

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 5 月 6 日 (06.05.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/083190 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/47 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 25/08* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/124325

(22) 国际申请日: 2020 年 10 月 28 日 (28.10.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911028727.X 2019 年 10 月 28 日 (28.10.2019) CN

(71) 申请人: 中国医学科学院药物研究所 (INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市西城区先农坛街 1 号张徐斌, Beijing 100050 (CN)。

(72) 发明人: 庾石山 (YU, Shishan); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。 王晓良 (WANG, Xiaoliang); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。 屈晶 (QU, Jing); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。 史国茹 (SHI, Guoru); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。 符江 (FU, Jiang); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。 王玲 (WANG, Ling); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。 冯楠 (FENG, Nan); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。 徐少峰 (XU, Shaofeng); 中国北京市西城区南纬路甲 2 号, Beijing 100050 (CN)。

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

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) Title: KERATIN BD-1, PREPARATION METHOD, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种角蛋白 BD-1、制法和其药物组合物与用途

(57) Abstract: Provided is a keratin BD-1, a nucleic acid molecule encoding the keratin BD-1, an expression vector containing the nucleic acid molecule, a host cell containing the expression vector or genome integrating the nucleic acid molecule, and a preparation method for the keratin BD-1, a pharmaceutical composition containing the keratin BD-1, and a use for the keratin BD-1, the nucleic acid molecule, the expression vector, the host cell, or the pharmaceutical composition in the preparation of antipyretic and analgesic, antitussive and phlegm-dispelling, anticonvulsant, antiepileptic, blood pressure reducing, anti-inflammatory, and antiviral drugs.

(57) 摘要: 提供了一种角蛋白 BD-1, 编码角蛋白 BD-1 的核酸分子, 含有该核酸分子的表达载体, 以及含有该表达载体或基因组整合该核酸分子的宿主细胞, 以及角蛋白 BD-1 的制备方法, 含有角蛋白 BD-1 的药物组合物, 以及上述角蛋白 BD-1、核酸分子、表达载体、宿主细胞、或药物组合物在制备解热镇痛、镇咳祛痰、抗惊厥、抗癫痫、降血压、抗炎、抗病毒药物中的应用。

WO 2021/083190 A1

一种角蛋白BD-1、制法和其药物组合物与用途

技术领域

本发明涉及一种角蛋白BD-1，编码角蛋白BD-1的核酸分子，含有该核酸分子的表达载体，以及含有该表达载体或基因组整合该核酸分子的宿主细胞，以及角蛋白BD-1的制备方法，含有这种角蛋白的药物组合物，以及这种角蛋白和所述药物组合物在制备解热镇痛、镇咳祛痰、抗惊厥、抗癫痫、降血压、抗炎、抗病毒药物中的应用。

背景技术

角蛋白是蛋白质的一种，广泛存在于人和动物的表皮，并且是毛发、羽毛、蹄、壳、爪、角等的主要成分，是结缔组织极重要的结构蛋白质，起着保护机体的作用。

角蛋白广泛存在于生物体中，是一种可再生资源，具有很大的利用价值，但并没有得到广泛有效的利用。主要原因是角蛋白不溶于各种溶剂，并且角蛋白一般都较其他蛋白质更耐蛋白酶的酶解。因此提取制备天然角蛋白的难度非常大。

随着基因组学、蛋白质组学、基因工程、微生物工程等现代生物技术的飞速发展，越来越多的基因被发现。而利用蛋白表达系统制备生产目的蛋白是研究基因或蛋白的生物功能的重要手段。

利用蛋白表达系统制备目的角蛋白，进而研究其结构与功能，未见其他文献报道，具有新颖性和创造性。

发明内容

本发明解决的技术问题是提供一种角蛋白BD-1，编码角蛋白BD-1的核酸分子，含有该核酸分子的表达载体，以及含有该表达载体或基因组整合该核酸分子的宿主细胞，以及角蛋白BD-1的制备方法，含有角蛋白BD-1的药物组合物，以及上述角蛋白BD-1、核酸分子、表达载体、宿主细胞、或药物组合物在制备解热镇痛、镇咳祛痰、抗惊厥、抗癫痫、降血压、抗炎、抗病毒药物中的应用。

为解决本发明的技术问题，本发明提供如下技术方案：

本发明技术方案的第一方面是提供了一种角蛋白BD-1，其特征在于，所述角蛋白BD-1的氨基酸序列为：

(1) 序列表中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列；

(2) 序列表中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加1-35个氨基酸形成的基本上保持相同生物学功能的氨基酸序列。

进一步的，在角蛋白BD-1上可进行常规修饰；或者在角蛋白BD-1上还连接有用

于检测或纯化的标签。

更进一步的，所述的常规修饰包括乙酰化、酰胺化、环化、糖基化、磷酸化、烷基化、生物素化、荧光基团修饰、聚乙二醇PEG修饰、固定化修饰、硫酸化、氧化、甲基化、脱氨化、形成二硫键或二硫键断裂；所述的标签包括His6、GST、EGFP、MBP、Nus、HA、IgG、FLAG、c-Myc、Profinity eXact。

本发明技术方案的第二方面是提供了一种编码第一方面所述角蛋白BD-1的核酸分子。

进一步的，所述的核酸分子的核苷酸序列为：

- (1) 序列表中SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列；
- (2) 基于SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列进行序列优化得到的核苷酸序列；
- (3) 与上述(1)或(2)中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

本发明技术方案的第三方面是提供了一种表达载体，其特征在于，所述的表达载体含有第二方面所述的核酸分子。

进一步的，表达载体可以为pET系列、pUC系列、pQE系列、pBV系列、pMAL系列，pPIC9、pPIC9K、pHIL-S1、pPICZ α /A、pYAM75P，pHIL-D2、pA0815、pPIC3K、pPICZ、pHWO10、pGAPZ、pGAPZ α 、pPIC3.5K等；优选的表达载体为pET系列载体；最优选的表达载体为pET-28a(+).

本发明技术方案的第四方面是提供了一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有第三方面所述的表达载体或者基因组中整合有第二方面所述的核酸分子。

进一步的，所述的宿主细胞包括细菌、酵母、曲霉菌、植物细胞、或昆虫细胞。

更进一步的，所述的细菌包括大肠杆菌或酵母。

感受态宿主细胞可以为BL21系列，Transetta系列，Rosetta系列，DH5 α 系列，JM系列，Top系列，Orgami系列，Trans1-T1，TG1，TB1；Y11430，MG1003，GS115 (AOX1)，KM71，SMD1168等；优选的表达感受态细胞为BL21 (DE3)，Transetta (DE3)。

本发明技术方案的第五方面是提供了一种制备第一方面所述角蛋白BD-1的方法，其特征在于，包括以下步骤：

A. 合成第一方面所述的角蛋白BD-1对应的核酸分子，将核酸分子连入相应的表达载体，将表达载体转化到宿主细胞，在一定条件下在发酵设备中培养带表达载体的宿主细胞并诱导表达角蛋白BD-1，得到含有角蛋白BD-1的粗蛋白溶液；

B. 对步骤A中所表达的粗蛋白溶液进行分离纯化干燥得到角蛋白BD-1。

进一步的，在步骤A中，所述的宿主细胞主要为选自大肠杆菌，所述的角蛋白BD-1在大肠杆菌包涵体中表达，所述的发酵设备包括摇瓶或发酵罐。

进一步的，在步骤A中，诱导表达角蛋白BD-1后，可用清洗剂清洗杂质，用溶液

溶解得到粗蛋白溶液。

进一步的，步骤A中的培养基可以为LB培养基、TB培养基、SB培养基、SOB培养基、SOC培养基，PDA培养基、YPD培养基、孟加拉红培养基、高盐察氏培养基、DOBA培养基、米曲培养基及其改良配方等；摇瓶发酵优选LB培养基、TB培养基，最优选为TB培养基；发酵罐优选LB培养基及其改良配方。

进一步的，步骤A中的诱导剂可以为IPTG、乳糖、阿拉伯糖等；优选为IPTG、乳糖。

进一步的，步骤A中，获得的发酵菌液，离心，弃去上清液；沉淀悬浮于缓冲液中，破碎菌体，再离心，弃去上清液；沉淀用清洗剂清洗后，再用尿素溶液溶解，得到BD-1粗蛋白溶液。

其中，缓冲液优选为buffer A，其用量为：发酵液体积:buffer A体积=1~100:1，优选为10:1；

清洗剂可以为尿素溶液、盐酸胍溶液、Triton、buffer A等，优选为尿素溶液，最优选为2M尿素溶液（可含有1%Triton），其用量为：发酵液体积:2M尿素体积=0.2~100:1，优选为1~15:1；

尿素溶液优选为8M尿素溶液，其用量为：发酵液体积:8M尿素体积=0.2~100:1，优选为2~15:1。

进一步的，在步骤B中，所述的分离纯化的方法包括超滤微滤膜技术纯化方法、柱色谱纯化方法、盐析方法、透析方法。

进一步的，步骤B中，分离纯化方法如下：

（1）所述透析方法，即将步骤A中获得的粗蛋白溶液用透析的方法纯化，得到目标蛋白BD-1溶液。

透析袋截留分子量可以为0.5-10kD，优选的透析袋截留分子量为3.5-10kD，最优选的透析袋截留分子量为10kD。

（2）所述超滤微滤方法，即将步骤A中获得的粗蛋白溶液用超滤膜或微滤膜等膜技术纯化，得到目标蛋白BD-1浓缩溶液。

优选的是两次微滤膜纯化，第一次膜孔径1000~1500nm，第二次膜孔径20~50nm。

（3）所述柱色谱方法，即将步骤A中获得的粗蛋白溶液通过柱色谱，例如各种交换柱或排阻柱色谱，分离纯化得到目标蛋白BD-1。

优选的排阻柱是葡聚糖凝胶柱，Superdex 30 Increase，Superdex 75 Increase，Superdex 200 Increase，Superose 6 Increase等；优选的交换柱是离子交换树脂柱：阴离子交换树脂柱，HiTrap Q FF，HiTrap Capto Q ImpRes，Capto Q ImpRes，HiTrap Capto Q，HiTrap DEAE，Toyopearl Q-650M，Toyopearl SuperQ-650M等；阳离子交换树脂柱，HiTrap SP FF，HiTrap Capto SP ImpRes，Capto SP ImpRes，HiTrap Capto SP，

