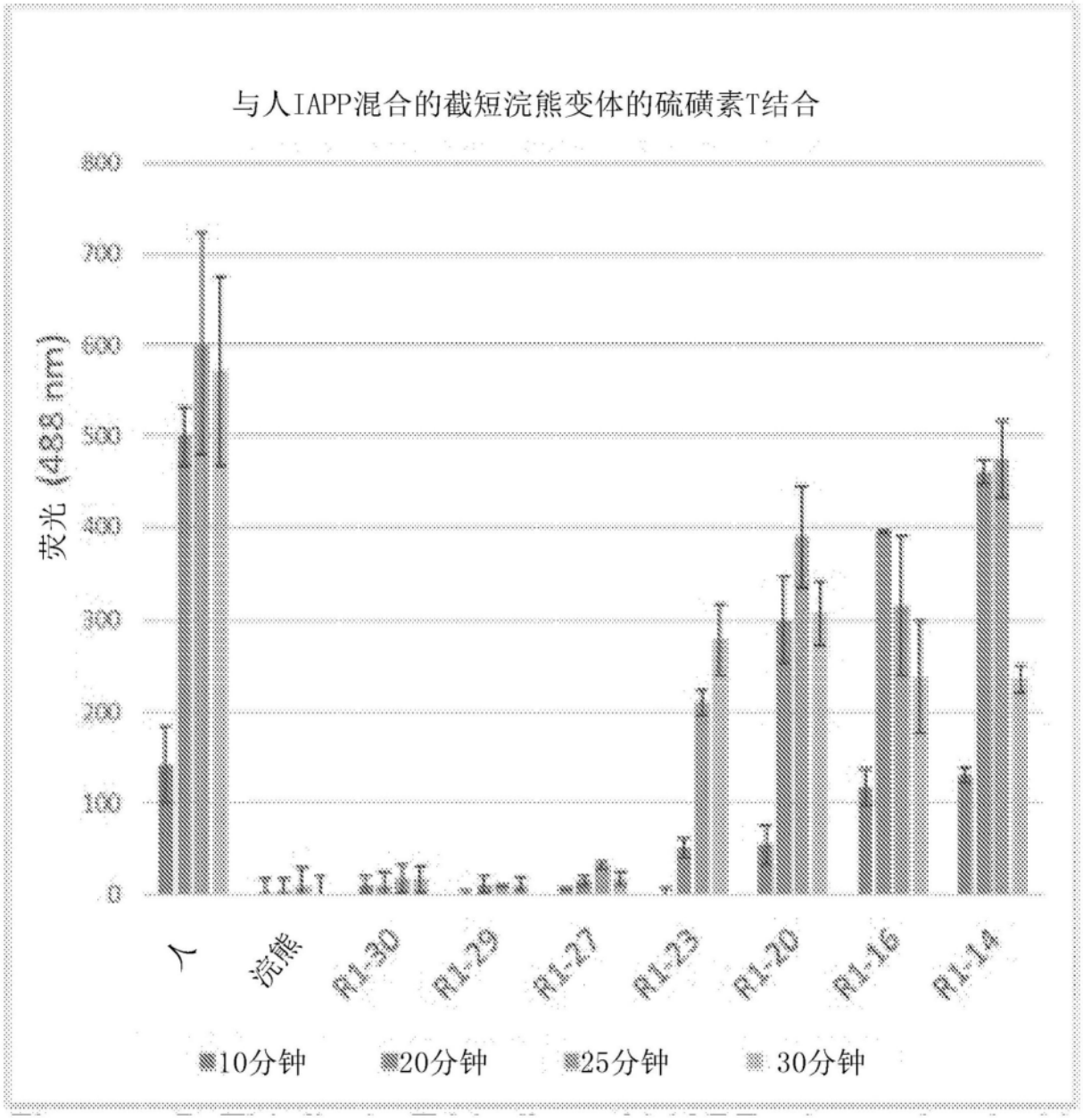

与人IAPP混合的截短浣熊变体的硫磺素T结合
荧光 (488 nm)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
人
浣熊
R1-30
R1-29
R1-27
R1-23
R1-20
R1-16
R1-14
10分钟
20分钟
25分钟
30分钟

