

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00808785.7

[51] Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/04 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1296384C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2000.6.19 [21] 申请号 00808785.7

[30] 优先权

[32] 1999.6.18 [33] NZ [31] 336359

[86] 国际申请 PCT/NZ2000/000102 2000.6.19

[87] 国际公布 WO2000/078805 英 2000.12.28

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.11

[73] 专利权人 普罗特米克斯发现有限公司

地址 新西兰奥克兰

[72] 发明人 G·J·S·库珀 C·M·布坎南

[56] 参考文献

WO9100737A1 1991.1.24 A61K37/02

EP0309100A2 1988.8.26 A61K37/02

WO8906135A1 1989.7.13 A61K37/02

WO9211862A1 1992.7.23 A61K37/02

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟 彭益群

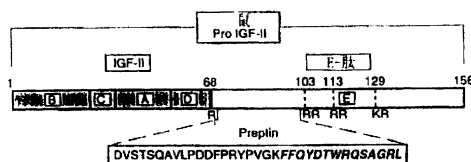
权利要求书 8 页 说明书 28 页 附图 7 页

[54] 发明名称

具有 preptin 功能的肽

[57] 摘要

本发明涉及一种哺乳动物的生物活性肽。尤其是，本发明涉及一种由胰腺胰岛 β - 细胞分泌的刺激胰岛素分泌的肽，称为 preptin。本发明还尤其提供了 preptin 的类似物、含有 preptin 或其类似物的药物组合物以及它们作为药物的用途。



1. 一种生物活性肽，其氨基酸序列如下：

Asp Val Ser Thr R₁ R₂ R₃ Val Leu Pro Asp R₄ Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys
Phe Phe R₅ R₆ Asp Thr Trp R₇ Gln Ser R₈ R₉ Arg Leu

其中：

R₁ 为 Ser 或 Pro;

R₂ 为 Gln 或 Pro;

R₃ 为 Ala 或 Thr;

R₄ 为 Asp 或 Asn;

R₅ 为 Gln 或 Lys;

R₆ 为 Tyr 或 Phe;

R₇ 为 Arg 或 Lys;

R₈ 为 Ala 或 Thr; 和

R₉ 为 Gly 或 Gln。

2. 具有如下氨基酸序列的人 preptin:

Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu。

3. 具有如下氨基酸序列的大鼠 preptin:

Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Lys Phe Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly Arg Leu。

4. 具有如下氨基酸序列的小鼠 preptin:

Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly Arg Leu。

5. 一种选自人 preptin 的肽，具有如下氨基酸序列：

Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu

或者其片段，其中所说的片段选自：

-
- (i) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg;
 - (ii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln;
 - (iii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr;
 - (iv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser;
 - (v) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln;
 - (vi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys;
 - (vii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp;
 - (viii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr;
 - (ix) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp;
 - (x) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr;
 - (xi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln;
 - (xii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe;
 - (xiii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe;
 - (xiv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val

Gly Lys;

- (xv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly;
- (xvi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val;
- (xvii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro;
- (xviii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr;
- (xix) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg;
- (xx) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro;
- (xxi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe;
- (xxii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn;
- (xxiii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp;
- (xxiv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro;
- (xxv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu;
- (xxvi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val;
- (xxvii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr; 和
- (xxviii) Asp Val Ser Thr Pro Pro。

6. 一种分离的多核苷酸，它编码如权利要求 1-5 中任一项所述的多肽、preptin 或其片段。

7. 一种分离的多核苷酸，它编码人的 preptin，并且它包含下面的核苷酸序列：

```
gacgtgtcgaccctccgaccgtgcttccggacaactccccagataccccgtggcaagttcttccaatga  
cacctggaagcagtcaccagcgcctg。
```

8. 一种分离的多核苷酸，它编码大鼠的 preptin，并且它包含下面的核苷酸序列：
gacgtgtctacctctcaggccgtactccggacgactccccagataccccgtgggcaagttcttcaaattcgac
acctggagacagtccgcgggacgcctg。

9. 一种分离的多核苷酸，它编码小鼠的 preptin，并且它包含下面的核苷酸序列：
gacgtgtctacctctcaggccgtactccggacgactccccagataccccgtgggcaagttcttccaatatgac
acctggagacagtccgcgggacgcctg。

10. 一种载体或细胞系，它包含权利要求 7-9 中任意一项的多核苷酸，并且它能够表达由所述多核苷酸编码的肽。

11. 如权利要求 10 所述的载体或细胞系，它包含权利要求 7 的多核苷酸。

12. 一种药物组合物，它包含如权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段。

13. 一种剂量形式，它含有如权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段，以及适于施用于人的生理缓冲液。

14. 如权利要求 13 所述的剂量形式，其用于注射给药。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的剂量形式，其中所说的 preptin 是如权利要求 2、或 5 所述的人 preptin 或其片段。

16. 如权利要求 1-5 任意一项所述的多肽、preptin 或其片段的制剂，其中所说的多肽、preptin 或其片段的存在量为至少 50% 重量。

17. 如权利要求 16 中所述的制剂，其中所说的多肽、preptin 或其片段为所说制剂的至少 80% 重量。

18. 如权利要求 16 中所述的制剂，其中所说的多肽、preptin 或其片段为所说制剂的至少 90% 重量。

-
19. 如权利要求 16 中所述的制剂，其中所说的多肽、preptin 或其片段为所说制剂的至少 95%重量。
20. 如权利要求 16 中所述的制剂，其中所说的多肽、preptin 或其片段为所说制剂的至少 99%重量。
21. 如权利要求 16 所述的制剂，其中所说的多肽、preptin 或其片段是纯的。
22. 权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段的盐。
23. 如权利要求 22 所述的盐，其是一种生理可接受的盐。
24. 如权利要求 23 所述的盐，其中所说的多肽、preptin 或其片段是通过与有机酸的阴离子结合而形成的。
25. 如权利要求 24 所述的盐，其中所说的盐选自苹果酸、乙酸、丙酸、丁酸、草酸、柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸和三氟乙酸的盐类。
26. 一种包含如权利要求 23-25 中任意一项所述盐的药物组合物。
27. 如权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段用于制备治疗 II 型糖尿病的药物中的用途。
28. 如权利要求 23-25 中任意一项所述的盐用于制备治疗 II 型糖尿病的药物中的用途。
29. 如权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段用于制备治疗导致或涉及胰岛素合成、分泌或功能缺陷的状态的药物中的用途。

-
30. 如权利要求 23-25 中任意一项所述的盐用于制备治疗导致或涉及胰岛素合成、分泌或功能缺陷的状态的药物中的用途。
31. 权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段在制备治疗糖尿病的药物中的用途。
32. 权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段在制备用于刺激胰岛素分泌的药物中的用途。
33. 权利要求 23-25 中任意一项所述的盐在制备治疗糖尿病的药物中的用途。
34. 权利要求 23-25 中任意一项所述的盐在制备用于刺激胰岛素分泌的药物中的用途。
35. 与如权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段结合的抗体。
36. 与如权利要求 1-5 中任意一项所述的多肽、preptin 或其片段结合的单克隆抗体。
37. 与如权利要求 2 或 5 所述的人 preptin 或其片段结合的单克隆抗体。
38. 一种使用如权利要求 35-37 中任意一项所述的抗体的体外免疫学测定法。
39. 如权利要求 38 所述的测定法，其中对 preptin 在生物液中的存在进行定量测定。
40. 如权利要求 39 所述的测定法，其中所述生物液是血液、血清、血浆、尿液或脑脊液。
41. 一种体外免疫学测定法，它使用如权利要求 35-37 中任意一项所述的抗体，并且它是 RIA、IRMA 或 ELISA。

42. 一种测定试剂盒，它包含如权利要求 35-37 中任意一项所述的抗体。
43. 如权利要求 42 所述的测定试剂盒，它包含如权利要求 35-37 中任意一项所述的抗体以及 preptin 参考标准。
44. 如权利要求 43 所述的测定试剂盒，其中所说的参考标准是如权利要求 1-5 中任意一项所述的 preptin 或其片段。
45. 一种鉴定 preptin 激动剂的方法，它包括步骤：
在存在及不存在候选物激动剂的情况下，对由预定浓度的如权利要求 1 中所述的多肽所诱导的胰岛素分泌程度进行测定；以及
对具有提高 preptin 介导的胰岛素分泌效应的任何化合物，作为激动剂，予以鉴定。
46. 一种鉴定 preptin 拮抗剂的方法，它包括步骤：
在存在及不存在候选物拮抗剂的情况下，对由预定浓度的如权利要求 1 中所述的多肽所诱导的胰岛素分泌程度进行测定；以及
对具有减小 preptin 介导的胰岛素分泌效应的任何化合物，作为拮抗剂，予以鉴定。
47. 根据权利要求 45 或 46 的方法所鉴定的 preptin 激动剂或者 preptin 拮抗剂在制备用于调节葡萄糖介导的胰岛素分泌的药物中的用途。
48. 一种分离的多肽，其具有如下的氨基酸序列：
Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu,
或者其片段，其中所述片段选自：
(i) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val
Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg;
(ii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val
Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln;
(iii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val
Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr;

-
- (iv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser;
- (v) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln;
- (vi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys;
- (vii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp;
- (viii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr;
- (ix) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp;
- (x) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr;
- (xi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln;
- (xii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe Phe;
- (xiii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys Phe;
- (xiv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys;
- (xv) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly;
- (xvi) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val;
以及
- (xvii) Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro。

具有 preptin 功能的肽

本发明涉及一种生物活性肽。尤其是，本发明涉及一种由胰腺胰岛 β -细胞分泌的刺激胰岛素分泌的肽。

发明背景

胰腺胰岛 β -细胞，主要是通过其胰岛素的分泌，在生理学中扮演着一个重要的调节角色，而胰岛素是一种对中间代谢施加深刻效应的肽激素（Draznin 等人，（1994））。第二种 β -细胞激素，即糊精，通过其对胰岛素分泌以及组织胰岛素敏感性的作用，也有助于 β -细胞的调节功能（Cooper, C（1994）； Hettiarachchi 等人，（1997））。

在胰岛 β -细胞中，激素被包装在分泌性颗粒中，通过对信号诸如燃料（例如，葡萄糖、氨基酸类）或神经激素性刺激的响应，这些激素经历了调节性释放。这些颗粒含有富含胰岛素和 Zn 的致密核，而在颗粒基质中存在有较少量的胰岛素 C-肽、糊精、胰岛素原、嗜铬粒蛋白衍生的肽类、蛋白酶类和其它蛋白质类（Hutton, J（1989））。

本发明申请人当前已确定的是：胰腺胰岛 β -细胞还分泌一种调节性肽。本发明申请人已进一步地确定，这种肽增强葡萄糖介导的胰岛素分泌。

针对这种肽，本发明申请人称其为 preptin，本发明广泛地涉及其多个方面。

发明概述

因此，在第一方面本发明提供了 preptin 肽或其类似物。

对于“preptin”，本发明申请人是指一种 34 个氨基酸的肽，其序列如下：

Asp Val Ser Thr R₁ R₂ R₃ Val Leu Pro Asp R₄ Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys
Phe Phe R₅ R₆ Asp Thr Trp R₇ Gln Ser R₈ R₉ Arg Leu

其中:

R₁ 为 Ser 或 Pro;

R₂ 为 Gln 或 Pro;

R₃ 为 Ala 或 Thr;

R₄ 为 Asp 或 Asn;

R₅ 为 Gln 或 Lys;

R₆ 为 Tyr 或 Phe;

R₇ 为 Arg 或 Lys;

R₈ 为 Ala 或 Thr; 和

R₉ 为 Gly 或 Gln,

或者其类似物。

在一个实施方案中, 本发明提供了人的 preptin, 其氨基酸序列为:

Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu.

