

说明书

发明名称: 用于血管修复的164.88度重组Ⅲ型人源化胶原蛋白

[0001] 本申请要求申请日为2023年7月19日、申请号: 202310890232.8、发明名称“用于血管修复的164.88度重组Ⅲ型人源化胶原蛋白”的中国发明专利申请的优先权权益。该专利申请通过提及完整并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及胶原蛋白应用领域, 具体地涉及164.88度重组Ⅲ型人源化胶原蛋白用于血管修复重建或抗高血压的应用。

背景技术

[0003] 胶原蛋白是人体组织器官的主要结构蛋白, 约占全身蛋白质的30-40%, 主要位于皮肤、骨骼和肌肉组织中。它作为细胞外基质的主要成分, 可以满足良好的生物材料的要求, 如良好的生物相容性、适当的机械强度、适度的柔韧性和细胞粘附活性, 因此是一种具有生物技术价值的结构蛋白。目前, 至少有28种胶原蛋白被报道, 它们在体内的位置不同, 并根据发现时间逐渐从I型命名到XXV型, 它的独特标志是一个右旋三螺旋结构域, 即具有重复的Gly-X-Y三联体的蛋白质, 其中脯氨酸和赖氨酸通常出现在X和Y位置。然而, 对动物源性胶原蛋白纯度、疾病传播和可重复性的担忧限制了其应用, 并需要替代的重组来源。

[0004] 随着基因工程和合成生物学的进步, 具有特定结构和功能的重组胶原蛋白可以被开发出来, 并显示出作为外科植入物的起始材料和再生医学基质的潜力。一般来说, 重组胶原是通过转录特定的基因片段制备, 在酵母、细菌或动物细胞中表达, 配方产量一致, 生产率高。为了与人体具有生物相容性, 主要选择一种人类胶原蛋白基因来编码一种特定类型的人类胶原蛋白, 以生产可预测、可靠的重组胶原蛋白, 具有广泛的医学应用前景。2021年3月, 中国国家药品监督管理局(NMPA)发布了重组胶原蛋白定义标准指南。其中, 重组人源化胶原蛋白被定义为由特定类型的人胶原蛋白基因编码的全长或片段的功能性氨基酸序列, 或含人胶原蛋白功能片段的组合。

- [0005] 重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(Rh COL Ⅲ)是由山西锦波生物医药股份有限公司所研发。该技术研究是基于Ⅲ型人胶原蛋白的原始基因序列,优化选择其中水溶性强、生物活性高的部分进行密码子优化和拼接重组,得到了全新的重组人源胶原蛋白序列,实验证实此胶原蛋白表达量大,水溶性好,生物活性高,其性能优于人天然胶原蛋白。已经有研究表明Rh COL Ⅲ具有抗光老化,促进伤口修复,促增殖等功效。Rh COL Ⅲ抗高血压活性还未见报道。
- [0006] 本领域需要进一步拓展重组人源化Ⅲ型胶原蛋白的应用。
- [0007] 发明内容
- [0008] 发明人先前发现了一种重组Ⅲ型胶原蛋白,具有高的细胞黏附性质;在水溶液中具有高的稳定性,便于制备和纯化等优势(见CN 201811438582.6,其通过引用并入本文)。为了拓展该重组Ⅲ型胶原蛋白的应用,发明人进行了大量的生物活性研究。令人惊讶地,发明人发现该重组Ⅲ型胶原蛋白可具有血管损伤修复活性,可用于预防和/或治疗心血管疾病。该蛋白的制备参考发明人专利201811438582.6,其中提到该蛋白晶体结构已被PDB数据库收录,标号6A0A,6A0C。且蛋白结构解析文章: Hua C,Zhu Y,Xu W,Y e S,Zhang R,Lu L,Jiang S.Characterization by high-resolution crystal structure analysis of a triple-helix region of human collagen type Ⅲ with potent cell adhesion activity.BiochemBiophys Res Commun.2019Jan 22; 508(4):1018-1023.doi:10.1016/j.bbrc.2018.12.018.Epub 2018Dec 11.PMID:30545625; PMCID:PMC7092849中阐述了该蛋白具有164.88° 的弯曲结构。
- [0009] 在第一方面,本申请提供了胶原蛋白(也可称为多肽或蛋白)、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞或包含胶原蛋白、融合蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞的组合物在制备医疗器械或药物或药械组合产品或试剂盒中的用途,所述医疗器械或药物或药械组合产品或试剂盒用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复或预防和/或治疗血管损伤,其中胶原蛋白包含n个重复单元,所述重复单元包含:

- [0010] (1)以SEQ ID No.1所示的序列(GERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAP);
- [0011] (2)与以SEQ ID No.1所示的序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列;或
- [0012] (3)以SEQ ID No.1所示的序列进行了1-5个氨基酸残基的取代、添加、缺失或插入的序列;
- [0013] 其中n为大于等于1的整数。
- [0014] 在一个实施方案中,所述胶原蛋白是重组Ⅲ型人源化胶原蛋白,优选164.88度重组Ⅲ型人源化胶原蛋白。优选地,重组Ⅲ型人源化胶原蛋白为三聚体形式。
- [0015] 在一个实施方案中,受试者具有紫外线光老化诱导受损皮肤或糖尿病性感染创面。
- [0016] 在一个实施方案中,胶原蛋白具有抗内皮细胞损伤效果。
- [0017] 在一个实施方案中,融合蛋白包含胶原蛋白和用于促进胶原蛋白分泌、分离和/或纯化的蛋白质。
- [0018] 在一个实施方案中,所述蛋白质选自酶切位点序列、信号肽和纯化标签序列。
- [0019] 在一个实施方案中,所述酶切位点序列是TEV蛋白酶酶切位点序列。
- [0020] 在一个实施方案中,蛋白标签序列His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签、Cytiva Protein Select标签或NusA标签。
- [0021] 在一个实施方案中,所述胶原蛋白与所述蛋白质是直接连接的或者通过接头连接的,所述接头是柔性接头,诸如(G)_a或(GGGGS)_b,其中a和b各自独立为1-10或1-5或1-3的整数。
- [0022] 在一个实施方案中,医疗器械或药物或药械组合产品或试剂盒还用于预防和/或治疗紫外线光老化诱导的皮肤受损或糖尿病性感染创面。
- [0023] 在一个实施方案中,所述医疗器械是凝胶、敷料、侵入器械、或植入器械。
- [0024] 在一个实施方案中,n为1-32的整数。在一个实施方案中,当n为大于等于2的整数时,各重复序列之间是直接连接的。在一个实施方案中,n为

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、
21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31。