图12

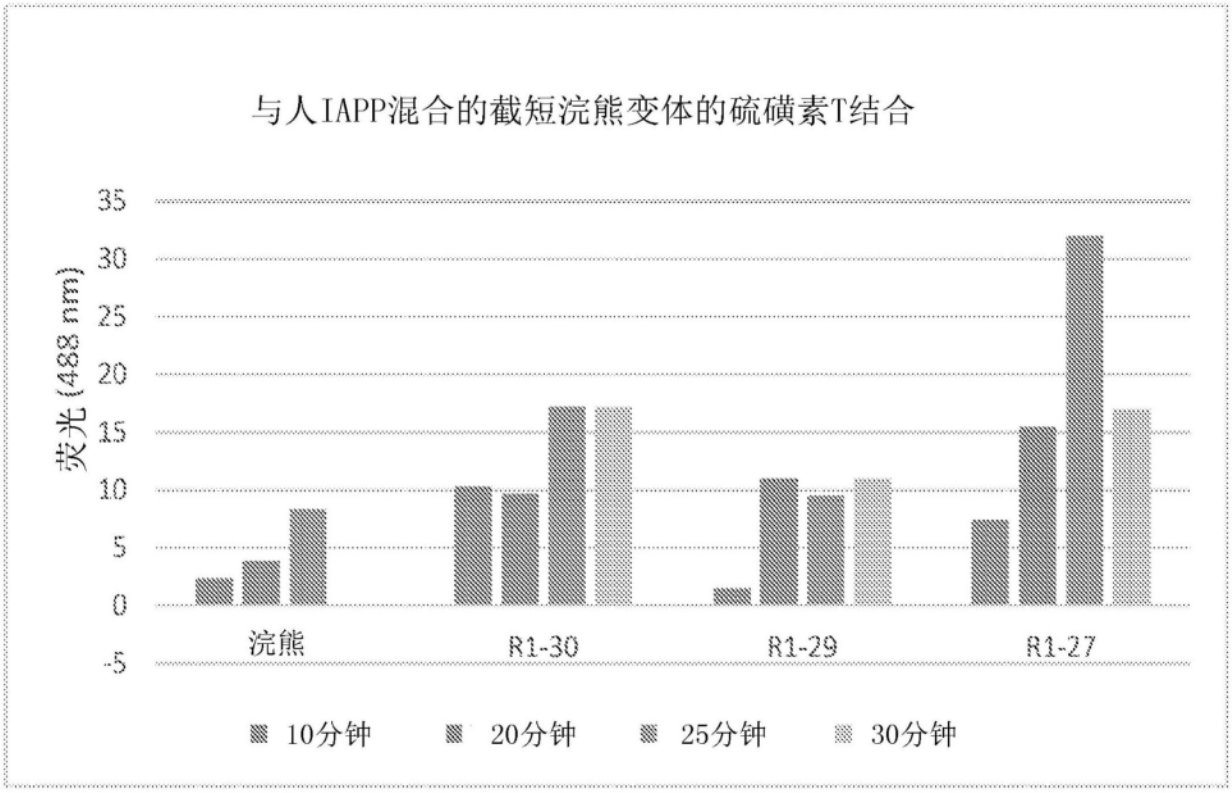

与人IAPP混合的截短浣熊变体的硫磺素T结合
荧光(488 nm)
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
浣熊
R1-30
R1-29
R1-27
10分钟
20分钟
25分钟
30分钟

图13

名称	序列	序列编号	抑制	拯救
Rac_V8A	KCNTATC**A**TQRLANFLLRSSNNLGAIL—SPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:42)	是	否
Rac_N13D	KCNTATCVTQRLA**D**FLLRSSNNLGAIL—SPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:43)	是	否
Rac_L16V	KCNTATCVTQRLANFT**V**RSSNNLGAIL—SPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:44)	是	否
Rac_L22I	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNN**I**GAIL—SPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:45)	是	否
Rac_L26Y	KCNTATCVTQRLANFLLRSSNNLGAI**Y**—SPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:46)	是	是