在另一个实施方案中, 本发明提供了大鼠的 preptin, 其氨基酸序列为:

Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Lys Phe Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly Arg Leu.

在又一个实施方案中, 本发明提供了小鼠的 preptin, 其氨基酸序列为:

Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly Arg Leu.

这些氨基酸序列相当于每种哺乳动物中的 proIGF-II E-肽的 Asp₆₉-Leu₁₀₂。

在另一方面, 本发明提供了编码 preptin 或其类似物的多核苷酸。

在另一方面, 本发明提供了包含有编码 preptin 或其类似物的多核苷酸并且具有表达 preptin 或所述类似物能力的载体或细胞系。

本发明也提供了 preptin 的盐类, 其优选地为生理可接受的 preptin 盐类。

在另一方面,本发明进一步提供了包含 preptin 或其类似物或 preptin 盐类的药物组合物。

在再一方面,本发明提供了以治疗或预防为目的的刺激胰岛素分泌的方法,它包括对需要这种治疗或预防的患者施用有效量的 preptin 或其类似物这一步骤。

在又一方面,本发明提供了 preptin 或其类似物或其盐在制备药物尤其是用于刺激胰岛素分泌的药物中的用途。

在另一方面,本发明提供了调制葡萄糖介导的胰岛素分泌的方法,它包括对患者施用有效量的 preptin、preptin 类似物、preptin 激动剂或 preptin 拮抗剂这一步骤。

在另一些实施方案中,本发明提供了结合 preptin 或其类似物的抗体、使用了这些抗体的测定方法和含有这些抗体的测定试剂盒。

上面的概述并没有包括本发明的全部内容。从下面的描述以及从所附的权利要求书,将显而易见本发明的其它方面。

附图说明

尽管对本发明进行了如上的概括性描述,但是也应该明白:本发明包括实施方案,并在这些实施方案的下面给出了实施例。另外,通过参考其中的附图,将会更好地理解本发明。

图 1 是 preptin 的纯化与表征图。a) 对标志蛋白质的测定表明,来自 β TC6-F7 细胞的细胞器被定位于 OptiPrep 的连续梯度内:颗粒核(胰岛素),颗粒基质(糊精),溶酶体(芳香基硫酸酯酶),线粒体(柠檬酸合酶)。b) RP-HPLC 纯化颗粒蛋白质:收集所指示的峰(加影线)并进一步纯化。c) 采用 MALDI-TOF MS 来确定来自加影线峰的主要肽的纯度和质量($M+H^+$)。d) 从加影线峰纯化的肽,用 Lys-C 消化后经 RP-HPLC 纯化的图谱:1 为 NH_2 -末端片段,2 为 $COOH$ -末端片段,3 为未消化的肽。e) 通过对(d)中 Lys-C 衍生的肽进行测序,而确定出的小鼠 preptin 的结构: NH_2 -末端片段为正体, $COOH$ -末端片段为斜黑体,并且 preptin 被定位于所显示的鼠 proIGF-II E 肽的一个片段中。图中对 proIGF-II 的结构域(B、C、A、D、E)均予以显示。位于 Arg₆₈ 的已识别切点用黑体表示,而推定的双碱性基序(motif)用间隔

线显示。

图 2 是 preptin 的细胞分泌图。a) preptin 的 RIA 标准曲线。b) 24 小时的 β TC6-F7 条件培养液和来自图 1b 的颗粒内部分，在这二者的 RP-HPLC 分部收集部分中，preptin 样免疫反应性物质 (PLIM) 的 RIA 表征。c) 从 β TC6-F7 细胞分泌的含有主要的 PLIM 的分级部分之 MALDI-TOF MS，峰对应于鼠 preptin ($M+H^+$)，误差率为 0.07%。

图 3 是 preptin 对胰岛素分泌的效应图。a) preptin 介导的从 β TC6-F7 细胞分泌胰岛素。曲线表明胰岛素的浓度增加超过了基础水平 (没有加入 preptin 时)。b) preptin 介导的从分离的被灌注的大鼠胰腺分泌胰岛素。每个点为平均值 \pm sem (复式分析，对于每根曲线 $n=4$ 个胰腺)。曲线下面积 (胰岛素的第二期分泌; $P=0.03$ ，不配对的双尾部 t-试验)。

图 4 是鼠胰腺的免疫组织化图。对从成年 FVB/n 小鼠中收集的胰腺进行切片，用苏木精和多克隆兔抗血清染色，并使用了免疫过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗。分图中：a. 抗胰岛素抗血清 (1: 40); b. 抗 preptin 抗血清 (1: 40); c. 和 d. 用合成的大鼠 preptin 在 c. 1mg/ml、d. 5mg/ml, Bar = 100 μ m 下预温育 30 分钟的抗 preptin 抗血清 (1: 40)。

图 5 是在大鼠胰岛或 β TC6-F7 颗粒部分的 RP-HPLC 分部收集部分中，对 preptin 样免疫反应性物质 (PLIM) 的 RIA 表征 (标准: 图 1b)。

图 6 表示从 β TC6-F7 细胞和分离的大鼠胰岛共分泌的 preptin 和胰岛素。a 和 b 为葡萄糖介导的来自 a. β TC6-F7 细胞和 b. 分离的大鼠胰岛的 preptin 和胰岛素共分泌。

图 7 是 preptin 对胰岛素分泌的效应图。a 和 b 表示纯化的 a. 兔抗大鼠 preptin 的 γ -球蛋白和 b. 未免疫的兔 γ -球蛋白的纯度与质量。1: 轻链 IgG, $M+H^+$; 2: 完整的 IgG, $M+4H^+$; 3: 重链 IgG, $M+H^+$; 4: 完整的 IgG, $M+2H^+$; 完整的 IgG, $M+H^+$ 。c 是用抗 preptin 的 γ -球蛋白在 35 μ g/ml、37 $^{\circ}$ C、pH7.4 的条件下模拟抗体灌注实验的接触时间、稀释度、温度和 pH 进行灌注后，在 1 分钟内结合 preptin 的能力。d 是注入抗 preptin 的 γ -球蛋白或对照 (未免疫的兔 γ -球蛋白)，对葡萄糖刺激 (20mM, 方形波) 的分离的被灌注大鼠胰腺的胰岛素分泌之效应图。每个点均为平均值 \pm s.e.m. (复式分析，对于每根曲线 $n=5$ 个胰腺)。曲线下面积 (胰岛素的第二期分泌; $P=0.03$ ，不配对的

单尾部 t-试验)。

发明描述

正如上面的概括性描述, 本发明涉及一种新的肽, 并发现其存在于胰腺胰岛 β -细胞颗粒中。已确定这种肽, 即 preptin, 能够刺激葡萄糖引起的胰岛素分泌。

总之, 通过使用一步密度梯度离心法纯化来自培养的鼠 β TC6-F7 细胞的分泌颗粒以及对标志蛋白质进行分析以确定其纯度 (图 1a), 从而鉴定出了 preptin。胰岛素被用来跟踪颗粒核的纯化, 而通过测定存在于颗粒基质 (Johnson, K (1988)) 中的糊精可以证实颗粒膜的完整性 (图 1a)。接着, 使用反相 HPLC (A_{214} : 图 1b), 对可溶性的颗粒组分进行分离。通过质谱和 NH_2 -末端氨基酸测序, 对肽的同一性进行了确定。主要峰含有鼠胰岛素-I 和-II 以及 C-肽-I 和-II (图 1a)。没有检测到任何非 β -细胞肽, 并且糊精对胰岛素 (1: 23) 以及小鼠胰岛素 I 对小鼠胰岛素 II (1: 3) 的摩尔比值与生理性 β -细胞的比值相同 (Cooper (1994); Linde (1989))。

在紧邻胰岛素-I 之前的一个主要洗脱峰中, 发现含有一种以前未知的肽 (图 1b)。将这种肽纯化至均一性后, 其分子量为 3950Da (图 1c)。用赖氨酸专一性的蛋白酶对该分子消化, 接着将得到的肽用 RP-HPLC 分离 (图 1d), 然后进行完整 NH_2 -末端蛋白质测序。完整序列证实: 该分子含有 34 个氨基酸, 它相当于鼠 proIGF-II E-肽的 Asp₆₉-Leu₁₀₂ (图 1c)。这种肽就是小鼠的 preptin。

在 preptin 的 NH_2 -末端侧翼是一个已识别的 Arg 切点, 在其 COOH-末端侧翼是一个推定的双碱性 (Arg-Arg) 切割基序 (Bell 等人, (1985)) (图 1e)。这些残基在不同物种之间高度保守, 并且很可能是翻译后的加工信号。

虽然另一些研究者已表明: 在细胞培养液以及多种哺乳动物的生物液中, 有不同的 proIGF-II E-肽衍生肽存在 (Hylka 等人, (1985); Daughaday 等人, (1992); Liu 等人, (1993)), 但是他们都没有鉴定出一种与 preptin 相当的肽。

小鼠 preptin 的氨基酸序列如下:

Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly Arg Leu

人和大鼠的 preptin 的等同氨基酸序列分别为：

Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu; 和

Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly
Lys Phe Phe Lys Phe Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly Arg Leu.