Toyopearl SP-650M, Toyopearl Super SP-650M。最优选的是阴离子交换树脂柱。

洗脱剂可以使用本领域常用的洗脱剂,例如水、盐溶液,所述盐溶液包括氯化钠溶液、磷酸二氢钠溶液、磷酸氢二钠溶液、醋酸钠、醋酸等。

(4) 所述盐析方法,即将步骤A中获得的粗蛋白溶液中用盐析的方法纯化,得到目标蛋白BD-1混悬液。

盐析剂可以为硫酸铵、硫酸钠、氯化钠、氯化镁、硫酸铝,硝酸铵、氯化铵、硫酸镁等。优选的盐析剂为硫酸铵及其水溶液。加入饱和硫酸铵水溶液使硫酸铵终浓度达到10~50%,优选为20~30%,更优选为25%。

盐析次数为1~3次,优选为2次。

盐析后沉淀加入纯水清洗,清洗次数为2~5次,优选为3次。

进一步的,步骤B纯化得到的目标蛋白BD-1溶液可经冷冻干燥或真空干燥成干粉,也可将浓缩液直接喷雾干燥成干粉。

本发明技术方案的第六方面是提供了一种药物组合物,其特征在于,所述的药物组合物含有第一方面所述的角蛋白BD-1或第二方面所述的核酸分子或第三方面所述的表达载体或第四方面所述的宿主细胞以及药学上可接受的载体或赋形剂。

本发明上述步骤中得到的角蛋白可经冷冻干燥或真空干燥成干粉,也可把浓缩液体直接喷雾干燥成干粉,然后制成各种剂型。

本发明涉及一种药物组合物,包括上述步骤中得到的任意一种角蛋白及药学上可接受的载体。

本发明还涉及含有作为活性成份的本发明角蛋白以及常规药物赋形剂或辅剂的药物组合物。通常本发明角蛋白占药物组合物总重量的0.1~100.0%。

本发明还提供一种药物组合物,它包括药物有效剂量的作为活性成分的蛋白质及药学上可接受的载体。

本发明所述的药物组合物可根据本领域公知的方法制备。用于此目的时,如果需要,可将本发明蛋白质与一种或多种固体或液体药物赋形剂和/或辅剂结合,制成可作作为人药或兽药使用的适当的施用形式或剂量形式。

本发明角蛋白或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药,给药途径可为肠道或非肠道,如口服、肌肉、皮下、鼻腔、口腔粘膜、眼、肺、皮肤、阴道、腹膜、直肠等,优选口服给药。

本发明角蛋白或含有它的药物组合物的给药途径可为注射给药。注射包括静脉注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射、腹腔注射和穴位注射等。

给药剂型可以是液体剂型、固体剂型或半固体剂型。液体剂型可以是溶液剂(包括真溶液和胶体溶液)、乳剂(包括水包油型、油包水型和复乳)、混悬剂、注射剂(包括水针剂、粉针剂和输液)、滴眼剂、滴鼻剂、洗剂和搽剂等。固体剂型可以是

片剂（包括普通片、肠溶片、含片、分散片、咀嚼片、泡腾片、口腔崩解片）、胶囊剂（包括硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊）、颗粒剂、散剂、微丸、滴丸、栓剂、膜剂、贴片、气（粉）雾剂、喷雾剂等；半固体剂型可以是软膏剂、凝胶剂、糊剂等。

本发明角蛋白可以制成普通制剂、也可以是缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。

为了将单位给药剂型制成片剂，可以广泛使用本领域公知的各种赋形剂，包括稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、助流剂。稀释剂可以是淀粉、糊精、蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、微晶纤维素、硫酸钙、磷酸氢钙、碳酸钙等；湿润剂可以是水、乙醇、异丙醇等；粘合剂可以是淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、微晶纤维素、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、丙烯酸树脂、卡波姆、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇等；崩解剂可以是干淀粉、微晶纤维素、低取代羟丙基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠；润滑剂和助流剂可以是滑石粉、二氧化硅、硬脂酸盐、酒石酸、液体石蜡、聚乙二醇等。

还可以将片剂进一步制成包衣片，例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片，或双层片和多层片。

为了将给药单元制成丸剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、月桂酸聚乙二醇甘油酯、高岭土、滑石粉等；粘合剂，如阿拉伯胶、黄蓍胶、明胶、乙醇、蜂蜜、液糖、米糊或面糊等；崩解剂，如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。

为了将给药单元制成栓剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如聚乙二醇、卵磷脂、可可脂、高级醇、高级醇的酯、明胶、半合成甘油酯等。

为了将给药单元制成胶囊，将有效成分本发明角蛋白与上述的各种载体混合，并将由此得到的混合物置于硬的明胶胶囊或软胶囊中。也可将有效成分本发明角蛋白制成微囊剂，混悬于水性介质中形成混悬剂，亦可装入硬胶囊中或制成注射剂应用。

例如，将本发明角蛋白制成注射用制剂，如溶液剂、混悬剂溶液剂、乳剂、冻干粉针剂，这种制剂可以是含水或非水的，可含一种和/或多种药效学上可接受的载体、稀释剂、粘合剂、润滑剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂。如稀释剂可选自水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外，为了制备等渗注射液，可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油，此外，还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH调节剂等。这些辅料是本领域常用的。

此外，如需要，也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味

剂或其它材料。

为达到用药目的，增强治疗效果，本发明的角蛋白或药物组合物可用任何公知的给药方法给药。

本发明角蛋白药物组合物的给药剂量取决于许多因素，例如所要预防或治疗疾病的性质和严重程度，患者或动物的性别、年龄、体重、性格及个体反应，给药途径、给药次数、治疗目的，因此本发明的治疗剂量可以有大范围的变化。一般来讲，本发明中药学成分的使用剂量是本领域技术人员公知的。可以根据本发明角蛋白组合物中最后的制剂中所含有的实际药物数量，加以适当的调整，以达到其治疗有效量的要求，完成本发明的预防或治疗目的。本发明角蛋白的每天的合适剂量范围：本发明的角蛋白的用量为0.01~500 mg/kg体重，优选为0.5~100 mg/kg体重，更优选为1~50 mg/kg体重，最优选为2~30 mg/kg体重。上述剂量可以单一剂量形式或分成几个，例如二、三或四个剂量形式给药，这取决于给药医生的临床经验以及包括运用其它治疗手段的给药方案。每一种治疗所需总剂量可分成多次或按一次剂量给药。本发明的蛋白质或药物组合物可单独服用，或与其他治疗药物或对症药物合并使用并调整剂量。

本发明技术方案的第七方面是提供了第一方面所述的角蛋白BD-1或第二方面所述的核酸分子或第三方面所述的表达载体或第四方面所述的宿主细胞或第六方面所述的药物组合物在制备解热、镇痛、镇咳、祛痰、抗惊厥、抗癫痫、降血压、抗炎、抗病毒药物中的应用。

为了完成本发明之目的，本发明采取如下技术方案，具体地讲，制备本发明角蛋白BD-1，包括如下步骤：

(1) 合成核苷酸序列，并测定序列的准确性；

优选的核苷酸序列如SEQ ID No. 2所示。

(2) 将核苷酸序列转入表达载体中；

表达载体可以为pET系列、pUC系列、pQE系列、pBV系列、pMAL系列，pPIC9、pPIC9K、pHIL-S1、pPICZ α /A、pYAM75P，pHIL-D2、pA0815、pPIC3K、pPICZ、pHWO10、pGAPZ、pGAPZa、pPIC3.5K等；优选的表达载体为pET系列载体；最优选的表达载体为pET-28a(+).

(3) 将表达载体转染入宿主细胞中；

宿主细胞可以为大肠杆菌或酵母；优选的宿主细胞为大肠杆菌；

感受态细胞可以为BL21系列，Transetta系列，Rosetta系列，DH5 α 系列，JM系列，Top系列，Orgami系列，Trans1-T1，TG1，TB1；Y11430，MG1003，GS115 (AOX1)，KM71，SMD1168等；优选的表达感受态细胞为BL21 (DE3)，Transetta (DE3)。

(4) 将在适当的条件下，发酵培养宿主细胞，诱导表达目标蛋白BD-1；

发酵设备可以采用摇瓶或发酵罐；

培养基可以为LB培养基、TB培养基、SB培养基、SOB培养基、SOC培养基，PDA培养基、YPD培养基、孟加拉红培养基、高盐察氏培养基、DOBA培养基、米曲培养基及其改良配方等；摇瓶发酵优选LB培养基、TB培养基，最优选为TB培养基；发酵罐优选LB培养基及其改良配方。

诱导剂可以为IPTG、乳糖、阿拉伯糖等；优选为IPTG、乳糖。

(5) 目标蛋白BD-1产物富集；

步骤(4)获得的发酵菌液，离心，弃去上清液；沉淀悬浮于缓冲液中，破碎菌体，再离心，弃去上清液；沉淀用清洗剂清洗后，再用尿素溶液溶解，得到BD-1粗蛋白溶液。

其中，缓冲液优选为buffer A，其用量为：发酵液体积:buffer A体积=1~100:1，优选为10:1；

清洗剂可以为尿素溶液、盐酸胍溶液、Triton、buffer A等，优选为尿素溶液，最优选为2M尿素溶液（可含有1%Triton），其用量为：发酵液体积:2M尿素体积=0.2~100:1，优选为1~15:1；

尿素溶液优选为8M尿素溶液，其用量为：发酵液体积:8M尿素体积=0.2~100:1，优选为2~15:1。

(6) 分离纯化目标蛋白BD-1；

步骤(5)获得的粗蛋白溶液，需经过纯化获得目标蛋白BD-1。所述纯化可以通过透析、或超滤微滤、或柱色谱、或盐析步骤进行。

A. 所述透析步骤，即将步骤(5)获得的粗蛋白溶液用透析的方法纯化，得到目标蛋白BD-1溶液。

透析袋截留分子量可以为0.5-10kD，优选的透析袋截留分子量为3.5-10kD，最优选的透析袋截留分子量为10kD。

B. 所述超滤微滤步骤，即将步骤(5)获得的粗蛋白溶液用超滤膜或微滤膜等膜技术纯化，得到目标蛋白BD-1浓缩溶液。

优选的是两次微滤膜纯化，第一次膜孔径1000~1500nm，第二次膜孔径20~50nm。

C. 所述柱色谱步骤，即将步骤(5)获得的粗蛋白溶液通过柱色谱，例如各种交换柱或排阻柱色谱，分离纯化得到目标蛋白BD-1。

优选的排阻柱是葡聚糖凝胶柱，Superdex 30 Increase，Superdex 75 Increase，Superdex 200 Increase，Superose 6 Increase等；优选的交换柱是离子交换树脂柱：阴离子交换树脂柱，HiTrap Q FF，HiTrap Capto Q ImpRes，Capto Q ImpRes，HiTrap Capto Q，HiTrap DEAE，Toyopearl Q-650M，Toyopearl SuperQ-650M等；阳离子交换树脂柱，HiTrap SP FF，HiTrap Capto SP ImpRes，Capto SP ImpRes，HiTrap Capto SP，