[0025] 在一个实施方案中，胶原蛋白包含以SEQ ID No.2所示的序列(GPPGPCCGGG)
或者不含以SEQ ID No.2所示的序列。

[0026] 在一个实施方案中，胶原蛋白包含：

[0027] a)SEQ ID No.3的氨基酸序列；

[0028] b)与SEQ ID No.3的氨基酸序列具有至少80%、85%、90
%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸
序列，其保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的抗内皮细胞损伤效果；或

[0029] c)SEQ ID No.3的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1-80个(例如1-70、1-
60、1-50、1-40、1-30、1-10、1-8或1-5个)氨基酸残基的氨基酸序列，其保
留SEQ ID No.3的氨基酸序列的抗内皮细胞损伤效果。

[0030] 在一个实施方案中，SEQ ID No.3的氨基酸序列为

[0031] GERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEK
GPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPA
GPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGER
GAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGP
GERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPN
GIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAP
GFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGER
GAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIP
GEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFR
GPAGPNGIPGEKGPAGERGAP。在本文中，具有SEQ ID No.3的氨基酸序列的
胶原蛋白也称为RhCOL III。

[0032] 在一个实施方案中，心血管疾病是内皮细胞损伤相关的心血管疾病。在一个实
施方案中，内皮细胞损伤是血管紧张素II或ROS诱导的内皮细胞损伤，和/或所
述血管损伤是由血管紧张素II或ROS诱导的血管损伤。在一个实施方案中，血管
损伤是血管内皮损伤，优选是糖尿病血管内皮损伤。

- [0033] 在一个实施方案中，心血管疾病选自：动脉硬化、动脉粥样硬化、高血压、冠心病、周围血管病、脑卒中、心力衰竭、心律失常、脑血管病、心房颤动及血栓性疾病。在一个实施方案中，高血压是自发性高血压。
- [0034] 在一个实施方案中，所述医疗器械或药物或试剂盒是降低血压的医疗器械或药物或试剂盒。
- [0035] 在一个实施方案中，组合物包含调脂药和/或降压药，诸如他汀类降脂药、血管紧张素转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和/或 β 受体阻断剂。
- [0036] 在第二方面，本申请提供了药物组合物或医疗器械或药械组合产品。在一个实施方案中，药物组合物包含上文第一方面所述的胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞以及用于预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复的药物。在一个实施方案中，药物是调脂药和/或降压药，诸如他汀类降脂药、血管紧张素转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和/或 β 受体阻断剂。在另一个实施方案中，医疗器械或药械组合产品包含上文第一方面所述的胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞以及用于对血管损伤的修复的材料或装置。优选地，医疗器械是凝胶、敷料、侵入器械、或植入器械。在一个实施方案中，材料或装置是用作医疗器械的材料或装置。
- [0037] 在第三方面，本申请提供了在体外阻断或消除血管紧张素II诱导的血管内皮细胞损伤的方法，其包括将血管内皮细胞与本文第一方面所述的胶原蛋白接触的步骤。在一个实施方案中，血管内皮细胞是脐静脉血管内皮细胞，优选是人脐静脉血管内皮细胞。
- [0038] 在第四方面，本申请提供了体外方法，其用于在细胞中(1)降低血管紧张素II诱导的ROS生成/或(2)缓解微管损伤，所述方法包括将细胞与本文第一方面所述的胶原蛋白接触的步骤。在一个实施方案中，细胞是血管内皮细胞，优选是脐静脉血管内皮细胞，优选是人脐静脉血管内皮细胞。在一个实施方案中，微管损伤是Ang II诱导的微管损伤。

- [0039] 在第五方面，本申请提供了预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复或预防和/或治疗血管损伤的方法，其包括对受试者施用上文第一方面所述的胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞或包含胶原蛋白、融合蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞的组合物，或者对受试者施用本文第二方面的药物组合物或医疗器械或药械组合产品。
- [0040] 在一个实施方案中，心血管疾病是内皮细胞损伤相关的心血管疾病。在一个实施方案中，内皮细胞损伤是血管紧张素II或ROS诱导的内皮细胞损伤，和/或所述血管损伤是由血管紧张素II或ROS诱导的血管损伤。
- [0041] 在一个实施方案中，心血管疾病选自：动脉硬化、动脉粥样硬化、高血压、冠心病、周围血管病、脑卒中、心力衰竭、心律失常、脑血管病、心房颤动及血栓性疾病。
- [0042] 在一个实施方案中，组合物包含调脂药和/或降压药，诸如他汀类降脂药、血管紧张素转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和/或 β 受体阻断剂。
- [0043] 在一个方面，提供了筛选活性成分的方法，所述活性成分用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复，其包括
- [0044] (i)提供胶原蛋白，所述胶原蛋白包含n个重复单元，所述重复单元包含：
- [0045] (1)以SEQ ID No.1所示的序列；
- [0046] (2)与以SEQ ID No.1所示的序列具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列；或
- [0047] (3)以SEQ ID No.1所示的序列进行了1-5个氨基酸残基的取代、添加、缺失或插入的序列；
- [0048] 其中n为大于等于1的整数，优选地为1-32的整数，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31，其中当n为大于等于2的整数时，各重复序列之间是直接连接的；
- [0049] (ii)在经血管紧张素II处理的HUVEC细胞中添加所述胶原蛋白；

- [0050] (Ⅲ)选择如下性质的胶原蛋白作为活性成分：(a)降低ROS/或(b)缓解微管损伤。
- [0051] 在一个实施方案中，受试者具有紫外线光老化诱导的受损皮肤或糖尿病性感染创面。
- [0052] 在一个实施方案中，胶原蛋白具有抗内皮细胞损伤效果。
- [0053] 在一个实施方案中，活性成分还用于预防和/或治疗紫外线光老化诱导的皮肤受损或糖尿病性感染创面。
- [0054] 在一个实施方案中，心血管疾病是内皮细胞损伤相关的心血管疾病，优选地，内皮细胞损伤是血管紧张素II或ROS诱导的内皮细胞损伤，和/或所述血管损伤是由血管紧张素II或ROS诱导的血管损伤。
- [0055] 在一个实施方案中，心血管疾病选自：动脉粥样硬化、高血压、冠心病、周围血管病、脑卒中、心力衰竭、心律失常、脑血管病、心房颤动及血栓性疾病。
- [0056] 在一个实施方案中，挑选的胶原蛋白包含：
- [0057] a)SEQ ID No.3的氨基酸序列；
- [0058] b)与SEQ ID No.3的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列；或
- [0059] c)SEQ ID No.3的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1-80个，例如1-70、1-60、1-50、1-40、1-30、1-10、1-8或1-5个氨基酸残基的氨基酸序列。
- [0060] 在一个实施方案中，活性成分用作医疗器械或用作药物或药械组合产品。
- [0061] 本申请的优点包括：
- [0062] 1.RhCOL Ⅲ胶原蛋白不影响HUVEC细胞活力。
- [0063] 2.RhCOL Ⅲ胶原蛋白显著抑制HUVEC中ROS的产生。
- [0064] 3.RhCOL Ⅲ处理细胞可显著缓解微管损伤。
- [0065] 4.RhCOL Ⅲ胶原蛋白可以在体内降低血压，如在自发性高血压大鼠中证明的。