编码 preptin 的多核苷酸的核苷酸序列如下：

gacgtgtcgaccctccgaccgtgcttccggacaactccccagataccccgtgggcaagttctccaatatga
cacctggaagcagtcaccaccagcgcctg (人)

gacgtgtctacctctcaggccgtacttccggacgacttccccagataccccgtgggcaagttctcaaattcgac
acctggagacagtcgcgggacgcctg (大鼠)

gacgtgtctacctctcaggccgtacttccggacgacttccccagataccccgtgggcaagttctccaatatga
acctggagacagtcgcgggacgcctg (小鼠)

preptin 可通过合成或重组方法生成。例如，在用合成方法制备时，可以使用任何可商业获得的固相技术诸如 Merryfield 固相合成方法，在这种方法中氨基酸被顺序地加入到一个正在延伸的氨基酸链上，从而合成 preptin（见 Merryfield, *J. Am. Soc.* 85:2146-2149 (1963)）。自动合成肽的设备也可从供应商诸如 Perkin Elmer/应用生物系统公司 (Applied Biosystems, Inc) 处商业获得，并且可以根据制造商的说明书来操作。

preptin 也可以通过将编码蛋白质的多核苷酸（通常为 DNA）序列插入到表达载体中并在合适宿主中将其表达，从而用重组方法生成。本领域普通技术人员已知的多种表达载体中的任何一种都可以拿来使用。在用含有编码重组肽之 DNA 分子的表达载体转化或转染任何合适的宿主细胞后，就可以在这种细胞中实现表达。合适的宿主细胞包括原核细胞、酵母和高等真核细胞。

用于产生重组的标准技术，在例如 Maniatis 等人的分子克隆：实验室手册 (Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour

Laboratories, Cold Spring Harbour, New York (1989)) 中予以了描述。

表达 preptin 的载体和/或细胞系, 各有各的作用, 并且它们也成为本发明的一部分。

preptin 的类似物以及它的编码多核苷酸也在本发明的范围之内。这样的类似物包括 preptin 和上述多核苷酸的功能性等同物。

对于 preptin 本身, 其功能性等同物包括在免疫学上可与 preptin 发生交叉反应并且具有与 preptin 基本相同功能的所有蛋白质。这样的功能性等同物可以是, 例如, 含有 6 至 33 个氨基酸(通常是以 C-末端被截短的形式出现)并包含 preptin 的一个或多个活性位点的 preptin 的片段, preptin 的替代、添加或缺失突变体, 或者带有其它氨基酸的 preptin 或片段或突变体的融合体。

形成最小片段的六个氨基酸, 只要它们在 preptin 序列中是连续的并且满足功能要求, 就可以来自序列的任何部分。当然, 生物活性肽也可能(并已明确地构思了)包括那些六肽中的任何一种, 或者确实是或者包括来自 preptin 序列的任何七肽、八肽、九肽或十肽。

尤其优选这样的肽类, 它们是或者包括来自人 preptin 的六肽、七肽、八肽、九肽或十肽。

肽中残基的改变是可能的, 而且对此进行了构思。例如, 采用常规技术用等同的氨基酸替换序列中的氨基酸是可能的。通常所知的等同的氨基酸组为:

- (a) Ala Ser Thr Pro Gly;
- (b) Asn Asp Glu Gln;
- (c) His Arg Lys;
- (d) Met Glu Ile Val; 和
- (e) Phe Tyr Trp.

只要所得到的肽可与 preptin 发生免疫交叉反应并且具有与 preptin 基本相同的功能, 也可以进行氨基酸的添加和/或缺失。

等同的多核苷酸包括编码与如上所述的 preptin 等同的蛋白质之核酸序列。等同的多核苷酸也包括这样的核酸序列, 由于核酸密码的简并性, 它们与天然的多核苷酸有不同之处, 但是这些不同之处并没有

影响相应的氨基酸序列。

可以根据同源性来预测某一特定的多核苷酸或多肽是否与上面所给出的那些多核苷酸或多肽相当。通过利用可公开获得的计算机算法，可以将多核苷酸或多肽的序列进行比对 (align)，从而确定某一特定区域相对于另一序列的核苷酸同一性百分比。用于比对和鉴定多核苷酸序列相似性的两个示范性算法是 BLASTN 和 FASTA 算法。多肽序列的相似性可以使用 BLASTP 算法来检验。BLASTN 和 BLASTP 软件均可以在 NCBI 匿名的 FTP 服务器 (ftp://ncbi.nlm.nih.gov.) 上，在 /blast/executables/ 下获得。在确定根据本发明的变异体时，优选使用按文件中所述的缺省参数进行设置并与算法一起发放的 2.0.4 版本 [1998 年 2 月 24 日] 的 BLASTN 算法。包括 BLASTN 和 BLASTP 在内的 BLAST 算法家族的用途，在位于 URL 的 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/newblast.html> 的 NCBI 之 web 站点 (website) 有描述，并且在 Altschul 和 Stephen F 等人 (1997) “有空位的 BLAST 和 PSI-BLAST: 新一代的蛋白质数据库搜索程序 (Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs)”、核酸研究 (*Nucleic Acids Res.*) 25: 3389-3402 这些出版物中也有描述。计算机算法 FASTA 可以在互联网 (Internet) 上的 ftp 站点 ftp://ftp.virginia.edu/pub/fasta/ 上获得。在确定根据本发明的变异体时，优选使用按文件中所述的缺省参数进行设置并与算法一起发放的 2.0.4 版本，1996 年 2 月。FASTA 算法的用途，在 W R Pearson 和 D. J. Lipman, “生物序列分析员使用的改进工具 (Improved Tools for Biological Analysts)”，美国国家科学院院刊 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*), 85: 2444-2448 (1988) 以及 W.R. Pearson, “用 FASTP 和 FASTA 进行快速和灵敏的序列比较 (Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA)”，酶学方法 (*Methods in Enzymology*), 183: 63-98 (1990) 中予以了描述。

本发明的类似物也包括来自除人、大鼠或小鼠以外的物种的 preptin 同源物。这样的同源物通过使用，例如，基于编码人、大鼠和小鼠的 preptin 多核苷酸之保守区的核酸探针，能够很容易地予以鉴定。

preptin 或其类似物也可以以多种程度的纯度形式存在。优选地

preptin/类似物组分构成制备物重量的至少 50%，更优选地至少 80%，更优选地至少 90%，更优选地至少 95% 以及仍更优选地至少 99%。然而，preptin 或类似物在应用于药物中时，一般优选其处于纯的或基本纯的形式。

在对患者施用 preptin 或 preptin 类似物时，有可能使用其这样的纯或基本纯的化合物。然而，preptin 或 preptin 类似物也可以以药物组合物的形式存在。这样的组合物可包含 preptin 或 preptin 类似物，并再加入一种或多种药学可接受的载体以及如果希望的话，任选地其它治疗性成分。

载体的可接受性，是指其必须与 preptin 或 preptin 类似物相容，并且对受治疗的患者无害。所希望的组合物还不应该包含有与已知肽类不相容的物质。

可以将组合物还可以单位剂量的形式方便地存在，并且可以采用药学领域公知的任何方法制备。所有的方法均包括使活性成分与载体相结合这一步骤，而其中的载体由一种或多种辅助成分构成。

组合物所采用的具体形式，在很大程度上将取决于所选择的施用途径。例如，可以将 preptin 或 preptin 类似物以非肠道途径注射，例如，通过静脉内注射进入受治疗患者的血流中。然而，本领域的技术人员欢迎将施用途径多样化，它们可以是静脉内、皮下、肌内、腹膜内、肠道、经皮、跨粘膜、持续释放聚合物组合物（如，交酯聚合物或共聚物微粒或植入体）、灌注、肺（例如，吸入）、鼻、口等等。

目前，优选适于非肠道途径、尤其是静脉内施用的组合物。这样的组合物方便地含有 preptin 或 preptin 类似物的无菌水性溶液。优选地，溶液与受治疗患者的血液等渗。将 preptin 或类似物溶于水中以生成水性溶液，接着无菌化这种溶液，就可以方便地制备出这样的组合物。这时就可以以单位或多剂量的包装物形式，例如密封的安瓿或小瓶，传递组合物。

一种尤其优选的组合物是 preptin 处于适于注射的生理缓冲液中。

适于非肠道施用的持续释放性组合物（例如，可生物降解聚合物的配制物），也为本领域公知。见，例如，美国专利 3773919 和 4767628 以及 PCT 出版物 WO 94/15587。

将 preptin 转化为盐的形式也很方便。这样的盐一般是生理可接受的盐，并且可以通过利用任何方便的技术标准方法来生成。

尤其优选通过 preptin 与有机酸类的阴离子结合而生成的 preptin 盐类。这样的盐类包括但不限于苹果酸、乙酸、丙酸、丁酸、草酸、柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸和三氟乙酸的盐类。

也可以将这样形成的盐类配制于药物组合物中，当需要的时候用于治疗性施用。

以下，通过参考下面的非限制性实验部分，对本发明的若干方面进行描述。

实验

第一部分

方法和材料

细胞培养

将 β TC6-F7 鼠胰腺胰岛 β -细胞，传代数 49-60，在三联瓶中于 37 °C 培养，其中，O₂ 对 CO₂ 的比例为 95: 5 (体积/体积)，瓶中装有用 15% 加热灭活的马血清和 2.5% 胎牛血清补充的 nDMEM (Gibco)，并且通过采用 PBS 洗、随后是胰蛋白酶 (2.5% 胰蛋白酶-EDTA) 处理，每 5 天进行一次次代培养。在生长至 70% 汇合时，每个瓶可得到大约 2.0×10^8 个细胞。

颗粒纯化

将来自 8-12 个三联瓶中、处于传代数为 55-60 的 β -细胞在用胰蛋白酶处理后收获，平均得到 2.5-4.0 ml 纯净细胞 ($1.6-2.4 \times 10^9$ 个)，将其浓缩 (1700 \times g, 5 分钟)，然后用 PBS 洗两次，接着用均质化介质 (0.3 M 蔗糖/10mM MES K (σ)/1mM K₂EGTA/1mM MgSO₄/pH6.5) 洗一次，然后在冰上于相同介质 (按 1: 5 体积/体积) 中进行均质化处理。将细胞悬浮液通过球磨 (ball-bearing) 匀浆器 (7.87×10^{-5} cm 间隙) 20 遍进行均质化处理，然后通过离心 (400 \times g, 10 分钟) 进行澄清，将沉淀物再进行一次均质化处理和离心，然后将两次上清液合并 (终体积 = 20ml)。通过用均质化介质稀释来制备 13% 和 31% 的 Optiprep™ (Nycomed) 溶液 (体积/体积)，然后将 6 \times 10 ml 的连续梯

