

婷(YU, Tingting); 中国北京市丰台区科学城海鹰路8号2号楼1层109室, Beijing 100070 (CN)。

(74) 代理人: 北京康思博达知识产权代理事务所(普通合伙)(BEIJING CONCEPT INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY); 中国北京市昌平区回龙观西大街9号院3号楼2层222, Beijing 102208 (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

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))。

(57) 摘要: 提供一种鞘氨醇激酶1及其融合蛋白和用途, 所述鞘氨醇激酶1及其融合蛋白具有显著的降血糖作用和将其体重作用, 可用于制备肥胖等代谢性疾病的控制和糖尿病的蛋白质类药物。还提供了一种蛋白质类药物, 其为含有鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列的融合蛋白, 所述融合蛋白包含鞘氨醇激酶1(SPHK1)或具有其活性的氨基酸序列、FC序列和连接序列, 所述蛋白质类药物可显著降低血糖、血脂、体重和改善脂肪代谢。还提供了蛋白质类药物的制备方法、编码基因、表达构建体和宿主细胞, 以及蛋白质类药物、编码基因、表达构建体和宿主细胞在制备用于预防和/或治疗肥胖、高血脂症或糖尿病的药物组合物中的应用。

鞘氨醇激酶 1 及其融合蛋白及其用途

技术领域

5 本发明属于生物制药领域。具体地，本发明涉及鞘氨醇激酶1的用途，更具体地，本发明涉及一种鞘氨醇激酶1的融合蛋白，尤其涉及一种含有鞘氨醇激酶1和FC序列的融合蛋白及其用途。

背景技术

10 肥胖和2型糖尿病(T2DM)是困扰现代社会的主要公共健康问题之一。肥胖及其伴随的胰岛素抵抗是2型糖尿病发病的关键因素，据调查，80-90%的2型糖尿病患者超重或肥胖(邹大进等,上海医学, 2014, 37(9), 729~734)。因此，有效控制血糖和体重始终是有关研究领域的焦点课题。据统计，目前全球2型糖尿病的发病人群已经达到4亿，占有所有糖尿病患者的90%-95%。目前治疗糖尿病的药物主要包括胰岛素和口服降糖药如二甲双胍，但是这些药物的缺点在于容易引起低血糖，并且在对患者体重的控制等方面没有明显作用。另一类药物是GLP-1受体激动剂药物，如诺和诺德公司的利拉鲁肽，礼来公司的杜拉鲁肽等。这类药物在控制血糖的同时也有减轻体重的效果，但是主要是通过抑制患者食欲和控制患者的进食量来实现，大大降低了患者的生活质量。

15 在人体内还有一类在调控代谢中起到非常重要作用的酶类物质，如鞘氨醇激酶1(SphK1)等，SphK1作为新近发现的脂质激酶家族，从进化上讲在人、小鼠、酵母和植物中是保守的，该酶属于鞘脂代谢途径中的一种关键酶，催化由鞘氨醇形成鞘氨醇-1-磷酸(S1P)，是调控神经酰胺和鞘氨醇-1-磷酸(S1P)合成的“变阻器”。SphK1催化神经酰胺的代谢产物鞘氨醇生成S1P。S1P与受体结合后可调控细胞生长、凋亡、分化、造血等细胞过程。SphK1/S1P信号通路参与了多种生物学过程和疾病的发生，包括肿瘤发生和糖尿病。现有技术表明SphK1可以分泌到细胞外，但是对其在胞外的作用以及是否存在胞外的受体还不清楚(Venkataraman K, 等. Biochemical Journal, 2006, 397(3):461-71)。进一步地，缺失SphK1的小鼠在高糖高脂饮食下会促进胰腺细胞凋亡，从而诱发糖尿病的形成(Qi Y, 等. Faseb Journal, 2013, 27(10):4294-4304)。另外，糖尿病小鼠在注射了带有人SphK1基因的腺病毒之后，与对照组小鼠相比显示了降低的血糖和血脂水平。目前对SphK1在研究主要是基于其在细胞内的作用，因此以该蛋白为靶点开发的药物主要是使用其抗体或拮抗剂，并没有直接将该蛋白制成药物进行治疗。另一种是以病毒等为载体将SPHK1基因倒入到细胞进行基因治疗，例如用腺病毒作为载体的基因治疗，然而该方法很容易在体内产生抗药性，而治疗糖尿病等代谢性疾病需要长期用药，这就限制了该方法的使用。因此，基于人SPHK1基因进行
20
25
30
35 药物研发具有广阔的前景。

发明内容

40 基于以上，本发明的目的是针对现有技术的不足，提供一种鞘氨醇激酶1的用途。发明人意外的发现，直接将SphK1制成蛋白质类药物，使其可以不进入细胞内，在细胞外就能发挥功能，具有显著的降血糖作用和减轻体重作用。因此，本发明提供了一种鞘氨醇激酶1在制备用于预防和/或治疗肥胖、高血脂症或糖尿病的药物中的用途。本发明还提供了一类蛋白质类药物，所述药物包含鞘氨醇激酶1(SPDK1)，本发明还提供了所述蛋白质类药物的制备方法及其用途。与现有技术相比，本发明提供的蛋白质类药物可显著降低血糖、血脂、体重和改善脂肪代谢。

45 一方面，本发明提供了一种鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列在制备用于

预防和/或治疗肥胖、高血脂症或糖尿病的蛋白质类药物中的用途。

优选地,所述鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列包含如SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列。

另一方面,本发明提供了一种蛋白质类药物,所述蛋白质类药物包含鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列;

优选地,所述蛋白质类药物为含有鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列的融合蛋白;更优选地,所述融合蛋白包含鞘氨醇激酶1(SPHK1)或具有其活性的氨基酸序列、FC序列和连接序列;

其中,所述FC序列选自人或动物的免疫球蛋白及其亚型和变体的氨基酸序列,或者人或动物白蛋白及其变体的氨基酸序列;

优选地,其中所述连接序列通式为(GGGGS)_n,其中n为0-5的整数;优选地,n为3;

优选地,所述人或动物的免疫球蛋白选自IgG4 FC片段;更优选地,所述人或动物的免疫球蛋白选自如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;

优选地,所述融合蛋白包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

在一个优选的实施方案中,所述融合蛋白使用聚乙二醇修饰;优选地,所述聚乙二醇的平均分子量为5-50KD;更优选地为20-45KD;优选地,所述聚乙二醇为直链或支链聚乙二醇。

另一方面,本发明提供了一种编码基因,其中,所述编码基因含有上述蛋白质类药物的编码核苷酸序列;优选地,所述编码核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

再一方面,本发明提供了一种表达构建体,所述表达构建体含有上述蛋白质类药物的编码核苷酸序列;优选地,所述编码核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

优选地,所述表达构建体是原核表达构建体;更优选地,所述原核表达构建体为pET载体系列;

或所述表达构建体为真核表达构建体;优选地,所述真核表达构建体为质粒DNA载体,优选pVAX1载体和pSV1.0载体;重组病毒载体,优选重组痘苗病毒载体、重组腺病毒载体或重组腺相关病毒载体;或逆转录病毒载体,优选HIV病毒载体,或慢病毒载体。

另一方面,本发明提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包括上述表达构建体;

优选地,当所述表达构建体是原核表达构建体时,所述宿主细胞是原核生物细胞,优选细菌细胞;或当所述表达构建体是真核表达构建体时,所述宿主细胞是真核生物细胞,优选哺乳动物细胞,更优选地为CHO细胞。

另一方面,本发明提供了一种蛋白质类药物的制备方法,所述方法包括将所述蛋白质类药物的核苷酸序列克隆至表达载体的步骤。

具体地,所述制备方法包括以下步骤:

1)构建上述蛋白质类药物的核酸序列;

2)构建包含步骤1)的核酸序列的表达载体;

3)将步骤2)的表达载体用于转染或转化宿主细胞,并使所述核酸序列在宿主细胞中表达;

4)将步骤3)中表达的蛋白进行纯化;