附图说明

- [0066] 图1显示了RhCOL Ⅲ与HUVEC细胞相互作用。

- [0067] 图2显示了RhCOL III对HUVEC生存能力的影响。与对照组(Ang II诱导组)比较, **表示 $p<0.05$, ***表示 $p<0.001$ 。
- [0068] 图3显示了用荧光探针DCFH-DA检测HUVEC中细胞内总ROS水平。与对照组(Ang II诱导组)比较, ***表示 $p<0.001$ 。
- [0069] 图4显示了RhCOL III对HUVEC细胞微管形成的影响。
- [0070] 图5显示了RhCOL III对SHR的血压、体重、心率和心脏重量比值的影响。测量(A)收缩压、(B)心率、(C)体重和(D)心脏重量比值。与对照组相比, *表示 $P<0.01$, **表示 $p<0.05$, ***表示 $p<0.001$ 。
- [0071] 图6显示了RhCOL III对SHR血液生化指标的影响。(A)Ang II,(B)LDH,(C)UA,(D)ALT,(E)CERA,(F)LAC。与对照组比较, ***表示 $p<0.001$ 。

具体实施方式

- [0072] 下文提供进一步的描述以便于理解本发明。
- [0073] 如在本文中使用,“血管内皮细胞(VEC)”又称为内皮细胞,是介于血流和血管壁之间的一层扁平单核细胞。VEC受损在动脉粥样硬化性心脏病、急性心肌梗死、急性心梗无再流、各种脑血管疾病。肾血管疾病等发病和病理过程中都起着非常重要的作用。在进行血管内皮细胞实验时,通常选用的细胞模型为“人脐静脉内皮细胞”(Human umbilical vein endothelial cells,简称HUVECs)。血管内皮覆盖于血管内壁,与血管管腔内的血液直接接触。研究表明,血管内皮功能受损和NO代谢紊乱是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的始动因素和中心环节。内皮损伤是糖尿病患者宏观和微观血管功能障碍的第一步,是糖尿病血管并发症(如动脉粥样硬化、肾病、视网膜病变和神经病变)的高发原因。内皮细胞作为内皮组织中的主要细胞类型,通过释放血管活性因子如前列环素(PGI₂)、活性氧(ROS)、内皮素-1(ET-1)、一氧化氮(NO)、血管紧张素II(Ang II)等,在调节血管结构和功能方面发挥着至关重要的作用。在长期暴露于高血糖环境后,内皮细胞分泌的血管收缩和炎症因子(如TNF- α 、Ang II、ROS、ET-1)增多,NO的产生和高密度脂蛋白(HDL)的摄取减少,导致血管系统脆弱,氧化应激增强,内皮修复受损,这是一个促动脉粥样硬化的状态。

- [0074] 如在本文中使用,“血管紧张素(Ang)II”是肾素-Ang-醛固酮系统(RAAS)中尤为重要的血管活性物质,是多种心血管疾病的重要促进因素。它具有收缩血管的功能,主要由VEC及血管平滑肌细胞分泌,通过多种机制导致VEC的结构和功能损伤,对VEC的超微结构、屏障功能及分泌功能产生重大不良影响,还可以引起细胞衰老和诱导其凋亡。
- [0075] 如在本文中使用,“医疗器械”是指直接或者间接用于人体的仪器、设备、器具、体外诊断试剂及校准物、材料以及其他类似或者相关的物品。本文的胶原蛋白可以实现医疗器械用途,因此可以用作医疗器械。在一些实施方案中,本发明的胶原蛋白发挥药理学作用,可以用作药物。在一些实施方案中,本发明的胶原蛋白用作药械组合产品。可以根据胶原蛋白的主要作用机制判定以药品作用为主或者以医疗器械作用为主的药械组合产品。本发明的胶原蛋白可以作为医疗器械。例如,胶原蛋白在注射后,其三螺旋结构通过分子间相互作用自组装形成胶原蛋白纤维网,该网状结构对细胞、组织起支撑作用,物理连接受损血管,改善血管机械性能和血管弹性,最终实现血管损伤修复。
- [0076] “药物组合物”意指组合物包含本发明的胶原蛋白与至少一种另外的药学上可接受的载体的组合。“药学上可接受的载体”是指本领域中普遍接受的用于向动物(特别是哺乳动物)递送生物活性剂的介质,包括佐剂、赋形剂或媒介物,如稀释剂、防腐剂、填充剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、抗细菌剂、抗真菌剂、润滑剂和分散剂。
- [0077] 如在本文中使用,“重组Ⅲ型胶原蛋白”是人Ⅲ型胶原蛋白基因编码的全长或片段的功能性氨基酸序列,或含人胶原蛋白功能片段的组合。在本文中,RhCOLⅢ是多个重复单元,该重复单元是人Ⅲ型胶原蛋白片段。本文的重组Ⅲ型胶原蛋白可以在N端和/或C端包含少量的非天然序列,例如GPPGPC CGGG(SEQ ID No.2)。重复单元的序列可以来源于人。本文所述的重组Ⅲ型胶原蛋白可以具有血管内皮细胞修复功能,或者可以阻断或消除Ang II诱导的对血管内皮细胞的损伤。在一些实施方案中,本文的胶原蛋白是合成制备的。在一些实施方案中,本文的胶原蛋白是在原核生物,例如大肠杆菌中表达制备的。在一些实施方案中,本文的胶原蛋白是在真核生物,例如酵母细胞,例如毕赤

酵母细胞中表达制备的。在优选的实施方案中，本文的胶原蛋白是由大肠杆菌表达的。

[0078] 例如，重组Ⅲ型胶原蛋白可以包含：a)SEQ ID No.3的氨基酸序列；b)与SEQ ID No.3的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列，其保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的抗内皮细胞损伤效果；或c)SEQ ID No.3的氨基酸序列中突变(例如添加、取代、缺失或插入)1-80个氨基酸残基的氨基酸序列，其保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的抗内皮细胞损伤效果。突变数目可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80。