度 (31%-13%Optiprep) 倾入 (Auto Densi-flow II, Haakebuchler) 超净离心管 (Beckman) 中。将沉淀物平铺于上层或底层, 然后进行超离心 (SW40 T1 / 160000 × g / 16h / 4°C)。将 RI 为 1.363-1.368 的分级部分, 其中含有最高纯度的分泌颗粒, 收集起来, 而线粒体和溶酶体则被分离到 RI 大于 1.371 的分级部分中。通过使用放射性免疫测定胰岛素 (结晶的颗粒核)、糊精 (颗粒基质), 检测所制备颗粒的完整性; 通过芳香基硫酸酯酶 (溶酶体) 和柠檬酸合酶 (线粒体) 的功能测定, 检测纯度; 并采用 Bicinchoninic acid (Pierce) 测定总蛋白质含量。

RP-HPLC

顺序进行两次 RP-HPLC (A: 0.08% TFA 体积/体积; B: 80%乙腈 + 20%A; Applied Biosystems 140B/785A/112A 系统: Jupiter C18 RP 柱, 250 × 2.0 毫米 (Phenomenex): 250-300 微升/分钟; A₂₁₄), 纯化颗粒蛋白质。在上柱前, 首先将分泌性颗粒物离心 (16000 × g, 20 分钟)。开始的 15 分钟采用等度洗脱, 并在注射后 19 分钟时开始顺序收集, 每 30 秒一个分部收集部分。为了纯化蛋白质, 顺序使用了略微不同的梯度: 第一次 RP-HPLC 得到的是半纯化的颗粒蛋白质, 而第二次 RP-HPLC 使用了更加平缓的梯度, 以提高分辨率和纯度。

肽序列分析

采用 N-末端序列测定 (自动化的 Edman 法; ABI Procise™) 并结合 MALDI-TOF MS 精确测定质量, 对纯化的肽进行鉴定。为了验证全序列, 使用 Lys-C (Boehringer Mannheim) 对纯化的小鼠 preptin 分离物进行切割, 然后将所得到的肽片段用 RP-HPLC 再纯化。

MALDI-TOF MS 质谱

采用装备有 500 兆赫数字示波器 (G2030AA, LeCroy) 的 MALDI-TOF MS (惠普公司 (Hewlett-Packard) G2025A: 337 纳米氮激光发射光/最大输出 150 微焦耳/脉冲宽度 9 纳秒/90 千伏离子加速电压), 采用加入了重组人胰岛素 (Novo Nordisk; M+H⁺, 5808.66 Da; M+2H⁺, 2904.83) 以及生长抑素 (Bachem, M+H⁺, 1638.91; M+Na⁺, 1660.90) 的一种 α-CHC 基质作为分子量标准, 以确定肽的分子量。在高真空度 (小于 1.0 微托) 下进行 MS, 并且采用外质量标定法以“单次发射”方式进行数据采集 (ChemStation: 0-20PS 方法, 阳极性 (positive

polarity) 在 0-20 kDa 范围内)。通过采用外质量标准化内插法, 确证纯化的肽的精确分子量。

大鼠 preptin 的化学合成

通过与已知的推定 IGF-II 序列进行比较, 对大鼠和人的 preptin 的序列进行了确定。根据推定的序列, 采用 Fmoc 化学、在肽合成仪器 (Advanced Chem Tech 396 Robotics Peptide Synthesiser) 上、用 FmocLeu-Wang 树脂起始, 化学合成大鼠的 preptin (Auspep Pty, Australia (澳大利亚))。将肽脱保护并采用 92.5% TFA : 2.5% 水 : 2.5% 三异丙基硅烷 : 2.5% 二硫苏糖醇的溶液, 处理 3 小时从而将肽从树脂上切下。通过加入二异丙醚将肽从 TFA 溶液中沉淀出来, 接着将沉淀溶解于 30% 乙腈 : 水中, 冻干并用 RP-HPLC 纯化。用分析型 RP-HPLC 测定 (大鼠 preptin 在 47%B 时被洗脱下来) 证实纯度为大于 99%, 与此同时, MALDI-TOF MS 确证的质量为 $3932.4 \text{ Da} \pm 0.026\%$ 。

preptin 的放射性免疫测定

采用戊二醛一步法于 pH7.0, 将合成的大鼠 preptin 与载体卵清蛋白偶联, 接着用它在 NZW 兔中产生多克隆抗血清。采用氯胺 T 法将 preptin 进行 ^{125}I -放射性标记, 然后用 Sephadex G-10 层析 (50 mM 磷酸缓冲液, pH7.5) 纯化 [^{125}I] preptin (362 微居/微克)。接着, 开发了用于 preptin 的最优化 RIA, 其中通过采用 PEG 辅助的第二抗体将 B/F 分开 (山羊-抗-兔法)。该法采用了终稀释度为 1: 10000 的抗血清 (测定时的终稀释度为 1: 30000), R/T 值为 0: 30; 示踪器的读数为每管 8000 计数/分钟 (cpm); 温育时间为 24 小时 + 72 小时; EC_{20} 值为 344 pM preptin; EC_{50} 为 39 pM; 最低检测浓度为 $11.2 \pm 9.8 \text{ pM}$; 与啮齿类 (大鼠/小鼠) 胰岛素和糊精无交叉反应。

preptin 的细胞分泌

在 β TC6-F7 细胞 (传代数[#]52) 中对 preptin 的分泌进行了研究, β TC6-F7 细胞是在 24 孔板中以 4×10^5 个细胞/孔进行培养的, 其它培养条件同上。对 preptin 的刺激是在生长 3 天后达到 80% 汇合时实施的。在进行分泌研究开始之前, 将细胞在用 HEPES 缓冲的 KRB 中洗两次, 接着在 1 毫升/孔的温育缓冲液 (0 mM 葡萄糖; 0.1% 溶于 HEPES-KRB 中的 Fraction V BSA (Sigma) 重量/重量) 中预温育 1 小时, 之后从每

孔中移出 500 μ l, 并补充以等体积的含有多种浓度葡萄糖的新鲜温育缓冲液。在温育 (37 $^{\circ}$ C) 2 小时后, 将温育介质移出, 用 PBS 洗细胞三次, 然后用裂解缓冲液裂解。接着, 采用已描述的 RIA, 对温育上清液和细胞裂解物进行胰岛素和 preptin 含量测定。在分开的实验中, 对激素分泌的时间依赖性也进行了测定。

分泌的 preptin 样免疫反应性物质 (PLIM) 的表征

既然 preptin 是 IGF-II 之 E-肽的一种切割产物, 并且过去已从血清中分离出源自一个更小区域的其它切割产物 (Hylka (1985); Daughaday (1992); Liu (1993)), 所以采用 preptin RIA 定量并不能充分地表征该被分泌和循环肽的特性。因此, 开发了 RP-HPLC / preptin RIA 相结合的方法, 以进一步表征 PLIM。将 2ml 来自一个人供体的分离血浆分装物和 2ml β TC6-F7 条件培养液, 分别用 0.1ml 4 M 乙酸酸化, 然后加载到已用 10 ml 100% 甲醇和 20 ml 4% (体积/体积) 乙酸预平衡的 C-18 Sep Pak (Waters, 1ml 体积) 上。先用 20 ml 4% 乙酸洗 Sep Pak, 然后用 2 ml 于 70% 甲醇中的 0.1M 乙酸洗脱结合组分, 然后通过旋转蒸发将洗脱液的最终体积减小至 150 μ l。接着, 对洗脱液按上面所述进行 RP-HPLC, 合并多次层析操作的相应的分部收集部分。将很可能含有 preptin 和胰岛素的分部收集部分进行 MALDI-TOF MS。接着, 用 preptin 测定缓冲液将所有分部收集部分的体积补至 350 μ l, 然后采用 RIA 对 preptin 和胰岛素进行分析。为了比较这些分泌产物的免疫反应性图谱与颗粒内物质的图谱 (图 1b), 将 10 μ l 来自初始的 RP-HPLC 颗粒分部收集部分用 preptin RIA 缓冲液稀释至终体积 610 μ l, 也进行胰岛素和 preptin 测定。

在分离的大鼠骨骼肌中糖类代谢的速率

在外周组织包括骨骼肌中, β -细胞激素糊精和胰岛素调制糖类的利用。在对比目鱼肌进行分离、温育和剥离后, 将其用作模型组织, 对 preptin 改变葡萄糖吸收及掺入到肌肉糖原中的能力进行了研究。所实施的所有动物方法, 均已得到了动物道德委员会组织 (Institutional Animal Ethics Committee) 的恰当许可。将雄性 Wistar 大鼠 (200 \pm 20 g) 饲养于条件受控的房间 (20 $^{\circ}$ C, 12 小时光/暗循环) 内, 并给予标准的大鼠食物 (Diet 86. NRM Tegel, Auckland) 和随意饮水。将禁食 18 小

时的大鼠麻醉（戊巴比妥钠 45mg/kg），并采用颈脱位法将其处死，随后在生碳氧-KHB（O₂与CO₂的比例为95:5 体积/体积）下解剖比目鱼肌，接着将其温育在补充了多种浓度的胰岛素和 preptin 的 nDMEM 中。将肌肉沿纵向挑开为 3 个等条，每条的最终半径为大约 1.5mm。将[(U)¹⁴C]D(+)-葡萄糖（1 毫居/毫升，Amersham）按 1: 20（体积/体积）稀释于 70%乙醇中，所得终浓度为 0.5 微居/10 微升。将 Actrapid[®] 重组的人胰岛素（100 单位/毫升，Novo Nordisk）按 1: 1000 稀释于 10 毫升 nDMEM 中。将 60 μg 大鼠 preptin 溶解于 1526 μl nDMEM 中，至浓度为 10 μM，然后在 nDMEM 中进一步稀释，以获得 1 μM、100nM、10 nM、100 pM 和 1 pM 的储存液。采用两个不同的实验范例，以确定 preptin 是（i）刺激葡萄糖掺入糖原中的速率，还是（ii）作为胰岛素引起的葡萄糖掺入糖原中的拮抗剂。

preptin 拮抗剂的温育方法

将四个肌肉条转至一个瓶中，共转入 9 个瓶，每瓶含有生碳氧（carboxygenated）nDMEM、0（对照）或最有效胰岛素（23.7 nM）和多种浓度的 preptin（10fM, 100fM, 1pM, 0, 10 pM, 100pM, 1nM 或 10nM），共 10 ml。接着，将瓶子在摇动水浴（30℃，20 分钟）中平衡，在此之后，按精确的 1.5 分钟间隔，加入 10 μl（0.5 微居）D- [(U)¹⁴C] 葡萄糖。接着，在卡波金（carbogen）下，将肌肉条在 30℃温育 120 分钟。温育后，按 1.5 分钟间隔，将肌肉条从每个瓶子中移出，吸干水分。将这些肌肉条在液氮中急速冷冻，随后在预称重的管中进行 24 小时冻干，接着确定肌肉条的干重。然后，将肌肉条在 250 μl 60%KOH 中进行溶解，在 70℃温育 45 分钟，冷却后用冰冷的乙醇在 -20℃沉淀过夜。接着，通过离心（9000×g，15 分钟，0℃）制备糖原沉淀物，然后将沉淀物再悬浮，再沉淀两次，最后吸出上清液并将糖原沉淀物在 70℃放置 2 小时进行彻底干燥。这时，通过闪烁计数可以确定出 ¹⁴C 的掺入量。