Toyopearl SP-650M, Toyopearl Super SP-650M。最优选的是阴离子交换树脂柱。

洗脱剂可以使用本领域常用的洗脱剂,例如水、盐溶液,所述盐溶液包括氯化钠溶液、磷酸二氢钠溶液、磷酸氢二钠溶液、醋酸钠、醋酸等。

D. 所述盐析步骤,即将步骤(5)获得的粗蛋白溶液中用盐析的方法纯化,得到目标蛋白BD-1混悬液。

盐析剂可以为硫酸铵、硫酸钠、氯化钠、氯化镁、硫酸铝,硝酸铵、氯化铵、硫酸镁等。优选的盐析剂为硫酸铵及其水溶液。加入饱和硫酸铵水溶液使硫酸铵终浓度达到10~50%,优选为20~30%,更优选为25%。

盐析次数为1~3次,优选为2次。

盐析后沉淀加入纯水清洗,清洗次数为2~5次,优选为3次。

步骤 A~D 纯化得到的目标蛋白 BD-1 溶液可经冷冻干燥或真空干燥成干粉,也可将浓缩液直接喷雾干燥成干粉。

本发明的有益技术效果:

1、本发明蛋白为首次获得的角蛋白,本发明的制备方法具备收率高、样品纯度高的特点。

2、本发明通过蛋白BD-1对脂多糖(LPS)诱导的SD大鼠发热模型的药效试验研究,证明蛋白BD-1在造模后2小时具有显著的降低体温升高的作用;通过蛋白BD-1对酵母诱导的SD大鼠发热模型的药效试验研究,证明蛋白BD-1在造模后4小时、6小时、8小时,均可显著抑制体温升高,且作用较强;

3、本发明分别通过蛋白BD-1对匹罗卡品(PLO)和戊四唑(PTZ)致小鼠惊厥和癫痫的药效试验研究,证明蛋白BD-1能够显著延长小鼠癫痫III级发作潜伏期;

4、本发明通过蛋白BD-1对小鼠酚红排泄法祛痰的药效试验研究,证明蛋白BD-1具有明显的祛痰作用;

5、本发明通过蛋白BD-1对小鼠氨水引咳法镇咳的药效试验研究,证明蛋白BD-1能够明显减少咳嗽次数,具有显著的镇咳作用;

6、本发明通过蛋白BD-1对ICR小鼠醋酸扭体的药效试验研究,证明蛋白BD-1具有减少小鼠扭体次数的趋势,具有镇痛作用的潜力。

附图说明

图 1: 表达蛋白 BD-1 还原型 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析

(M: 蛋白分子量标准; S: 表达蛋白 BD-1)

图 2. 蛋白 BD-1 对脂多糖 (LPS) 诱导大鼠发热模型的影响

（与正常对照组比较，*** P<0.001；与模型组比较，## P<0.01，### P<0.001）

图 3. 蛋白 BD-1 对酵母诱导大鼠发热模型的影响

（与正常对照组比较，** P<0.01，*** P<0.001；与模型组比较，# P<0.05，## P<0.01，### P<0.001）

具体实施方式

下面的实施例及药理活性试验例用来进一步说明本发明，但这并不意味着对本发明的任何限制。

下述实施例及药理活性试验例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法；所用的实验材料，如无特殊说明，均购自常规生化试剂公司。

实施例 1 摇瓶发酵制备蛋白 BD-1 粗溶液 A（TB 培养基）

合成如 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列，将其转入 pET-28a(+)载体中；测序确定得到含有正确序列的表达载体；将表达载体转染入 BL21 (DE3) 细胞，得到含有目标核苷酸序列的表达感受态宿主细胞。加入 LB 培养基中，于摇床中，在 37℃、220 rpm 条件下培养 1 小时，得到重组菌株。

蘸取重组菌株在含有 Kana 霉素的 LBA 平板中划线，平板倒置于 37℃恒温培养箱过夜培养 16 小时。

配置400 ml TB培养基，分装2瓶，每瓶200 ml。在每瓶（200 ml）TB培养基中加入Kana霉素（终浓度50 μg/ml），取平板上单一菌落加入TB培养基中，于摇床中，在 37℃、220 rpm条件下过夜扩增培养，得到种子液。

配置28.8 L TB培养基，分装于144瓶，每瓶200 ml。在每瓶（200 ml）TB培养基中加入Kana霉素（终浓度50 μg/ml），再加入2 ml种子液，于摇床中，在37℃、220 rpm 条件下培养2-3小时。监测OD₆₀₀，当OD₆₀₀达到1.0左右时，加入诱导剂，于摇床中诱导表达蛋白，诱导条件选自下表。

	诱导剂	诱导温度	诱导时间	摇床转速
诱导条件	IPTG（终浓度0.5mM）	16℃ 25℃ 37℃	16小时 8小时 5小时	220 rpm

合并各瓶菌液，7000 rpm 离心 5 分钟，上清液灭菌后弃去；沉淀悬浮于约 3 L 缓冲液中，用 80-100 目筛网过滤，滤液用高压破碎仪破碎，压力 800-1000 bar，2 次，每次 2 分钟。破碎后菌液 7000 rpm 离心 30 分钟，弃去上清液，得到沉淀（即包涵体）。沉淀加入 1L 清洗剂清洗 2 次，离心，弃去上清液。沉淀再加入尿素溶液溶解 4 次，分别为 800 ml、600 ml、400 ml、400ml。合并 4 次溶液，7000 rpm 离心 30 分钟，沉淀弃去，上清液即为蛋白粗溶液 A。

缓冲液	清洗剂	尿素溶液
buffer A	2M 尿素溶液（可含 Triton） 4M 尿素溶液（可含 Triton） 2M 盐酸胍溶液 4M 盐酸胍溶液	8M 尿素溶液 （可含 Tris/HCl 缓冲液或 NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 缓冲液） 4M 尿素溶液（可含 Tris/HCl 缓冲液）

蛋白BD-1粗溶液A，用还原型SDS-PAGE分析，分离胶浓度为12.5%，考马斯亮蓝R250法染色；在分子量46kD附近显示明显蓝色条带。

实施例 2 摇瓶发酵制备蛋白 BD-1 粗溶液 B（其它培养基）

实施例 1 中合成并测序确定得到含有如 SEQ ID No.2 所示的序列的表达载体；将表达载体转染入 Transetta (DE3) 细胞，得到含有目标核苷酸序列的表达感受态宿主细胞。

配制 20ml LB 培养基，取 800μl，加入含有目标编码序列的宿主细胞 50μl，于摇床中，在 37℃、220 rpm 条件下培养 1 小时。

蘸取上述菌液在含有 Kana 霉素的 LBA 平板中划线，平板倒置于 37℃恒温培养箱过夜培养 16 小时。

取10 ml LB培养基，加入Kana霉素（终浓度50 μg/ml），取平板上单一菌落加入LB培养基中，于摇床中，在37℃、220 rpm条件下过夜扩增培养15小时，得到种子液。

配置1 L 下表所示培养基，分装于10瓶，每瓶100 ml。在每瓶（100 ml）培养基中加入Kana霉素（终浓度50 μg/ml），再加入1 ml种子液，于摇床中，在37℃、220 rpm 条件下培养2-3小时。监测OD₆₀₀，当OD₆₀₀达到1.0左右时，加入诱导剂 IPTG（终浓度0.5 mM），于摇床中，在37℃、220 rpm 条件下诱导表达蛋白。

培养基	LB培养基、SOB培养基、SOC培养基
-----	---------------------

合并各瓶菌液，10000 rpm 离心 10 分钟，上清液灭菌后弃去；沉淀悬浮于约 100 mL 缓冲液中，用 80-100 目筛网过滤，滤液用高压破碎仪破碎，压力 800-1000 bar，2 次，每次 2 分钟。破碎后菌液 10000 rpm 离心 30 分钟，弃去上清液。

沉淀先加入 40 mL 清洗剂 buffer A 清洗 3 次，离心，弃去上清液；沉淀加入 40 mL 清洗剂 2M 尿素溶液清洗 2 次，离心，弃去上清液；沉淀再加入 40 mL 4M 尿素溶液清洗 2 次，离心，弃去上清液；沉淀再加入 8M 尿素溶液（含 50mM Tris/HCl 缓冲液）溶解 3 次，分别为 40 ml、30 ml、30 ml；合并溶液，7000 rpm 离心 30 分钟，沉淀弃去，上清液即为蛋白粗溶液 B。

蛋白BD-1粗溶液B，用还原型SDS-PAGE分析，分离胶浓度为12.5%，考马斯亮蓝R250法染色；在分子量46kD附近显示明显蓝色条带。

实施例 3 发酵罐制备蛋白 BD-1 粗溶液 C

实施例 1 中合成并测序确定得到含有如 SEQ ID No.2 所示的序列的表达载体；将

表达载体转染入 BL21 (DE3) 细胞，得到含有目标核苷酸序列的表达感受态宿主细胞。加入 LB 培养基中，于摇床中，在 37℃、220 rpm 条件下培养 1 小时，得到重组菌株。

在含有 Kana 霉素的 LBA 平板中，加入重组菌株 100 μ l，涂布器涂至均匀变干，平板倒置于 37℃ 恒温培养箱过夜培养。分别取三个单菌落在含有 Kana 霉素的平板中划线，平板过夜培养，经三批摇瓶发酵表达验证确认无误后，用 15% 甘油保存菌株，分装成每支 0.8 ml，即得工作细胞库，冻存于 -80℃ 冰箱备用。

从工作细胞库中取出 1 支甘油菌，取 100 μ l，加入 40 ml LB 培养基中，加入 Kana 霉素（终浓度 50 μ g/ml），于振荡器中，以 37℃、220 rpm 条件培养 6 小时，得一级种子液。

取一级种子液 1.2ml，加入 120 ml LB 培养基中，加入 Kana 霉素（终浓度 50 μ g/ml），于振荡器中，以 37℃、220 rpm 条件培养 7 小时，得二级种子液。