图14

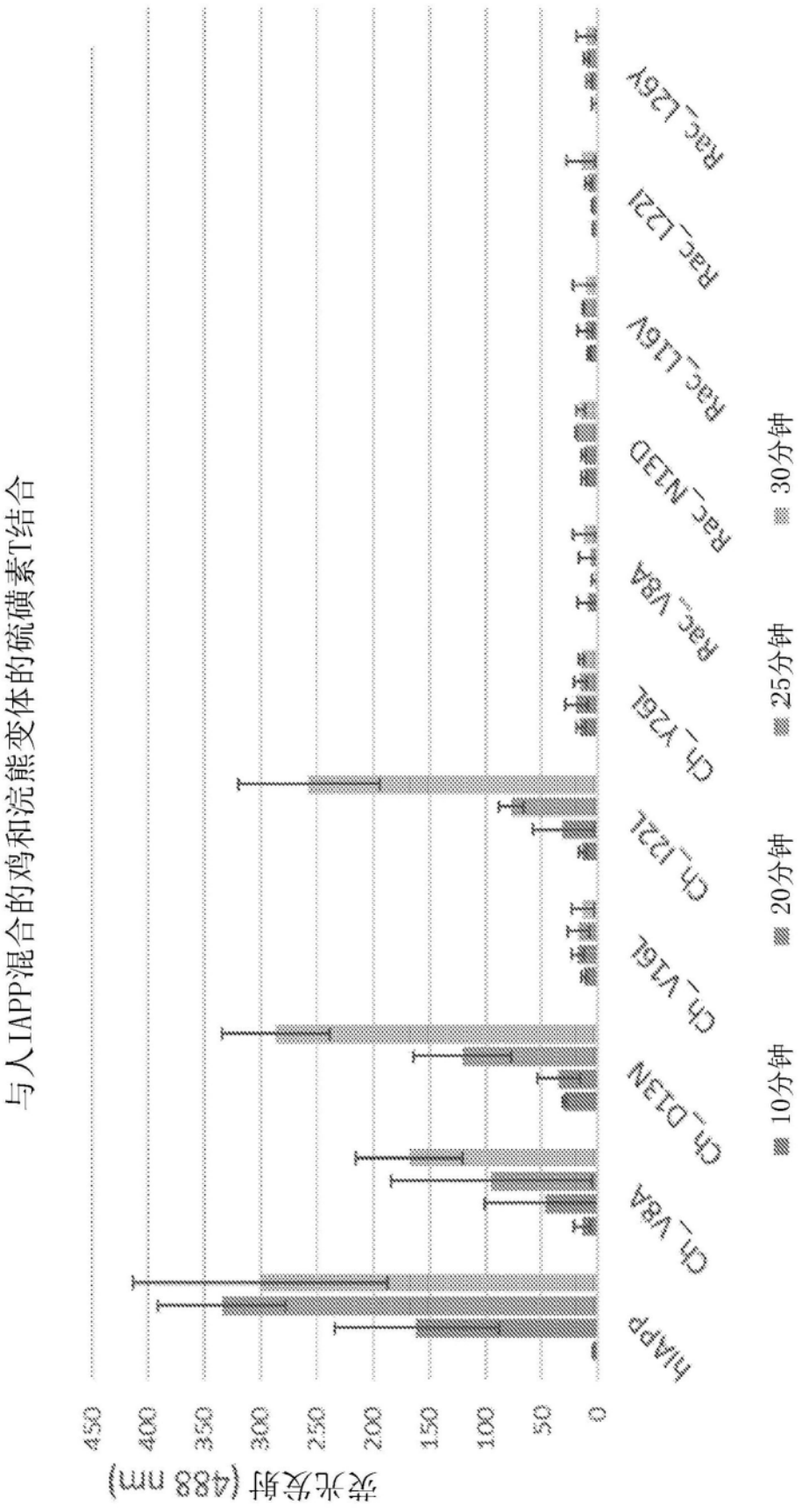

与人IAPP混合的鸡和浣熊变体的硫磺素T结合
荧光发射 (488 nm)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
hIAPP
Ch_V8A
Ch_D13N
Ch_V16L
Ch_I22L
Ch_Y26L
Rac_V8A
Rac_N13D
Rac_L16V
Rac_I22L
Rac_Y26V
10分钟
20分钟
25分钟
30分钟