优选地,在步骤3)中,所述宿主细胞为CHO-S细胞。

本发明还提供了上述蛋白质类药物、编码基因、表达构建体、所述的宿主细胞在制备用于预防和/或治疗肥胖、高血脂症或糖尿病的药物组合物中的应用。

与现有技术相比,本发明具有以下优点:本发明发现鞘氨醇激酶1及其融合蛋白具有显著的降血糖作用和减轻体重作用,可用于制备肥胖等代谢性疾病的控制和糖尿

病的蛋白质类药物。

附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

- 5 图1为本发明pCDH-SPHK1-L-Fc的载体构建示意图；图2为使用蛋白印迹法检测蛋白SPHK1-Fc的表达情况，其中，a是慢病毒感染细胞后，上清中蛋白的表达情况；其中“空白”是加病毒感染的细胞上清，用人IgG4Fc特异性抗体检测；b为纯化后的SDS-PAGE电泳图；图3显示本发明的SPHK1蛋白及其融合蛋白SPHK1-Fc对II型糖尿病模型小鼠空腹血糖的影响；对照是生理盐水组；*代表与对照相比差异显著(p值<0.05)；图4显示本发明的SPHK1蛋白及其融合蛋白SPHK1-Fc治疗2周后对II型糖尿病模型小鼠体重的影响；对照是生理盐水组；*代表与对照相比差异显著(p值<0.05)；图5显示本发明的SPHK1蛋白及其融合蛋白SPHK1-Fc治疗2周后对II型糖尿病模型小鼠糖耐量的影响；对照是生理盐水组；*代表与对照相比差异显著(p值<0.05)；**代表与对照相比差异极显著(p值<0.001)；图6显示本发明的SPHK1蛋白及其融合蛋白SPHK1-Fc治疗后对II型糖尿病模型小鼠血脂水平的影响；对照是生理盐水组；*代表与对照相比差异显著(p值<0.05)。

具体实施方式

下面通过优选实施方式和实施例对本发明进一步详细说明。通过这些说明，本发明的特点和优点将变得更为清楚明确。

在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

除非特别指明，以下实施例中所用的试剂均为分析纯级试剂，且可从正规渠道商购获得。

25 实施例1 制备融合蛋白SPHK1-Fc

1.构建含有融合蛋白SPHK1-Fc的慢病毒表达载体pCDH-SPHK1-L-Fc

其中，鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:1；

MDPAGGPRGVLPRPCRVLVLLNPRGGK GKALQLFRSHVQPLLA EAEISFTLMLT
ERRNHARELVRSEELGRWDALVVMMSGDGLMHEVVNGLMERPDWETAIQKPLCSLPAG
30 SGNALAASLNHYAGYEQVTNEDLLTNCTLLLCRLLSPMNLLSLHTASGLRFLSVLSL
AWGFIADV DLESEKYRRLGEMRFTLTGFLRLAALRTYRGRLAYLPVGRVGSKTPASPV
VVQQGPVDAHLVPLEEPVPSHWTVVPDEDFVLVLALLHSHLGSEMFAAPMGRCAAGV
MHLFYVRAGVSRAMLLRLFLAMEKGRHMEYECPLYVYVPVVAFRLEPKDGKGVFAV
DGELMVSEAVQGQVHPNYFWMVSGC VEP PPSWKPQQMPPPEEPL；

35 其编码核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示；

ATGGACCCAGCGGGCGGCCCCCGGGCGGTGCTCCCGCGGCCCTGCCGCGTG
CTGGTGCTGCTGAACCCGCGCGGCGGCAAGGGCAAGGCCTTGCAGCTCTTCCGGA
GTCACGTGCAGCCCCTTTTGGCTGAGGCTGAAATCTCCTTCACGCTGATGCTCACTG
AGCGGCGGAACACGCGCGGGAGCTGGTGCGGTCGGAGGAGCTGGGCCGCTGGGA
40 CGCTCTGGTGGTCATGTCTGGAGACGGGCTGATGCACGAGGTGGTGAACGGGCTCA
TGGAGCGGCCTGACTGGGAGACCGCCATCCAGAAGCCCCTGTGTAGCCTCCCAGCA
GGCTCTGGCAACGCGCTGGCAGCTTCCTTGAACCATTATGCTGGCTATGAGCAGGTC
ACCAATGAAGACCTCCTGACCAACTGCACGCTATTGCTGTGCCGCCGGCTGCTGTC
ACCCATGAACCTGCTGTCTCTGCACACGGCTTCGGGGCTGCGCCTCTTCTCTGTGCT
45 CAGCCTGGCCTGGGGCTTCATTGCTGATGTGGACCTAGAGAGTGAGAAGTATCGGC

GTCTGGGGGAGATGCGCTTCACTCTGGGCACCTTCCTGCGTCTGGCAGCCCTGCGC
 ACCTACCGCGGCCGACTGGCTTACCTCCCTGTAGGAAGAGTGGGTTCCAAGACACC
 TGCCTCCCCCGTTGTGGTCCAGCAGGGCCCGGTAGATGCACACCTTGTGCCACTGG
 AGGAGCCAGTGCCCTCTCACTGGACAGTGGTGCCCGACGAGGACTTTGTGCTAGTC
 5 CTGGCACTGCTGCACTCGCACCTGGGCAGTGAGATGTTTGTGCTGCACCCATGGGCCG
 CTGTGCAGCTGGCGTCATGCATCTGTTCTACGTGCGGGCGGGAGTGTCTCGTGCCAT
 GCTGCTGCGCCTCTTCCTGGCCATGGAGAAGGGCAGGCATATGGAGTATGAATGCC
 CTACTTGGTATATGTGCCCGTGGTCGCCTTCGCTTGGAGCCCAAGGATGGGAAAGG
 TGTGTTTGCAGTGGATGGGGAATTGATGGTTAGCGAGGCCGTGCAGGGCCAGGTGC
 10 ACCCAAATACTTCTGGATGGTCAGCGGTTGCGTGGAGCCCCCGCCAGCTGGAAG
 CCCCAGCAGATGCCACCGCCAGAAGAGCCCTTA

所述融合蛋白SPHK1-Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，其核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。其N段到C段依次为SPHK1、连接序列L和Fc；

Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示：

15 ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K;

20 融合蛋白SPHK1-Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，其中，斜体加粗部分为链接序列的氨基酸序列，下划线部分为Fc的氨基酸序列：

MDPAGGPRGVLPRPCRVLVLLNPRGGK GKALQLFRSHVQPLLA EAEISFTLMLT
 ERNHARELVRSEELGRWDALVMSGDGLMHEVVNGLMERPDWETAIQKPLCSLPAG
 SGNALAA SLNHYAGYEQVTNEDLLTNCTLLLCRRLSPMNLLSHTASGLR LFSVLSL
 25 AWGFIADV DLESEKYRRLGEMRFTLGTFLRLAALR TYRGR LAYLPVGRV GSKTPASPV
 VVQQGPV DAHLVPLEEPVPSHWTVPDEDFVLVLALLHSHLGSEMFAAPMGRCAAGV
 MHLFYVRAGVSRAMLLRFLAMEKGRHMEYECPLYVYVPVVAFRLEPKDGKGVFAV
 DGELMVSEAVQQQVHPNYFWMVSGCVEPPPSWK PQQMPPPEEPL **GGGGSGGGGSGG**
GGSEESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
 30 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
;

35 其核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示，其中，斜体部分为链接序列的核苷酸序列，下划线部分为Fc的核苷酸序列：

ATGGACCCAGCGGGCGGCCCGGGGCGTGCTCCCGCGGCCCTGCCGCGTG
 CTGGTGCTGCTGAACCCGCGCGGGCGGCAAGGGCAAGGCCTTGCAGCTCTTCCGGA
 GTCACGTGCAGCCCCTTTTGGCTGAGGCTGAAATCTCCTTCACGCTGATGCTCACTG
 AGCGGCGGAACACGCGCGGGAGCTGGTGCGGTCGGAGGAGCTGGGCCGCTGGGA
 40 CGCTCTGGTGGTCATGTCTGGAGACGGGCTGATGCACGAGGTGGTGAACGGGCTCA
 TGGAGCGGCCTGACTGGGAGACCGCCATCCAGAAGCCCCTGTGTAGCCTCCCAGCA
 GGCTCTGGCAACGCGCTGGCAGCTTCCTTGAACCATTATGCTGGCTATGAGCAGGTC
 ACCAATGAAGACCTCCTGACCAACTGCACGCTATTGCTGTGCCGCCGGCTGCTGTC
 ACCCATGAACCTGCTGTCTCTGCACACGGCTTCGGGGCTGCGCCTCTTCTCTGTGCT
 45 CAGCCTGGCCTGGGGCTTCATTGCTGATGTGGACCTAGAGAGTGAGAAGTATCGGC