5L 发酵罐中加入 3L 改良的 LB 培养液，再加入 120 ml 二级种子液，3 ml Kana 霉素（终浓度 50 μ g/ml），以 37℃、溶氧 30%（串联转速）条件培养约 8 小时。监测 OD 值在 20 左右，3g 乳糖作为诱导剂，于 20℃ 进行诱导，以 30ml/小时的速率进行补料，20℃ 培养 24 小时。

菌液 7000 rpm 离心 5 分钟，上清液灭菌后弃去；沉淀悬浮于约 200 ml buffer A 中，用 80-100 目筛网过滤，滤液用高压破碎仪破碎，压力 800-1000 bar，2 次，每次 2 分钟。破碎后菌液 7000 rpm 离心 30 分钟，弃去上清液。

沉淀加入 2M 尿素溶液（含 1% Triton）清洗 2 次，每次 1L；再加入 1L 2M 尿素溶液清洗 1 次，离心，弃去上清液。沉淀加入 8M 尿素溶液溶解 4 次，分别为 400 ml、300 ml、200 ml、100 ml。合并四次溶液，7000 rpm 离心 30 分钟，沉淀弃去，上清液即为蛋白粗溶液 C。

蛋白 BD-1 粗溶液 C，用还原型 SDS-PAGE 分析，分离胶浓度为 12.5%，考马斯亮蓝 R250 法染色；在分子量 46kD 附近显示明显蓝色条带。

实施例 4 蛋白粗溶液 A 通过透析制备得蛋白 BD-1

实施例 1 获得的蛋白粗溶液 A 用 0.45 μ m 1 滤膜过滤，合并滤液。滤液用水透析，透析袋截留分子量 10kD，透析 72 小时，内液冷冻干燥，即得目标蛋白 BD-1；电泳测得纯度 94.5%。

蛋白 BD-1 结构确证：

1、还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）分析

仪器：蛋白质电泳仪（Bio-Rad）。

方法和结果：蛋白 BD-1 溶液，用还原型 SDS-PAGE 分析，分离胶浓度为 12.5%，考马斯亮蓝 R250 法染色。BD-1 条带分子量在 46kD 附近。

2、基于 LC-MS/MS 的蛋白质全序列分析

主要材料：乙腈、甲酸、碳酸氢铵、二硫苏糖醇（DTT）、碘乙酰胺（IAA）、胰蛋白酶、糜蛋白酶、Glu-C、Asp-N；

主要仪器：毛细管高效液相色谱仪（Thermo Ultimate 3000 型），电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪（Thermo Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer）。

方法和结果：

蛋白 BD-1 通过溶解置换、还原烷基化、多种蛋白酶解等前处理，得到酶切肽段；酶切肽段溶液，经液相色谱串联质谱分析，质谱原始文件使用 Maxquant（1.6.2.10）检索蛋白数据库分析数据，鉴定结果如下表：

蛋白酶	覆盖率	鉴定结果			
胰蛋白酶	85.1%	总覆盖率 97.1% (详见下序列表: 下划线的氨基酸 (SEQ ID NO.1 中 13R-416R) 为 本实验鉴定覆盖到的序列)			
糜蛋白酶	72.8%				
Glu-C	54.8%				
Asp-N	41.3%				
10	20	30	40	50	60
MSYNFCLPNL	SFRSSCSSRP	CVPPSCCGTT	LPGACNIPAN	VGSCNWFCEG	SFNGNEKETM
70	80	90	100	110	120
QFLNDRLAS	LEKVRQLERE	NAELESRILE	RSQQQEPLLC	PNYQSYFRTI	EELQQKILCA
130	140	150	160	170	180
KSENARLVVQ	IDNAKLAADD	FRTKYETELG	LRQLVESDIN	GLRRILDELT	LCKSDLEAQV
190	200	210	220	230	240
ESLKEELICL	KSNHEEEVNT	LRSQLGDRLN	VEVDAAPTVD	LNRVLNETRA	QYEALVETNR
250	260	270	280	290	300
RDVEEWYIRQ	TEELNKQVVS	SSEQLQSCQT	EIIELRRTVN	ALEVELQAQH	NLRDSLENTL
310	320	330	340	350	360
TETEARYSCQ	LAQVQGLIGN	VESQLAEIRS	DLERQNQEYQ	VLLDVRARLE	CEINTYRGLL
370	380	390	400	410	
DSEDCKLPCN	PCATTNACGK	TITPCISSPC	TPCAPAAPCT	PCVPRSRCGP	CNSYVR

3、基于 Edman 降解的蛋白 N 端序列测定

主要材料：PTH-氨基酸、甲醇、三氟乙酸

主要仪器：全自动蛋白质多肽测序仪（岛津 PPSQ-33A型）。

方法和结果：

将供试品放置于反应器中，通过软件PPSQ-30 Analysis设置：样品名称、样品号、测试循环数、选择方法文件，设置完成后开始测试；PPSQ-33A产生的原始数据及图谱由PPSQ-30 DataProcessing软件识别标峰并导出对应图谱。

BD-1 进行 15 个循环测试，测得 N 端序列为：

NH2-Ser-Tyr-Asn-Phe-X-Leu-Pro-Asn-Leu-Ser-Phe-Arg-Ser-Ser-X（其中 X 指代 Cys），即 BD-1 的 N 端序列为 MSYNFCLPNLSFRSSC。

综上分析，表达产物蛋白 BD-1，应用 SDS-PAGE 分析，结合基于 LC-MS/MS 的蛋白质全序列分析和基于 Edman 降解的蛋白 N 端序列测定，确定其与目标序列 SEQ ID No.1 一致，覆盖率 100%。

实施例 5 蛋白粗溶液 A 通过其它方法纯化制备得蛋白 BD-1

实施例 1 获得的蛋白粗溶液 A 通过下述两种方法进行纯化：

第一种方法：盐析；

蛋白粗溶液 A 置于带搅拌的容器中进行两次盐析：沿壁缓慢加入硫酸铵饱和溶液，使硫酸铵终浓度为 25%或 50%，盐析过程中蛋白析出，待盐析完全后，过滤，完成第一次盐析；沉淀中加入 400 ml 纯水混悬，再次沿壁缓慢加入硫酸铵饱和溶液，使硫酸铵终浓度为 25%，进行第二次盐析，过滤，沉淀即为蛋白粗提物。蛋白粗提物用水进行三次清洗：加 200 ml 纯水混悬，搅拌，静置，过滤；如此重复三次后，沉淀冷冻干燥即得目标蛋白 BD-1。

第二种方法：柱色谱；

蛋白粗溶液 A 分别经过 HiTrap Q FF 16/10，HiTrap Capto Q ImpRes，Capto Q ImpRes，HiTrap Capto Q，HiTrap DEAE 等阴离子交换树脂柱纯化。洗脱液为 NaCl 溶液梯度洗脱，加 20mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 缓冲液(pH 8.0)。各洗脱流份用 SDS-PAGE 电泳检测合并，合并的洗脱液 7000 rpm 离心 2 次，每次 1 小时；上清液用 0.45μm 滤膜过滤，合并滤液。滤液用水透析浓缩，透析袋截留分子量 10kD，内液冷冻干燥，即得目标蛋白 BD-1。

两种方法得到的产物蛋白 BD-1，经与实施例 4 相同的结构确证方法，确认其与实施例 4 制备得到的蛋白具有相同的氨基酸序列。

实施例 6 蛋白粗溶液 B 纯化制备得蛋白 BD-1

实施例 2 获得的蛋白粗溶液 B 通过下述三种方法进行纯化：

第一种方法：透析；

蛋白粗溶液 B，用 0.45 μm 膜过滤，滤液用水透析，透析 72 小时以上，内液冷冻干燥，即得目标蛋白 BD-1。

透析袋	截留分子量：0.5kD、3.5kD、5kD、10kD
-----	----------------------------

第二种方法：柱色谱；

蛋白粗溶液 B 分别经过 HiTrap Q FF 16/10，HiTrap Capto Q ImpRes，Capto Q ImpRes，HiTrap Capto Q，HiTrap DEAE 等阴离子交换树脂柱纯化。洗脱液为 NaCl

溶液梯度洗脱,加 20mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 8.0)。各洗脱流份用 SDS-PAGE 电泳检测合并,合并的洗脱液 7000 rpm 离心 2 次,每次 1 小时;上清液用 0.45 μm 滤膜过滤,合并滤液。滤液用水透析浓缩,透析袋截留分子量 10kD,内液冷冻干燥,即得目标蛋白 BD-1。

第三种方法:盐析;

蛋白粗溶液 B 置于带搅拌的容器中进行两次盐析:沿壁缓慢加入硫酸铵饱和溶液,使硫酸铵终浓度为 25%或 50%,盐析过程中蛋白析出,待盐析完全后,过滤,完成第一次盐析;沉淀中加入 400 ml 纯水混悬,再次沿壁缓慢加入硫酸铵饱和溶液,使硫酸铵终浓度为 25%,进行第二次盐析,过滤,沉淀即为蛋白粗提物。蛋白粗提物用水进行三次清洗:加 200 ml 纯水混悬,搅拌,静置,过滤;如此重复三次后,沉淀冷冻干燥即得目标蛋白 BD-1。

三种方法得到的产物蛋白 BD-1,经与实施例 4 相同的结构确证方法,确认其与实施例 4 制备得到的蛋白具有相同的氨基酸序列。

实施例 7 蛋白粗溶液 C 纯化制备得蛋白 BD-1

实施例 3 获得的蛋白粗溶液 C 通过下述两种方法进行纯化:

第一种方法:微滤膜技术;

蛋白粗溶液 C,通过微滤膜技术进行纯化:先用 1500 nm 或 1000 nm 陶瓷膜芯进行固液分离;内液弃去,外液再用 20 nm 或 50 nm 陶瓷膜芯反复微滤除去尿素;二次微滤的内液冷冻干燥,即得目标蛋白 BD-1。

第二种方法:盐析;

蛋白粗溶液 C 置于带搅拌的容器中进行两次盐析:沿壁缓慢加入硫酸铵饱和溶液,使硫酸铵终浓度为 25%,盐析过程中蛋白析出,待盐析完全后,过滤,完成第一次盐析;沉淀中加入 400 ml 纯水混悬,再次沿壁缓慢加入硫酸铵饱和溶液,使硫酸铵终浓度为 25%,进行第二次盐析,过滤,沉淀即为蛋白粗提物。蛋白粗提物用水进行三次清洗:加 200 ml 纯水混悬,搅拌,静置,过滤;如此重复三次后,沉淀冷冻干燥即得目标蛋白 BD-1。