图15

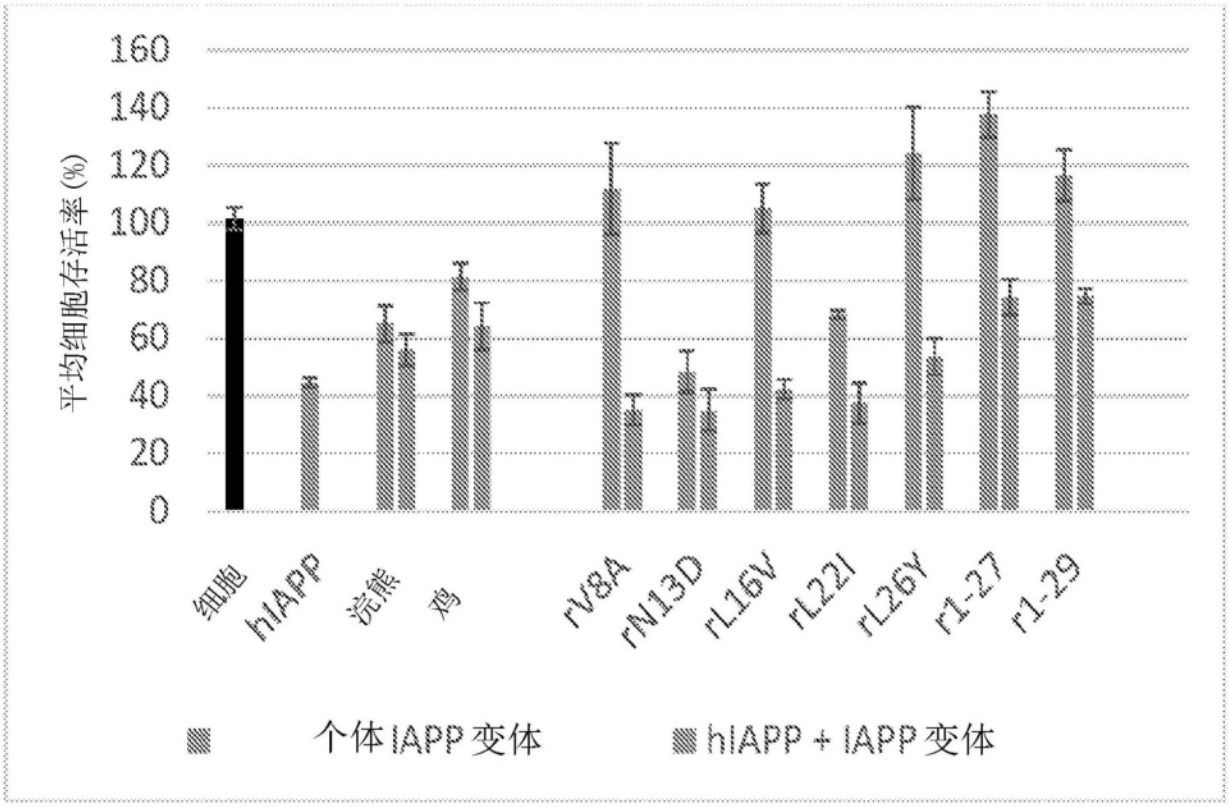

160
140
120
100
80
60
40
20
0
平均细胞存活率(%)
细胞
hIAPP
浣熊
鸡
rV8A
rN13D
rL16V
rL22I
rL26Y
r1-27
r1-29
个体IAPP变体
hIAPP + IAPP变体