preptin 激动剂方法

除了在对肌肉条进行温育时，其中不含胰岛素（但阳性对照除外，其中含有 23.7 nM 胰岛素）以及 preptin 的终浓度为 0, 0.1, 1, 10 和 100nM 外，其余所有方法按如上描述。

preptin 对胰岛素分泌的效应

已知胰岛素和糊精通过推测的自分泌机制, 调制 β -细胞的胰岛素分泌。因此, 采用 β -细胞促分泌素方法, 对 *preptin* 对胰岛素分泌的效应进行了测定。将 β TC6-F7 细胞在传代数[#]52 时, 次代培养于 24 孔板中, 4×10^5 个细胞/孔。将它们在 nDMEM 中培养 3 天, 生长至 80% 汇合, 接着用 KRB-HEPES 洗两次。将 *preptin* 储存液系列稀释于含有 10mM D(+)-葡萄糖的温育培养液中, 所得溶液的 *preptin* 终浓度分别为 150, 75, 25, 5, 1 和 0.1nM。然后洗细胞, 并将含有 10mM 和多种终浓度的 *preptin* 的温育培养液, 按 1 毫升/孔加入到每孔中。将细胞在 37°C 温育 2 小时, 然后移出培养液。用 PBS 洗细胞三次, 然后用 500 μ l 裂解缓冲液进行裂解。将温育培养液离心 (16000 \times g, 3 分钟), 并将上清液与沉淀的碎片分开。接着, 对温育培养液和裂解物按上面所述进行胰岛素、*preptin* 和蛋白质分析。

结果

上述实验的结果见图 1、2 和 3。

讨论

小鼠的 *preptin* 是一个 34 个氨基酸的肽, 它相当于鼠 proIGF-II E-肽的 Asp₆₉-Leu₁₀₂。

通过对 RP-HPLC 的峰面积进行积分, 测定出 *preptin* 在颗粒中存在的含量是胰岛素的八分之一, 但却是糊精含量的两倍 (摩尔/摩尔)。在 *preptin* 的 NH₂-末端侧翼是一个已识别的 Arg 切点, 在 *preptin* 的 COOH-末端侧翼是一个推定的双碱性 (Arg-Arg) 切割基序 (Bell (1984)) (图 1e)。这些残基在不同物种之间高度保守, 并且很可能是翻译后的加工信号。许多激素原的前体是多于一种激素的结合体, 其中带有不同的并常常是组织特异性的蛋白分解加工机制 (Martinez (1989))。上面的结果表明, proIGF-II 是一种含有多于一种肽激素产物的激素原。

IGF-II 是胰岛素家族的一员, 它调节着细胞的生长、分化和代谢 (De Chiara 等人 (1990))。IGF-II 是一条单多肽链, 源自 proIGF-II 的 BCA 和 B 结构域 (见图 1e), 并且在胎儿和成年组织中有广泛的合成。而胰岛素的表达, 却几乎完全限制于 β -细胞。在哺乳动物的基因组中,

IGF-II 基因与胰岛素基因邻近 (Bell (1985)), 而且最近在对人的研究中, 在 *INS* 和 *IGF-II* 基因的上游已鉴定出一种 VNTR 多态性, 这也许有助于这两种基因的差异性调节 (Ong (1999))。

对 preptin 的放射性免疫测定 (RIA) (图 2a) 以及用 preptin RIA 对图 1a 颗粒纯化图谱的再分析, 发现 preptin 与胰岛素和糊精被共纯化, 从而证实它确实是一种颗粒成分。通过对纯化的颗粒以及 β TC6-F7 细胞条件培养液进行 RP-HPLC/RIA, 对 preptin 样免疫反应性物质 (PLIM) 进行了表征。颗粒内和细胞外的 PLIM 的主要形式, 在 RP-HPLC 上均被共洗脱 (图 2b)。对相当于来自 β TC6-F7 细胞之 PLIM 峰的 HPLC 纯化物质所作的质谱表明只有一种物质存在, 其分子量与鼠 preptin 的分子量完全相同 (图 2c)。RP-HPLC 还证明, 人和大鼠血浆的 PLIM 的主要形式与颗粒内的鼠 preptin 共洗脱。preptin 与胰岛素一起从 β TC6-F7 细胞中共分泌, 以应答葡萄糖刺激 (图 2d), 在 1mM 或更高浓度葡萄糖时达到了最高水平。

这些结果证实, preptin 在胰岛 β -细胞中合成, 并被包装于分泌性颗粒中。此外, 它与胰岛素一起以葡萄糖依赖方式共分泌。

有证据表明: 胰岛素的分泌可被包括胰岛素 (Kulkarni (1999); Elahi (1982); Argoud (1987))、糊精 (Waggoner 等人 (1993); Silvestre (1996); Degano 等人 (1993)) 和胰抑制素 (Tatemoto (1986)) 在内的胰岛 β -细胞激素调制。一般认为它们是通过自分泌性的负反馈回路起作用, 并通过与特异的细胞表面受体结合被介导。因而, 对 preptin 对胰岛素分泌的效应进行了研究。所获得的结果表明: 合成的大鼠 preptin, 以一种既是浓度依赖性的又有饱和性的方式, 增强葡萄糖 (10 mM) 刺激胰岛素从培养的 β TC6-F7 细胞分泌 (图 3a)。在浓度为 0.1nM 和更高时, 与对照 (没有加 preptin) 相比, 检测到 preptin 的显著效应, 并在 75nM 时达到了最大效应。也正是在该浓度下, 糊精引起胰岛素分泌的抑制 (Degano 等人 (1993))。这些 preptin 浓度与 β TC6-F7 细胞分泌的浓度相似 (图 2d), 因而它们非常可能在生理性胰岛中于原位发生于 β -细胞细胞膜的附近。对 preptin 刺激胰岛素分泌的浓度依赖性和饱和性的证实, 提示 preptin 是通过与细胞表面受体结合而引起这些效应。

对分离的被灌注的大鼠胰脏采用最有效的 preptin 浓度 (75nM), 注入合成的大鼠 preptin, 测定了它在其中对葡萄糖 (20 mM) 刺激的胰岛素分泌的效应 (图 3b)。与对照 (没有加 preptin) 值相比, preptin 显著地增强 (增强 30%; $p=0.03$, 曲线下面积的双尾部 t-试验) 胰岛素的第二期分泌 (图 3b)。这些发现与从 β TC6-F7 细胞得到的那些结果 (图 3a) 是一致的。它们提示: preptin 是胰岛素分泌的一种生理调节子, 它以一种新认识到的前反馈自分泌性回路方式, 增强葡萄糖刺激的胰岛素分泌, 而且也许在抗衡其它 β -细胞激素对胰岛素分泌的抑制效应中发挥作用。

因此, 本发明申请人的观点是: preptin 以一种局部方式, 在恢复、引发和协调 β -细胞对葡萄糖的应答活性中起作用, 将葡萄糖引发的信号放大给 β -细胞器官。这种作用与前反馈机制相似, 凝血酶所引发的血栓烷 A_2 的释放在血小板中就产生出这种机制 (Barritt (1992))。

一种以前未意料到的机制的存在, 通过这种机制一种新的胰岛 β -细胞激素将葡萄糖介导的胰岛素分泌放大, 提示 preptin 的生物学将在 II 型糖尿病中很重要, II 型糖尿病的特征在于一种复杂的胰岛素分泌损害 (De Fronzo 等人 (1992))。在 preptin 的合成、分泌或作用方面的缺陷, 会促成这种情况下葡萄糖介导的胰岛素分泌的缺陷, 施用 preptin 也许对治疗 II 型糖尿病或者其它与 β -细胞减少胰岛素分泌相关的疾病有帮助。要指出的是, 在人类中, 位于相邻的胰岛素 (INS) 和 IGF-II 基因之上游的串联重复数目变化 (VNTR) 的多态性, 调节着这两个基因的表达, 并且与 II 型糖尿病和多囊性卵巢综合症这两种疾病的增加趋势相关。

第二部分

preptin 与胰岛素共包装于胰岛组织中

为了研究 preptin 的生理学, 通过采用对 preptin 特异的抗血清, 对正常的鼠胰脏进行了免疫组化研究。将按上面所述 (Auspep Pty Ltd) 制备的合成大鼠 preptin, 采用戊二醛一步法于 pH7.0 与卵清蛋白偶联 (Harlow 和 Lane)。采用新西兰白兔, 用于产生针对大鼠 preptin 偶联物的多克隆抗血清。

采用苏木精及专一性地抗 preptin 或抗胰岛素的抗血清和采用山羊-抗-兔免疫过氧化物酶标记的第二抗体,并对所有染色剂进行 40 倍终稀释(体积/体积),对来自正常的成年小鼠(FVB/n)胰脏的系列切片进行染色。先将 preptin (1 或 5 mg/ml)与抗-preptin 抗血清预温育 30 分钟,然后再将其加入切片,以证实 preptin 免疫染色的特异性。

preptin 样免疫反应性物质(PLIM)和胰岛素样免疫反应性物质已被共定位于胰岛 β -细胞中(图 4a,b)。竞争性研究表明:将 preptin 抗血清与合成的 preptin 预温育,会以浓度依赖方式抑制 PLIM 染色(图 4b-d)。这些研究提示 preptin 存在于生理性的胰腺胰岛 β -细胞中。

PLIM 存在于正常的胰岛组织中

为了证实正常胰岛组织中的 PLIM,我们对来自分离的大鼠胰岛的酸性乙醇提取物进行了 RP-HPLC/RIA。胰腺胰岛是分离自正常的成年雄性 Wistar 大鼠,并根据已发表方法(Wollheim 和 Sharp (1981); Romanus (1988))的修改本,对内含物用酸性乙醇抽提。

结果见图 5。

尽管 preptin 的水平比在 β TC6-F7 细胞中低许多,但是 PLIM 的主峰与颗粒内的 preptin 被共洗脱下来,这表明在正常的胰岛中 preptin 是 PLIM 的占主导地位的生理成分(图 5)。这些数据证实:从 β TC6-F7 细胞纯化的 preptin 并不只是一种在纯化过程中由蛋白裂解产生的人工产物,而是 preptin 就以这种形式存在并从 β TC6-F7 细胞以及正常的大鼠胰岛分泌出来。