两种方法得到的产物蛋白 BD-1,经与实施例 4 相同的结构确证方法,确认其与实施例 4 制备得到的蛋白具有相同的氨基酸序列。

药理试验

实验例 1 蛋白 BD-1 (实施例 4 蛋白) 对脂多糖 (LPS) 诱导 SD 大鼠发热模型的药效试验

动物:雄性 SD 大鼠 230-260 克;

药品:脂多糖 (LPS, SIGMA L-2880), 阿司匹林 (SIGMA A2093), 蛋白 BD-1;

仪器：电子天平（SARTORIUS BP121S 型），电子体温计（CITIZEN CT-513W 型）。

实验分组：

- 正常对照组；
- 模型组：脂多糖发热模型；
- 阳性对照组：阿司匹林（Aspirin）300mg/kg 组；
- 蛋白 BD-1，10mg/kg 组，50mg/kg 组。

方法：腹腔注射脂多糖复制大鼠发热模型方法：

实验动物的准备：实验动物在实验环境（温度 22℃±2℃，相对湿度 50%±2%）中适应 1 天后，分别于早 8:00 及 15:00 预适应测量肛温操作，实验前 12 小时禁食不禁水，测定肛温前让动物排空粪便。每次测温前电子体温计探头涂抹凡士林，插入大鼠直肠 2cm（可在 2cm 处标记，确保每次插入深度一致），待读数稳定以后记录体温值。

腹腔注射脂多糖复制大鼠发热模型：造模前测大鼠体温，筛选出体温在 36.2-37.3℃的合格大鼠，随机分组，每组 8 只。口服给予阿司匹林及不同剂量蛋白 BD-1 后立即腹腔注射脂多糖（20μg/kg，2ml/kg），正常对照组腹腔注射等体积生理盐水，2 小时后开始监测大鼠体温，共监测 8 小时。

数据统计：

根据实验当天测量的各时间点体温值，计算各组大鼠体温均值、标准差及标准误，应用 TTEST 将各组数据进行组间比较，P<0.05 认为有显著性差异。

实验结果：

口服给予阿司匹林（300mg/kg）、蛋白 BD-1（10mg/kg、50mg/kg）后立即腹腔注射 20μg/kg 脂多糖造模，分别于造模后 2 小时、4 小时、6 小时、8 小时监测动物体温。结果见表 1 和图 2。

表 1. 受试药对脂多糖（LPS）诱导大鼠发热模型的影响

组别	N	基础体温 （℃）	造模后 2 小时 体温（℃）	造模后 4 小时 体温（℃）	造模后 6 小时 体温（℃）	造模后 8 小时 体温（℃）
正常对照组	8	36.8±0.1	36.6±0.1	36.7±0.1	36.7±0.1	36.6±0.1
模型组	8	36.8±0.1	37.8±0.1***	37.8±0.2***	37.5±0.2***	37.5±0.2***
阳性对照组	8	36.9±0.1	36.7±0.1###	36.7±0.1###	36.6±0.1##	36.6±0.1###
BD-1-10mg/kg	8	36.9±0.1	37.1±0.1###	37.3±0.2	37.7±0.2	37.5±0.2
BD-1-50mg/kg	8	36.8±0.04	37.2±0.1##	37.4±0.3	37.4±0.2	37.2±0.3

（与正常对照组比较，*** P<0.001；与模型组比较，## P<0.01，### P<0.001）

实验结论：

分别口服给予阿司匹林（300mg/kg）、蛋白 BD-1（10mg/kg、50mg/kg）后立即腹腔注射 20 μ g/kg 脂多糖造模，并于造模后 2 小时、4 小时、6 小时、8 小时监测动物体温，结果显示：

1) 腹腔注射 20 μ g/kg 脂多糖可成功诱导大鼠体温升高，模型组大鼠在造模 2 小时、4 小时、6 小时、8 小时体温明显升高，与正常组比较， $P<0.05$ ，有统计学差异，模型稳定。

2) 阳性工具药阿司匹林组在造模 2 小时、4 小时、6 小时、8 小时均可以有效抑制模型大鼠体温升高，与模型组比较， $P<0.05$ ，有统计学差异，阳性工具药表现较稳定。

3) 不同剂量蛋白 BD-1 在造模后 2 小时可不同程度的降低模型大鼠体温，且与模型组比较， $P<0.05$ ，有统计学差异。

实验例 2 蛋白 BD-1（实施例 4 蛋白）对酵母诱导 SD 大鼠发热模型的药效试验

动物：雄性 SD 大鼠 230-260 克；

药品：酵母菌（OXOID LP0021），阿司匹林（SIGMA A2093），蛋白 BD-1；

仪器：电子天平（SARTORIUS BP121S 型），电子体温计（CITIZEN CT-513W 型）。

实验分组：

正常对照组；

模型组：酵母菌发热模型；

阳性对照组：阿司匹林（Aspirin）300mg/kg 组；

蛋白 BD-1，10mg/kg 组，50mg/kg 组。

方法：

实验动物的准备：实验动物在实验环境（温度 $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $50\%\pm 2\%$ ）中适应 1 天后，分别于早 8:00 及 15:00 进行预适应测量肛温操作，实验前 12 小时禁食不禁水，测定肛温前让动物排空粪便。每次测温前电子体温计探头涂抹凡士林，插入大鼠直肠 2cm（可在 2cm 处标记，确保每次插入深度一致），待读数稳定以后记录体温值。

皮下注射干酵母复制大鼠发热模型：造模前测大鼠体温，筛选出体温在 $36.2-37.3^{\circ}\text{C}$ 的合格大鼠，随机分组，每组 8 只。口服给予阿司匹林、不同剂量蛋白 BD-1 后立即皮下注射 20% 酵母菌混悬液（10ml/kg），正常对照组皮下注射等体积生理盐水，2 小时后开始监测大鼠体温，每间隔 2 小时监测体温 1 次，共监测 8 小时。

数据统计：

根据实验当天测量的各时间点体温值，计算各组大鼠体温均值、标准差及标准误，

应用 TTEST 将各组数据进行组间比较， $P<0.05$ 认为有显著性差异。

实验结果：

口服给予阿司匹林（300mg/kg）、蛋白 BD-1（10mg/kg、50mg/kg）后立即皮下注射 20%酵母菌造模，分别于造模后 2 小时、4 小时、6 小时、8 小时监测动物体温。结果见表 2 和图 3。

表 2. 受试药对酵母菌诱导大鼠发热模型的影响

组别	N	基础体温 ($^{\circ}\text{C}$)	造模后 2 小时 体温 ($^{\circ}\text{C}$)	造模后 4 小时 体温 ($^{\circ}\text{C}$)	造模后 6 小时 体温 ($^{\circ}\text{C}$)	造模后 8 小时 体温 ($^{\circ}\text{C}$)
正常对照组	8	36.8 ± 0.1	36.7 ± 0.04	36.6 ± 0.04	36.7 ± 0.04	36.6 ± 0.04
模型组	8	36.8 ± 0.1	$37.1\pm0.1^{**}$	$37.8\pm0.1^{***}$	$37.6\pm0.1^{***}$	$37.6\pm0.1^{***}$
阳性对照组	8	36.9 ± 0.1	37.1 ± 0.1	$37.0\pm0.1^{###}$	$37.1\pm0.1^{##}$	$37.1\pm0.1^{###}$
BD-1-10mg/kg	8	36.8 ± 0.1	37.1 ± 0.1	$37.2\pm0.1^{###}$	37.3 ± 0.13	$37.3\pm0.1\#$
BD-1-50mg/kg	8	36.9 ± 0.1	37.1 ± 0.1	$37.5\pm0.1\#$	$37.3\pm0.09\#$	$37.4\pm0.07\#$

（与正常对照组比较， $** P<0.01$ ， $*** P<0.001$ ；与模型组比较， $\# P<0.05$ ， $## P<0.01$ ， $### P<0.001$ ）

实验结论：

口服给予阿司匹林（300mg/kg）、蛋白 BD-1（10mg/kg、50mg/kg）后立即皮下注射 20%酵母菌造模，分别于造模后 2 小时、4 小时、6 小时、8 小时监测动物体温。结果显示：

- 1) 模型组大鼠在造模 2 小时、4 小时、6 小时、8 小时体温明显升高，与正常组比较， $P<0.05$ ，有统计学差异，模型建立成功且稳定可靠。
- 2) 阳性工具药阿司匹林组在造模 4 小时、6 小时、8 小时均可以有效抑制模型大鼠体温升高，与模型组比较， $P<0.05$ ，有统计学差异，阳性工具药阿司匹林表现稳定。
- 3) 不同剂量蛋白 BD-1 在造模后均可不同程度抑制模型大鼠体温升高，且作用较强，在造模后绝大部分时间点均可抑制模型大鼠体温升高，且与模型组比较， $P<0.05$ ，有统计学差异。

实验例 3 蛋白 BD-1(实施例 4 蛋白)对致惊剂匹罗卡品(Pilocarpine, PLO)致小鼠惊厥癫痫的药效试验

动物：雄性 ICR 小鼠；

药品：Pilocarpine HCl（PLO，匹罗卡品，盐酸毛果芸香碱），Diazepam（地西洋片），蛋白 BD-1。

实验分组：

模型组；

地西洋（Diazepam）2mg/kg 组；

蛋白 BD-1，50mg/kg 组，200mg/kg 组。

方法：

模型制备及给药：

造模前一天下午给药一次，造模当天灌胃受试药后 1 小时腹腔注射 PLO-225mg/kg（造模剂），阳性药在造模前 20 分钟给药一次即可。注射 PLO 后持续观察 30 分钟。

观察指标：①癫痫发作情况：II 级~IV 级发作时间；②死亡时间。

发作级别：参照 Racine 分级标准：0 级：没有任何反应；I 级：表现为面部肌肉或是嘴角的抽动；II 级：可以点头；III 级：一侧肢体抽搐；IV 级：强直或全身肢体抽搐；V 级：癫痫全面大发作（全身强直性惊厥发作）。

数据处理：

统计实验中各组小鼠 IV 级发作及死亡例数；II 级、III 级及 IV 级潜伏期，未发作至 IV 级的小鼠潜伏期记作最大值 1800 秒。例数统计用卡方检验统计。潜伏期计算均值及标准误，应用 TTEST，将模型组与其他各组进行组间比，P<0.05 认为有显著性差异。

