(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103703016 A
(43)申请公布日 2014.04.02

(21)申请号 201280036356.X
(22)申请日 2012.05.25
(30)优先权数据
61/519,747 2011.05.26 US
61/519,746 2011.05.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/039743 2012.05.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/162679 EN 2012.11.29
(71)申请人 凤凰制药公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 吕荣铭 张肇康
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 庞东成 解延雷
(51)Int.Cl.
C07K 7/00(2006.01)
C07K 1/113(2006.01)

权利要求书4页 说明书14页
序列表22页 附图22页

(54)发明名称

菲尼克斯蛋白肽

(57)摘要

本发明涉及人菲尼克斯蛋白肽、类似物和模拟物，其可用于生产抗菲尼克斯蛋白抗体、诊断筛查和检验，以及调节细胞内 cAMP 浓度和治疗与细胞中 cAMP 或 Ca^{2+} 浓度有关的疾病、调节高血压和心血管功能以及调节促性腺激素细胞和胃排空。

CN 103703016 A

1. 一种经纯化分离的多肽，所述多肽包含下述序列中的任一种：SEQ. ID NO:2、SEQ. ID NO:3、SEQ. ID NO:4、SEQ. ID NO:5、SEQ. ID NO:6、SEQ. ID NO:7、SEQ. ID NO:8、SEQ. ID NO:9、SEQ. ID NO:10、SEQ. ID NO:11、SEQ. ID NO:12、SEQ. ID NO:13、SEQ. ID NO:14、SEQ. ID NO:15、SEQ. ID NO:16、SEQ. ID NO:17、SEQ. ID NO:18、SEQ. ID NO:19、SEQ. ID NO:20、SEQ. ID NO:21、SEQ. ID NO:22、SEQ. ID NO:23、SEQ. ID NO:24、SEQ. ID NO:25、SEQ. ID NO:26、SEQ. ID NO:27、SEQ. ID NO:28、SEQ. ID NO:29、SEQ. ID NO:30、SEQ. ID NO:31、SEQ. ID NO:32、SEQ. ID NO:33、SEQ. ID NO:34、SEQ. ID NO:35、SEQ. ID NO:36、SEQ. ID NO:37、SEQ. ID NO:38、SEQ. ID NO:29、SEQ. ID NO:40、SEQ. ID NO:41、SEQ. ID NO:42、SEQ. ID NO:43、SEQ. ID NO:44、SEQ. ID NO:45、SEQ. ID NO:46、SEQ. ID NO:47、SEQ. ID NO:48、SEQ. ID NO:49、SEQ. ID NO:50、SEQ. ID NO:51、SEQ. ID NO:52、SEQ. ID NO:53、SEQ. ID NO:54、SEQ. ID NO:55、SEQ. ID NO:56、SEQ. ID NO:57、SEQ. ID NO:58、SEQ. ID NO:59 和 SEQ. ID NO:60。

2. 如权利要求 1 所述的经纯化分离的多肽，所述多肽由下述多肽中的任一种构成：由 SEQ. ID NO:2 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:3 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:4 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:5 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:6 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:7 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:8 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:9 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:10 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:11 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:12 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:13 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:14 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:15 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:16 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:17 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:18 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:19 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:20 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:21 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:22 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:23 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:24 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:25 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:26 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:27 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:28 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:29 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:30 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:31 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:32 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:33 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:34 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:35 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:36 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:37 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:38 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:39 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:40 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:41 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:42 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:43 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:44 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:45 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:46 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:47 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:48 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:49 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:50 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:51 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:52 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:53 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:54 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:55 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:56 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:57 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:58 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:59 构成的多肽和由 SEQ. ID NO:60 构成的多肽。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的经纯化多肽，其中，所述经纯化分离的多肽发生至少一个保守性氨基酸替换。

4. 如权利要求 4 所述的经纯化多肽，其中，所述至少一个保守性氨基酸替换包括用 D 型氨基酸残基替换 L 型氨基酸残基。

5. 如权利要求 3 所述的经纯化多肽，其中，所述经纯化分离的多肽具有酰胺基 C 端。

6. 如权利要求 3 所述的经纯化多肽，其中，所述经纯化分离的多肽具有乙酰基 N 端。

7. 如权利要求 5 所述的经纯化多肽，其中，所述经纯化分离的多肽具有酰胺基 C 端。

8. 一种试剂盒，所述试剂盒用于检测菲尼克斯蛋白肽，所述试剂盒包含以下多肽中的一种或多种：由 SEQ. ID NO:2 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:3 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:4 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:5 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:6 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:7 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:8 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:9 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:10 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:11 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:12 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:13 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:14 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:15 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:16 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:17 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:18 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:19 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:20 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:21 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:22 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:23 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:24 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:25 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:26 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:27 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:28 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:29 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:30 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:31 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:32 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:33 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:34 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:35 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:36 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:37 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:38 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:39 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:40 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:41 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:42 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:43 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:44 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:45 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:46 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:47 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:48 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:49 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:50 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:51 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:52 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:53 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:54 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:55 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:56 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:57 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:58 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:59 构成的多肽和由 SEQ. ID NO:60 构成的多肽。

9. 一种抗体，所述抗体与菲尼克斯蛋白肽结合，所述抗体包含以下多肽中的一种或多种：由 SEQ. ID NO:2 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:3 构成的多肽、由 SEQ. IDNO:4 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:5 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:6 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:7 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:8 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:9 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:10 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:11 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:12 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:13 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:14 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:15 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:16 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:17 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:18 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:19 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:20 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:21 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:22 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:23 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:24 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:25 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:26 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:27 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:28 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:29 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:30 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:31 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:32 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:33 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:34 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:35 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:36 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:37 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:38 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:39 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:40 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:41 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:42 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:43 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:44 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:45 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:46 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:47 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:48 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:49 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:50 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:51 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:52 构成的多肽、由

SEQ. ID NO:53 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:54 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:55 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:56 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:57 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:58 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:59 构成的多肽和由 SEQ. ID NO:60 构成的多肽。

10. 一种方法，所述方法包括治疗对一种或多种经纯化多肽具有响应性的疾病，所述经纯化多肽选自包括以下多肽的组：由 SEQ. ID NO:2 构成的多肽、由 SEQ. IDNO:3 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:4 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:5 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:6 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:7 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:8 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:9 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:10 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:11 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:12 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:13 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:14 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:15 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:16 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:17 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:18 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:19 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:20 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:21 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:22 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:23 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:24 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:25 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:26 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:27 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:28 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:29 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:30 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:31 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:32 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:33 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:34 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:35 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:36 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:37 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:38 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:39 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:40 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:41 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:42 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:43 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:44 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:45 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:46 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:47 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:48 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:49 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:50 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:51 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:52 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:53 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:54 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:55 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:56 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:57 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:58 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:59 构成的多肽和由 SEQ. ID NO:60 构成的多肽。

11. 一种调节细胞中信号传导的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 使细胞与足量的一种或多种多肽接触，所述多肽选自由以下多肽组成的组：由 SEQ. ID NO:2 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:3 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:4 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:5 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:6 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:7 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:8 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:9 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:10 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:11 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:12 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:13 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:14 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:15 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:16 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:17 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:18 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:19 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:20 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:21 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:22 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:23 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:24 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:25 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:26 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:27 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:28 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:29 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:30 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:31 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:32 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:33 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:34 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:35 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:36 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:37 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:38 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:39 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:40 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:41

构成的多肽、由 SEQ. ID NO:42 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:43 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:44 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:45 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:46 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:47 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:48 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:49 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:50 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:51 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:52 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:53 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:54 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:55 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:56 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:57 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:58 构成的多肽、由 SEQ. ID NO:59 构成的多肽和由 SEQ. ID NO:60 构成的多肽 ;和

b) 增加胞内 cAMP 或 Ca^{2+} 的生产,所述细胞与所述量的所述一种或多种多肽接触。

菲尼克斯蛋白肽

[0001] 本国际专利合作条约专利申请要求2011年5月26日提交的美国临时专利申请61/519,747号和2011年5月28日提交的美国临时专利申请61/519,746号的权益，在此特将其各自援引加入。

技术领域

[0002] 本发明涉及人菲尼克斯蛋白(phoenixin)肽、类似物和模拟物，其可用于生产抗菲尼克斯蛋白抗体、诊断筛查和检验及调节细胞内cAMP的浓度；并且得益于能够调节细胞中cAMP浓度、调节高血压和心血管功能、调节促性腺激素细胞和胃排空的肽而治疗疾病。