图16

名称	序列	序列编号	抑制	拯救
鸡	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIY-- SPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:6)	**是**	**是**
C8-37	ATQRLADFLVRSSSNIGATYSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:44)	否	否
C1-29	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIYSP	(SEQ ID NO:59)	否	**是**
C1-27	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAIY	(SEQ ID NO:61)	**是**	**是**
C1-23	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNI	(SEQ ID NO:45)	否	否
C1-20	KCNTATCVTQRLADFLVRSS	(SEQ ID NO:46)	否	否
C1-18	KCNTATCVTQRLADFLVR	(SEQ ID NO:47)	否	否
C1-16	KCNTATCVTQRLADFL	(SEQ ID NO:48)	否	否
C1-14	KCNTATCVTQRLAD	(SEQ ID NO:49)	否	否

图17

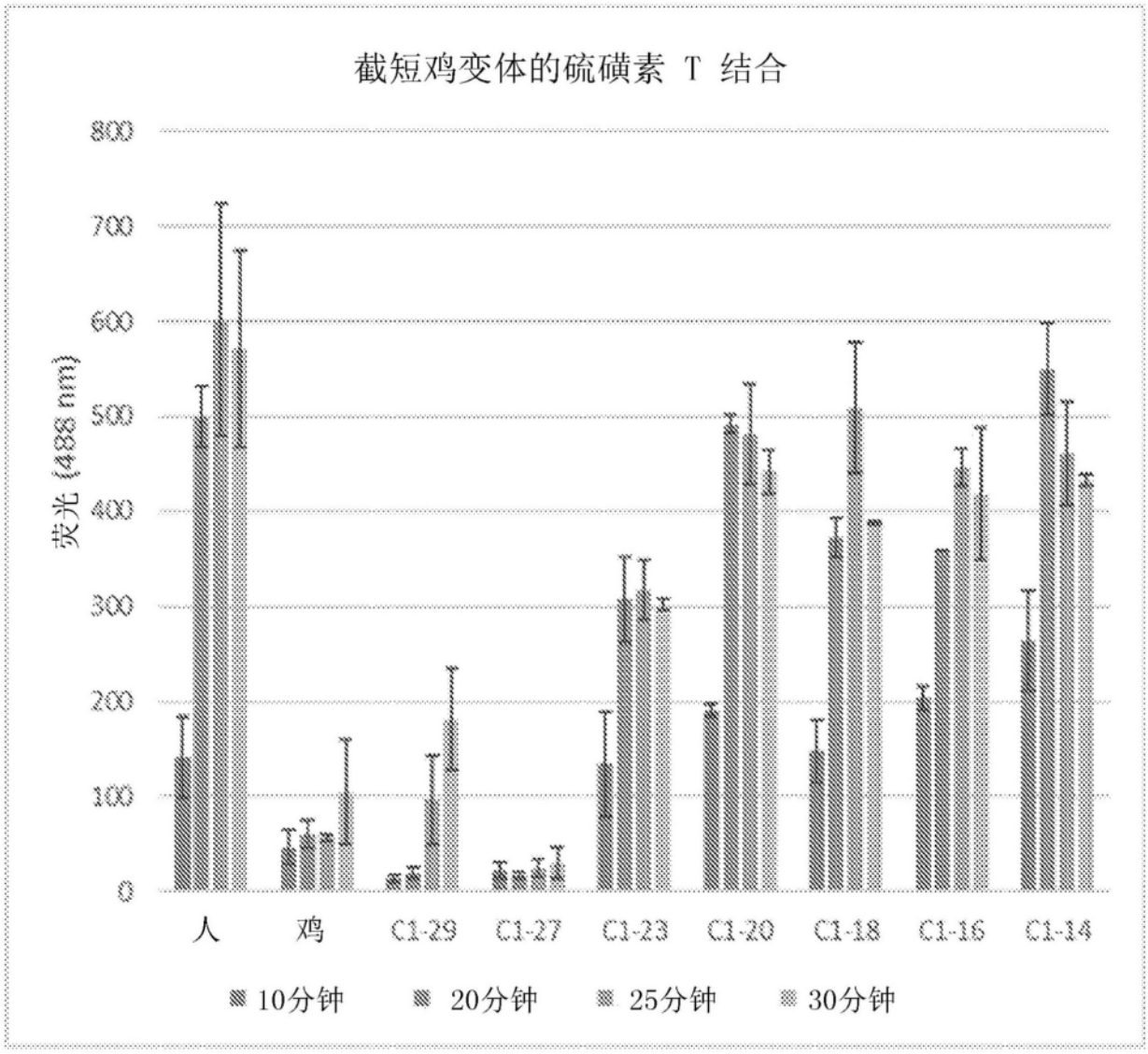

截短鸡变体的硫磺素 T 结合
荧光 (488 nm)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
人
鸡
C1-29
C1-27
C1-23
C1-20
C1-18
C1-16
C1-14
10分钟
20分钟
25分钟
30分钟