[0079] 如在本文中使用，重复单元是来源于天然存在的蛋白质，例如Ⅲ型胶原蛋白的片段。通过将重复单元以一定的数量互补连接可以形成本文中的重组Ⅲ型胶原蛋白。在本发明中，使用的SEQ ID No.1重复序列为GERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAP(SEQ ID No.1)。本发明的胶原蛋白可以包含多个重复序列，其中重复序列之间不含接头。重复序列也可以是以SEQ ID No.1所示的序列的变体，例如与以SEQ ID No.1所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列；或以SEQ ID No.1所示的序列进行了1-5(1、2、3、4或5)个氨基酸残基的取代、添加、缺失或插入的序列。重复单元的重复数目n可以为大于等于1的整数。例如，n可以为1-32的整数，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29。

- [0080] 如在本文中使用，宿主细胞可以是真核细胞，例如真菌和酵母，原核细胞，例如肠杆菌科细菌。应当理解，本领域技术人员可以通过用其它表达菌株替换上述大肠杆菌菌株作为宿主细胞。
- [0081] 本发明还提供了核酸分子，所述核酸分子包括编码本发明的胶原蛋白的核酸序列。核酸可以是DNA或cDNA。核酸分子可以主要由编码本发明所述肽的核酸序列组成，或可以仅由编码本发明所述的肽组成。此类核酸分子可以用本领域已知的方法合成。由于遗传密码的简并性，本领域技术人员应理解，不同核酸序列的核酸分子可以编码相同的氨基酸序列。
- [0082] 本发明还提供了载体，所述载体中包括本发明所述的核酸序列。合适的载体是载体构建领域已知的，包括启动子的选择和其他调控元件，例如增强子元件。本发明所述的载体包括适合引入细胞的序列。例如，载体可以是表达载体，在该载体中，所述胶原蛋白的编码序列受到它自身顺式作用调控元件的控制，载体的设计便于宿主细胞的基因整合或基因替换等。
- [0083] 本领域普通技术人员应理解，在本发明中，术语“载体”包括DNA分子，例如，质粒、噬菌体、病毒或其他载体，它含有一个或多个异源的或重组的核酸序列。合适的噬菌体和病毒载体包括，但不限于： λ -噬菌体、EMBL噬菌体、猿猴病毒、牛痘病毒、Epstein-Barr病毒、腺病毒、疱疹病毒、小鼠肉瘤病毒、鼠类乳癌病毒、慢病毒等。
- [0084] 本发明的胶原蛋白包含以SEQ ID No.1或3所示的序列或以SEQ ID No.1或3所示的序列中突变(例如取代、缺失、插入和/或添加)一个或多个氨基酸的序列，只要本发明的胶原蛋白保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的心血管疾病治疗效果或抗血管内皮细胞损伤效果。“多个”可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80。

- [0085] 氨基酸添加指在氨基酸序列，例如SEQ ID NO:1或3的C端或N端添加氨基酸，只要本发明的胶原蛋白保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的心血管疾病治疗效果或抗血管内皮细胞损伤效果。
- [0086] 氨基酸取代指在氨基酸序列，例如SEQ ID NO:1或3的序列的某个位置的某个氨基酸残基被其他氨基酸残基替代，只要本发明的胶原蛋白保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的心血管疾病治疗效果或抗血管内皮细胞损伤效果。
- [0087] 氨基酸插入指在氨基酸序列例如SEQ ID NO:1或3的序列的适当位置插入氨基酸残基，插入的氨基酸残基也可以全部或部分彼此相邻，或插入的氨基酸之间都不彼此相邻，只要本发明的胶原蛋白保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的心血管疾病治疗效果或抗血管内皮细胞损伤效果。在本文中氨基酸的插入位置不在各重复序列之间。
- [0088] 氨基酸缺失指可以从氨基酸序列，例如SEQ ID NO:1或3的序列中删除1、2或3个以上氨基酸，只要本发明的胶原蛋白保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的心血管疾病治疗效果或抗血管内皮细胞损伤效果。
- [0089] 在本发明中，取代可以是保守氨基酸取代，指与SEQ ID NO:1或3的氨基酸序列相比，有3个，更佳地2个氨基酸或1个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成肽。在本发明的上下文中，保守取代可由在一个或多个下表中反映的氨基酸类别内的取代定义：
- [0090] 保守类别的氨基酸残基：
- | | |
|----------|-----------|
| 酸性残基 | D和E |
| 碱性残基 | K、R、和H |
| 亲水的不带电残基 | S、T、N和Q |
| 脂族不带电残基 | G、A、V、L和I |
| 非极性不带电残基 | C、M和P |
| 芳族残基 | F、Y和W。 |
- [0091] 备选的氨基酸残基的物理和功能分类：
- | | |
|-------|---------|
| 含醇基残基 | S和T |
| 脂族残基 | I、L、V和M |

环烯基相关残基	F、H、W和Y
疏水的残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y
带负电残基	D和E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T
带正电残基	H、K和R
小残基	A、C、D、G、N、P、S、T和V
极小残基	A、G和S
参与转角形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P和T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E和R。

[0092] 两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。出于本发明的目的，使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS：欧洲分子生物学开放软件套件，Rice等人，2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch，1970 J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出(使用非简化选项获得)用作同一性百分比并且计算如下：

[0093] $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0094] 出于本发明的目的，使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS：欧洲分子生物学开放软件套件，Rice等人,2000,同上)(优选5.0.0版本或更新版本)的尼德尔程序所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch,1970,同上)来确定两个脱氧核苷酸序列之间的序列同一性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5、和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出(使用非简化选项获得)用作同一性百分比并且计算如下：

[0095] $(\text{相同的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0096] 术语“受试者”是指接受预防、治疗、诊断的任何人或其他动物，特别是其他哺乳动物。其他哺乳动物可以包括，例如，狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔子、大鼠、豚鼠、小鼠等。在一些实施方案中，受试者包括具有心血管疾

病风险因素的任何年龄的人类。常见风险因素包括年龄、性别、体重、家族史、睡眠呼吸暂停、饮酒或吸烟、缺乏运动性心律不齐、或胰岛素抵抗迹象。

[0097] 术语“治疗”是指旨在治愈、改善、稳定或预防疾病、病理状况或障碍的患者的医疗管理。该术语包括积极治疗，即专门针对疾病、病理状况或病症的改善的治疗，并且还包括因果治疗，即针对去除相关疾病、病理状况或病症的病因的治疗。此外，该术语包括姑息治疗，即设计用于缓解症状而不是治愈疾病、病理状况或病症的治疗；预防性治疗，即旨在最小化或部分或完全抑制相关疾病、病理状况或病症的发展的治疗；和支持性治疗，即用于补充针对改善相关疾病、病理状况或病症的另一种特定疗法的治疗。在一些实施方案中，本发明的重组胶原蛋白可以治疗心血管疾病、用于对血管损伤的修复、或治疗血管损伤。在一些实施方案中，本发明的重组胶原蛋白可以预防(即预防性治疗)心血管疾病或血管损伤。在一些实施方案中，本发明的重组胶原蛋白可以用作支持性治疗，也就是说本发明的胶原蛋白可以用于补充针对改善相关疾病、病理状况或病症的另一种特定疗法的治疗。