背景技术

[0003] 人前肽Swiss-Prot：Q8N5G0(还称为“Q8N5G0”)包含如图1(SEQ.ID NO.:1)所示的168个氨基酸，该前肽可以进行加工以获得多种肽形式，其已经显示出可调节心血管响应、血压、胃排空和平滑肌响应的细胞内稳定。

[0004] 不过，人前肽Q8N5G0的全部加工形式尚未完全进行鉴别或者记载，与本发明之前已知的那些肽相比，残基数减少、稳定性更高或活性更大的化学合成的活性肽将可用于：制造多克隆和单克隆抗体；诊断筛查和检验；调节生化途径；调节细胞中cAMP或Ca^{2+}浓度、平滑肌响应或胃排空；或者使用能够调节细胞中cAMP或Ca^{2+}浓度、平滑肌响应或胃排空等的肽治疗能够治疗的疾病。

发明内容

[0005] 因此，本发明的主要目的可以是提供一种新型的经纯化分离的原生肽或化学合成的经纯化分离的肽(也称为“菲尼克斯蛋白肽(Phoenixin peptide)”)，其各自对应于如图1(SEQ.ID NO.:1)所示的包含168个氨基酸的人前肽Q8N5G0(或如图71所示的其他物种的类似前肽，SEQ.ID NO.:61～66，本文中各自并统一称作“菲尼克斯蛋白前肽(Phoenixin propeptide)”)的一部分，或者整体或部分地提供该人前肽的模拟物。原生的菲尼克斯蛋白肽在人、大鼠、小鼠、猪、牛和犬等物种中相同。该经纯化分离的原生菲尼克斯蛋白肽和化学合成的经分离的菲尼克斯蛋白肽可以用于调节以下过程的一种或多种：细胞中cAMP生产、以及心血管响应、血压、胃排空和平滑肌响应的体内稳定；或者用于受益于调节以下过程的一种或多种的疾病治疗：细胞中cAMP生产、以及心血管响应、血压、胃排空和平滑肌响应的体内稳定。

[0006] 本发明的另一主要目的可以是提供一种化学合成的经纯化分离的菲尼克斯蛋白肽，其可溶于含有其成分的水溶液、组织、组织匀浆、细胞培养物或洗脱级分等并且在其中足够稳定，并且可用于与测定以下参数中的一种或多种有关的筛查检验和诊断程序：菲尼克斯蛋白前肽水平、加工人、牛、大鼠、小鼠、猪和狗的菲尼克斯蛋白前肽而获得的原生菲尼克斯蛋白肽的水平或化学合成的菲尼克斯蛋白肽水平等。

[0007] 本发明的另一主要目的可以是提供一种经纯化分离的化学合成菲尼克斯蛋白肽，

其可以用于生产与以下前肽中的一种或多种结合的多克隆和单克隆抗体：人、牛、大鼠、小鼠、猪、狗或其他菲尼克斯蛋白前肽、人菲尼克斯蛋白前肽的加工形式、菲尼克斯蛋白前肽的原生片段或化学合成的经纯化分离的菲尼克斯蛋白肽。

[0008] 本发明的另一主要目的可以是提供一种经纯化分离的菲尼克斯蛋白肽，与先前已知的肽相比，所述菲尼克斯蛋白肽相对于结合的底物具有相似的功能、相似或新颖且预料不到的更大的活性和 / 或特异性，并在一些实施方式中将该功能、活性或特异性赋予从已知肽省去一个或多个氨基酸残基的形式，并且赋予多种优势，如便于制造、效力提高、成本降低、溶解性或稳定性等。

[0009] 本发明的另一主要目的可以是提供包含一种或多种经纯化分离的菲尼克斯蛋白肽的试剂盒，该试剂盒可以还包含针对一种或多种菲尼克斯蛋白肽培养的抗体，这些抗体可用于以下用途中的一个或多个：使用凝胶过滤、离子交换色谱或反相色谱等由纯化分离程序产生的组织或细胞匀浆或洗脱级分的放射免疫检验（“RIA”）、酶联免疫吸附检验（“ELISA”）或酶免疫检验（“EIA”）等，以及用于组织的免疫组化分析或作为色谱或质谱的标准物，或者可用于测定调节其生产、代谢和分布的特定类似物、激动剂、拮抗剂、部分模拟物和药剂的筛查和研究方法。

[0010] 本发明的另一主要目的可以是一种调节细胞中信号传导的方法，其中，可以将有效量或治疗量的一种或多种经纯化分离的菲尼克斯蛋白肽与细胞接触或者以其他方式施用，从而调节或提高 cAMP 和 / 或 Ca^{2+} 的生产，或治疗与细胞、组织或动物中信号传导失调有关的疾病。

[0011] 当然，本发明的其他目的也在说明书、附图、照片和权利要求中他处得以披露。

附图说明

[0012] 图 1 显示了人考斯肽素 (cospeptin) 前原肽 (Q8N5G0) 残基 1-168 的序列 (SEQ. ID NO. :1)。

[0013] 图 2 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20) 的序列 (SEQ. ID NO. :2)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列。

[0014] 图 3 显示了菲尼克斯蛋白 (7-21) 的序列 (SEQ. ID NO. :3)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-166 的序列。

[0015] 图 4 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20) 的序列 (SEQ. ID NO. :4)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列。

[0016] 图 5 显示了菲尼克斯蛋白 (9-21) 的序列 (SEQ. ID NO. :5)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 154-166 的序列。

[0017] 图 6 显示了菲尼克斯蛋白 (8-20) 的序列 (SEQ. ID NO. :6)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 153-165 的序列。

[0018] 图 7 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :7)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列并具有 C 端酰胺基。

[0019] 图 8 显示了菲尼克斯蛋白 (8-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :8)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 153-165 的序列并具有 C 端酰胺基。

[0020] 图 9 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :9)，其对应于人考斯肽

素前原肽残基 152-165 的序列并具有 C 端酰胺基。

[0021] 图 10 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (6-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :10)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 151-165 的序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端酰胺基。

[0022] 图 11 显示了菲尼克斯蛋白 (9-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :11)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 154-165 的序列并具有 C 端酰胺基。

[0023] 图 12 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (9-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :12)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 155-165 的序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端酰胺基。

[0024] 图 13 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20) 甲基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :13)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列并具有 C 端甲基酰胺基。

[0025] 图 14 显示了菲尼克斯蛋白 (8-20) 甲基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :14)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 153-165 的序列并具有 C 端甲基酰胺基。

[0026] 图 15 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20) 甲基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :15)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列并具有 C 端甲基酰胺基。

[0027] 图 16 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (6-20) 甲基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :16)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 151-165 的序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端甲基酰胺基。

[0028] 图 17 显示了菲尼克斯蛋白 (9-20) 甲基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :17)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 154-165 的序列并具有 C 端甲基酰胺基。

[0029] 图 18 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (9-20) 甲基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :18)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 155-165 的序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端甲基酰胺基。

[0030] 图 19 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20) 乙基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :19)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列并具有 C 端乙基酰胺基。

[0031] 图 20 显示了菲尼克斯蛋白 (8-20) 乙基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :20)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 153-165 的序列并具有 C 端乙基酰胺基。

[0032] 图 21 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20) 乙基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :21)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列并具有 C 端乙基酰胺基。

[0033] 图 22 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (6-20) 乙基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :22)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 151-165 的序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端乙基酰胺基。

[0034] 图 23 显示了菲尼克斯蛋白 (9-20) 乙基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :23)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 154-165 的序列并具有 C 端乙基酰胺基。

[0035] 图 24 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (9-20) 乙基酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :24)，其对应于考斯肽素前原肽残基 155-165 的序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端乙基酰胺基。

[0036] 图 25 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 缬氨酸 (8)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :25)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列，在残基 153 处具有 D 型缬氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0037] 图 26 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 脯氨酸 (10)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :26)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列，在残基 155 处具有 D 型脯氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0038] 图 27 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 脯氨酸 (11)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :27)，其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列，在残基 156 处具有 D 型脯氨酸并具有 C

端酰胺基。

[0039] 图 28 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 丙氨酸 (12)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :28),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 157 处具有替换甘氨酸的 D 型丙氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0040] 图 29 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 亮氨酸 (13)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :29),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 158 处具有 D 型亮氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0041] 图 30 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 缬氨酸 (15)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :30),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 160 处具有 D 型缬氨酸和 C 端酰胺基。