GTCTGGGGGAGATGCGCTTCACTCTGGGCACCTTCCTGCGTCTGGCAGCCCTGCGC
 ACCTACCGCGGCCGACTGGCTTACCTCCCTGTAGGAAGAGTGGGTTCCAAGACACC
 TGCCTCCCCCGTTGTGGTCCAGCAGGGCCCGGTAGATGCACACCTTGTGCCACTGG
 AGGAGCCAGTGCCCTCTCACTGGACAGTGGTGCCCGACGAGGACTTTGTGCTAGTC
 5 CTGGCACTGCTGCACTCGCACCTGGGCAGTGAGATGTTTGTGCTGCACCCATGGGCCG
 CTGTGCAGCTGGCGTCATGCATCTGTTCTACGTGCGGGCGGGAGTGTCTCGTGCCAT
 GCTGCTGCGCCTCTTCCTGGCCATGGAGAAGGGCAGGCATATGGAGTATGAATGCC
 CTACTTGGTATATGTGCCCGTGGTCGCCTTCCGCTTGGAGCCCAAGGATGGGAAAGG
 TGTGTTTGCAGTGGATGGGGAATTGATGGTTAGCGAGGCCGTGCAGGGCCAGGTGC
 10 ACCCAAATACTTCTGGATGGTCAGCGGTTGCGTGGAGCCCCCGCCAGCTGGAAG
 CCCCAGCAGATGCCACCGCCAGAAGAGCCCTTAGGGCGGAGGGCGGAAGCGGAGGGCG
 GAGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCATCATGC
 CCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCCTGTTCCCCCAAACCCAA
 GGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGA
 15 GCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACC
 20 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAG
 CAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

25 信号肽序列为IL-2信号肽序列(SP, 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示; SEQ ID NO:
 4 MYRMQLLSICIALSLALVTNS)
 根据 IL-2 信号肽设计引物 , 包括 armSP-F(上游引
 物)(SEQ ID NO:6 :CTCCATAGAAGATTCTAGAGCTAGGGATCCGCCACCATGTACAG
 GATGCAACTCCTG) 和 armSP-R(下游引
 30 物)(SEQ ID NO:7 :GGGCCGCCCCTGGGTCCATCGAATTCGTGACAAGTGCAAG), 用
 质粒 pFUSE-hIgG4-Fc2(购自达科为生物技术有限公司)做模板, PCR 扩增片段
 SP(116bp); 根据 SPHK1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 设计引物, 包括 SPHK1-F(上游引
 物)(SEQ ID NO:8: ATGGACCCAGCGGGCGGCC)和 SPHK1-R (下游引物)(SEQ ID NO:9:
 35 GCCACCGCCGCTTCCCTCCGCCTCCGCTTCCGCCTCCGCCTAAGGGCTCTTCTG
 GCGGTG), 用质粒 pcDNA3.1-WSPK1c(军事医学科学院)做模板, PCR 扩增片段
 SPHK1(1191bp),
 该 PCR 产物片段 3' 段含有部分连接序列 L
 (5'-GGCGGAGGCGGAAGCGGAGGCGGAGGAAGCGGCGGTGGC-3'); 根据 Fc 蛋白的
 核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 设计引物, 包括
 40 Fc-F(SEQ ID NO:10:GCGGAGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCGAGTCCAAATATGGTC
 CCCCATGCCATCATGC) 和 Fc-R (SEQ ID NO:11
 GTAATCCAGAGGTTGATTGTGCGACTCATTTACCCGGAGACAGGG), 用质粒
 pFUSE-hIgG4-Fc2(购自达科为生物技术有限公司)做模板, PCR 扩增片段 Fc(740bp),
 该 PCR 产物片段 5' 段含有部分连接序列 L(序列 5'-
 45 GCGGAGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGC-3')。所有引物均由北京擎科新业生物技术有

限公司合成。PCR反应体系和反应条件如表1和表2所示。

表1 PCR反应体系

10×ExTaq 缓冲液 (购自 Takara 公司, 货号为 RR001A)	5 μ L
dNTP mixture (每种 2.5mM) (购自 Takara 公司, 货号为 RR001A)	4 μ L
上游引物 (10 μ M)	2.5 μ L
下游引物 (10 μ M)	2.5 μ L
模板 (0.1 μ g/ μ L)	1 μ L
ExTaq (购自 Takara 公司, 货号为 RR001A, 5U/ μ L)	0.25 μ L
H ₂ O	补至 50 μ L

表2: PCR反应条件

95 $^{\circ}$ C	4min
95 $^{\circ}$ C	30s
退火温度*	30s
72 $^{\circ}$ C	延伸时间#
72 $^{\circ}$ C	5min
10 $^{\circ}$ C	Forever

PCR进行了30个循环。

5 *PCR扩增不同的片段退火温度为引物的T_m值-3 $^{\circ}$ C; #PCR扩增不同的片段的延伸时间为1kb/min。

反应结束后, 将所得产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 胶回收纯化(胶回收试剂盒购自天根公司)各个PCR产物sp、SPHK1、Fc。

10 将质粒pCDH-CMV(购自Addgene公司)用BamHI和SalI双酶切, 酶切产物切胶回收后, 与上述纯化的PCR产物sp、SPHK1、Fc用无缝克隆的方法(Streamless Assembly Cloning Kit, 购买自Clone Smarter technologies公司)连接。将连接产物转化DH5 α 感受态细胞(购买自天根生化科技有限公司), 转化方法参看感受态细胞说明书。将转化后菌液涂布至含有100 μ g/mL氨苄青霉素的LB板上, 37 $^{\circ}$ C过夜培养。挑取单克隆进行菌落PCR, 将阳性克隆送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序, 保存测序结果正确的克隆并提取质粒, 并命名为pCDH-SPHK1-L-Fc, 质粒图谱如图1所示。

15 实施例2 制备携带质粒pCDH-SPHK1-L-Fc的慢病毒颗粒

20 将细胞汇合度达90%以上的293T细胞(东北农业大学Lab217胚胎工程实验室)接种到150mm培养皿中, 每皿接种 1.2×10^7 个细胞, 加入20ml含10%FBS的DMEM培养基, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂饱和湿度培养。转染前2h, 弃去原培养基, 更换为18ml不含血清的DMEM培养基。将上述所制备的p-SPHK1-L-Fc质粒分别和慢病毒包装的辅助质粒pHelper1、pHelper2(东北农业大学Lab217胚胎工程实验室)按照等比率混合均匀, 参照脂质体Lipofectamin 2000转染试剂盒(购自Invitrogen)说明书转染293T细胞。转染后6-8h后弃去含有转染混和物的上清, 每皿加入20ml新的含5%FBS的DMEM培养基, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂饱和湿度培养。24h后收集上清液保存于4 $^{\circ}$ C, 并加入新的20ml培养基。继续培养24h

25 后再次收集上清液。将两次收集的上清于4 $^{\circ}$ C、3500rpm离心15min, 弃沉淀, 将上清用Amicon Ultra-15超滤管(10KD, 购自Millipore公司)离心浓缩, 分别获得携带SPHK1-Fc的慢病毒颗粒。经过病毒滴度测定, 将病毒颗粒稀释为 1×10^8 TU/ml, 分装病毒并置于-80 $^{\circ}$ C保存。