[0098] Ang II诱导人脐静脉内皮细胞模型

[0099] 血管内皮细胞受损是引起高血压等心血管疾病的重要原因，其受损程度与高血压的严重程度呈正相关。细胞受损后会导致其分泌功能发生变化，如血管通透性增加，血管收缩因子增加舒张因子降低，导致血管压力增加，形成高血压。高血压又进一步引起内皮细胞损伤，形成恶性循环。人脐静脉内皮细胞(HU VECs)与血管内皮细胞有相似的生物学特征，接近人体生理状态，无种属差异、取材容易、来源丰富且符合伦理性，被国内外研究者广泛用于建立模拟高血压损伤的细胞模型。刘国艳等人(食品科学，174，vol.38,No.13,2017)采用Ang II诱导人脐静脉内皮细胞建立高血压损伤模型。

[0100] 治疗方法

[0101] 本文提供了在受试者中预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复或预防和/或治疗血管损伤的方法，其包括对受试者施用本文所述的胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸和/或包含所述核酸的载体、或者包含胶原蛋白、融合蛋白、核酸、和/或载体的组合物。胶原

蛋白可以是本文的第一方面中所述的任一种胶原蛋白。受试者还可以具有紫外线光老化诱导的受损皮肤或糖尿病性感染创面。因此，本发明的治疗方法还用于预防和/或治疗紫外线光老化诱导的皮肤受损或糖尿病性感染创面。血管损伤可以是血管内皮损伤。

[0102] 心血管疾病可以是内皮细胞损伤相关的心血管疾病，优选地，内皮细胞损伤是血管紧张素II诱导的内皮细胞损伤，和/或所述血管损伤是由血管紧张素II诱导的血管损伤。心血管疾病可以选自：动脉粥样硬化、高血压、冠心病、周围血管病、脑卒中、心力衰竭、心律失常、脑血管病、心房颤动及血栓性疾病。本发明的方法还可以包括对受试者施用调脂药和/或降压药，诸如他汀类降脂药、血管紧张素转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和/或 β 受体阻断剂。

[0103] 用途

[0104] 本文提供了胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞或包含胶原蛋白、融合蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞的组合物在制备医疗器械或药物或试剂盒中的用途，所述医疗器械或药物或试剂盒用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复或预防和/或治疗血管损伤。胶原蛋白可以是本文的第一方面中所述的任一种胶原蛋白。受试者还可以具有紫外线光老化诱导的受损皮肤或糖尿病性感染创面。因此，医疗器械或药物还用于预防和/或治疗紫外线光老化诱导的皮肤受损或糖尿病性感染创面。血管损伤可以是血管内皮损伤。

[0105] 本文还提供了胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞或包含胶原蛋白、融合蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞的组合物，其用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复或预防和/或治疗血管损伤。血管损伤可以是血管内皮损伤。胶原蛋白可以是本文的第一方面中所述的任一种胶原蛋白。胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞或包含胶原蛋白、融合

蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞的组合物还可以用于预防和/或治疗紫外线光老化诱导的皮肤受损或糖尿病性感染创面。

[0106] 心血管疾病可以是内皮细胞损伤相关的心血管疾病，优选地，内皮细胞损伤是血管紧张素II诱导的内皮细胞损伤，和/或所述血管损伤是由血管紧张素II诱导的血管损伤。心血管疾病可以选自：动脉粥样硬化、高血压、冠心病、周围血管病、脑卒中、心力衰竭、心律失常、脑血管病、心房颤动及血栓性疾病。本发明的方法还可以包括对受试者施用调脂药和/或降压药，诸如他汀类降脂药、血管紧张素转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和/或 β 受体阻断剂。

[0107] 体外方法

[0108] 本文涉及在体外阻断或消除血管紧张素II诱导的血管内皮细胞损伤的方法，其包括将血管内皮细胞与本文所述的胶原蛋白接触的步骤，优选地，血管内皮细胞是脐静脉血管内皮细胞，优选是人脐静脉血管内皮细胞。

[0109] 本文涉及体外方法，其用于在细胞中(1)降低血管紧张素II诱导的ROS生成，(2)缓解Ang II诱导的微管损伤，所述方法包括将细胞与本文中所述的胶原蛋白接触的步骤，优选地，细胞是血管内皮细胞，优选是脐静脉血管内皮细胞，优选是人脐静脉血管内皮细胞。

[0110] 组合物

[0111] 本发明的组合物可以是药物组合物。药物组合物可包含药学上可接受的载体，如佐剂，防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过上述灭菌程序并且通过加入各种抗菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)以确保无微生物存在。还可能希望在组合物中包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。此外，可注射药物形式的延长吸收可以通过包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。药学上可接受的载体是根据本领域普通技术人员认知范围内的许多因素来配制。这些包括但不限于所配制的活性剂的类型和性质；待施用含有所述药剂的组合物的受试者；药物组合物的预期施用途径；以及目标治疗适应症。药学上可接受的载体包括水性和非-水性液体介质两者、以及各种固体和半固体剂型。此类载体还可以包括除活性剂之外的许多不同的成分和添加剂，此类另外的成分出于本领域普通技术人员熟知的多种原因(例如，

活性剂、粘结剂等的稳定化)被包含在配制品中。合适的药学上可接受的载体以及其选择中涉及的因素的描述可在多种可易获得的来源例如像Allen, L.V.Jr.等人,Remington:The Science and Practice of Pharmacy(2卷),第22版, Pharmaceutical Press(2012)中找到。

- [0112] 胶原蛋白或药物组合物可以口服或肠胃外施用,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、气管内、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。
- [0113] 特别是当作为单一剂量单位提供时,组合的活性成分之间存在化学相互作用的可能性。出于这种原因,当将本发明的胶原蛋白和第二治疗剂以单一剂量单位组合时,将它们配制成使得尽管活性成分以单一剂量单位组合,但是活性成分之间的物理接触是最小化的(也就是说,减少的)。例如,活性成分可以是肠溶包衣的。通过对活性成分之一进行肠溶包衣,不仅可以使组合的活性成分之间的接触最小化,而且还可以控制这些组分之一在胃肠道中的释放,使得这些组分之一不在胃中释放,而是在肠道中释放。也可以将活性成分之一用材料包衣,所述材料在整个胃肠道中影响持续-释放并且还用于使组合的活性成分之间的物理接触最小化。在一些实施方案中,为了使胶原蛋白免于被胃液消化,可以将胶原蛋白进行包衣。
- [0114] 另一种方法涉及配制组合产品,其中将一种组分用持续释放和/或肠溶释放聚合物包衣,并且也将另一种组分用聚合物(如低粘度级羟丙基甲基纤维素(HPMC))或如本领域中已知的其他适当材料包衣,以进一步将活性组分分开。聚合物包衣用于形成针对与另一种组分相互作用的另外的屏障。
- [0115] 本发明的胶原蛋白的给药方案将根据已知因素(如特定药剂的药效学特征及其施用方式和途径;接受者的物种、年龄、性别、健康、医疗状况和体重;症状的性质和程度;同时治疗的种类;治疗频率;施用途径、患者的肾和肝功能和所希望的效果)而变化。
- [0116] 医疗器械
- [0117] “医疗器械”是指直接或者间接用于人体的仪器、设备、器具、体外诊断试剂及校准物、材料以及其他类似或者相关的物品。本文的胶原蛋白可以实现医疗