图18

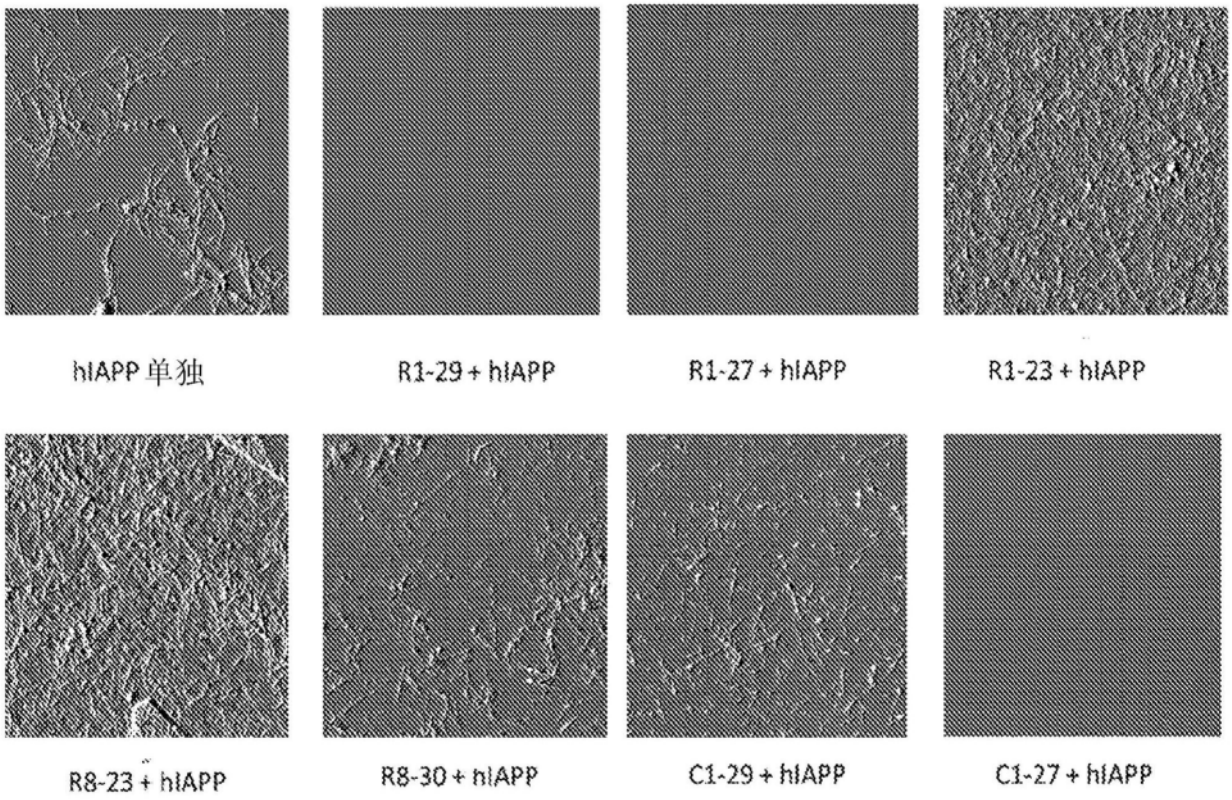

hIAPP 单独
R1-29 + hIAPP
R1-27 + hIAPP
R1-23 + hIAPP
R8-23 + hIAPP
R8-30 + hIAPP
C1-29 + hIAPP
C1-27 + hIAPP