实施例3 慢病毒感染CHO-S细胞及阳性单克隆的筛选和验证

3.1慢病毒感染CHO-S细胞

将悬浮FreeStyle CHO-S细胞(购买自Thermo scientific公司)以 2×10^5 细胞/mL接种于含30mL CD-SFM培养基(CD FortiCHO medium+8mM谷氨酰胺+1×HT supplement, 均购自Thermo scientific公司)的125mL摇瓶中(购自康宁公司), 120rpm, 8%CO₂, 37℃培养至对数生长期, 将细胞用CD-SFM培养基稀释成 4×10^4 细胞/mL的细胞悬液。取0.5mL细胞悬液, 按照感染复数(MOI)为80加入上述的慢病毒颗粒, 在32℃, 800g条件下离心30min。弃上清, 重新加入0.5mL CD-SFM培养基重悬细胞, 转移至24孔板中, 在37℃, 5%CO₂条件下培养48-72h后用免疫印迹(Western blot)检测培养上清中目的蛋白表达情况。取30μL细胞上清经10%还原SDS-PAGE后, 用低温湿法将蛋白质转印至PVDF膜上, 条件为恒流300mA转膜1h。用5%脱脂牛奶/TBST溶液室温封闭1h, 用偶联HRP的鼠抗人IgG4Fc抗体(1:3000稀释, 购自abcam公司)检测SPHK1-Fc的表达, 抗体与室温孵育1h, TBST溶液洗3次, 每次10min。用ECL发光成像系统(购自北京原平皓生物技术有限公司)检测拍照。结果如图2(a)所示, 在90KD处检测到特异性表达的条带, 比理论分子量大, 这主要是由于在CHO-S细胞表达时, 对Fc上存在糖基化位点进行修饰, 从而增加了分子量。

3.2阳性单克隆的筛选和验证

将感染慢病毒后的细胞用CD-SFM培养基+5%FBS重悬细胞至10个/mL, 于96孔板中每孔加入100μL细胞悬液, 继续培养10-14天后, 显微镜下观察细胞单克隆的形成。根据人IgG ELISA定量试剂盒(购自北京达科为生物技术有限公司)的说明书, 取50μL细胞单克隆培养上清进行检测蛋白表达。挑选高表达细胞株, 最终每种蛋白筛选各得到2株高表达细胞株(1B7、3E8)。检测结果如表3所示。

表3单克隆细胞培养上清ELISA检测结果

编号	OD450	编号	OD450	编号	OD450
1B3	0.0854	2B10	0.3062	3C5	0.7268
1B7	1.5640	2C2	0.4588	3C6	0.9519
1C11	0.5670	2C4	0.2153	3C9	0.2938
1D6	0.2386	2E5	0.1286	3D6	0.0461
1E2	0.0237	2E9	0.0533	3E8	1.3380
1G7	0.3485	2F3	0.9846	3F2	0.3794
1G2	0.6290	2G7	0.2654	3F11	0.8542
		2G11	0.1084	3G3	0.0985

实施例4 SPHK1-Fc蛋白的纯化和定量

挑选单克隆1B7至500mL摇瓶扩大培养, 用1200rpm离心10min弃细胞沉淀, 收集上清。上清用0.22μm滤膜过滤去除细胞碎片。用5倍柱体积的平衡缓冲液(5.6mM NaH₂PO₄, 14.4mM Na₂HPO₄, 0.15M NaCl, pH7.2)处理protein A亲和柱HiTrap MabSelect SuRe(购自GE通用公司), 再将上清进行上样, 上样结束后, 用缓冲液(5.6mM NaH₂PO₄·H₂O, 14.4mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH7.2)冲洗结合不牢固的杂蛋白至基线。再用洗脱液50mM柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液(含0.02%吐温-80+5%甘露醇, pH3.2)洗脱蛋白, 再用1M Tris-Cl(pH8.0)调节pH至7.0。纯化后的样品经0.22μm滤膜过滤除菌后保存于4℃。

纯化后的样品用BCA蛋白定量试剂盒(购自北京原平皓生物技术有限公司)测定

蛋白的浓度。根据定量的结果，取10 μ g蛋白，用10%胶进行SDS-PAGE电泳，用快速蛋白染色试剂盒(购自北京原平皓生物技术有限公司)染色显影，结果扫描保存。如图2(b)所示，纯化后得到的主要蛋白大小与实施例3.1中的免疫印迹结果一致。

实施例5 SPHK1-Fc蛋白的体内药效研究。

5 将18只4-8周龄的雄性II型糖尿病模型鼠BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/Nju(购自南京大学模式动物研究所)根据体重和空腹血糖分成3组：对照组(control, 生理盐水)、给药组1(SPHK1-Fc蛋白)和给药组2(SPHK1蛋白, 购自北京义翘神州生物技术有限公司, 货号15679-HNCB), 每组6只小鼠。每组给药方式均为皮下注射, 给药剂量均为2mg/kg。对照组和给药组1每周给药两次; 给药组2每天给药一次。每周称量记录小鼠
10 体重, 并测量小鼠空腹血糖: 给药当天晚上小鼠禁食12h(水正常供应), 次日早上测量血糖。根据小鼠平均血糖绘制血糖变化曲线, 图3结果表明, 两个给药组小鼠治疗两周后, 空腹血糖明显低于对照组。图4结果表明两个给药组小鼠体重也明显轻于对照组。但是两个给药组之间在空腹血糖和体重增长上的差异都没有统计性意义。说明SPHK1和SPHK1-Fc在控制血糖和体重方面都有显著的作用。

15 治疗2周后检测葡萄糖耐量: 测量前一晚禁食12h, 测量时按照1g葡萄糖/kg的剂量腹腔注射葡萄糖, 并在0, 30, 60和120min测量小鼠血糖。图5结果显示两个给药组比对照组在各个检测点的血糖水平都要低, 而两个给药组之间的葡萄糖耐量都没有显著性差异, 说明给药后小鼠对葡萄糖耐受性具有明显的改善。

20 葡萄糖耐量试验5天后检测血清生化指标: 小鼠眼球取血, 3000rpm离心10min分离血清, 样品送至北京北方生科医学技术有限公司检测甘油三脂(TG)、总胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白(HDLC)、低密度脂蛋白(LDLC)指标。图6结果表明, SPHK1-Fc和SPHK1蛋白治疗后, 小鼠的CHOL、TG和LDLC的水平明显低于对照组, 说明SPHK1-Fc和SPHK1对血脂代谢具有调控作用, 可以有效控制血脂水平。

25 以上结合具体实施方式和范例性实例对本发明进行了详细说明, 不过这些说明并不能理解为对本发明的限制。本领域技术人员理解, 在不偏离本发明精神和范围的情况下, 可以对本发明技术方案及其实施方式进行多种等价替换、修饰或改进, 这些均落入本发明的范围内。

SEQUENCE LISTING.txt

- <110> 北京双因生物科技有限公司
段海峰
- <120> 鞘氨醇激酶1及其融合蛋白及其用途
- <130> 2019
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 384
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Asp Pro Ala Gly Gly Pro Arg Gly Val Leu Pro Arg Pro Cys Arg
1 5 10 15

Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Arg Gly Gly Lys Gly Lys Ala Leu Gln
20 25 30

Leu Phe Arg Ser His Val Gln Pro Leu Leu Ala Glu Ala Glu Ile Ser
35 40 45

Phe Thr Leu Met Leu Thr Glu Arg Arg Asn His Ala Arg Glu Leu Val
50 55 60

Arg Ser Glu Glu Leu Gly Arg Trp Asp Ala Leu Val Val Met Ser Gly
65 70 75 80

Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly Leu Met Glu Arg Pro Asp
85 90 95

Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu Cys Ser Leu Pro Ala Gly Ser
100 105 110

Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Leu Asn His Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln
115 120 125

Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu Thr Asn Cys Thr Leu Leu Leu Cys Arg
130 135 140

SEQUENCE LISTING.txt

Arg Leu Leu Ser Pro Met Asn Leu Leu Ser Leu His Thr Ala Ser Gly
 145 150 155 160

Leu Arg Leu Phe Ser Val Leu Ser Leu Ala Trp Gly Phe Ile Ala Asp
 165 170 175

Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Tyr Arg Arg Leu Gly Glu Met Arg Phe
 180 185 190

Thr Leu Gly Thr Phe Leu Arg Leu Ala Ala Leu Arg Thr Tyr Arg Gly
 195 200 205

Arg Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Arg Val Gly Ser Lys Thr Pro Ala
 210 215 220

Ser Pro Val Val Val Gln Gln Gly Pro Val Asp Ala His Leu Val Pro
 225 230 235 240

Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val Val Pro Asp Glu Asp
 245 250 255