器械用途，因此可以用作医疗器械。在一些实施方案中，本发明的胶原蛋白发挥药理学作用，可以用作药物。在一些实施方案中，本发明的胶原蛋白用作药械组合产品。

[0118] 本文所述的胶原蛋白或重组胶原蛋白适用于多种目的。在一些实施方案中，通过将胶原蛋白或重组胶原蛋白作为医疗器械直接应用于或引入受试者的身体，尤其是血管损伤部位。在一些实施方案中，可以将胶原蛋白或重组胶原蛋白作为医疗器械用于多种治疗应用或预防应用中。这样的应用可用于预防或治疗血管损伤，例如在涉及皮肤和其他含有胶原的结构和器官的血管损伤中。本文所述的胶原蛋白或重组胶原蛋白也可用于提供用于某些医疗器械的生物相容性涂层，以促进身体区域的损伤和紊乱的愈合。在该区域中，此类装置用于治疗或预防受试者的心血管疾病。

[0119] 进一步提供以下实施例以阐明本发明。

[0120] 实施例

[0121] 下面结合实施例对本发明的发明目的、技术特点和有益效果作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0122] 发明人进行了细胞毒性实验，验证了Rh COL III在0.1–2mg/mL浓度范围内对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)细胞活力无影响。

[0123] 然后，发明人评估了Rh COL III对血管紧张素II(AngII)诱导的HUVEC内皮损伤的保护作用。结果表明，Rh COL III抑制了细胞内活性氧(ROS)的荧光强度。

[0124] 本文中使用的RhCOL III为发明人制备获得。序列为GERGAPGFR

GPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAP
GERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEK
GPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPA
GPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGER
GAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPA
GERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPN
GIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAP
GFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGER

GAPGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGERGAPGFRGPAGPNGIP
GEKGPAGERGAP。具体制备过程可见CN 201811438582.6。

[0125] 实施例1: RhCOL III通过附着在细胞表面发挥作用。

[0126] 用0.1M碳酸钠缓冲液(pH 9.0)配制重组胶原蛋白RhCOL III溶液, 浓度 $\geq 2\text{mg/mL}$, 体积为20mL, 按1mL重组胶原蛋白溶液加入50 μL FITC(厂商MCE, 产品目录编号HY-66019)溶液的比例, 将FITC少量多次(每次5 μL)加入至重组胶原蛋白溶液中, 边加边轻轻搅拌。待所需FITC加入完毕, 将反应液于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育8h。取1.05mL的 NH_4Cl 溶液加至反应液中, 轻轻摇晃均匀, 使 NH_4Cl 终浓度至50mM, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应2h。透析过夜。将HUVEC以 2×10^4 的密度接种到24孔板中, 待贴壁后加入制备好的重组胶原蛋白-FITC标记物, 避光孵育30min后用4%多聚甲醛固定10min, 加入抗淬灭封片剂后用荧光倒置显微镜进行观察并拍照。

[0127] 实验结果:

[0128] 为研究RhCOL III与HUVEC的相互作用机制, 我们利用FITC标记了RhCOL III。从图1中可以看出RhCOL III型胶原蛋白大量附着在HUVEC细胞表面, 说明RhCOL III不会进入到细胞内, 是通过附着在细胞表面发挥作用的。

[0129] 实施例2: CCK8法测定RhCOL III对HUVEC细胞的影响

[0130] HUVEC细胞使用ECM培养基(厂商Scencell, 产品目录编号1001)(1%青霉素-链霉素, 5%胎牛血清), 在温度为37 $^{\circ}\text{C}$, 含有5%二氧化碳培养箱中培养。将 5×10^3 个细胞均匀铺在96孔板中, 在含有5%二氧化碳及温度为37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养。贴壁之后饥饿处理12h, 再加入不同浓度(0.1、0.5、1和2mg/mL)的RhCOL III(溶解于ECM培养基)或8% NaCl(用作对照)孵育24h, 洗涤后加入100 μL 1mg/mL的CCK-8(厂商Vazyme, 产品目录编号A311-01)孵育1h。用酶标仪在450nm处测定吸光度。相对细胞活力的计算公式:

$$\text{细胞活力}(\%) = (\text{测量值} - \text{空白值}) / (\text{对照值} - \text{空白值}) \times 100\%$$

[0131] 实施结果:

[0132] 检测加入不同浓度(0.1、0.5、1和2mg/mL)的RhCOL III对HUVEC细胞活力的影响, 结果如图2所示。结果表明在浓度低于2mg/mL时样品不影响HUVEC细胞活力, 可用于后续实验。

[0133] 实施例3：细胞内活性氧簇(ROS)的测定

[0134] 异常的血管功能是高血压、动脉粥样硬化、糖尿病和衰老的关键特征，因此是发病和死亡的主要促成因素。驱动这些疾病状态中的血管功能障碍的常见因素是活性氧类(ROS)的过量产生。超氧阴离子和相关的ROS不仅淬灭一氧化氮(NO)，而且它们还通过氧化翻译后修饰直接损害细胞蛋白质的功能，驱动炎症、细胞增殖、纤维化、动脉粥样硬化和膜运输中的损害。血管疾病中该升高的ROS的主要促成因素是肾素-血管紧张素系统的活化，其产生血管紧张素II(Ang II)-活化NADPH氧化酶，以及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的解偶联。

[0135] 将 2×10^4 个HUVEC细胞均匀铺于24孔板中，在ECM培养基中在含有5%二氧化碳及温度为37℃的培养箱中培养。贴壁之后饥饿处理12h。弃去24孔板中的旧培养基，加入不同浓度(0.1、0.5、1和2mg/mL)的RhCOL III (ECM培养基中配制)孵育2h后，每孔加入1 μ M的Ang II(ECM培养基中配制)孵育24h，弃去旧培养基，用PBS缓冲溶液小心清洗细胞，重复3次，加入200 μ L 10 μ M DCFH-DA试剂(厂商碧云天，产品目录编号S0033M)，置于37℃恒温培养箱中孵育30min后用PBS缓冲溶液小心清洗细胞，重复3次。在整个实验过程中，不添加RhCOL III和Ang II的孔为空白组。置于荧光倒置显微镜下观察并拍照，用image J计算出平均光密度。