[0042] 图 31 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 色氨酸 (16)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :31),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 161 处具有 D 型色氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0043] 图 32 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 脯氨酸 (19)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :32),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 164 处具有 D 型脯氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0044] 图 33 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 苯丙氨酸 (20)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :33),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 165 处具有 D 型苯丙氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0045] 图 34 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,Tic(20)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :34),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 165 处具有替换 L 型苯丙氨酸的 1,2,3,4- 四氢异喹啉 -3- 羧酸并具有 C 端酰胺基。

[0046] 图 35 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20,D- 丙氨酸 (1)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :35),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列,在残基 146 处具有 D 型丙氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0047] 图 36 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20,D- 丙氨酸 (2)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :36),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列,在残基 147 处具有替换 L 型甘氨酸的 D 型丙氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0048] 图 37 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20,D- 缬氨酸 (4)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :37),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列,在残基 149 处具有 D 型缬氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0049] 图 38 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20,D- 缬氨酸 (8)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :38),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列,在残基 153 处具有 D 型缬氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0050] 图 39 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20,D- 丝氨酸 (17)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :39),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列,在残基 162 处具有 D 型丝氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0051] 图 40 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20,D- 脯氨酸 (19)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :40),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列,在残基 164 处具有 D 型脯氨酸并具有 C

端酰胺基。

[0052] 图 41 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20,D- 苯丙氨酸 (20)) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :41),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列,在残基 165 处具有 D 型苯丙氨酸并具有 C 端酰胺基。

[0053] 图 42 显示了乙酰菲尼克斯蛋白 (1-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :42),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列并具有 N 端乙酰基和 C 端酰胺基。

[0054] 图 43 显示了乙酰菲尼克斯蛋白 (8-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :43),其对应于人考斯肽素前原肽残基 153-165 的序列并具有 N 端乙酰基和 C 端酰胺基。

[0055] 图 44 显示了乙酰菲尼克斯蛋白 (7-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :44),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列并具有 N 端乙酰基和 C 端酰胺基。

[0056] 图 45 显示了甲酰菲尼克斯蛋白 (1-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :45),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列并具有 N 端甲酰基和 C 端酰胺基。

[0057] 图 46 显示了甲酰菲尼克斯蛋白 (6-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :46),其对应于人考斯肽素前原肽残基 151-165 的序列并具有 N 端甲酰基和 C 端酰胺基。

[0058] 图 47 显示了甲酰菲尼克斯蛋白 (7-20) 酰胺的序列 (SEQ. ID NO. :47),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列并具有 N 端甲酰基和 C 端酰胺基。

[0059] 图 48 显示了菲尼克斯蛋白 (1-19) 萘的序列 (SEQ. ID NO. :48),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-164 的序列并具有 C 端萘基。

[0060] 图 49 显示了菲尼克斯蛋白 (7-19) 萘的序列 (SEQ. ID NO. :49),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-164 的序列并具有 C 端萘基。

[0061] 图 50 显示了菲尼克斯蛋白 (8-19) 萘的序列 (SEQ. ID NO. :50),其对应于人考斯肽素前原肽残基 153-164 的序列并具有 C 端萘基。

[0062] 图 51 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (6-19) 萘的序列 (SEQ. ID NO. :51),其具有位于人考斯肽素前原肽残基 151-164 的主序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端萘基的序列。

[0063] 图 52 显示了菲尼克斯蛋白 (9-19) 萘的序列 (SEQ. ID NO. :52),其对应于人考斯肽素前原肽残基 154-164 的序列并具有 C 端萘基。

[0064] 图 53 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (9-20) 萘的序列 (SEQ. ID NO. :53),其对应于人考斯肽素前原肽残基 155-164 的序列并具有 N 端焦谷氨酸和 C 端萘基。

[0065] 图 54 显示了菲尼克斯蛋白 (1-20, 色氨酸 (20)) 的序列 (SEQ. ID NO. :54),其对应于人考斯肽素前原肽残基 146-165 的序列并且残基 165 处的苯丙氨酸用色氨酸替换。

[0066] 图 55 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20, 色氨酸 (20)) 的序列 (SEQ. ID NO. :55),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列并且残基 165 处的苯丙氨酸用色氨酸替换。

[0067] 图 56 显示了菲尼克斯蛋白 (8-20, 色氨酸 (20)) 的序列 (SEQ. ID NO. :56),其对应于人考斯肽素前原肽残基 153-165 的序列并且残基 165 处的苯丙氨酸用色氨酸替换。

[0068] 图 57 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (5-20, 色氨酸 (20)) 的序列 (SEQ. ID NO. :57),其对应于人考斯肽素前原肽残基 151-165 的序列,具有 N 端焦谷氨酸,并且残基 165 处的苯丙氨酸用色氨酸替换。

[0069] 图 58 显示了菲尼克斯蛋白 (9-20, 色氨酸 (20)) 的序列 (SEQ. ID NO. :58),其对应于人考斯肽素前原肽残基 154-165 的序列并且残基 165 处的苯丙氨酸用色氨酸替换。

[0070] 图 59 显示了焦谷氨酸 - 菲尼克斯蛋白 (9-20, 色氨酸 (20)) 的序列 (SEQ. ID NO. :59),其对应于人考斯肽素前原肽残基 155-165 的序列,具有 N 端焦谷氨酸,并且残基 165 处的苯丙氨酸用色氨酸替换。

[0071] 图 60 显示了菲尼克斯蛋白 (7-20,D- 色氨酸 (11) 色氨酸 (20)) 的序列 (SEQ. ID NO. :60),其对应于人考斯肽素前原肽残基 152-165 的序列,在残基 161 处具有 D 型色氨酸,并且残基 165 处的苯丙氨酸用色氨酸替换。

[0072] 图 61 是第一 RP-HPLC 分离图谱,其显示了对由大鼠组织匀浆的分级分离纯化获得的免疫反应性级分应用 RP-HPLC 而产生的免疫反应性肽 (基线上方的峰) 的洗脱。

[0073] 图 62 是对包含图 61 的第一 RP-HPLC 分离中约 26.5 分钟的洗脱峰的级分进行质谱而产生的质谱曲线。

[0074] 图 63 是对图 61 的第一 RP-HPLC 分离中约 27 分钟的洗脱出的级分进行高压模式质谱而产生的质谱曲线。

[0075] 图 64 是第二 RP-HPLC 分离图谱,其显示了对由图 61 的上述第一 RP-HPLC 分离获得的免疫反应性级分应用 RP-HPLC 而产生的肽 (基线上方的峰) 的洗脱。

[0076] 图 65 对包含图 64 的第二 RP-HPLC 分离中约 26.5 分钟的洗脱峰的级分进行质谱而产生的质谱曲线。

[0077] 图 66A ～ 66D 是使用针对图 7 所示的 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7) 培育出的抗菲尼克斯蛋白抗体在载玻片上固定并免疫染色的大鼠髓质的组织切片的图像。

[0078] 图 67A ～ 67D 是使用针对图 7 所示的 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7) 培育出的抗菲尼克斯蛋白抗体在载玻片上固定并免疫染色的大鼠前脑的组织切片的图像。

[0079] 图 68A ～ 68F 是使用针对图 7 所示的 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7) 培育出的抗菲尼克斯蛋白抗体在载玻片上固定并免疫染色的大鼠脊髓的组织切片的图像。

[0080] 图 69 是描绘对应于图 7 和图 9 所示的 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7) 和 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :9) 的原生菲尼克斯蛋白肽的组织分布和浓度的柱状图。

[0081] 图 70 是比较用图 7 所示的 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7)、图 3 所示的 DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ. ID NO. :3)、图 9 所示的 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :9) 和磷酸盐缓冲盐水 (“PBS”) 对照物激发大鼠垂体细胞中的 cAMP 生产的柱状图。

[0082] 图 71 显示了不同动物物种中菲尼克斯蛋白 (1-20)、菲尼克斯蛋白 (7-20) 和菲尼克斯蛋白 (7-21) 的区域的比对。由序列比对可知,前原肽中菲尼克斯蛋白 (1-20) 序列在人、牛、大鼠和小鼠的物种之间相同。犬和猪物种中的菲尼克斯蛋白 (1-20) 的肽具有一个残基差异,即缬氨酸或异亮氨酸替换异亮氨酸或缬氨酸残基。

具体实施方式

[0083] 从本说明书可以容易地理解到,本发明的基本构思可以体现为各种方式。本发明涉及经纯化分离的多肽和肽模拟物的制造和使用方法,所述多肽和肽模拟物是调节胃肠道、心血管、下丘脑 - 垂体轴和中枢神经系统组织的细胞功能的蛋白偶联受体的配体。