Phe Val Leu Val Leu Ala Leu Leu His Ser His Leu Gly Ser Glu Met
 260 265 270

Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Ala Ala Gly Val Met His Leu Phe
 275 280 285

Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Met Leu Leu Arg Leu Phe Leu
 290 295 300

Ala Met Glu Lys Gly Arg His Met Glu Tyr Glu Cys Pro Tyr Leu Val
 305 310 315 320

Tyr Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu Pro Lys Asp Gly Lys Gly
 325 330 335

Val Phe Ala Val Asp Gly Glu Leu Met Val Ser Glu Ala Val Gln Gly
 340 345 350

Gln Val His Pro Asn Tyr Phe Trp Met Val Ser Gly Cys Val Glu Pro
 355 360 365

SEQUENCE LISTING.txt

Pro Pro Ser Trp Lys Pro Gln Gln Met Pro Pro Pro Glu Glu Pro Leu
 370 375 380

<210> 2
 <211> 628
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Met Asp Pro Ala Gly Gly Pro Arg Gly Val Leu Pro Arg Pro Cys Arg
 1 5 10 15

Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Arg Gly Gly Lys Gly Lys Ala Leu Gln
 20 25 30

Leu Phe Arg Ser His Val Gln Pro Leu Leu Ala Glu Ala Glu Ile Ser
 35 40 45

Phe Thr Leu Met Leu Thr Glu Arg Arg Asn His Ala Arg Glu Leu Val
 50 55 60

Arg Ser Glu Glu Leu Gly Arg Trp Asp Ala Leu Val Val Met Ser Gly
 65 70 75 80

Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly Leu Met Glu Arg Pro Asp
 85 90 95

Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu Cys Ser Leu Pro Ala Gly Ser
 100 105 110

Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Leu Asn His Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln
 115 120 125

Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu Thr Asn Cys Thr Leu Leu Leu Cys Arg
 130 135 140

Arg Leu Leu Ser Pro Met Asn Leu Leu Ser Leu His Thr Ala Ser Gly
 145 150 155 160

Leu Arg Leu Phe Ser Val Leu Ser Leu Ala Trp Gly Phe Ile Ala Asp
 165 170 175

Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Tyr Arg Arg Leu Gly Glu Met Arg Phe

SEQUENCE LISTING.txt

180	185	190
Thr Leu Gly Thr Phe Leu Arg Leu Ala Ala Leu Arg Thr Tyr Arg Gly		
195	200	205
Arg Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Arg Val Gly Ser Lys Thr Pro Ala		
210	215	220
Ser Pro Val Val Val Gln Gln Gly Pro Val Asp Ala His Leu Val Pro		
225	230	235
Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val Val Pro Asp Glu Asp		
245	250	255
Phe Val Leu Val Leu Ala Leu Leu His Ser His Leu Gly Ser Glu Met		
260	265	270
Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Ala Ala Gly Val Met His Leu Phe		
275	280	285
Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Met Leu Leu Arg Leu Phe Leu		
290	295	300
Ala Met Glu Lys Gly Arg His Met Glu Tyr Glu Cys Pro Tyr Leu Val		
305	310	315
Tyr Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu Pro Lys Asp Gly Lys Gly		
325	330	335
Val Phe Ala Val Asp Gly Glu Leu Met Val Ser Glu Ala Val Gln Gly		
340	345	350
Gln Val His Pro Asn Tyr Phe Trp Met Val Ser Gly Cys Val Glu Pro		
355	360	365
Pro Pro Ser Trp Lys Pro Gln Gln Met Pro Pro Pro Glu Glu Pro Leu		
370	375	380
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
385	390	395
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu		

SEQUENCE LISTING.txt

405

410

415

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 420 425 430

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 435 440 445

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 450 455 460

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 465 470 475 480

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 485 490 495

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 500 505 510

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 515 520 525

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 530 535 540

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 545 550 555 560

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 565 570 575

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 580 585 590

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 595 600 605

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 610 615 620

Ser Pro Gly Lys

SEQUENCE LISTING.txt

625

<210> 3
 <211> 1884
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3
 atggaccag cgggcggccc cggggcgctg ctcccgcggc cctgcccgtg gctgggtgctg 60
 ctgaaccgc gcggcggcaa gggcaaggcc ttgcagctct tccggagtca cgtgcagccc 120
 cttttggctg aggctgaaat ctcttcacg ctgatgctca ctgagcggcg gaaccacgcg 180
 cgggagctgg tgcggtcgga ggagctgggc cgctgggacg ctctgggtgt catgtctgga 240
 gacgggctga tgcacgaggt ggtgaacggg ctcatggagc ggccctgactg ggagaccgcc 300
 atccagaage cctgtgtag cctcccagca ggctctggca acgcgctggc agcttccttg 360
 aaccattatg ctggctatga gcaggtcacc aatgaagacc tctgaccaa ctgcacgcta 420
 ttgtgtgccc gccggctgct gtcaccatg aacctgctgt ctctgcacac ggcttcgggg 480
 ctgcgectct tctctgtgct cagcctggcc tggggcttca ttgtgatgt ggacctagag 540
 agtgagaagt atcggcgtct gggggagatg cgcttcactc tgggcacctt cctgcgtctg 600
 gcagccctgc gcacctaccg cggccgactg gcttacctcc ctgtaggaag agtgggttcc 660
 aagacacctg cctccccctg tgttggtccag cagggcccg tagatgcaca ccttgtgcca 720
 ctggaggagc cagtgcctc tcaactggaca gtggtgcccg acgaggactt tgtgctagtc 780
 ctggcactgc tgcactgca cctgggcagt gagatgtttg ctgcacccat gggccgctgt 840
 gcagctggcg tcatgcatct gttctacgtg cgggcgggag tgtctcgtgc catgctgctg 900
 cgctcttcc tggccatgga gaagggcagg catatggagt atgaatgccc ctacttggtgta 960
 tatgtgcccg tggtcgcctt ccgcttggag cccaaggatg ggaaaggtgt gtttgcagtg 1020
 gatggggaat tgatggttag cgaggccgtg cagggccagg tgcacccaaa ctacttctgg 1080
 atggtcagcg gttgcgtgga gccccgccc agctggaagc ccagcagat gccaccgcca 1140
 gaagagccct taggcggagg cggaagcgga ggcggaggaa gcggcggtgg cggcagcgag 1200
 tccaaatag gtccccatg cccatcatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 1260
 gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac cctgaggtc 1320
 acgtgcgtgg tgggtggactg gagccaggaa gaccccagg tccagttcaa ctggtactgtg 1380
 gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 1440

SEQUENCE LISTING.txt

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1500
 aagtgcaagg tetccaacaa aggcctcccc tcttccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1560
 aaagggcage cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1620
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1680
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1740
 tccgacgget ctttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1800
 gggaatgtet tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacacagaag 1860
 agcctctccc tgtctccggg taaa 1884

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser
 20

<210> 5
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

atggaccag cgggcggccc ccggggcgtg ctcccgcggc cctgcccgtg gctgggtgctg 60
 ctgaaccgc gcggcgcaa gggcaaggcc ttgcagctct tccggagtca cgtgcagccc 120
 cttttggtg aggctgaaat ctcttcacg ctgatgctca ctgagcggcg gaaccacgcg 180
 cgggagctgg tgcggtcgga ggagctgggc cgctgggacg ctctggtggt catgtctgga 240
 gacgggctga tgcacgaggt ggtgaacggg ctcatggagc ggcctgactg ggagaccgcc 300
 atccagaage cctgtgtag cctcccagca ggctctggca acgcgctggc agcttccttg 360
 aaccattatg ctggctatga gcaggtcacc aatgaagacc tctgaccaa ctgcacgcta 420
 ttgetgtgcc gccggtgct gtcacctatg aacctgctgt ctctgcacac ggcttcgggg 480
 ctgcgectct tctctgtgct cagcctggcc tggggcttca ttgctgatgt ggacctagag 540