在对葡萄糖刺激的应答中 preptin 与胰岛素共分泌

由于已知 preptin 与胰岛素共定位于 β -细胞分泌性颗粒中,所以进行实验以确定 preptin 和胰岛素是否以受调节的方式共分泌。根据已发表的方法,采用 β TC6-F7 细胞(Efrat 等人(1993); Knaack 等人(1994))以及分离的大鼠胰岛(Gotoh 等人(1987)),对葡萄糖刺激的肽分泌进行了研究,并且通过使用特异性的 RIA 对 preptin 和胰岛素的浓度进行了测定。

结果见图 6。这些结果表明:当 β TC6-F7 细胞对亚生理浓度的葡萄糖(小于 5mM)应答(S Efrat, 私人通讯)的同时,从 β TC6-F7 细胞(图 6a)以及正常的大鼠胰岛(图 6b)观察到清晰的胰岛素/preptin

共分泌型式。从胰岛组织（preptin 与胰岛素的比例为 1: 500）分泌的 preptin 的量比从 β TC6-F7 细胞（preptin 与胰岛素的比例为 1: 8）分泌的水平低许多。该观察结果支持了 HPLC/RIA 结果，它表明在生理性组织中 preptin 的水平比培养的 β -细胞中的 preptin 水平低许多。尽管 preptin 的水平在生理性组织中低许多，但是这两个模型都明确地表明：为了应答葡萄糖刺激，preptin 与胰岛素一起从生理性胰岛 β -细胞共分泌。

去除内源性 preptin 显著地减少了胰岛素从分离的被灌注的大鼠胰脏分泌。为了确定内源性的胰脏 preptin 在胰岛素的分泌中可能扮演的角色，通过注入抗-preptin 抗体到分离的被灌注的胰脏模型中，将内源性的 preptin 作用去除，做法如下：

用补充了 4% 葡聚糖、0.5% BSA、3mM 精氨酸、5.5mM 葡萄糖（最终浓度）的 KHB 对胰脏进行灌注。用 95% O₂ / 5% CO₂ 混合物对灌注液充气，并采用蠕动泵将其以 2.7ml/min 的速度无再循环注入。在每次 70 分钟的灌注之前，先对胰脏进行灌注及平衡 20 分钟。在进入实验 10 分钟时，将抗-preptin 的 γ -球蛋白或未免疫的兔 γ -球蛋白，通过侧臂注入（在灌注液中 γ -球蛋白的终浓度为：35 μ g/ml 于载体缓冲液（0.1% BSA 于 0.9% NaCl 中）中）。此外，在 25 分钟时，用 20 分钟时间将葡萄糖注入（在灌注液中测定的终浓度为 20mM）。于冰上收集 1-分钟连续分部收集部分，然后对其测定胰岛素（RIA）。

采用 Protein A 亲和层析（Pharmacia Biotech, Hi-Trap Protein A *Tech Rep.* Wikstroms, 瑞典（1999）），对兔抗-大鼠 preptin 的 γ -球蛋白或对照（未免疫的兔） γ -球蛋白进行纯化，以减小来自其它血清组分的潜在影响。采用 MALDI-TOF MS，对这两种不同的 γ -球蛋白分级部分的组成进行了确定（图 7a, b），并且在模拟如上所述的抗体灌注实验的条件下，对这两种不同的 γ -球蛋白分级部分的结合能力进行了测定。在被灌注的胰脏实验条件下，由抗-preptin 的 γ -球蛋白完全结合的 preptin 的最大量为 20ng/min（图 7c）。

对分离的被灌注的胰脏注入抗-preptin 或对照的 γ -球蛋白，并用 20mM 葡萄糖对其进行方波刺激（图 7d）。抗-preptin 的 γ -球蛋白使胰岛素的第一以及第二期分泌均显著地降低（第一期：与对照相比平均

抑制 29%， $P=0.02$ ，单尾部 t-试验；第二期：与对照相比平均抑制 26%， $P=0.03$ ，曲线下面积的单尾部 t-试验)。在这个实验中，我们已经表明：除去内源性的循环的 preptin，会引起葡萄糖介导的胰岛素分泌的显著减少。如果已估计出 preptin 在生理性胰岛中存在的浓度相当低（大约比胰岛素低 500 倍），并且仍然能够对胰岛素分泌施加显著效应，那么这个结果将是非常非常有趣的。这些实验结果与这样的前提是一致的，即胰腺的 preptin 生理浓度扮演着一个自分泌性角色，以提高葡萄糖介导的胰岛素分泌。这种作用也许与由凝血酶引发的血栓烷 A_2 的释放而在血小板中引起的前反馈机制相似（Barrit（1992））。

总结论

总之，preptin 是一种以前未知的胰腺胰岛 β -细胞激素。它由 pro-IGF-II 的 E-肽产生，在胰岛 β -细胞颗粒中以显著量存在，以一种受调节方式与胰岛素共分泌，增强葡萄糖刺激的胰岛素分泌，并且很可能通过与 β -细胞表面受体结合而在前反馈自分泌性回路中可能起作用。

工业应用

正如上面所描述，本发明提供了 preptin（包括其人、大鼠和小鼠形式）以及 preptin 的类似物。preptin 和它的类似物在刺激由葡萄糖引起的胰岛素分泌中，扮演着一个生理性角色。

因而本发明也提供了这样一些方法，采用这些方法可以对葡萄糖引起的胰岛素分泌进行调制。这样的调制将通常包括按如上所述施用 preptin 及其类似物。但是，使用 preptin 的激动剂和拮抗剂也可以实现调制。

preptin 激动剂就是能够促进或加强 preptin 对胰岛素分泌的效应的化合物。与此相反，preptin 拮抗剂就是能够与 preptin 竞争或者反而能够与 preptin 反应，从而封阻或减小 preptin 对胰岛素分泌的效应的化合物。

在存在和不存在试验化合物的情况下，通过对那些能够测量 preptin 对胰岛素分泌效应的系统进行测定，就可以对 preptin 激动剂和 preptin 拮抗剂进行鉴定。例如，可以使用在本文的实验部分中描述的测定系

统。

在调制胰岛素分泌中，当需要使用 preptin 激动剂或 preptin 拮抗剂时，可以将激动剂/拮抗剂以纯的化合物施用，或者配制为如上所述的 preptin 的药物组合物。

本专利也提供了结合 preptin 的免疫试剂。这样的免疫试剂（它们可以是多克隆抗体）可通过使用本领域的标准技术来产生，其中包括在实验部分中描述的那些技术。

也可以提供单克隆抗体。这样的抗体一般是通过标准程序，正如在例如 Harlow 和 Lane 1988 中所描述的，来进行制造。概括地讲就是选择合适的动物并按所希望的免疫程序进行。经过一段合适的时间后，将这样的动物的脾脏摘除，然后将单个脾脏细胞一般地与永生化的骨髓瘤细胞，选择合适的条件进行融合。此后，将细胞克隆性地分开，并对每个克隆的上清液所产生的对免疫原之所希望部分特异的合适抗体进行测试。

用于制备抗体的其它合适的技术包括将淋巴细胞在体外暴露给抗原，或者替代性地，也可以筛选位于噬菌体或类似载体中的抗体文库，例如，参见 Huse 等人 1989。

另外，通过采用本领域已知的方法，可以产生重组抗体。见例如，美国专利 4816567。

可以使用带或不带修饰的抗体。经常通过共价或非共价方式将抗体与一种提供检测信号的物质连接，从而对抗体进行标记。已知有多种不同的标记物和偶联技术，并在文献中对它们有广泛的报道。

因而，可以将针对 preptin 的如上抗体用于监测患者或者在 preptin 定量测定中 preptin 的存在。在这样的测定中，可以采用任何方便的免疫学方法。这样的方法包括免疫组化测定法、RIA、IRMA 和 ELISA 测定法。

这些测定法可用于有关肯定或应该含有 preptin 的任何生物液。这样的液体包括血液、血清、血浆、尿液和脑脊液。

也可以将抗体包含在测定试剂盒中。这样的试剂盒可以另外含有若干任选的但却带来方便的成分，选择这些试剂盒对本领域的技术人员来讲属常规工作。但是，试剂盒中的那些另加组分将一般包括一个

preptin 参考标准，它可以是 preptin 本身，或是一种类似物（诸如一个片段）。

这种情况将是令人满意的：诸如上面所述的抗体在某些情况下，通过与 preptin 结合，也能作为 preptin 的拮抗剂发挥作用，从而部分或完全地干扰 preptin 的活性。

正如前面所暗示，本发明申请人在 preptin 方面的发现，也具有诊断含义。例如，为了引发胰岛素分泌至合适的水平，就需要一定量的 preptin，那些所产生的 preptin 比所需要的要少或者所产生的 preptin 处于活性较低或无活性（突变体）状态的个体，就需要治疗性干预。因而，诊断或预后方法也在本发明的范围之内。

在一个特定的实施方案中，诊断或预后方法将包括对编码 preptin 的基因和/或 preptin 分泌机制进行突变检测。对于检测，可以采用本领域的若干标准技术中的任何一种，包括单链确定分析（Single Stranded Confirmation Analysis）（Orita 等人（1989））或在欧洲专利申请出版物第 0332435 号中公开的抗扩增性突变系统（Amplification Refractory Mutation System）（ARMS）。

如果检测到了突变，那么就有可能给出校正方案来。校正方案包括但不限于基因治疗。此外，还将使用本领域的标准技术。

本发明申请人对 preptin 鉴定的其它含义和应用，对本领域的那些技术人员而言将是显而易见的，这些人将会理解：上面的描述只是通过举例方式提供的，而且本发明并不局限于上面的描述。

参考文献

- Draznin, B.和 LeRoith, D. (编著). II 型糖尿病的分子生物学. 胰岛素对基因表达与调节以及对葡萄糖转运的作用和效应 (Humana Press Inc., New Jersey (1994)).
- Cooper, G. *Endocr. Rev.* 15,163-201 (1994).
- Waggoner, P., Chen, C., Worley, J., Dukes, I. 和 Oxford, G. 美国国家科学院院刊 (*Proc. Natn. Acad. Sci., USA*), 90,9145-9149 (1993).
- Hettiarachchi, M., 等人. 美国生理学杂志 (*Am J. Physiol.*), 273, E859-E867 (1997).
- Hutton, 糖尿病学杂志 (*J. Diabetologia*), 12,271-281 (1989).
- Efrat, S. 等人. 糖尿病 (*Diabetes*), 42,901-907 (1993).
- Knaack, D. 等人. 糖尿病, 43,1413-1417 (1994).