[0084] 现主要参见图 1,具有 168 个氨基酸的人菲尼克斯蛋白前肽 (Q8N5G0) (SEQ. ID NO. :1) 可以加工为多种肽形式,包括 : 图 2 所示的长度为 20 个氨基酸

残基的AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF(SEQ.ID NO.:2)；图3所示的长度为15个氨基酸残基的DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:3)；图4所示的长度为14个氨基酸残基的DVQPPGLKVWSDPF(SEQ.ID NO.:4)；图5所示的长度为13个氨基酸残基的QPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:5)；和图6所示的长度为13个氨基酸残基的VQPPGLKVWSDPF(SEQ.ID NO.:6)。

[0085] 原生菲尼克斯蛋白肽可以为如上所述在羧基端为游离酸的形式，或者可以酰胺化，如图7所示的AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:7)、图8所示的VQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:8)或图9所示的DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9)的形式。

[0086] 菲尼克斯蛋白肽的某些残基（无论游离酸还是酰胺基）可以为L型氨基酸或D型氨基酸。例如，图9所示的DVQPPGLKVWSDPFG-NH2(SEQ.ID NO.:9)和图31所示的DVQPPGLKVdWSDPF-NH2(SEQ.ID NO:31)。

[0087] 菲尼克斯蛋白转录可以在消化道、下丘脑、髓质、前脑、心脏、垂体、肾脏、胰腺、肝脏、脾脏、胸腺的人组织和其他组织中表达。

[0088] 菲尼克斯蛋白序列的预测

[0089] 由约100种已知的前激素原菲尼克斯蛋白序列中的潜在一价或二价裂解位点设计肽库。肽合成用候选物基于前激素原菲尼克斯蛋白的蛋白可以在体内在一价残基(如Arg或Lys)、二价残基对(如Arg-Arg)、多价裂解位点或三联体Gly-Arg-Arg处加工得到(其在蛋白水解断裂时可以生成人菲尼克斯蛋白的体内加工形式，或者适合用于俘获人菲尼克斯蛋白的加工形式的抗体生产的其他形式)的预期来进行选择。建模产生候选物的一级序列，从中选择以下序列用来化学合成：AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF(SEQ.ID NO.:2)、DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:3)和DVQPPGLKVWSDPF(SEQ.ID NO.:4)。

[0090] 菲尼克斯蛋白肽的生产

[0091] 现主要参见图2～60，通过建模确定SEQ.ID NO.:2、SEQ.ID NO.:3和SEQ.ID NO.4的一级序列后，相应的C端游离酸(SEQ ID.NO.:2～6)、C端酰胺(SEQ ID NO.:7～12)、C端甲基酰胺(SEQ.ID NO.13～18)、C端乙基酰胺(SEQ.ID NO.19～24)、D型氨基酸肽(SEQ.ID.NO.24～41和60)、N端乙酰基(SEQ.ID NO.42～44)、N端甲酰基(SEQ.ID NOS.45～47)、C端萘(SEQ.ID NO.48～50和52)和替换苯丙氨酸的色氨酸(SEQ.ID.NO.54～60)肽使用芴氧基甲基羰基(FMOC)氨基酸或叔丁氧基甲基羰基(BOC)氨基酸、利用自动肽合成器(如Ranin Instruments Symphony多重肽合成器)按照厂家说明进行自动化学合成，或者按照本领域技术人员公知的技术所理解的那样人工合成。还可参见Solid Phase Peptide Synthesis:A practical approach,E.Atherton和R.C.Sheppard,IRL Press,Oxford,England，在此特援引加入。

[0092] 某些菲尼克斯蛋白肽可以进行修饰以提供以下形式的一种或多种：N端乙酰基、N端甲酰基、N端焦谷氨酸、C端酰胺、C端甲基酰胺、C端乙基酰胺、C端萘、C端色氨酸、将一种或多种L型氨基酸残基替换为同一D型氨基酸，这些形式与相应的初始原生肽相比具有以下一种或多种优势：更为稳定、溶解性更好且具有更高的效力。参见例如Wei E.T等，Peptides.1998;19(7):1183-90，在此援引加入。

[0093] 由化学合成得到的多肽混合物通过反相（“RP”）高压液相色谱法（“HPLC”）、使

用填装有孔隙为 80 埃(“Å”)～300Å 并连接有 C-4、C-8 或 C-18 配体中的任一种的二氧化硅的柱进行纯化和彼此分离。如本领域普通技术人员所了解的,所述柱可以用 0.1% 三氟乙酸水溶液以由柱尺寸决定的流速进行平衡。将合成肽混合物施加到反相 HPLC 柱并用 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液以约 0% ～约 60% 的梯度进行时长约 1 小时的洗脱。按约 0.5 分钟的间隔收集级分。然后通过再施加和从反相 HPLC 系统洗脱、质谱、SDS-PAGE 或在 Perkin Elmer/Applied Biosystems Model470A 蛋白测序仪上根据厂家说明进行自动 Edman 降解来分析级分的均匀性。

[0094] 本发明还涵盖与图 2 ～ 60 所示的菲尼克斯蛋白肽 (SEQ. ID NO.:2 ～ 60) 中的一种或多种基本上相似的经纯化分离的肽,所述肽保持了调节大鼠垂体细胞内的胞内环状单磷酸腺苷 (“cAMP”) 浓度的功能。作为非限制性实例,可举出残基的沉默替换,其中将残基用结构或化学相似的残基进行替换,这不会显著改变多肽的结构、构象或活性。这样的沉默替换应落入在随后的非临时专利申请中可能提交的权利要求的范围内。于是,可以理解本发明和本说明书还包括与 SEQ. ID NO.:2 ～ 60 有关的肽,其中从一端或两端或从内部区域除去了一个或多个残基、或者在一端或两端或肽的内部位置增加了一个或多个残基,或者还包括具有为了化学或放射标记而添加的化学基团或残基(如为了 ^{125} 碘标记而添加的酪氨酸)。类似地,可以将 N 端制备为氨基、乙酰基、甲酰基或留下完整的 FMOC 或 BOC 残基。C 端可以保留为与树脂结合,或者通过选择相应的 4- 羟甲基 - 苯乙酰氨基甲基 (“PAM”) 树脂或 4- 甲基二苯甲胺盐酸盐 (“MBHA”) 树脂而断裂为羧基或酰胺基。可以将 C 端修饰为提供甲基酰胺、乙基酰胺、萘或其他基团。

[0095] 抗菲尼克斯蛋白和菲尼克斯蛋白肽抗体的生产

[0096] 针对与 SEQ. ID.:3、SEQ. ID NO.:7、SEQ. ID NO.:9、SEQ. ID NO.:10 和 SEQ. ID NO.:11 对应的化学合成的经纯化分离的肽各自培养抗体。根据常规方式制备抗体,其中,将化学合成肽用作与已知免疫原载体缀合的免疫原,所述免疫原载体如钥孔戚血蓝蛋白 (“KLH”)、乙肝病毒表面抗原 (“HBsAg”) 或其他病毒或真核蛋白等。可以采用各种佐剂,在适当时利用一系列的注射液。对于单克隆抗体,在一次或多次加强注射之后,脾脏可以分离通过细胞融合而永生化的淋巴细胞,然后筛选高亲和性抗体结合。产生所需抗体的永生化细胞 (杂种细胞) 然后可以扩增。更详细的说明请参见 Monoclonal Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow 和 Lane eds.,Cold Spring Harbor Laboratories,Cold Spring Harbor,N.Y.,1988,在此将其援引加入。

[0097] 原生菲尼克斯蛋白肽的分离

[0098] 由成年大鼠的心脏组织制备匀浆。将大鼠心脏匀浆的上清液通过 C18 萃取柱和 P6 凝胶过滤以进一步纯化原生肽候选物。通过常规酶免疫分析 (“EIA”) 测定的免疫反应性级分(其中如上所述经标记的化学合成肽与未标记的原生菲尼克斯蛋白肽竞争有限量的抗菲尼克斯蛋白肽抗体)如上所述制得。标记物可以为生物素复合物,其通过与链霉亲和素辣根过氧化物酶的反应和后续的辣根过氧化物酶与比色或荧光底物的反应而可以量化。免疫反应性级分进一步通过以下过程纯化 :利用 P6 大小分级凝胶 (Bio-Rad laboratory,Hercules,CA),或者通过施加到羧甲基纤维素 (“CMC”) 树脂并用 0.2M 乙酸铵洗脱而进行离子交换。由于 P6 大小分级可产生最好的免疫反应性结果,该免疫反应性级分然后如上所述通过第一 RP-HPLC 分离进一步纯化,所得免疫反应性级分如上所述通过后续