SEQUENCE LISTING.txt

```

agtgagaagt atcggcgtct gggggagatg cgcttcactc tgggcacctt cctgcgtctg      600
gcagecctgc gcacctaccg cggccgactg gcttacctcc ctgtaggaag agtgggttcc      660
aagacacctg cctcecccgt tgtggtccag cagggcccgg tagatgcaca ccttgtgcc      720
ctggaggage cagtgcctc tcaactggaca gtggtgcccg acgaggactt tgtgctagtc      780
ctggcaactgc tgcactcgca cctgggcagt gagatgtttg ctgcacccat gggccgctgt      840
gcagctggcg tcatgatct gttctacgtg cgggcgggag tgtctcgtgc catgctgctg      900
cgectettcc tggccatgga gaagggcagg catatggagt atgaatgccc ctacttggt      960
tatgtccccg tggtegcctt ccgcttggag cccaaggatg ggaaaggtgt gtttgcagt      1020
gatggggaat tgatggttag cgaggccgtg cagggccagg tgcacccaaa ctacttctgg      1080
atggtcagcg gttgcgtgga gccccgccc agctggaagc cccagcagat gccaccgcca      1140
gaagagccct ta                                                                1152

```

<210> 6
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

```

<400> 6
ctccatagaa gattctagag ctagggatcc gccaccatgt acaggatgca actcctg      57

```

<210> 7
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

```

<400> 7
gggccgcccg ctgggtccat cgaattcgtg acaagtgcaa g                                                                41

```

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

```

<400> 8
atggaccag cgggcgccc                                                                19

```

<210> 9
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

SEQUENCE LISTING.txt

<400> 9
 gccaccgceg ctctctcegc ctccgcttcc gcctccgcct aagggtcttt ctggcggtg 59

<210> 10
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10
 ggggaggaag cggcggtggc ggcagcgagt ccaaatatgg tccccatgc ccatcatgc 59

<210> 11
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11
 gtaatccaga ggttgattgt cgactcattt acccgagac aggg 44

<210> 12
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110

SEQUENCE LISTING.txt

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Pro Gly Lys
 225

权利要求书

1. 一种鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列在制备用于预防和/或治疗肥胖、高血脂症或糖尿病的蛋白质类药物中的用途；

优选地，所述鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

2. 一种蛋白质类药物，所述蛋白质类药物包含鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列；

优选地，所述蛋白质类药物为含有鞘氨醇激酶1或具有其活性的氨基酸序列的融合蛋白。

3. 根据权利要求2所述的蛋白质类药物，其中，所述融合蛋白包含鞘氨醇激酶1(SPHK1)或具有其活性的氨基酸序列、FC序列和连接序列；

其中，所述FC序列选自人或动物的免疫球蛋白及其亚型和变体的氨基酸序列，或者人或动物白蛋白及其变体的氨基酸序列；

所述连接序列通式为(GGGGS)_n，其中n为0-5的整数；

优选地，所述人或动物的免疫球蛋白选自IgG4FC片段；

更优选地，所述人或动物的免疫球蛋白选自如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列；

所述融合蛋白包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

4. 如权利要求2所述的蛋白质类药物，其中，所述融合蛋白使用聚乙二醇修饰；
优选地，所述聚乙二醇的平均分子量为5-50KD。

5. 一种编码基因，其中，所述编码基因含有如权利要求2-4中任一项所述的蛋白质类药物的编码核苷酸序列；
优选地，所述编码核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

6. 一种表达构建体，所述表达构建体含有如权利要求2-4中任一项所述的蛋白质类药物的编码核苷酸序列；
优选地，所述编码核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示；

所述表达构建体是原核表达构建体或真核表达构建体。

7. 根据权利要求6所述的表达构建体，所述原核表达构建体为pET载体系列；

所述真核表达构建体为质粒DNA载体，优选pVAX1载体和pSV1.0载体；

重组病毒载体，优选重组痘苗病毒载体、重组腺病毒载体或重组腺相关病毒载体；
或逆转录病毒载体，优选HIV病毒载体，或慢病毒载体。

8. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含如权利要求6或7所述的表达构建体；

当所述表达构建体是原核表达构建体时，所述宿主细胞是原核生物细胞，优选细菌细胞；

当所述表达构建体是真核表达构建体时，所述宿主细胞是真核生物细胞，优选哺乳动物细胞，更优选地为CHO细胞。

9. 一种蛋白质类药物的制备方法，所述方法包括将如权利要求2-4中任一项所述的蛋白质类药物的核苷酸序列克隆至表达载体的步骤。

具体地，所述制备方法包括以下步骤：

1)构建上述蛋白质类药物的核酸序列；

2)构建包含步骤1)的核酸序列的表达载体；

3)将步骤2)的表达载体用于转染或转化宿主细胞，并使所述核酸序列在宿主细胞中表达；

优选地，在步骤3)中，所述宿主细胞为CHO-S细胞。

10. 如权利要求2-4中任一项所述的蛋白质类药物、如权利要求5所述的编码基因、如权利要求6或7所述的表达构建体、如权利要求8所述的宿主细胞在制备用于预防和/或治疗肥胖、高血脂症或糖尿病的药物组合物中的应用。