- Linde, S. 等人. 色谱学杂志 (*J. Chromatogr.*) . 4642,243-254 (1989)
- Johnson, K., 等人. 美国病理学杂志 (*Am J. Pathol*), 130,1-8(1998).
- Bell, G, I., 等人. 自然 (*Nature*), 310,775-777(1984).
- Martinez, J. (编著). 肽激素前激素: 加工, 生物学活性, 药学 (*Peptide hormones prohormones: processing, biological activity, pharmacology*) (Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1989).
- DeChiara, T., Efstradiadis, A. and Robertson, E. 自然, 345, 78-79(1990).
- Kulkarni, R. 等人. 细胞 (*Cell*), 96, 329-339(1999).
- Elahi, D. 等人. 新英格兰医学杂志 (*N. Eng. J. Med.*), 306, 1196-1202(1982).
- Argoud, G., Schade, D. 和 Eaton, R. 糖尿病, 36, 959-962(1987).
- Silvestre, R. 等人. 不列颠药理学杂志 (*Br. J. Pharmacol.*), 117, 347-350(1995).
- Degano, P., Silvestre, R., Salas, M. 和 Peiro, E. *Regul. Pep.* 43,91-96 (1993).
- Tatemoto, K. 等人. 自然, 324,476-478 (1986).
- Barritt, G. 动物细胞内通讯 (*Communication within animal cells*), (Oxford University Press, Oxford, 1992).
- DeFronzo, R., Bonadonna, R. 和 Ferrannini, E. *Diabetes Care* 15,318-368 (1992).
- Hutton, J., Penn, E. 和 Peshavaria, M. 糖尿病学 (*Diabetologia*) 2, 365-373 (1982).
- Grodsky, G. 和 Fanska, R. 酶学方法 (*Methods Enzymol.*), 39,364-372 (1975).
- Stempien, M., Fong, N., Rall, L. 和 Bell, G. *DNA*, 5,357-361 (1986).
- Dull, T., Gray, A. Hayflick, J. 和 Ullrich, A. 自然, 310,777-780 (1984).
- Harlow 和 Lane (1988). 抗体: 实验室手册 (*Antibodies: A Laboratory Manual*) . (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York).
- Huse 等人. (1989). 科学 (*Science*), 246: 1275-1281.
- Orita 等人. (1989). 美国国家科学院院刊, 86: 276-277.
- Hylka, V., Teplow, D., Kent, S. 和 Strauss, D. 生物化学杂志 (*J. Biol. Chem*), 260,14417-14420 (1985).
- Daughaday, W. 和 Trivedi, B. 临床内分泌学杂志 (*J. Clin. Endocrinol. Metab.*), 75,641-645 (1992).
- Liu, F., Baker, B., Powell, D. 和 Hintz, R. 临床内分泌学杂志, 76, 1095-1100 (1993).
- Bell, G., Gerhard, D., Fong, N., Sanchez-Pescador, R. 和 Rall, L. 美国国家科学院院刊, 82,6450-6454 (1985).
- Ong, K.等人. *Nat. Genet.* 21,262-263 (1999)

序列表

<110> G·J·S·库珀
C·M·布坎南

<120> 肽

<130> 26010 MRB

<140>
<141>

<150> NZ336359
<151> 1999-06-18

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 34
<212> PRT
<213> 未知组织

<220>
<223> 未知组织的描述: 序列具有变体

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)
<223> Ser or Pro or an analog thereof

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)
<223> Gln or Pro or an analog thereof

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)
<223> Ala or Thr or an analog thereof

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)
<223> Asp or Asn or an analog thereof

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)
<223> Gln or Lys or an analog thereof

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)
<223> Tyr or Phe or an analog thereof

<220>
<221> VARIANT
<222> (28)
<223> Arg or Lys or an analog thereof

<220>
<221> VARIANT
<222> (31)
<223> Ala or Thr or an analog thereof

<220>
<221> VARIANT
<222> (32)
<223> Gly or Gln or an analog thereof

<400> 1
Asp Val Ser Thr Xaa Xaa Xaa Val Leu Pro Asp Xaa Phe Pro Arg Tyr
  1             5             10             15

Pro Val Gly Lys Phe Phe Xaa Xaa Asp Thr Trp Xaa Gln Ser Xaa Xaa
      20             25             30

Arg Leu

<210> 2
<211> 102
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(102)