的第二 RP-HPLC 分离进一步纯化。

[0099] 现主要参见图 61，第一 RP-HPLC 分离图显示出对由上述离子交换过程获得的免疫反应性级分进行 RP-HPLC 而产生的肽（基线上方的峰）的洗脱。含有肽的洗脱级分通过上述 EIA 程序检验，第一 RP-HPLC 图上叠加的免疫反应性水平表明，分别对应于约 26.5 分钟和约 27 分钟处出现的峰的洗脱级分分别含有原生菲尼克斯蛋白肽，其与如上所述制得的相应抗肽抗体结合。

[0100] 现主要参见图 62，其显示了对包含第一 RP-HPLC 分离中约 26.5 分钟洗脱出的肽的级分进行质谱而产生的质谱图。通过基质辅助激光解吸 / 电离飞行时间（“MALDI-TOF”）获得的质谱显示，对应于约 26.5 分钟处的洗脱峰的级分含有原生菲尼克斯蛋白肽 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9)、QPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:11) 和 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:7)。

[0101] 现主要参见图 63，其显示了对含有第一 RP-HPLC 分离中约 27 分钟的洗脱峰的级分进行质谱而产生的质谱图。在 MALDI-TOF 中的高压电源质谱显示，含有约 27 分钟处的洗脱峰的级分含有多种原生菲尼克斯蛋白肽 QPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:5)、VQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:8)、DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9)、DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:3) 和 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:7)。

[0102] 现主要参见图 64，其显示了对上述第一 RP-HPLC 分离获得的免疫反应性级分进行 RP-HPLC 而产生的肽（基线上方的峰）进行洗脱得到的第二 RP-HPLC 分离图。含有肽的洗脱级分通过上述 EIA 程序检验，第一 RP-HPLC 图上叠加的免疫反应性水平表明，对应于约 26 分钟～ 26.5 分钟处出现的峰的洗脱级分含有原生菲尼克斯蛋白肽，其与如上所述的相应抗肽抗体结合。

[0103] 现主要参见图 65，其显示了对第二 RP-HPLC 分离中约 26 分钟～ 26.5 分钟处的洗脱级分进行质谱而产生的质谱图。质谱图显示，与约 26 分钟处的峰对应的洗脱级分含有原生菲尼克斯蛋白肽 DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:3) 和 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9)。

[0104] 组织切片中的菲尼克斯蛋白肽的检测

[0105] 现主要参见图 66A ～ 66D，它们各自显示了使用针对 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:7) 和 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9) 培养出的抗菲尼克斯蛋白抗体通过常规免疫组化染色程序在载玻片上固定并免疫染色的大鼠髓质的组织切片。菲尼克斯蛋白免疫荧光细胞突起 (cell processes) 可见于：图 66A 中的三叉神经脊髓束 (Sp5) 和迷走传入；图 66B 中的三叉神经脊髓束和迷走传入的放大区域；图 66C 中的孤束内侧核 (SolM) 和孤束中央核 (SolC) 的免疫荧光细胞突起；图 66D 中的从三叉神经脊髓束突出到疑核 (nAmb) 的免疫荧光细胞突起。比例尺：A:250μm；B、C 和 D:100μm。

[0106] 通常，对冷冻组织切片的免疫组化染色包括在载玻片上建立组织切片。用合适的固定剂（如预冷丙酮 (-20℃)）将组织切片固定 10 分钟。可以倒掉固定剂，并使残留丙酮蒸发。载玻片可以用中性 pH 的缓冲液（如 10mM 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)）清洗 2 次，每次 5 分钟。载玻片可以在室温的约 0.3%H_2O_2 的 PBS 溶液中温育 10 分钟以阻断内源性过氧化物酶活性。然后将载玻片在 300ml PBS 中清洗 2 次，每次 5 分钟。可以在组织切片上使用可

选的阻断缓冲剂，包括例如 10% 正常羊血清的 PBS 溶液，并在室温温育 1 小时。将处于抗体稀释缓冲液（0.5% 牛血清白蛋白 PBS 溶液）中的针对 SEQ. ID NO. :7 和 SEQ. ID NO. :9 培养的稀释一级抗体施加到载玻片上的切片上并在室温温育 1 小时或在 4℃过夜。在约 300ml PBS 中清洗载玻片 2 次，每次 5 分钟。对载玻片上的组织切片施加处于抗体稀释缓冲液中的 100μl 适当稀释的生物素化二级抗体，并在室温温育约 30 分钟。在 300ml PBS 中清洗载玻片 2 次，每次 5 分钟。向载玻片上的切片施加 100μl 使用抗体稀释缓冲液预先稀释的辣根缀合物，并且在室温的调湿室中避光温育 30 分钟。在约 300ml PBS 中清洗载玻片 2 次，每次 5 分钟。向载玻片上的切片施加使用刚刚新制的约 100μl 3,3′ －二氨基联苯胺（“DAB”）底物溶液（0.05%DAB-0.015%H_2O_2 的 PBS 溶液）以揭示抗体染色的颜色。在 <5 分钟进行显色，直至达到希望的颜色强度。在 300ml PBS 中清洗载玻片 2 次，每次 5 分钟。可选地，通过将载玻片浸入苏木精 1 ～ 2 分钟来准备对比染色载玻片。在流动自来水中清洗载玻片 >15 分钟。组织切片经过 4 道乙醇 (95%、95%、100% 和 100%)、每次 5 分钟来进行脱水。在 3 道二甲苯中清洁组织载玻片，而盖玻片使用封固溶液。在显微镜下观察组织切片中的染色抗体的颜色。

[0107] 现参见图 67A ～ 67D，其显示了如上所述制备的大鼠前脑的组织样品中原生菲尼克斯蛋白肽的免疫活性。在图 67A 中，在尾壳核 (CPu) 中检测到菲尼克斯蛋白免疫反应性细胞体；在图 67B 中的 CPu、图 67C 中的杏仁核和图 67D 中的室周核 (Pe) 中也可以观察到细小的细胞突起。比例尺 :A:100μm ;B、C 和 D:50μm。

[0108] 现参见图 68A ～ 68F，其显示了如上所述制备的大鼠脊髓的组织切片中的原生菲尼克斯蛋白肽的免疫活性。菲尼克斯蛋白免疫荧光出现于颈椎（图 68A ～ 68B）、胸椎（图 68C 和 68D）和腰椎（图 68E）段的浅层背角。图 68F 显示了用预先吸收有所述肽 (1μg/ml 过夜）的菲尼克斯蛋白抗血清处理的腰椎切片；在背角中未检测到免疫荧光。比例尺 :A、C、E 和 F:250μm ;B 和 D:100μm。

[0109] 在组织匀浆提取物和血清中检测菲尼克斯蛋白肽

[0110] 现主要参见图 69，其显示了描绘与 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7) 和 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :9) 相对应的原生菲尼克斯蛋白肽的组织分布和浓度的柱状图。如上所述制备心脏、肺、肾脏、脊髓、小肠、肝脏、胰脏、下丘脑、脾脏和胸腺的猪或牛或大鼠组织的匀浆，并通过上述肽提取程序处理所得的级分，使用针对 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7) 培养的抗体通过放射免疫检验（“RIA”）或酶免疫检验 (EIA) 进行检验。针对 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :7) 培养的抗体还显示出与 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO. :9) 的 100% 交叉反应性，不过与 DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ. ID NO. :3) 的交叉反应性小于 0.5%。检测批内差异性为约 5%，检测限为约 34 皮克 / 毫升（“pg/mL”），EC50 为约 200pg/ML。使用牛血清白蛋白（“BSA”）作为标准物按照厂家 Thermo Scientific, Rockford, Illinois 的说明通过二喹啉甲酸（“BCA”）蛋白检测测定蛋白浓度。数据以三次重复检测的结果的平均值 ±SEM 表示，以免疫反应性菲尼克斯蛋白肽 / 毫克蛋白为单位。

[0111] 如图 69 和下表 1 所示，肝脏、胰脏、脾脏、肾脏和胸腺的组织与心脏和下丘脑的组织相比产生了明显较少的免疫反应性菲尼克斯蛋白肽。使用菲尼克斯蛋白荧光酶免疫检测，已经将无 C18 提取的人血清中的菲尼克斯蛋白肽水平测定为约 35.5±1.72pg/ml。

[0112] 图 1. 菲尼克斯蛋白荧光酶免疫检测测得的菲尼克斯蛋白的组织水平

[0113]