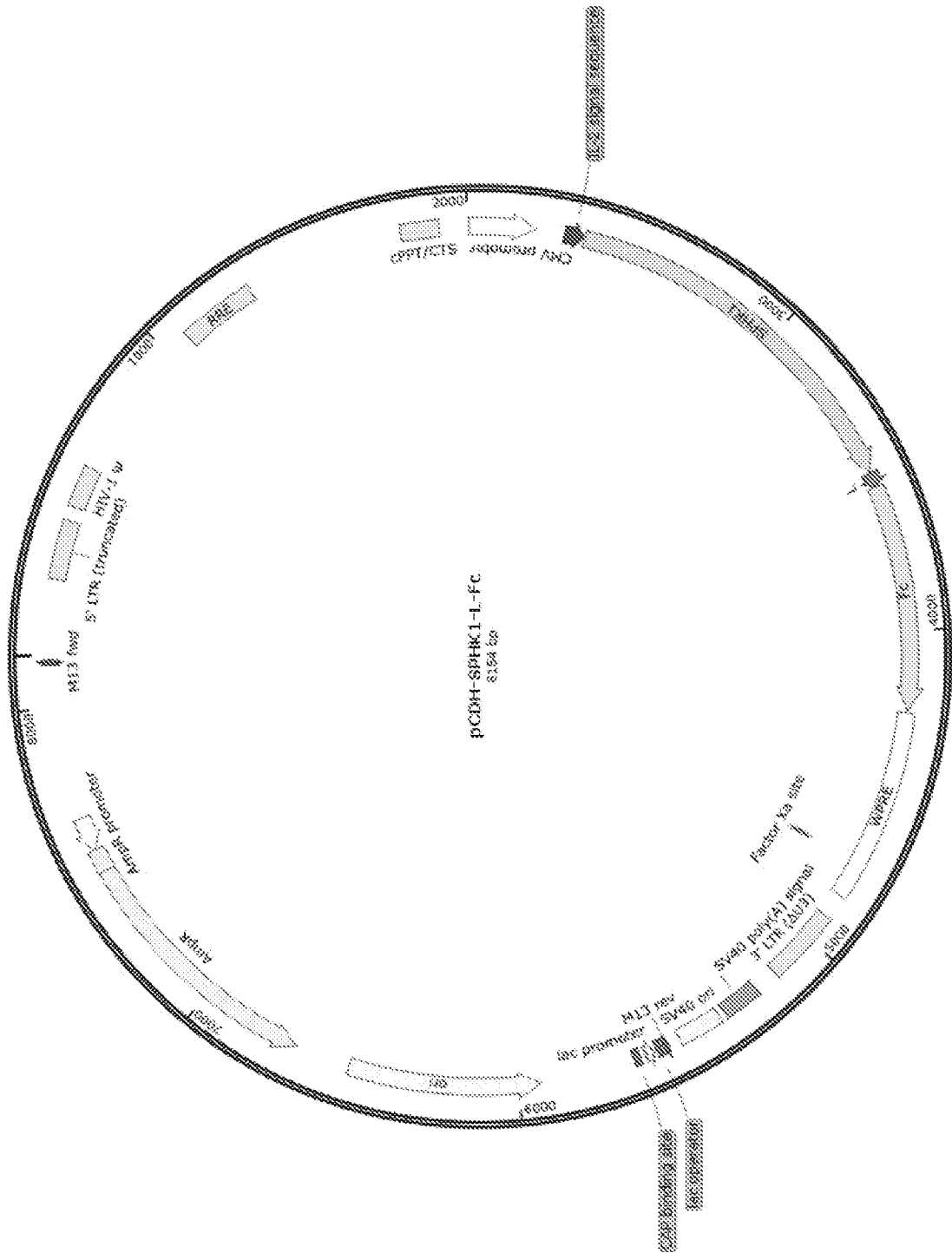


图 1

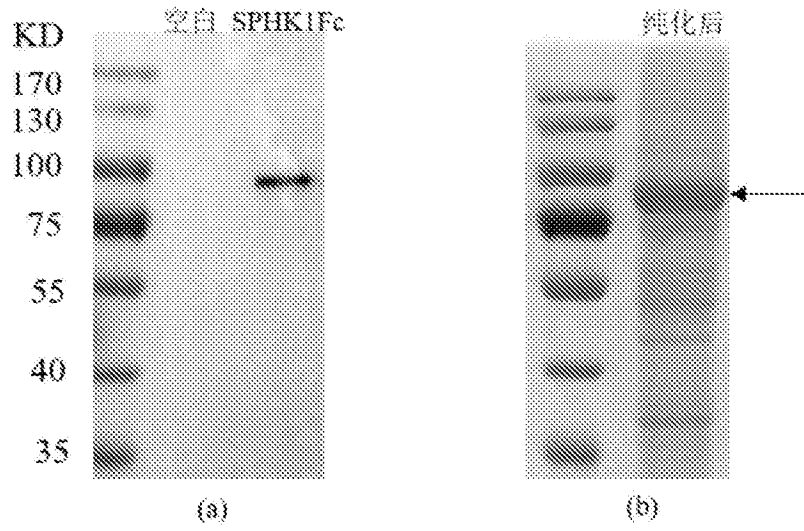


图 2

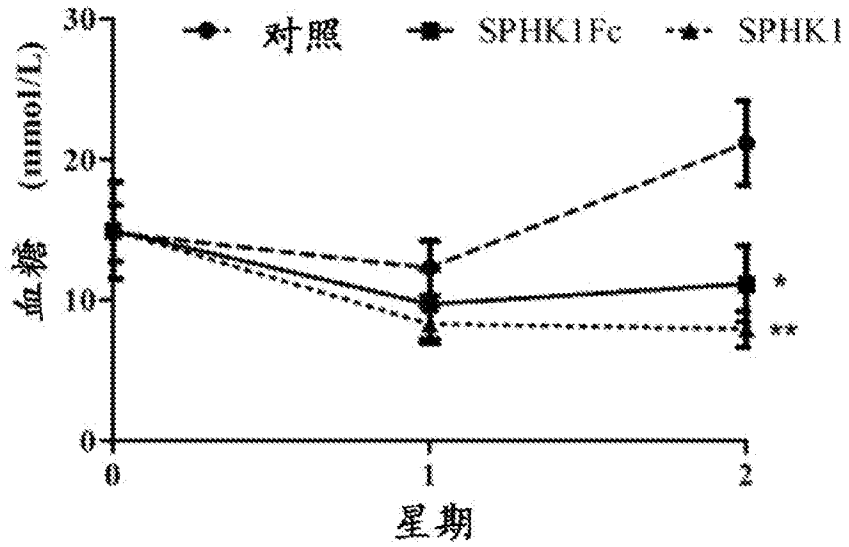


图 3

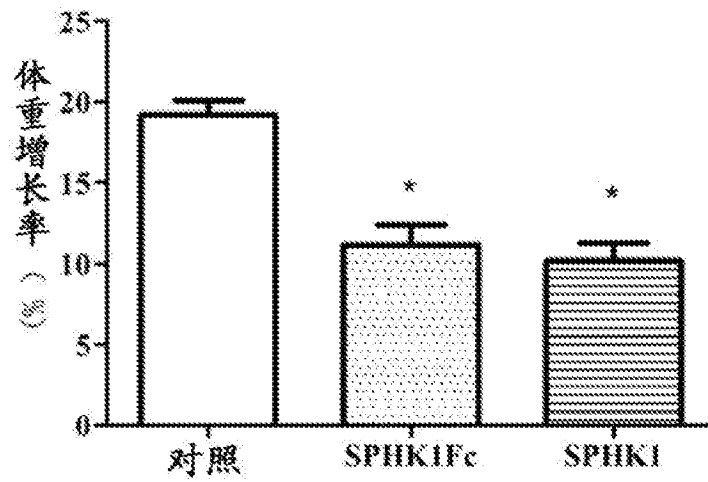


图 4

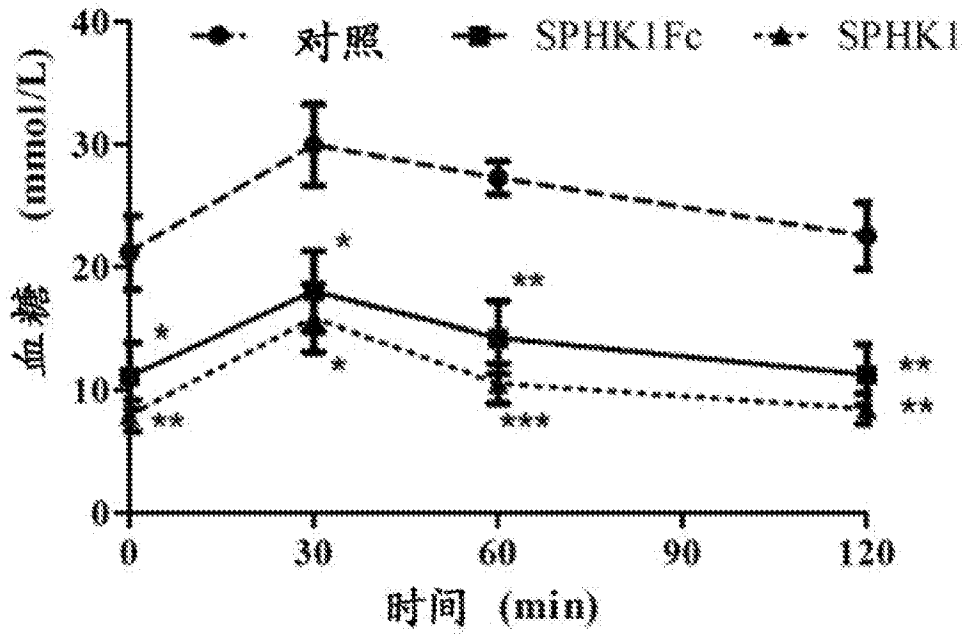


图 5

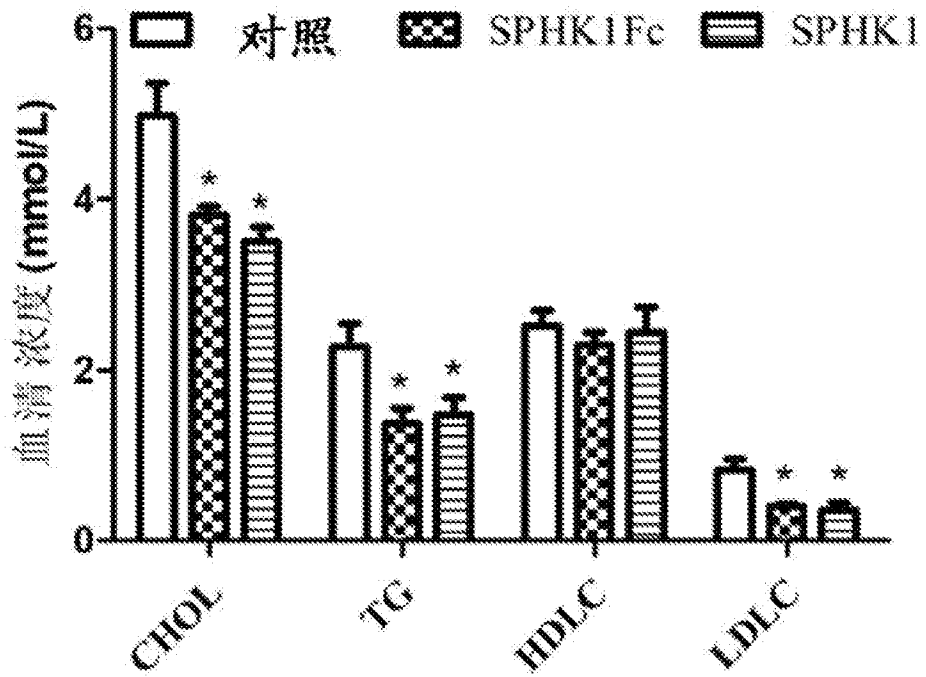


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/107091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/45(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) C12N;A61K		
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) DWPI, VEN, SIPOABS, CNABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, 万方数据库, WANFANG DATA, CNKI, PubMed, ISI web of Knowledge, GenBank, EBI, STN: 鞘氨醇激酶, 融合蛋白, 糖, 脂肪, 代谢, 血糖, 糖尿病, 磷脂, 鞘氨醇, SPK1, SK1, SphK, diabetes, glucose, blood sugar, sphingosine kinase, Fc, 双因生物科技, 段海峰, SEQ ID NO: 1和12, SEQ ID NO: 1 and 12		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109355269 A (BEIJING SHUANGYIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; DUAN, Haifeng) 19 February 2019 (2019-02-19) claims 1-9, and description, embodiments 1-5	1-10
Y	马萌萌 (MA, Mengmeng). "鞘氨醇激酶在糖代谢调控中的作用研究 (Studies on the Role of Sphingosine Kinase in the Regulation of Glucose Homeostasis)" 中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑 (Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database, Medicine and Health Sciences), No. 04, 15 April 2009 (2009-04-15), text, chapter 4, sections 4.3 and 4.4, chapter 5, sections 5.3 and 5.4 and chapter 7	1-10
Y	于红阳 (YU, Hongyang). "鞘氨醇激酶-1的乙酰化修饰及在糖尿病防治中的作用研究 (Acetylation of Sphingosine Kinase and Its Therapeutic Role in Diabetes Mellitus)" 中国博士学位论文全文数据库 工程技术辑 (Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database, Engineering Science and Technology I), No. 05, 15 May 2013 (2013-05-15), the abstract, and introduction, figure 3	1-10
Y	CN 106432511 A (SHANGHAI CHEMO WANBANG BIOPHARMA CO., LTD.) 22 February 2017 (2017-02-22) description, paragraphs [0030]-[0043] and [0054]-[0056]	2-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 25 November 2019		Date of mailing of the international search report 18 December 2019
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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	赵艳丽等 (ZHAO, Yanli et al.). "1-磷酸鞘氨醇对葡萄糖代谢的调节及其机制 (Sphingosine-1-Phosphate Regulates Glucose Metabolism and Its Mechanism)" <i>中华临床医师杂志(电子版) (Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition))</i> , Vol. 11, No. 3, 01 February 2017 (2017-02-01), pp. 484-487	1-10
A	BRUCE, C .R. et al. "Overexpression of Sphingosine Kinase 1 Prevents Ceramide Accumulation and Ameliorates Muscle Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Mice." <i>Diabetes</i> , Vol. 61, 31 December 2012 (2012-12-31), pp. 3148-3155	1-10
A	WANG, J. et al. "Sphingosine Kinase 1 Regulates Adipose Proinflammatory Responses and Insulin Resistance." <i>Am J Physiol Endocrinol Metab.</i> , Vol. 306, 28 January 2014 (2014-01-28), pp. E756-E768	1-10
A	赵艳丽等 (ZHAO, yanli et al.). "1-磷酸鞘氨醇促进胰岛素分泌及可能机制研究 (Effects and Possible Mechanism of Sphingosine-1-Phosphate-Stimulated Insulin Secretion from Rat Islets)" <i>中国药理学通报 (Chinese Pharmacological Bulletin)</i> , Vol. 32, No. 11, 30 November 2016 (2016-11-30), pp. 1516-1520	1-10

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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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/CN2019/107091

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109355269	A	19 February 2019	None			