[0136] 实验结果：

[0137] 检测加入不同浓度(0.1、0.5、1和2mg/mL)的RhCOL III对HUVEC细胞产生ROS的影响，如图3所示，空白组没有明显的荧光，与空白组相比，Ang II组对ROS荧光水平明显增强。RhCOL III处理降低了Ang II诱导的ROS生成增加。RhCOL III以剂量依赖性方式显著抑制HUVEC中ROS的产生。Ang II通过与血管紧张素I型受体(AT1-R)结合，激活NADPH氧化酶，促进ROS的产生，使氧化应激增加，这是高脂血症、高血压、糖尿病和动脉粥样硬化的共同机制之一(陈丽云,吴艳青,张正红,罗倩萍,王正朝等.NADPH氧化还原反应平台及其在Ang II介导ROS信号通路中的调节作用[J].生理科学进展,2012(06):41-46.)。在HUVEC中用RhCOL III处理可以消除Ang II诱导的ROS产生，缓解Ang II诱导的微管损伤。RhCOL III可以用于治疗或预防血管损伤和心血管疾病。

[0138] 实施例4: RhCOL III处理能显著缓解Ang II诱导的微管损伤。

[0139] 将HUVEC细胞均匀铺于24孔板中,贴壁之后饥饿处理12h。弃去24孔板中的旧培养基,加入不同浓度(0.1、0.5、1和2mg/mL)的RhCOL III孵育2h后,每孔加入1 μ m的Ang II孵育24h,弃去旧培养基,用PBS缓冲溶液小心清洗细胞,重复3次,用4%甲醛溶液室温固定15min后加入含0.1% Triton X-100的PBS孵育10min,最后加入Tubulin-Tracker Red(厂商碧云天,产品目录编号C1050)染色工作液室温避光孵育30-60分钟后用PBS缓冲溶液小心清洗细胞,重复3次。加入含DAPI的抗淬灭封片剂并置于荧光倒置显微镜下观察并拍照。

[0140] 实验结果:

[0141] 检测加入不同浓度(0.1、0.5、1和2mg/mL)的RhCOL III对HUVEC细胞微管形成的影响,如图4所示,与空白相比,Ang II组抑制了微管的形成。RhCOL III处理能显著缓解Ang II诱导的微管损伤。

[0142] 实施例5: 监测自发性高血压大鼠血压、心率和体重

[0143] 雄性自发性高血压大鼠(SHRs, 8周龄)购自北京维通利华实验动物技术有限公司(北京, 中国)。SHR随机分为SHR组、卡托普利(captopril)处理组(10mg/kg/天)和RhCOL III处理组(10mg/kg/天), 每组6只大鼠。所有动物在特定的恒温(20 $\pm$ 26°C)和相对湿度(40-70%)的无病原体条件下, 都经历了12小时的光-暗循环(12小时光照/12小时黑暗)。采用无创尾动脉血压计测量各组大鼠的血压, 每周1次, 连续4周。首先, 无创尾动脉血压计预热和检查其性能, 然后将大鼠放在一个安静的环境中适应环境, 将尾根放置于无创尾动脉血压计的传感器, 位置调整它与尾动脉, 按下测量键。该仪器可自动测量大鼠的收缩压、心率和体重。

[0144] 实验结果:

[0145] 为评价RhCOL III对SHR的降压作用, 我们测量了其尾动脉血压。如图5所示, RhCOL III治疗可显著缓解血压升高。我们还评估了RhCOL III对SHR的体重、心率和心脏重量比的影响, 结果显示RhCOL III对体重、心率和心脏重量比没有影响。与对照组(SHR组)相比, RhCOL III处理组和卡托普利处理组具有降低的收缩压。这些结果揭示了RhCOL III可以在自发性高血压大鼠中降低血压。

[0146] 实施例6：自发性高血压大鼠血液生化检测

[0147] 对于实施例5的各个处理组，连续注射四周之后进行眼眶采血，全血样品于4℃放置过夜后，3000转/分离心15min(2-8℃)，取上清即可立即检测，检测指标的含量按照试剂盒说明书(试剂盒的制造商和商品号如下表)进行测定。

[0148] 表1试剂盒信息

试剂盒名称	货号	厂家
乳酸测试盒	A019-2-1	南京建成
谷丙氨酸氨基转移酶	S03030	雷杜
ALT测定试剂盒		
尿酸测定试剂盒	S03035	雷杜
肌酐测定试剂盒	S03076	雷杜
乳酸脱氢酶测定试剂盒	S03034	雷杜

[0149] 实施结果：

[0150] 为了进一步研究RhCOL III对SHR的影响，我们测定了一系列的生化指标。如图6中的B-F图所示，RhCOL III能显著降低乳酸脱氢酶和尿酸的表达，有效缓解肾损伤，但对谷丙转氨酶、肌酐和乳酸的表达无显著影响。

[0151] 实施例7：测定血浆Ang II浓度

[0152] 对于实施例6的各个处理组，连续注射四周之后进行眼眶采血，分别取200 μ L待测血浆样本，加入200 μ L温育液(称取7.40g EDTA、12.11g Tris-base、0.063g PMSF和0.01mg SBTI，加入90mL蒸馏水溶解，用乙酸调节pH为5.4-5.5)，在37℃温育3h后加300 μ L Ang II内标工作液(20%乙腈稀释储备液)，得到预处理样本。在96孔正压装置(Oasis MAX μ Elution SPE，美国Waters公司)上，用200 μ L含1%甲酸的50%乙腈水溶液活化SPE板(Oasis MAX μ Elution SPE，美国Waters公司)。取550 μ L预处理样本至SPE板上，然后加200 μ L含1%氨水的10%甲醇洗涤杂质。接着将SPE板下方的废液板更换为96孔样品板，用40 μ L含1%甲酸的50%乙腈水溶液洗脱待测物并收集至样品板，然后通过LC-MS/MS测定，使用多元回归方程评价线性，记录线性方程和相关系数(R)，用于样本Ang II定量。

[0153] 实施结果：

[0154] Ang II(血管紧张素II)是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)中的主要生物活性肽，是引起高血压的主要病因。如图6中的A图所示，RhCOL III能显著降低Ang II的表达。

[0155] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

[权利要求 1]

胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞或包含胶原蛋白、融合蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞的组合物在制备医疗器械或药物或药械组合产品或试剂盒中的用途，所述医疗器械或药物或药械组合产品或试剂盒用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病、用于对血管损伤的修复、或预防和/或治疗血管损伤，其中胶原蛋白包含n个重复单元，所述重复单元包含：