组织匀浆（物种）	浓度 (pg/mg 组织蛋白）
大脑（大鼠）	未检测
小脑（大鼠）	0.051±0.002
下丘脑（大鼠）	363.292±0.384
海马体（大鼠）	未检测
脑桥（大鼠）	0.218±0.006
垂体（大鼠）	12628.782±505.026
心脏（大鼠）	1360.539±115.917
肺（大鼠）	1924.667±153.15
胃（猪）	520.446±119.702
小肠（大鼠）	122302.492±18315.776
肾脏（大鼠）	8530.822±1207.631
脾脏（大鼠）	5.393±0.067
胰脏（大鼠）	29.128±0.434
肝脏（大鼠）	585.518±48.389
卵巢（大鼠）	12.992±0.009
肝脏（猪）	0.0887±0.005

[0114] 菲尼克斯蛋白肽对垂体细胞的作用

[0115] 现主要参见图 70，其是比较了用图 7 所示的 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ. ID NO.:7)、图 3 所示的 DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:3)、图 9 所示的 DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9) 和 PBS 对照物激发的大鼠垂体细胞中 cAMP 生产的柱状图。

[0116] 将大鼠垂体腺瘤细胞 RC-4B/C(CRL-1903 ;ATCC,Manassas,VA,USA) 在补充有 0.01mM 非必需氨基酸、15mM HEPES、2.5ng/ml 表皮生长因子和经透析、热灭活的胎牛血清（“FBS”）的 Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium 和 Minimum Essential Alpha Medium(Invitrogen,CA,USA) 中在含有 5% 二氧化碳（“CO_2”）的调湿细胞培养箱中在 37℃进行培养。在 24 孔板中培养细胞 2 天后，将细胞在无血清培养基平衡 2 小时，然后在无血清培

养基中用0.1mM3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（“IBMX”）再次温育30分钟。然后，将细胞在IBMX的存在下用100nM的AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:7)、DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:3)、DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9)或PBS对照物激发并温育30分钟。在温育之后，然后将上清液培养基抽出，并用70%冷乙醇提取各孔中的细胞。在真空浓缩器(PN:AES2000，Savant,Hicksvile,NY,USA)中蒸发掉乙醇。然后，使用cAMP Biotrak酶免疫分析试剂盒(GE healthcare-Amersham,Piscataway,NJ,USA)根据厂家说明测定cAMP含量。

[0117] 另外，在放射性配体结合检验中使用大鼠垂体腺瘤细胞，即RC-4B/C细胞。对于结合置换而言，在存在或不存在较高浓度的未标记菲尼克斯蛋白-20酰胺（酰胺SEQ.ID NO.:7）或菲尼克斯蛋白-14酰胺（酰胺SEQ.ID NO.:9）的情况下，将细胞用50pM的1251-Y0-菲尼克斯蛋白-20（酰胺SEQ.ID NO.:7）温育30分钟。将非特异性结合定义为在1μM的未标记菲尼克斯蛋白-20酰胺（酰胺SEQ.ID NO.:7）或菲尼克斯蛋白-14酰胺（酰胺SEQ.ID NO.:9）的情况下的总结合率。在通过用1ml冷PBS清洗细胞而终止结合反应后，细胞用0.5ml的1%SDS进行溶解，并γ射线计数器检测放射性。由非线性曲线拟合可知，菲尼克斯蛋白-20酰胺的IC50为21.5nM，菲尼克斯蛋白-14酰胺的IC50为17.9nM。

[0118] 如图70所示，相对于PBS对照物，AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:7)、DVQPPGLKVWSDPFG(SEQ.ID NO.:3)、DVQPPGLKVWSDPF-NH2(SEQ.ID NO.:9)可以提高大鼠垂体腺瘤细胞中胞内cAMP生产超过2倍、甚至3倍。数据以对照值的百分比表示(PBS对照:100%;4.94±0.5pmol/mg蛋白)。

[0119] 菲尼克斯蛋白肽的用途

[0120] 菲尼克斯蛋白肽SEQ ID NO.:2～60可以用于四大领域。第一，作为菲尼克斯蛋白肽SEQ ID NO.:2～60中一种或多种的形式的抗原，其可以用作上述或下述检验中或者用于如上所述培养单克隆或多克隆抗体。所得单克隆或多克隆抗体可以用于结合菲尼克斯蛋白前肽或菲尼克斯蛋白肽等中的一种或多种。

[0121] 第二，在包含一种或多种化学合成的菲尼克斯蛋白肽SEQ ID NO.:2～60的试剂盒中作为分子工具或试剂，其可以与针对上述菲尼克斯蛋白肽的一种或多种培养的抗体一起使用。该试剂盒可用于例如使用凝胶过滤、离子交换色谱、反相色谱或免疫沉淀等的纯化程序产生的组织或细胞匀浆或洗脱级分的放射免疫检验（“RIA”）、酶联免疫吸附检验（“ELISA”）或酶免疫检验（“EIA”）等，以及用于组织的免疫组化分析，或作为色谱或质谱的标准物，或者作为疾病筛查的生物标记物。

[0122] 第三，作为评估某些疾病的临床用途中的诊断工具。因为原生菲尼克斯蛋白肽可以为人或动物生理机能的功能肽，所以菲尼克斯蛋白肽的缺失或异常水平（无论是与正常值相比异常高还是低）可以与指示特定疾病的其他生理因子或者症状相关联。在血液或组织中存在的一定量的菲尼克斯蛋白肽可以用作某些医学治疗的指标或者引导指数。

[0123] 第四，菲尼克斯蛋白肽可以在正常生理机能中发挥功能性作用。原生菲尼克斯蛋白肽的过度表达或者过低表达可以导致相关的疾病或功能紊乱。因此，对动物或人体施用一种或多种菲尼克斯蛋白肽或者与结合、竞争性结合、转移或者以其他方式利用菲尼克斯蛋白肽的细胞接触来调节或控制生理途径，可以反转或者修正疾病状态。为了使治疗有效性最大化，一种或多种菲尼克斯蛋白肽的施用可以通过各种方法(如静脉

内、肌内或皮下等）单独或者与其量足以产生治疗效果（如降低血压、排空肠道或释放促性腺激素等的心血管反应）的其他药用试剂联合来实现。仅作为一个实例，可以对动物施用菲尼克斯蛋白 SEQ. ID NO. :2 ～ 60 以实现血压下降。另外，可以对动物施用菲尼克斯蛋白肽 SEQ. ID NO. :2 ～ 60 中的一种或多种来调节细胞信号，特别是菲尼克斯蛋白肽 AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF（SEQ. ID NO. :2）、DVQPPGLKVWSDPFG（SEQ. ID NO. :3）、DVQPPGLKVWSDPF（SEQ. ID NO. :4）、QPPGLKVWSDPFG（SEQ. ID NO. :5）、VQPPGLKVWSDPF（SEQ. ID NO. :6）、AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-NH2（SEQ. ID NO. :7）、VQPPGLKVWSDPF-NH2（SEQ. ID NO. :8）、DVQPPGLKVWSDPF-NH2（SEQ. ID NO. :9）、DVQPPGLKVdWSDPF-NH2（SEQ. ID NO. :31）、DVQPPGLKVWSDdPF-NH2（SEQ. ID NO. :32）和 DVQPPGLKVdWSDPF-NH2（SEQ. ID NO. :60）可以用于调节细胞中的 cAMP 生产。

[0124] 现参见图 71，其显示了不同动物物种中菲尼克斯蛋白（1-20）、菲尼克斯蛋白（7-20）和菲尼克斯蛋白（7-21）区域的比对。序列比对证实了，前原蛋白中菲尼克斯蛋白（1-20）序列在人、牛、大鼠和小鼠物种之间相同。狗和猪物种中的菲尼克斯蛋白（1-20）具有一个残基差异，即一个缬氨酸或异亮氨酸替换为异亮氨酸或缬氨酸的残基。因此，上述菲尼克斯蛋白肽的序列、合成或分离、其分析和功能可以在不同物种间保持。

[0125] 现参见全部附图和上述的附图说明，人菲尼克斯蛋白或人菲尼克斯蛋白肽以及前肽人菲尼克斯蛋白（Swiss-Prot:Q8N5G0）中的残基位置标识的任何说明均是用于仅仅用于比对参照，不应认为这些附图标记承认或者暗示附图中所示的或者上述的任何菲尼克斯蛋白肽在现有技术中鉴定过，在自然中出现过，或者前肽人菲尼克斯蛋白的结构或功能与所述菲尼克斯蛋白肽类似。