图19

名称	序列	序列编号	抑制	拯救
Ch_V8A	KCNTATC**A**TQRLADFLVRSSSNIGAIYSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:65)	否	是
Ch_D13N	KCNTATCVTQRLA**N**FLVRSSSNIGAIYSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:69)	否	否
Ch_V16L	KCNTATCVTQRLADFL**L**RSSSNIGAIYSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:66)	是	是
Ch_I22L	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSN**L**GAIYSPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:67)	是	是
Ch_Y26L	KCNTATCVTQRLADFLVRSSSNIGAI**L**SPTNVGSNTY	(SEQ ID NO:68)	是	是

图20

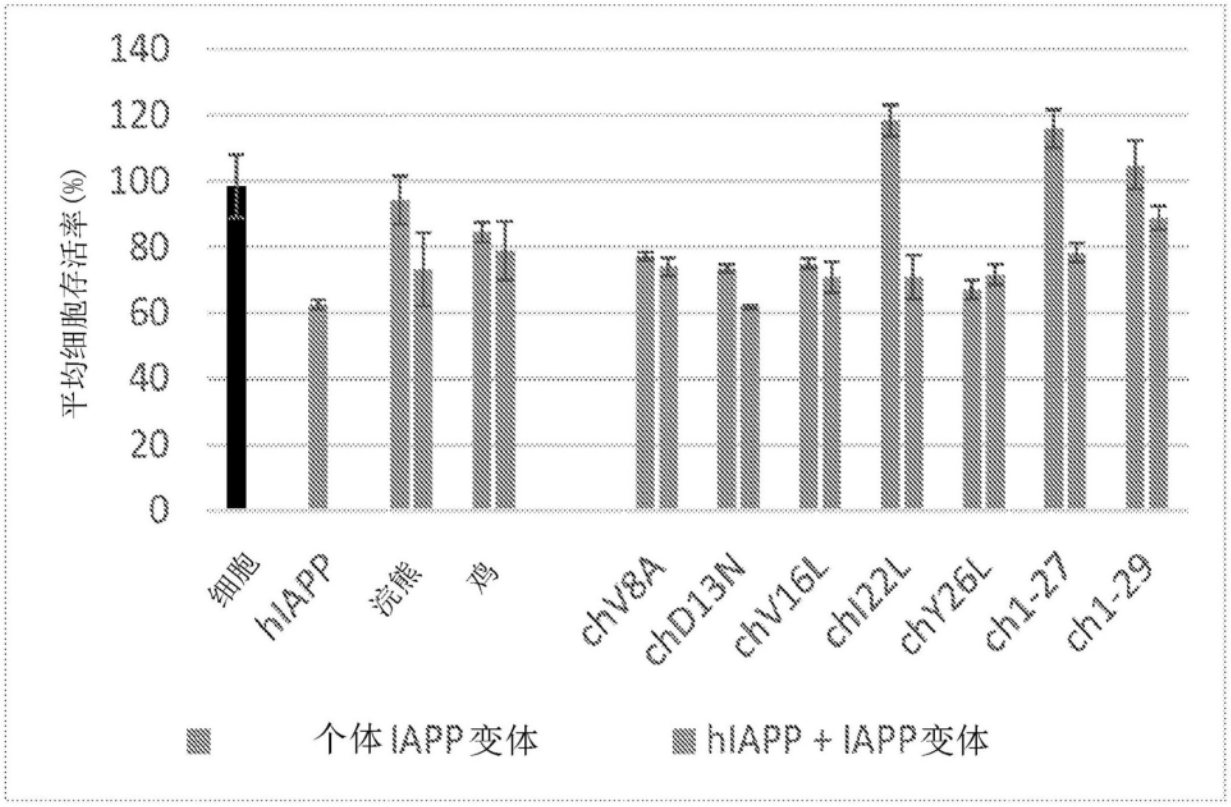

140
120
100
80
60
40
20
0
平均细胞存活率(%)
细胞
hIAPP
浣熊
鸡
chV8A
chD13N
chV16L
chI22L
chY26L
ch1-27
ch1-29
个体IAPP变体
hIAPP + IAPP变体