实验结果：见表 3 和表 4。

表 3. 受试药对 PLO 致小鼠癫痫实验一例数统计

组别	实验例数	IV 级例数	IV 级发作率	死亡例数	死亡率
模型组	10	8	80%	0	0
地西洋 2mg/kg	10	0**	0**	0	0
BD-1-50mg/kg	10	4	40%	0	0
BD-1-200mg/kg	10	5	50%	0	0

（与模型组比较，* P<0.05，** P<0.01）

表 4. 受试药对 PLO 致小鼠癫痫实验-II 级，III 级及 IV 级癫痫发作潜伏期（mean±SEM）

组别	II 级发作潜伏期 (s)	III 级发作潜伏期 (s)	IV 级发作潜伏期 (s)
模型组	88±7	141±7	950±165
地西洋 2mg/kg	151±6**	275±20**	1800±0**
BD-1-50mg/kg	97±7	199±13**	1397±171
BD-1-200mg/kg	98±6	191±18*	1240±191

（与模型组比较，* P<0.05，** P<0.01）

实验结论：

1）实验结果显示，模型组 IV 级发作率为 80%。40 只小鼠无死亡。

2) 阳性药可以完全抑制癫痫 IV 级发作率, 并显著延长小鼠 II 级、III 级及 IV 级癫痫发作潜伏期。

3) 在癫痫 III 级潜伏期比较中, BD-1 50mg/kg、200mg/kg 剂量组与模型组比较均有统计学差异。

实验例 4 蛋白 BD-1 (实施例 4 蛋白) 对戊四唑 (PTZ) 致小鼠癫痫的药效试验

动物: 雄性 ICR 小鼠;

药品: 戊四唑 (PTZ), 瑞替加滨, 蛋白 BD-1。

实验分组:

模型组;

瑞替加滨 60mg/kg 组;

蛋白 BD-1, 50mg/kg 组, 200mg/kg 组。

方法:

模型制备及给药:

造模前一天下午给药一次, 造模当天灌胃受试药后 1 小时腹腔注射 PTZ-65mg/kg (造模剂), 阳性药在造模前半小时给药一次即可。注射 PTZ 后持续观察 15 分钟。

观察指标: ①癫痫发作情况: III 级~VI 级发作时间; ②死亡情况

发作级别: 参照 Racine 分级标准: 0 级: 没有任何反应; I 级: 表现为面部肌肉或是嘴角的抽动; II 级: 可以点头; III 级: 一侧肢体抽搐; IV 级: 强直或全身肢体抽搐; V 级: 癫痫全面大发作 (全身强直性惊厥发作)。

数据处理:

统计实验中各组小鼠发作及死亡例数; III 级及 IV 级潜伏期, 未发作至 IV 级的小鼠潜伏期记作最大值 900 秒。例数统计用卡方检验统计。潜伏期计算均值及标准误, 应用 TTEST, 将模型组与其他各组进行组间比, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

实验结果: 见表 5 和表 6。

表 5. 受试药对 PTZ 致小鼠癫痫实验一例数统计

组别	实验例数	IV 级例数	IV 级发作率	死亡例数	死亡率
模型组	10	10	100%	1	10%
瑞替加滨 60mg/kg	10	4*	40%*	0	0
BD-1-50mg/kg	10	7	70%	0	0
BD-1-200mg/kg	10	9	90%	1	10%

(与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

表 6. 受试药对 PTZ 致小鼠癫痫实验—III 级及 IV 级癫痫发作潜伏期 (mean±SEM)

组别	III 级发作潜伏期(秒)	IV 级发作潜伏期(秒)
模型组	53±2	169±46
瑞替加滨 60mg/kg	104±13**	634±109**
BD-1-50mg/kg	77±7**	365±118
BD-1-200mg/kg	68±2**	192±80

(与模型组比较, * P<0.05, ** P<0.01)

实验结论:

- 1) 实验结果显示, 模型组 IV 级发作率为 100%。40 只小鼠有 2 只死亡。
- 2) 阳性药可以显著降低癫痫 IV 级发作率, 并显著延长小鼠 III 级及 IV 级癫痫发作潜伏期。
- 3) 在癫痫 III 级潜伏期比较中, BD-1 50mg/kg、200mg/kg 剂量组与模型组比较均有统计学差异; 在 IV 级潜伏期比较中, 由于标准误较大, 受试药组与模型组比较均没有统计学差异。

实验例 5 蛋白 BD-1 (实施例 4 蛋白) 对小鼠酚红排泄法祛痰的药效试验

动物: 雄性 ICR 小鼠;

药品与试剂: 沐舒坦 (盐酸氨溴索片), 苯酚红, 碳酸氢钠, 蛋白 BD-1;

仪器: 离心机 (Sigma-3K15 型), 天平 (XS105DU 型), 酶标测试仪 (BIO-TEK 型)。

实验分组:

- 溶剂对照组;
- 沐舒坦 30mg/kg 组;
- 蛋白 BD-1, 20mg/kg 组, 50mg/kg 组。

方法:

模型制备及给药:

动物于实验前 16 小时禁食不禁水。按分组口服给予沐舒坦及不同剂量蛋白 BD-1 (给药体积 10ml/kg), 溶剂对照组给予等量体积蒸馏水, 1 小时后腹腔注射 2.5%酚红溶液, 30 分钟后脱颈处死小鼠, 取自甲状软骨下至气管分支前一段气管, 将气管放入 3 ml 5%NaHCO₃ 溶液静置 3 小时, 取上清 1 ml, 3000 rpm 离心 5 分钟后, 546 nm 处测量并记录吸光度。根据酚红的标准曲线计算出酚红的排泄量。

数据处理:

分别记录口服给药时间点, 2.5%酚红溶液腹腔注射时间点, 取气管时间点; 酶标仪 546nm 处测量得到各组样本吸光度, 根据酚红的标准曲线计算出酚红的排泄量。

各组数据计算均值及标准误，应用 TTEST，将溶剂对照组与其他各组进行组间比， $P<0.05$ 认为有显著性差异。

实验结果：

给予沐舒坦（30mg/kg）及不同剂量蛋白 BD-1（20mg/kg、50mg/kg），1 小时后腹腔注射 2.5%酚红溶液，30 分钟后脱颈处死小鼠，取自甲状软骨下至气管分支前一段气管，将气管放入 3ml 5%NaHCO₃ 溶液静置 3 小时，取上清 1ml，3000rpm 离心 5 分钟后，546nm 处测量并记录吸光度。根据酚红的标准曲线计算出酚红的排泄量。结果见表 7。

表 7. 受试药对小鼠酚红排泄法祛痰药效实验（X±SEM）

组别	N	酚红排泄量（μg/ml）	P
溶剂对照组	10	0.502±0.057	---
沐舒坦 30mg/kg	10	1.103±0.096**	0.001
BD-1-20mg/kg	10	0.830±0.083**	0.004
BD-1-50mg/kg	10	0.833±0.069**	0.002

（与溶剂对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ）

实验结论：

- 1）实验结果显示，沐舒坦 30mg/kg 组与溶剂对照组比较，酚红排泄量明显升高， $P<0.05$ ，具有统计学意义。
- 2）BD-1 20mg/kg、50mg/kg 剂量组与溶剂对照组比较，酚红排泄量明显升高， $P<0.05$ ，具有统计学意义。

实验例 6 蛋白 BD-1（实施例 4 蛋白）对小鼠氨水引咳法镇咳的药效试验

动物：雄性 ICR 小鼠；

药品与试剂：氢溴酸右美沙芬，氨水，0.2%CMC-Na，蛋白 BD-1；

仪器：压缩雾化器（403T 型），天平（XS105DU 型）。

实验分组：

- 溶剂对照组；
- 右美沙芬 15mg/kg 组；
- 蛋白 BD-1，20mg/kg 组，50mg/kg 组。

方法：

模型制备及给药：

按分组口服给予右美沙芬及不同剂量蛋白 BD-1（给药体积 10ml/kg），溶剂对照组给予等量体积蒸馏水，1 小时后放入密封盒内，通雾化 10%浓度氨水 10 秒钟，然

后观察和记录小鼠的咳嗽潜伏期和 2 分钟内咳嗽次数。

数据处理：

分别记录口服给药时间点，雾化实验时间点，小鼠的咳嗽潜伏期和 2 分钟内咳嗽次数。咳嗽潜伏期是指雾化氨水开始时间至发生咳嗽所需的秒数。小鼠咳嗽表现以其腹肌收缩（缩胸），同时张大嘴为准。各组数据计算均值及标准误，应用 TTEST，将模型组与其他各组进行组间比， $P<0.05$ 认为有显著性差异。

实验结果：

提前给予右美沙芬（15mg/kg）及不同剂量蛋白 BD-1（20mg/kg、50mg/kg），1 小时后放入密封盒内，通雾化 10%浓度氨水 10 秒钟，然后其对观察和记录小鼠的咳嗽潜伏期和 2 分钟内咳嗽次数。结果见表 8。

表 8. 受试药对小鼠氨水引咳法的镇咳药效实验（ $X\pm SEM$ ）

组别	N	潜伏期（秒）	P	咳嗽次数	P
溶剂对照组	9	25.0±1.3	---	62.7±3.3	---
右美沙芬 15mg/kg	9	37.3±2.4**	0.001	30.2±2.0**	0.001
BD-1-20mg/kg	9	30.9±2.5	0.051	45.7±4.4**	0.007
BD-1-50mg/kg	9	30.7±3.6	0.155	42.1±3.4**	0.001

（与溶剂对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ）

实验结论：

1）实验结果显示，右美沙芬组与溶剂对照组在潜伏期和咳嗽次数上比较，有明显的改善作用， $P<0.05$ ，具有统计学意义。

2）BD-1 20mg/kg、50mg/kg 剂量组，在咳嗽次数上与溶剂对照组比较，有明显改善作用， $P<0.05$ ，具有统计学意义。

实验例 7 蛋白 BD-1（实施例 4 蛋白）对 ICR 小鼠醋酸扭体的药效试验

动物：雄性 ICR 小鼠；

药品与试剂：阿司匹林、生理盐水、冰醋酸、蛋白 BD-1。

实验分组：

模型组；

阿司匹林（Aspirin）300mg/kg 组；

蛋白 BD-1，50mg/kg 组，200mg/kg 组。

方法：

实验动物适应环境一天后，提前一小时分别口服给予阿司匹林 300mg/kg，蛋白 BD-1 50mg/kg、200mg/kg，给药体积为 10ml/kg；而后腹腔注射 0.6%醋酸溶液，观察