[0126] 从上述说明易于理解，本发明的基本构思可以以各种方式体现。包括最佳实施方式的本发明涉及菲尼克斯蛋白 / 菲尼克斯蛋白肽的各种和变化实施方式 ：其可用于产生抗体、诊断筛查和检验、调节细胞 cAMP 和受益于可以调节 cAMP、高血压和平滑肌反应的肽的疾病治疗。

[0127] 因此，由包括最佳实施方式的本说明书所披露的或在本申请所附的图或表中显示的本发明的特定实施方式或要素的意图不是限制，而是对本发明大体上涵盖的各种和变化的实施方式或者对于其任何特定要素涵盖的等同物的例示。另外，本发明的一个实施方式或要素的具体说明可能并未明确地阐述所有可能的实施方式或要素 ；许多替代物由说明书和附图隐含地披露。

[0128] 应理解，装置的各要素或方法的各步骤可以通过装置术语或方法术语来描述。这些术语在必要时可以进行替换以使本发明隐含的大覆盖范围得以明确。仅仅作为一个实例，应理解，方法的所有步骤可能披露为动作、进行该动作的手段或引起该动作的要素。类似地，装置的各要素可能披露为物理要素或者该物理要素所推动的作用。仅仅作为一个实例，“一种化学合成肽”的公开应被理解为涵盖了“在化学上合成肽”的行为的公开（无论明确讨论与否），相反地，如果有效地公开了“在化学上合成肽”的行为，这样的公开应被理解为涵盖了“一种化学合成肽”和甚至“在化学上合成肽的手段”的公开。各要素或步骤的这种替代性术语应被理解为明确包括在本说明之中。

[0129] 另外，对于所用的各术语，应理解，除非本申请中对其的使用与这样的解释不一致，否则应理解为本发明对于各属于包含了常用的词典定义，如 Random House Webster’s

Unabridged Dictionary 第二版中所包含的各术语定义，在此特将各定义援引加入。

[0130] 此外，出于本发明的目的，术语“a”或“an”修饰的实体指的是一个或多个该实体；例如，“a light source”指的是一个或多个此种光源。如此，术语“a”或“an”、“一个或多个”和“至少一个”可以在此互换使用。

[0131] 本文中的所有数值均假定为由术语“约”所修饰，无论是否有明确说明。出于本发明的目的，范围可能以从〝约〞一个特定值到〝约〞另一个特定值表示。在表达这样的范围时，另一实施方式包括从所述一个特定值到其他特定值。通过端点表述的数值范围包括该范围内纳入的所有数值。1 ～ 5 的数值范围包括例如数值 1、1.5、2、2.75、3、3.80、4 和 5 等。还应理解，该范围的各端点均明显既与其他端点相关联，也独立于其他端点。当数值通过使用先行词〝约〞表达为近似值时，应理解，特定值可形成另一实施方式。

[0132] 因此，应理解申请人至少要求保护：i) 本文公开和记载的各种菲尼克斯蛋白肽，ii) 公开和记载的相关方法，iii) 这些装置和方法各自的类似、等同和甚至隐含的变型，iv) 实现所显示、公开或记载的各功能的那些替代性实施方式，v) 实现所公开和记载内容所隐含的、实现所示各功能的那些替代性设计和方法，vi) 作为单独和独立发明展示的各特征、部件和步骤，vii) 由所公开的各种系统或部件强化的应用，viii) 由该系统或部件制造的所得产品，ix) 基本上如上文并参照任何所附实例说明的方法和装置，x) 公开的各前述要素的各种组合和排列。

[0133] 本专利申请的背景技术部分提供了本专利所属领域的陈述。该部分也可能引入或包含某些美国专利、专利申请、出版物或可用于相关信息、问题的要求保护的发明的主题的解释，或者关注引入本发明的技术的状态。不应认为，本文中引用或加入的任何美国专利、专利申请、出版物、陈述或其他信息应被解释、理解或视为承认其对于本发明为现有技术。

[0134] 本说明书中阐述的权利要求（如果存在）在此援引加入作为本发明描述的一部分，申请人明确保留使用所有或部分这些权利要求的此种加入内容作为补充说明来支持任何或全部权利要求或其任何要素或部件的权利，申请人还明确保留将这些权利要求或其任何要素或部件的任何部分或全部的加入内容从说明书中移到权利要求中或必要时方向操作从而限定本申请或其任何后续申请或继续、分案或部分继续申请要求保护的主题、或获得按照专利法律、规章或任何国家或条约的规则的费用减少的任何权益，而且援引加入的此类内容应在本申请的整个未决期（包括其后续的继续、分案或部分继续申请或其任何重授专利或延长）期间有效。

[0135] 本说明书阐述的权利要求（如果存在）还意在说明本发明的有限数量的优选实施方式的边界和约束，不应被理解为构成本发明的最广义的实施方式或可以主张权利的本发明的实施方式的全部清单。本申请人并未放弃在如上阐述的说明书的基础上进一步发展其他权利要求作为任何继续、分案或部分继续或类似申请的一部分。

[0001]

序列表

<110> 凤凰制药公司
张肇康
吕荣铭

<120> 菲尼克斯蛋白肽

<130> PCTphoenixin

<150> US 61/519,746
<151> 2011-05-28

<150> US 61/519,747
<151> 2011-05-26

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 168
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Val Lys Glu Val Trp Arg Val Leu Arg Glu Glu Pro Gly Arg Arg
1 5 10 15

Lys Glu Ser Arg Gln Asn Arg Ala Arg Gly Asn Arg Val Gln Gln Asn
20 25 30

Ser Ser Asn Leu Asn Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro His Ser Thr Glu
35 40 45

Ser Arg Gly Arg Arg Arg Ala Gly Ser Glu Ala Pro Pro Arg Pro Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Leu Ser Thr Ser Ser Glu Arg Gly His Gly Pro Ala Val
65 70 75 80

Gly Asn Leu Val Ser Glu Ser Ala Gly Arg Ser Ala Gly Gln Gly Ser
85 90 95

Pro Gly Pro Asp Ala Met Ser Arg Asn Leu Arg Thr Ala Leu Ile Phe
100 105 110

Gly Gly Phe Ile Ser Leu Ile Gly Ala Ala Phe Tyr Pro Ile Tyr Phe
115 120 125

Arg Pro Leu Met Arg Leu Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Gln Ala Ile Asn
130 135 140

[0002]

Arg Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val
145 150 155 160

Trp Ser Asp Pro Phe Gly Arg Lys
165

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly
1 5 10 15

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

[0003]

Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 7

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> C端酰胺化

<400> 8

Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 9

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

[0004]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> C端酰胺化

<400> 10

Xaa Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10 15

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> C端酰胺化

<400> 11

Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> C端酰胺化

<400> 12

Xaa Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

[0005]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端甲基酰胺化

<400> 13

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> C端甲基酰胺化

<400> 14

Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端甲基酰胺化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端甲基酰胺化

<400> 15

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

[0006]

<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> C端甲基酰胺化

<400> 16

Xaa Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10 15

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> C端甲基酰胺化

<400> 17

Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> C端甲基酰胺化

<400> 18

Xaa Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端乙基酰胺化

[0007]

<400> 19

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> C端乙基酰胺化

<400> 20

Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端乙基酰胺化

<400> 21

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> C端乙基酰胺化

<400> 22

Xaa Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe

[0008]

1 5 10 15

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> C端乙基酰胺化

<400> 23

Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> C端乙基酰胺化

<400> 24

Xaa Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 位置2处缬氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 25

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

[0009]

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 位置4处脯氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 26

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 位置5处脯氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 27

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 位置6处丙氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 28

[0010]

Asp Val Gln Pro Pro Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 位置7处亮氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 29

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 位置9处缬氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 30

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 位置10处色氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

[0011]

<400> 31

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> 位置13处脯氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 32

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> 位置14处苯丙氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 33

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 位置14处X为D型1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸

<220>

[0012]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 34

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Xaa
1 5 10

<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处丙氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 35

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 36
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 位置2处丙氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 36

Ala Ala Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 37

[0013]

<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 位置4处缬氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 37

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 位置8处缬氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 38

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 39
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 位置17处丝氨酸为D型

<220>

[0014]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 39

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 40
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> 位置19处脯氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 40

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 位置20处苯丙氨酸为D型

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 41

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe

[0015]

20

<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N端乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 42

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N端乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> C端酰胺化

<400> 43

Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N端乙酰化

<220>

[0016]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 44

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N端甲酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> C端酰胺化

<400> 45

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro Phe
20

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N端甲酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> C端酰胺化