CN	106432511	A	22 February 2017	CN	110172103	A	27 August 2019

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 9/12(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/45(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N;A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>DWPI, VEN, SIPOABS, CNABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, 万方数据库, CNKI, PubMed, ISI web of Knowledge, GenBank, EBI, STN:鞘氨醇激酶, 融合蛋白, 糖, 脂肪, 代谢, 血糖, 糖尿病, 磷脂, 鞘氨醇, SPK1, SK1, SphK, diabetes, glucose, blood sugar, sphingosine kinase, Fc, 双因生物科技, 段海峰, SEQ ID NO:1和12</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109355269 A (北京双因生物科技有限公司, 段海峰) 2019年 2月 19日 (2019 - 02 - 19) 权利要求1-9, 说明书实施例1-5</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>马萌萌. "鞘氨醇激酶在糖代谢调控中的作用研究." 中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑., 第04期, 2009年 4月 15日 (2009 - 04 - 15), 正文第四章第4.3-4.4节、第五章第5.3-5.4节和第7章</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>于红阳. "鞘氨醇激酶-1的乙酰化修饰及在糖尿病防治中的作用研究." 中国博士学位论文全文数据库工程科技I辑., 第05期, 2013年 5月 15日 (2013 - 05 - 15), 摘要和前言图3</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106432511 A (上海凯茂生物医药有限公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 说明书第30-43和54-56段</td> <td>2-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109355269 A (北京双因生物科技有限公司, 段海峰) 2019年 2月 19日 (2019 - 02 - 19) 权利要求1-9, 说明书实施例1-5	1-10	Y	马萌萌. "鞘氨醇激酶在糖代谢调控中的作用研究." 中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑., 第04期, 2009年 4月 15日 (2009 - 04 - 15), 正文第四章第4.3-4.4节、第五章第5.3-5.4节和第7章	1-10	Y	于红阳. "鞘氨醇激酶-1的乙酰化修饰及在糖尿病防治中的作用研究." 中国博士学位论文全文数据库工程科技I辑., 第05期, 2013年 5月 15日 (2013 - 05 - 15), 摘要和前言图3	1-10	Y	CN 106432511 A (上海凯茂生物医药有限公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 说明书第30-43和54-56段	2-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 109355269 A (北京双因生物科技有限公司, 段海峰) 2019年 2月 19日 (2019 - 02 - 19) 权利要求1-9, 说明书实施例1-5	1-10															
Y	马萌萌. "鞘氨醇激酶在糖代谢调控中的作用研究." 中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑., 第04期, 2009年 4月 15日 (2009 - 04 - 15), 正文第四章第4.3-4.4节、第五章第5.3-5.4节和第7章	1-10															
Y	于红阳. "鞘氨醇激酶-1的乙酰化修饰及在糖尿病防治中的作用研究." 中国博士学位论文全文数据库工程科技I辑., 第05期, 2013年 5月 15日 (2013 - 05 - 15), 摘要和前言图3	1-10															
Y	CN 106432511 A (上海凯茂生物医药有限公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 说明书第30-43和54-56段	2-10															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p>																	
<p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"D" 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 11月 25日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 12月 18日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>黎舒婷</p> <p>电话号码 86-(10)-53961957</p>															

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
A	赵艳丽等. "1-磷酸鞘氨醇对葡萄糖代谢的调节及其机制." 中华临床医师杂志(电子版), 第11卷, 第3期, 2017年 2月 1日 (2017 - 02 - 01), 第484-487页	1-10
A	BRUCE, C.R. 等. "Overexpression of Sphingosine Kinase 1 Prevents Ceramide Accumulation and Ameliorates Muscle Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Mice." DIABETES., 第61卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第3148-3155页	1-10
A	WANG, J等. "Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab., 第306卷, 2014年 1月 28日 (2014 - 01 - 28), 第E756-E768页	1-10
A	赵艳丽等. "1-磷酸鞘氨醇促进胰岛素分泌及可能机制研究." 中国药理学通报., 第32卷, 第11期, 2016年 11月 30日 (2016 - 11 - 30), 第1516-1520页	1-10

第1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/CN2019/107091

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	109355269	A	2019年 2月 19日	无	
CN	106432511	A	2017年 2月 22日	CN 110172103	A 2019年 8月 27日