15 分钟内动物出现扭体潜伏期（秒）及次数。

数据处理：

各组数据计算均值及标准误，应用 TTEST，与模型组比较， $P<0.05$ 认为有统计学差异。

实验结果：

口服给予阿司匹林 300mg/kg 及不同剂量蛋白 BD-1（50mg/kg、200mg/kg）一小时后，腹腔注射 0.6%醋酸溶液，观察 ICR 小鼠扭体潜伏期和次数。结果见表 9。

表 9. 受试药对 ICR 小鼠醋酸扭体实验的影响

组别	N	体重（克）	扭体潜伏期(秒)	扭体次数(次)
模型组 0.6%醋酸	20	23.5±0.2	196.5±12.2	30.4±2.8
阿司匹林 300mg/kg	15	23.5±0.2	281.6±26.0**	14.8±3.3**
BD-1-50mg/kg	13	23.8±0.3	211.2±17.4	25.8±3.9
BD-1-200mg/kg	13	24.1±0.3	203.5±13.2	23.9±3.7

（与模型组比较，** $P<0.01$ ）

实验结论：

应用 0.6%醋酸溶液注入小鼠腹腔内，引起深部的大面积而较久的疼痛刺激，致使小鼠产生扭体反应（腹部收缩成“S”形，躯干与后腿伸张、臀部高起及蠕行）。以小鼠开始出现扭体的潜伏时间及次数作为痛反应指标，判断受试样品是否具有镇痛作用。本次实验结果显示：

1) 阿司匹林 300mg/kg 可明显后延扭体潜伏期和减少扭体次数，具有一定的镇痛作用，与模型组比较， $P<0.05$ ，有统计学意义。

2) BD-1 50mg/kg、200mg/kg 剂量组，与模型组比较，均有减少小鼠扭体次数的趋势，但无统计学意义。

权 利 要 求 书

- 1、一种角蛋白BD-1，其特征在于，所述角蛋白BD-1的氨基酸序列为：
 - (1) 序列表中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列；
 - (2) 序列表中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加1-35个氨基酸形成的基本上保持相同生物学功能的氨基酸序列。
- 2、根据权利要求1的角蛋白BD-1，其特征在于，在角蛋白BD-1上可进行常规修饰；或者在角蛋白BD-1上还连接有用于检测或纯化的标签。
- 3、根据权利要求2的角蛋白BD-1，其特征在于，所述的常规修饰包括乙酰化、酰胺化、环化、糖基化、磷酸化、烷基化、生物素化、荧光基团修饰、聚乙二醇PEG修饰、固定化修饰、硫酸化、氧化、甲基化、脱氨化、形成二硫键或二硫键断裂；所述的标签包括His6、GST、EGFP、MBP、Nus、HA、IgG、FLAG、c-Myc、Profinity eXact。
- 4、一种编码权利要求1-3任一项所述角蛋白BD-1的核酸分子。
- 5、根据权利要求4的核酸分子，其特征在于，所述的核酸分子的核苷酸序列为：
 - (1) 序列表中SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列；
 - (2) 基于SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列进行序列优化得到的核苷酸序列；
 - (3) 与上述(1)或(2)中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。
- 6、一种表达载体，其特征在于，所述的表达载体含有权利要求4-5任一项所述的核酸分子。
- 7、一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有权利要求6所述的表达载体或者基因组中整合有权利要求4-5任一项所述的核酸分子。
- 8、根据权利要求7的宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞包括细菌、酵母、曲霉菌、植物细胞、或昆虫细胞。
- 9、根据权利要求8的宿主细胞，其特征在于，所述的细菌包括大肠杆菌。
- 10、一种制备生产权利要求1~3任一项所述角蛋白BD-1的方法，其特征在于，包括以下步骤：
 - A. 合成权利要求1~3任一项所述的角蛋白BD-1对应的核酸分子，将核酸分子连入相应的表达载体，将表达载体转化到宿主细胞，在一定条件下在发酵设备中培养带表达载体的宿主细胞并诱导表达角蛋白BD-1，得到含有角蛋白BD-1的粗蛋白溶液；
 - B. 对步骤A中所表达的粗蛋白溶液进行分离纯化干燥得到角蛋白BD-1。
- 11、根据权利要求10的方法，其特征在于，在步骤A中，所述的宿主细胞主要为选自大肠杆菌，所述的角蛋白BD-1在大肠杆菌包涵体中表达，所述的发酵设备包括

摇瓶或发酵罐。

12、根据权利要求10的方法，其特征在于，在步骤A中，诱导表达角蛋白BD-1后，可用清洗剂清洗杂质，用溶液溶解得到粗蛋白溶液。

13、根据权利要求10的方法，其特征在于，在步骤B中，所述的分离纯化的方法包括超滤微滤膜技术纯化方法、柱色谱纯化方法、盐析方法、透析方法。

14、一种药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物含有权利要求1~3任一项所述的角蛋白BD-1以及药学上可接受的载体或赋形剂。

15、权利要求1~3任一项所述的角蛋白BD-1或权利要求4-5任一项所述的核酸分子或权利要求6所述的表达载体或权利要求7-9所述的宿主细胞或权利要求14所述的药物组合物在制备解热、镇痛、镇咳、祛痰、抗惊厥、抗癫痫、降血压、抗炎、抗病毒药物中的应用。