图21

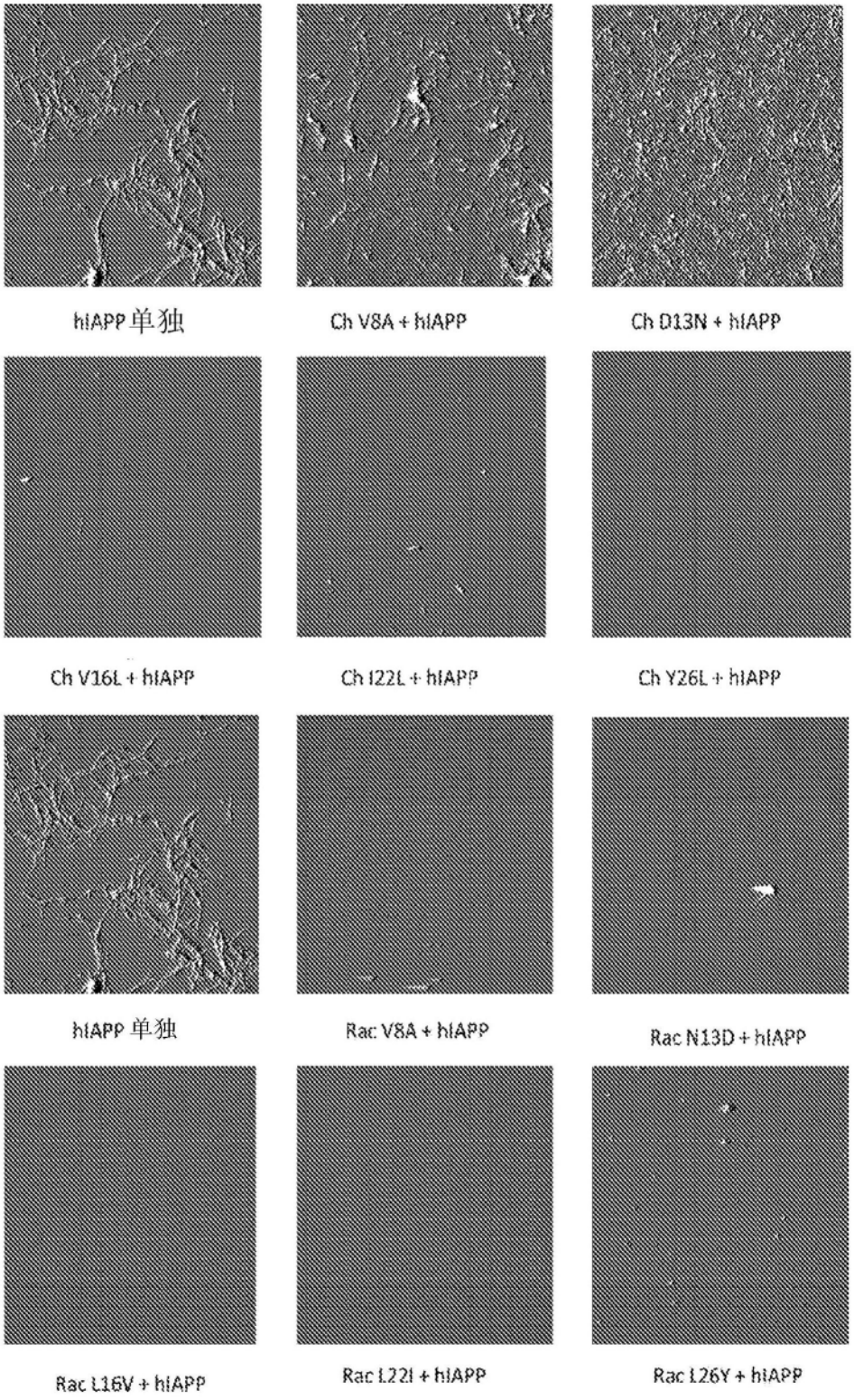

hIAPP单独
Ch V8A + hIAPP
Ch D13N + hIAPP
Ch V16L + hIAPP
Ch I22L + hIAPP
Ch Y26L + hIAPP
hIAPP 单独
Rac V8A + hIAPP
Rac N13D + hIAPP
Rac L16V + hIAPP
Rac L22I + hIAPP
Rac L26Y + hIAPP

图22