<400> 2
gac gtg teg acc cct ccg acc gtg ctt ccg gac aac ttc ccc aga tac 48
Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr

```

1	5	10	15	
ccc gtg ggc aag ttc ttc caa tat gac acc tgg aag cag tcc acc cag				96
Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln				
	20	25	30	
cgc ctg				102
Arg Leu				
<210> 3				
<211> 34				
<212> PRT				
<213> 智人				
<400> 3				
Asp Val Ser Thr Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr				
1	5	10	15	
Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln				
	20	25	30	
Arg Leu				
<210> 4				
<211> 102				
<212> DNA				
<213> 家鼠属(Rattus sp.)				
<220>				
<221> CDS				
<222> (1)..(102)				
<400> 4				
gac gtg tct acc tct cag gcc gta ctt ccg gac gac ttc ccc aga tac				48
Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr				
1	5	10	15	
ccc gtg ggc aag ttc ttc aaa ttc gac acc tgg aga cag tcc gcg gga				96
Pro Val Gly Lys Phe Phe Lys Phe Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly				
	20	25	30	
cgc ctg				102
Arg Leu				

<210> 5

<211> 34

<212> PRT

<213> 家鼠属(Rattus sp.)

<400> 5

Asp	Val	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	Asp	Asp	Phe	Pro	Arg	Tyr
1				5				10						15	

Pro	Val	Gly	Lys	Phe	Phe	Lys	Phe	Asp	Thr	Trp	Arg	Gln	Ser	Ala	Gly
			20					25					30		

Arg Leu

<210> 6

<211> 102

<212> DNA

<213> 鼠属(Mus sp.)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(102)

<400> 6

gac	gtg	tct	acc	tct	cag	gcc	gta	ctt	ccg	gac	gac	ttc	ccc	aga	tac	48
Asp	Val	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	Asp	Asp	Phe	Pro	Arg	Tyr	
1				5				10						15		

ccc	gtg	ggc	aag	ttc	ttc	caa	tat	gac	acc	tgg	aga	cag	tcc	gcg	gga	96
Pro	Val	Gly	Lys	Phe	Phe	Gln	Tyr	Asp	Thr	Trp	Arg	Gln	Ser	Ala	Gly	
			20					25					30			

cgc	ctg															102
Arg	Leu															

<210> 7

<211> 34

<212> PRT

<213> 鼠属(Mus sp.)

<400> 7

Asp	Val	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	Asp	Asp	Phe	Pro	Arg	Tyr
1				5				10						15	

Pro Val Gly Lys Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Arg Gln Ser Ala Gly
 20 25 30

Arg Leu

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:作为实例提供

<400> 8

Ala Ser Thr Pro Gly

1 5

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:作为实例提供

<400> 9

Asn Asp Glu Gln

1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:作为实例提供

<400> 10

Met Glu Ile Val

1

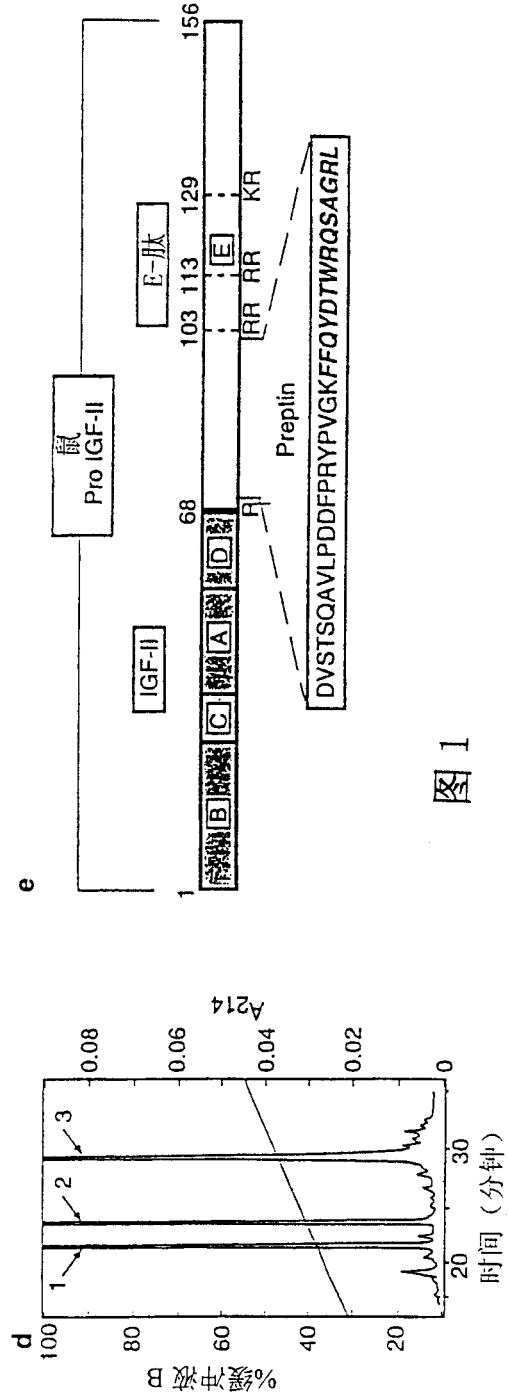
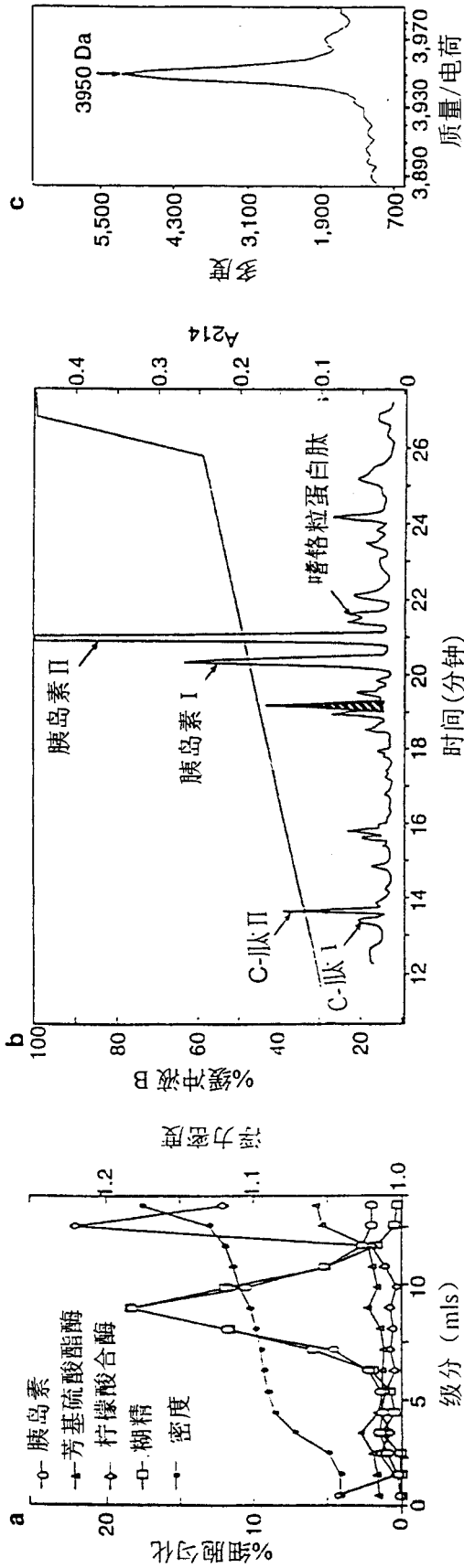


图 1

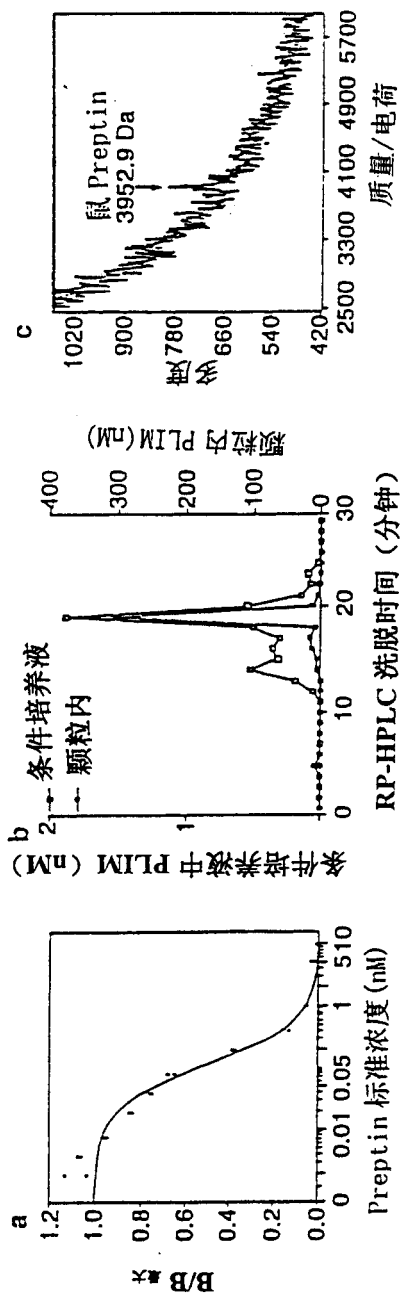


图 2

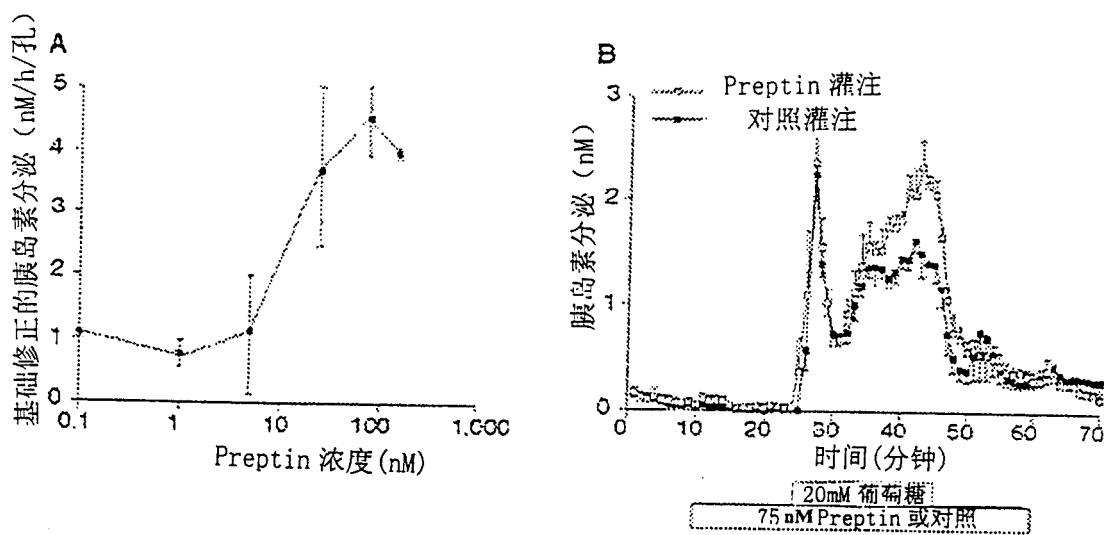


图 3

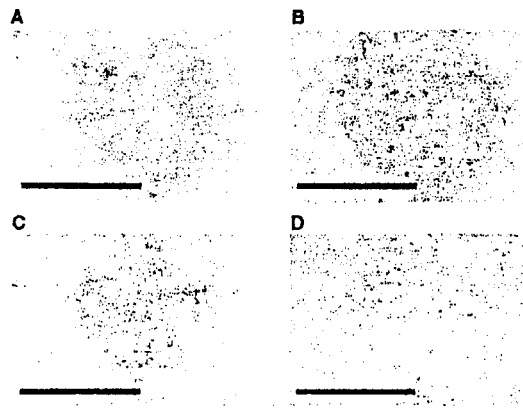


图 4

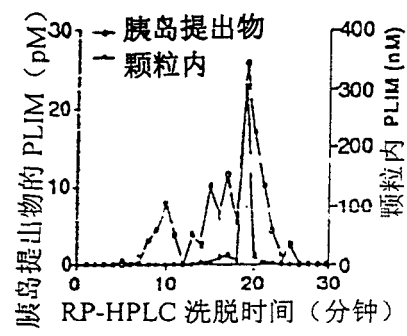


图 5

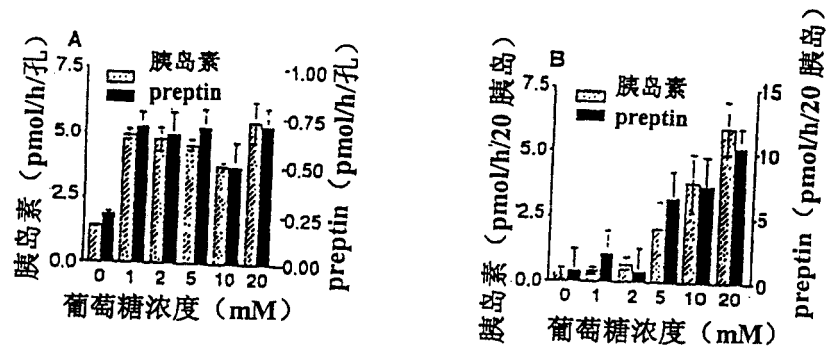


图 6

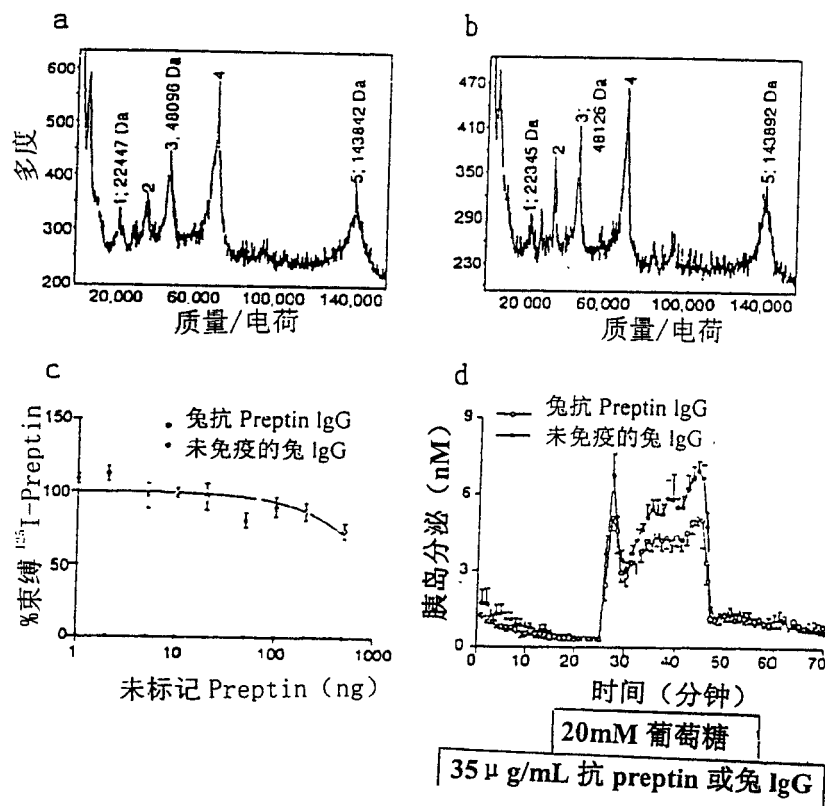


图 7

专利名称(译)	具有preptin功能的肽		
公开(公告)号	CN1296384C	公开(公告)日	2007-01-24
申请号	CN00808785.7	申请日	2000-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	普罗特米克斯公司		
申请(专利权)人(译)	普罗特米克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	普罗特米克斯发现有限公司		
[标]发明人	GJS库珀 CM布坎南		
发明人	G·J·S·库珀 C·M·布坎南		
IPC分类号	C07K14/47 C07K7/06 C07K7/04 C07K16/18 A61K38/17 A61K38/08 A61K38/10 A61P5/50 C12N15/12 G01N33/53 A61K9/08 A61K38/00 A61K38/22 A61K45/00 A61K47/12 A61P3/10 A61P43/00 C07K7/08 C07K14/65 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/65 A61K38/00 A61P3/10 A61P5/50 A61P43/00		
代理人(译)	程伟		
优先权	336359 1999-06-18 NZ		
其他公开文献	CN1355813A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种哺乳动物的生物活性肽。尤其是，本发明涉及一种由胰腺胰岛β-细胞分泌的刺激胰岛素分泌的肽，称为preptin。本发明还尤其提供了preptin的类似物、含有preptin或其类似物的药物组合物以及它们作为药物的用途。