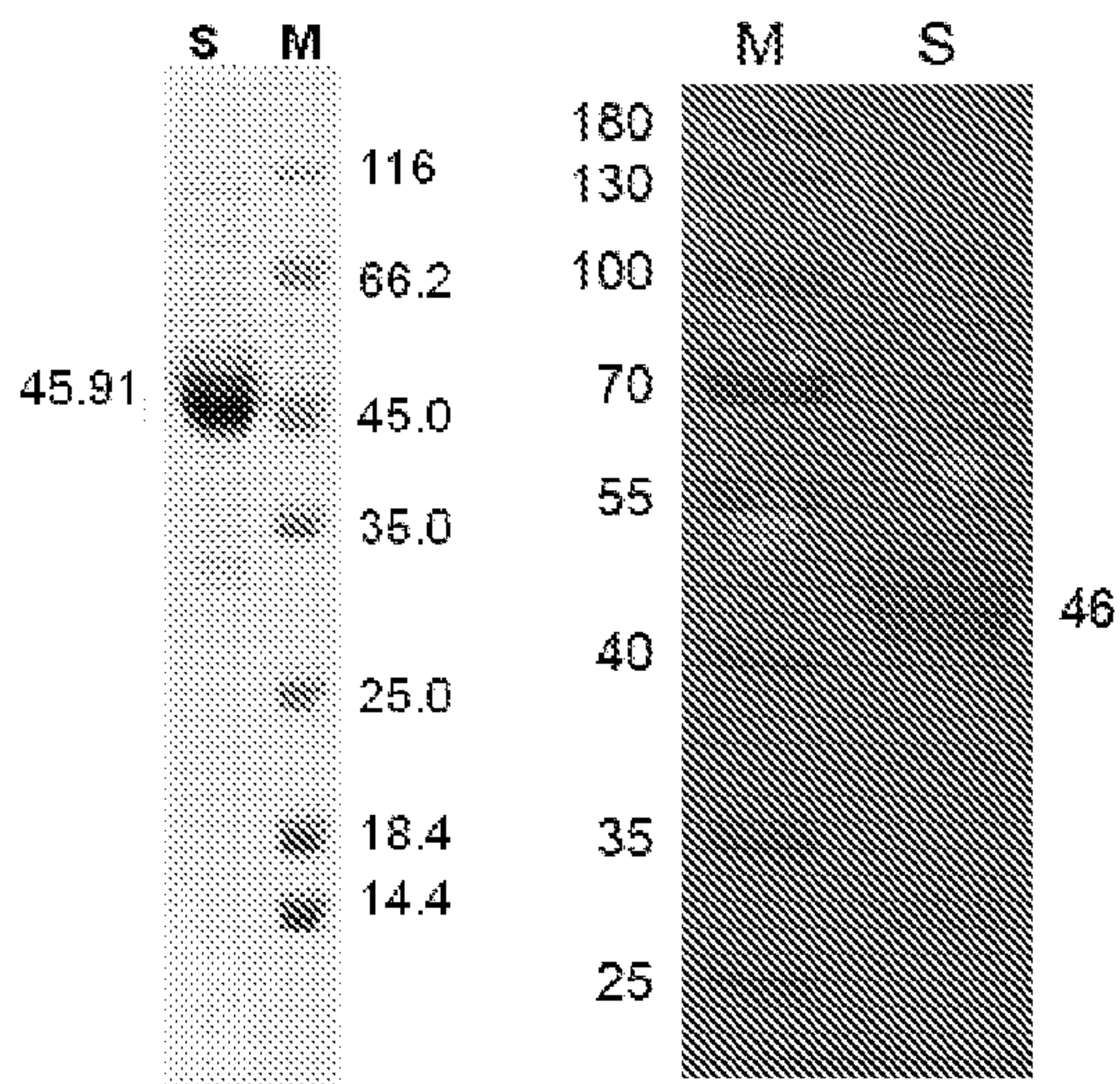


图 1

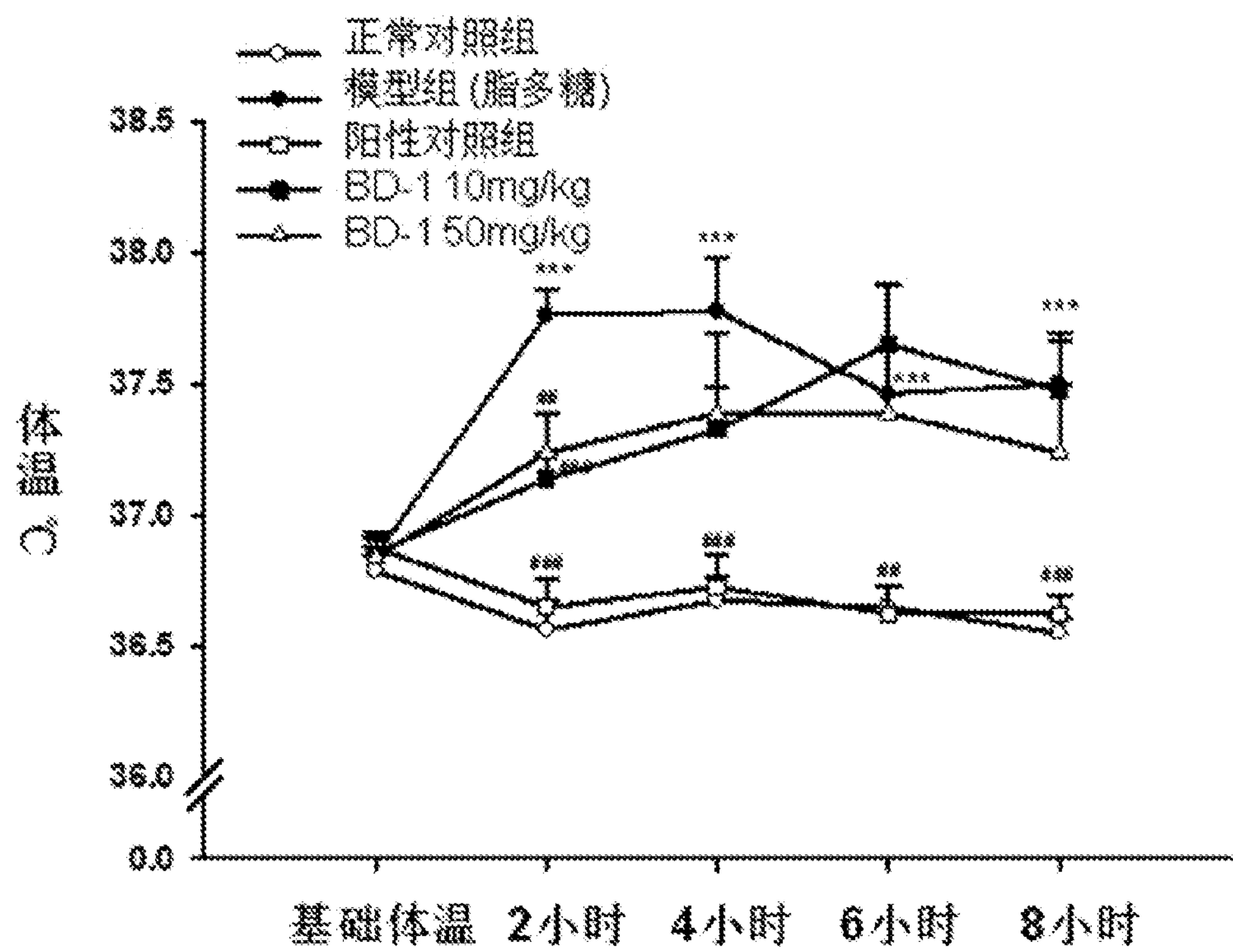


图 2

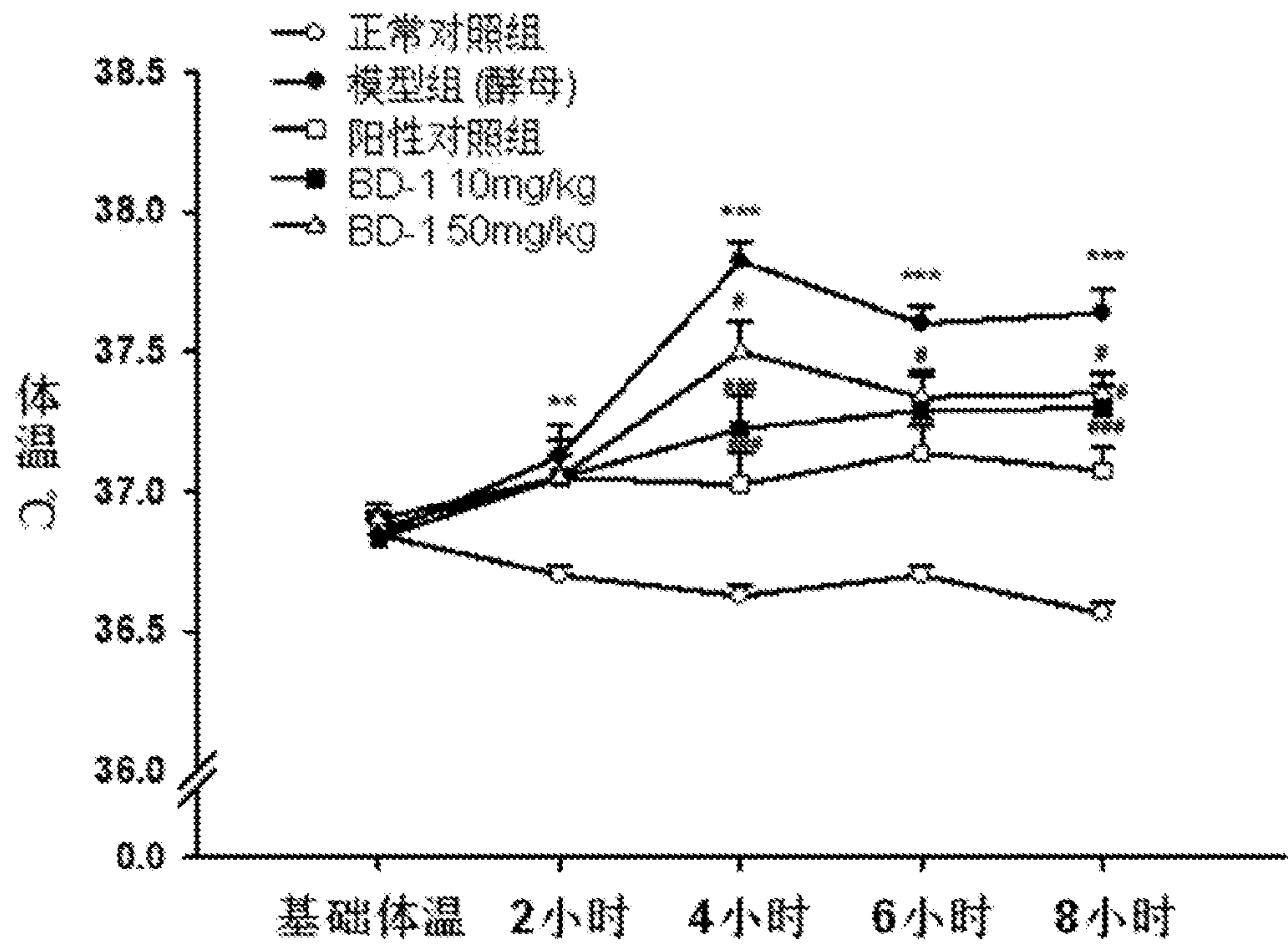


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/124325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 25/08(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N A61K A61P

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

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

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI web of science: 角蛋白, 牛, 抗炎, 抗病毒, 镇痛, keratin, cattle, bovine, bos taurus, inflammation, virus, pain et al.; GenBank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统and sequences searched: SEQ ID NOs: 1-2.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Bos taurus keratin 31 (KRT31), mRNA, NM_001076506.1" <i>NCBI Nucleotide</i> , 26 October 2019 (2019-10-26), see DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	1-13
Y	"Bos taurus keratin 31 (KRT31), mRNA, NM_001076506.1" <i>NCBI Nucleotide</i> , 26 October 2019 (2019-10-26), see DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	14, 15
Y	CN 101647814 A (BEIJING KERRY INNOVATION PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 17 February 2010 (2010-02-17) see abstract, claims 1-10, description pages 1- 4	14, 15
Y	CN 107519203 A (INSTITUTE OF SPECIAL ANIMAL AND PLANT SCIENCES OF CAAS) 29 December 2017 (2017-12-29) see abstract, and particular embodiments	14, 15
Y	WO 2008130607 A2 (UNIV WAKE FOREST HEALTH SCIENCES et al.) 30 October 2008 (2008-10-30) see abstract, and embodiments 1-3	14

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2021

Date of mailing of the international search report

28 January 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/124325

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102993291 A (WUREN TAO-DING) 27 March 2013 (2013-03-27) see claims 1-13, embodiments 1-2	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/124325

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/124325

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101647814	A	17 February 2010	None			
CN	107519203	A	29 December 2017	None			
WO	2008130607	A2	30 October 2008	EP	2146738	A2	27 January 2010
				WO	2008130607	A3	26 February 2009
				JP	5868592	B2	24 February 2016
				JP	2010524943	A	22 July 2010
				AU	2008241396	A1	30 October 2008
				CN	101730540	A	09 June 2010
				IL	201425	D0	31 May 2010
				CA	2683015	C	08 November 2016
				AU	2008241396	B2	19 June 2014
				CA	2683015	A1	30 October 2008
CN	102993291	A	27 March 2013	None			

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2020/124325
A. 主题的分类 C07K 14/47(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 25/08(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K C12N A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI web of science和检索词: 角蛋白, 牛, 抗炎, 抗病毒, 镇痛, keratin, cattle, bovine, bos taurus, inflammation, virus, pain 等; GenBank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-2。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	"Bos taurus keratin 31 (KRT31), mRNA , NM_001076506.1" NCBI Nucleotide, 2019年 10月 26日 (2019 - 10 - 26), 见DEFINITION、FEATURES、ORIGIN	1-13
Y	"Bos taurus keratin 31 (KRT31), mRNA , NM_001076506.1" NCBI Nucleotide, 2019年 10月 26日 (2019 - 10 - 26), 见DEFINITION、FEATURES、ORIGIN	14、15
Y	CN 101647814 A (北京凯瑞创新医药科技有限公司) 2010年 2月 17日 (2010 - 02 - 17) 见摘要、权利要求1-10、说明书第1- 4页	14、15
Y	CN 107519203 A (中国农业科学院特产研究所) 2017年 12月 29日 (2017 - 12 - 29) 见摘要、具体实施方式	14、15
Y	WO 2008130607 A2 (UNIV WAKE FOREST HEALTH SCIENCES等) 2008年 10月 30日 (2008 - 10 - 30) 见摘要、实施例1-3	14
A	CN 102993291 A (乌仁套迪) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 见权利要求1-13、实施例1-2	1-15
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 1月 15日		国际检索报告邮寄日期 2021年 1月 28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 王金凤 电话号码 (86-10)-62412282

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2020/124325			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101647814	A	2010年 2月 17日	无			
CN	107519203	A	2017年 12月 29日	无			
WO	2008130607	A2	2008年 10月 30日	EP	2146738	A2	2010年 1月 27日
				WO	2008130607	A3	2009年 2月 26日
				JP	5868592	B2	2016年 2月 24日
				JP	2010524943	A	2010年 7月 22日
				AU	2008241396	A1	2008年 10月 30日
				CN	101730540	A	2010年 6月 9日
				IL	201425	D0	2010年 5月 31日
				CA	2683015	C	2016年 11月 8日
				AU	2008241396	B2	2014年 6月 19日
				CA	2683015	A1	2008年 10月 30日
CN	102993291	A	2013年 3月 27日	无			