(1)以SEQ ID No.1所示的序列；

(2)与以SEQ ID No.1所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列；或

(3)以SEQ ID No.1所示的序列进行了1-5个氨基酸残基的取代、添加、缺失或插入的序列；

其中n为大于等于1的整数，优选地为1-32的整数，

例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、1

3、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24

、25、26、27、28、29、30或31，其中当n为大于等于2的整数时，

各重复序列之间是直接连接的；

优选地，受试者具有紫外线光老化诱导的受损皮肤或糖尿病性感染创面；

优选地，胶原蛋白具有抗内皮细胞损伤效果；

优选地，血管损伤是血管内皮损伤；

优选地，所述医疗器械或药物或药械组合产品或试剂盒还用于预防和/或治疗紫外线光老化诱导的皮肤受损或糖尿病性感染创面；

优选地，所述胶原蛋白是重组Ⅲ型人源化胶原蛋白，优选164.88度重组Ⅲ型人源化胶原蛋白；优选地，重组Ⅲ型人源化胶原蛋白为三聚体形式；

- 优选地，融合蛋白包含胶原蛋白和用于促进胶原蛋白分泌、分离和/或纯化的蛋白质；
- 优选地，所述蛋白质选自酶切位点序列、信号肽和纯化标签序列；
- 优选地，所述酶切位点序列是TEV蛋白酶酶切位点序列；
- 优选地，蛋白标签序列His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签、Cytiva Protein Select标签或NusA标签；
- 优选地，所述胶原蛋白与所述蛋白质是直接连接的或者通过接头连接的，所述接头是柔性接头，诸如(G)_a或(GGGGS)_b，其中a和b各自独立为1-10或1-5或1-3的整数；
- 优选地，所述医疗器械是凝胶、敷料、侵入器械、或植入器械。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的用途，其中所述胶原蛋白包含以SEQ ID No. 2所示的序列或者不含以SEQ ID No.2所示的序列。
- [权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述胶原蛋白包含：
- a)SEQ ID No.3的氨基酸序列；
- b)与SEQ ID No.3的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列，其保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的抗内皮细胞损伤效果；或
- c)SEQ ID No.3的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1-80个，例如1-70、1-60、1-50、1-40、1-30、1-10、1-8或1-5个氨基酸残基的氨基酸序列，其保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的抗内皮细胞损伤效果。
- [权利要求 4] 根据权利要求1-3中任一项所述的用途，其中心血管疾病是内皮细胞损伤相关的心血管疾病，优选地，内皮细胞损伤是血管紧张素II或ROS诱导的内皮细胞损伤，和/或所述血管损伤是由血管紧张素II或ROS诱导的血管损伤。
- [权利要求 5] 根据权利要求1-4中任一项所述的用途，其中心血管疾病选自：动脉硬化、动脉粥样硬化、高血压、冠心病、周围血管病、脑卒中、

- 心力衰竭、心律失常、脑血管病、心房颤动及血栓性疾病；优选地，其中高血压是自发性高血压；优选地，所述药物是降低血压的药物；优选地，血管内皮损伤是糖尿病血管内皮损伤。
- [权利要求 6] 根据权利要求1-5中任一项所述的用途，其中组合物包含调脂药和/或降压药，诸如他汀类降脂药、血管紧张素转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和/或 β 受体阻断剂。
- [权利要求 7] 药物组合物，其包含权利要求1-3中任一项中所述的胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞以及用于预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复的药物，优选是调脂药和/或降压药，诸如他汀类降脂药、血管紧张素转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和/或 β 受体阻断剂。
- [权利要求 8] 医疗器械，其包含权利要求1-3中任一项中所述的胶原蛋白、包含胶原蛋白的融合蛋白、编码所述胶原蛋白或融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述载体的宿主细胞以及用于对血管损伤的修复的材料或装置；优选地，所述医疗器械是凝胶、敷料、侵入器械、或植入器械。
- [权利要求 9] 在体外阻断或消除血管紧张素II或ROS诱导的血管内皮细胞损伤的方法，其包括将血管内皮细胞与权利要求1-3中任一项中所述的胶原蛋白接触的步骤，优选地，血管内皮细胞是脐静脉血管内皮细胞，优选是人脐静脉血管内皮细胞。
- [权利要求 10] 体外方法，其用于在细胞中(1)降低血管紧张素II诱导的ROS生成或(2)缓解微管损伤，优选Ang II诱导的微管损伤，所述方法包括将细胞与权利要求1-3中任一项中所述的胶原蛋白接触的步骤，优选地，细胞是血管内皮细胞，优选是脐静脉血管内皮细胞，优选是人脐静脉血管内皮细胞。
- [权利要求 11] 筛选活性成分的方法，所述活性成分用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病或者用于对血管损伤的修复，其包括

(i)提供胶原蛋白，所述胶原蛋白包含n个重复单元，所述重复单元包含：

(1)以SEQ ID No.1所示的序列；

(2)与以SEQ ID No.1所示的序列具有至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列；或

(3)以SEQ ID No.1所示的序列进行了1-5个氨基酸残基的取代、添加、缺失或插入的序列；

其中n为大于等于1的整数，优选地为1-32的整数，

例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、1

3、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24

、25、26、27、28、29、30或31，其中当n为大于等于2的整数时，各重复序列之间是直接连接的；

(ii)在经血管紧张素II处理的HUVEC细胞中添加所述胶原蛋白；

(iii)选择如下性质的胶原蛋白作为活性成分：(a)降低ROS生成/或(b)缓解微管损伤；

优选地，受试者具有紫外线光老化诱导的受损皮肤或糖尿病性感染创面；

优选地，胶原蛋白具有抗内皮细胞损伤效果；

优选地，活性成分还用于预防和/或治疗紫外线光老化诱导的皮肤受损或糖尿病性感染创面；

优选地，其中心血管疾病是内皮细胞损伤相关的心血管疾病，优

选地，内皮细胞损伤是血管紧张素II或ROS诱导的内皮细胞损伤，和/或所述血管损伤是由血管紧张素II或ROS诱导的血管损伤；

优选地，其中心血管疾病选自：动脉粥样硬化、高血压、冠心病、周围血管病、脑卒中、心力衰竭、心律失常、脑血管病、心房颤动及血栓性疾病；

优选地，挑选的胶原蛋白包含：

a)SEQ ID No.3的氨基酸序列；

b)与SEQ ID No.3的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列；或

c)SEQ ID No.3的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1-80个，例如1-70、1-60、1-50、1-40、1-30、1-10、1-8或1-5个氨基酸残基的氨基酸序列；

优选地，所述活性成分用作药物或者用作医疗器械或用作药械组合产品。