<400> 46

Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10 15

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

[0017]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N端甲酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> C端酰胺化

<400> 47

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe
1 5 10

<210> 48
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> C端用萘修饰

<400> 48

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp
1 5 10 15

Ser Asp Pro

<210> 49
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> C端用萘修饰

<400> 49

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0018]

<223> C端用萘修饰

<400> 50

Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro
1 5 10

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> C端用萘修饰

<400> 51

Xaa Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro
1 5 10 15

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> C端用萘修饰

<400> 52

Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro
1 5 10

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> C端用萘修饰

[0019]

<400> 53

Xaa Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro
1 5 10

<210> 54
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val
1 5 10 15

Trp Ser Asp Pro Trp
20

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Trp
1 5 10

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Trp
1 5 10

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<400> 57

Xaa Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Trp
1 5 10 15

<210> 58
<211> 12

[0020]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Trp
1 5 10

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 位置1处X为焦谷氨酸

<400> 59

Xaa Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Trp
1 5 10

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> 位置11处色氨酸为D型

<400> 60

Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Asp Trp Ser Asp Pro Trp
1 5 10 15

<210> 61
<211> 57
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61

Phe Gly Gly Phe Ile Ser Leu Ile Gly Ala Ala Phe Tyr Pro Ile Tyr
1 5 10 15

Phe Arg Pro Leu Met Arg Leu Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Gln Ala Ile
20 25 30

Asn Arg Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys
35 40 45

Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly Arg Lys

[0021]

50 55

<210> 62
<211> 57
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 62

Phe Gly Gly Phe Ile Ser Met Val Gly Ala Ala Phe Tyr Pro Ile Tyr
1 5 10 15

Phe Arg Pro Leu Leu Arg Leu Glu Glu Tyr Gln Lys Glu Gln Ala Val
20 25 30

Asn Arg Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys
35 40 45

Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly Arg Lys
50 55

<210> 63
<211> 57
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 63

Phe Gly Gly Phe Ile Ser Met Val Gly Ala Ala Phe Tyr Pro Ile Tyr
1 5 10 15

Phe Arg Pro Leu Leu Arg Leu Glu Glu Tyr Gln Lys Glu Gln Ala Val
20 25 30

Asn Arg Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys
35 40 45

Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly Arg Lys
50 55

<210> 64
<211> 57
<212> PRT
<213> 猪

<400> 64

Phe Gly Gly Phe Ile Ser Leu Ile Gly Ala Ala Phe Tyr Pro Ile Tyr
1 5 10 15

Phe Arg Pro Leu Met Arg Leu Glu Glu Tyr Gln Lys Glu Gln Ala Ile
20 25 30

[0022]

Asn Arg Ala Gly Val Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys
35 40 45

Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly Arg Lys
50 55

<210> 65
<211> 57
<212> PRT
<213> 牛

<400> 65

Phe Gly Gly Phe Ile Ser Leu Ile Gly Ala Ala Phe Tyr Pro Ile Tyr
1 5 10 15

Phe Arg Pro Leu Met Arg Leu Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Gln Ala Ile
20 25 30

Asn Arg Ala Gly Ile Val Gln Glu Asp Val Gln Pro Pro Gly Leu Lys
35 40 45

Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly Arg Lys
50 55

<210> 66
<211> 47
<212> PRT
<213> 犬

<400> 66

Ala Phe Tyr Pro Ile Tyr Phe Arg Pro Leu Leu Leu Pro Glu Glu Tyr
1 5 10 15

Gln Lys Glu Gln Ala Val Asn Arg Ala Gly Ile Ile Gln Glu Asp Val
20 25 30

Gln Pro Pro Gly Leu Lys Val Trp Ser Asp Pro Phe Gly Arg Lys
35 40 45

Met-Val-Lys-Glu-Val-Trp-Arg-Val-Leu-Arg-Glu-Glu-Pro-Gly-Arg-
1 5 10 15
Arg-Lys-Glu-Ser-Arg-Gln-Asn-Arg-Ala-Arg-Gly-Asn-Arg-Val-Gln-
16 20 25 30
Gln-Asn-Ser-Ser-Asn-Leu-Asn-Pro-Thr-Pro-Ala-Pro-Gly-Pro-His-
31 35 40 45
Ser-Thr-Glu-Ser-Arg-Gly-Arg-Arg-Arg-Ala-Gly-Ser-Glu-Ala-Pro-
46 50 55 60
Pro-Arg-Pro-Gly-Ser-Glu-Ser-Leu-Ser-Thr-Ser-Ser-Glu-Arg-Gly-
61 65 70 75
His-Gly-Pro-Ala-Val-Gly-Asn-Leu-Val-Ser-Glu-Ser-Ala-Gly-Arg-
76 80 85 90
Ser-Ala-Gly-Gln-Gly-Ser-Pro-Gly-Pro-Asp-Ala-Met-Ser-Arg-Asn-
91 95 100 105
Leu-Arg-Thr-Ala-Leu-Ile-Phe-Gly-Gly-Phe-Ile-Ser-Leu-Ile-Gly-
106 110 115 120
Ala-Ala-Phe-Tyr-Pro-Ile-Tyr-Phe-Arg-Pro-Leu-Met-Arg-Leu-Glu-
121 125 130 135
Glu-Tyr-Lys-Lys-Glu-Gln-Ala-Ile-Asn-Arg-Ala-Gly-Ile-Val-Gln-
136 140 145 150
Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-
151 155 160 165
Gly-Arg-Lys
166 168
(SEQ ID NO:1)

图 1

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe
1 5 10 15 20
(SEQ ID NO.:2)

图 2

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-Gly
(SEQ. ID NO.: 3)

图 3

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe
(SEQ. ID NO.: 4)

图 4

Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-Gly
(SEQ. ID NO.: 5)

图 5

Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe
(SEQ. ID NO.: 6)

图 6

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 7)

图 7

Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 8)

图 8

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 9)

图 9

pGlu-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 10)

图 10

Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 11)

图 11

pGlu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 12)

图 12

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NHCH3
(SEQ. ID NO.: 13)

图 13

Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NHCH3
(SEQ. ID NO.: 14)

图 14

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NHCH3
(SEQ. ID NO.: 15)

图 15

pGlu-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NHCH3
(SEQ. ID NO.: 16)

图 16

Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NHCH3
(SEQ. ID NO.: 17)

图 17

pGlu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NHCH3
(SEQ. ID NO.: 18)

图 18

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NHCH2CH3
(SEQ. ID NO.: 19)

图 19

Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH CH2CH3
(SEQ. ID NO.: 20)

图 20

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH CH2CH3
(SEQ. ID NO.: 21)

图 21

pGlu-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH CH2CH3
(SEQ. ID NO.: 22)

图 22

Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH CH2CH3
(SEQ. ID NO.: 23)

图 23

pGlu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH CH2CH3
(SEQ. ID NO.: 24)

图 24

Asp-dVal-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 25)

图 25



图 26



图 27



图 28



图 29



图 30



图 31

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-dPro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 32)

图 32

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-dPhe-NH2
(SEQ. ID NO.: 33)

图 33

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-dTic-NH2
(SEQ. ID NO.: 34)

图 34

dAla-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 35)

图 35

Ala-dAla-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 36)

图 36

Ala-Gly-Ile-dVal-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 37)

图 37

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-dVal-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 38)

图 38

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-dSer-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 39)

图 39

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-dPro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 40)

图 40

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-dPhe-NH2
(SEQ. ID NO.: 41)

图 41

Ac-Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 42)

图 42

Ac-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 43)

图 43

Ac-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 44)

图 44

Fom-Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 45)

图 45

Fom-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 46)

图 46

Fom-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH2
(SEQ. ID NO.: 47)

图 47

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Nap
(SEQ. ID NO.: 48)

图 48

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Nap
(SEQ. ID NO.: 49)

图 49

Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Nap
(SEQ. ID NO.: 50)

图 50

pGlu-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Nap
(SEQ. ID NO.: 51)

图 51

Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Nap
(SEQ. ID NO.: 52)

图 52

pGlu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Nap
(SEQ. ID NO.: 53)

图 53

Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Trp
(SEQ. ID NO.: 54)

图 54

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Trp
(SEQ. ID NO.: 55)

图 55

Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Trp
(SEQ. ID NO.: 56)

图 56

pGlu-Glu-Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Trp
(SEQ. ID NO.: 57)

图 57

Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Trp
(SEQ. ID NO.: 58)

图 58

pGlu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Trp
(SEQ. ID NO.: 59)

图 59

Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Asp-dTrp-Ser-Asp-Pro-Trp
(SEQ. ID NO.: 60)

图 60

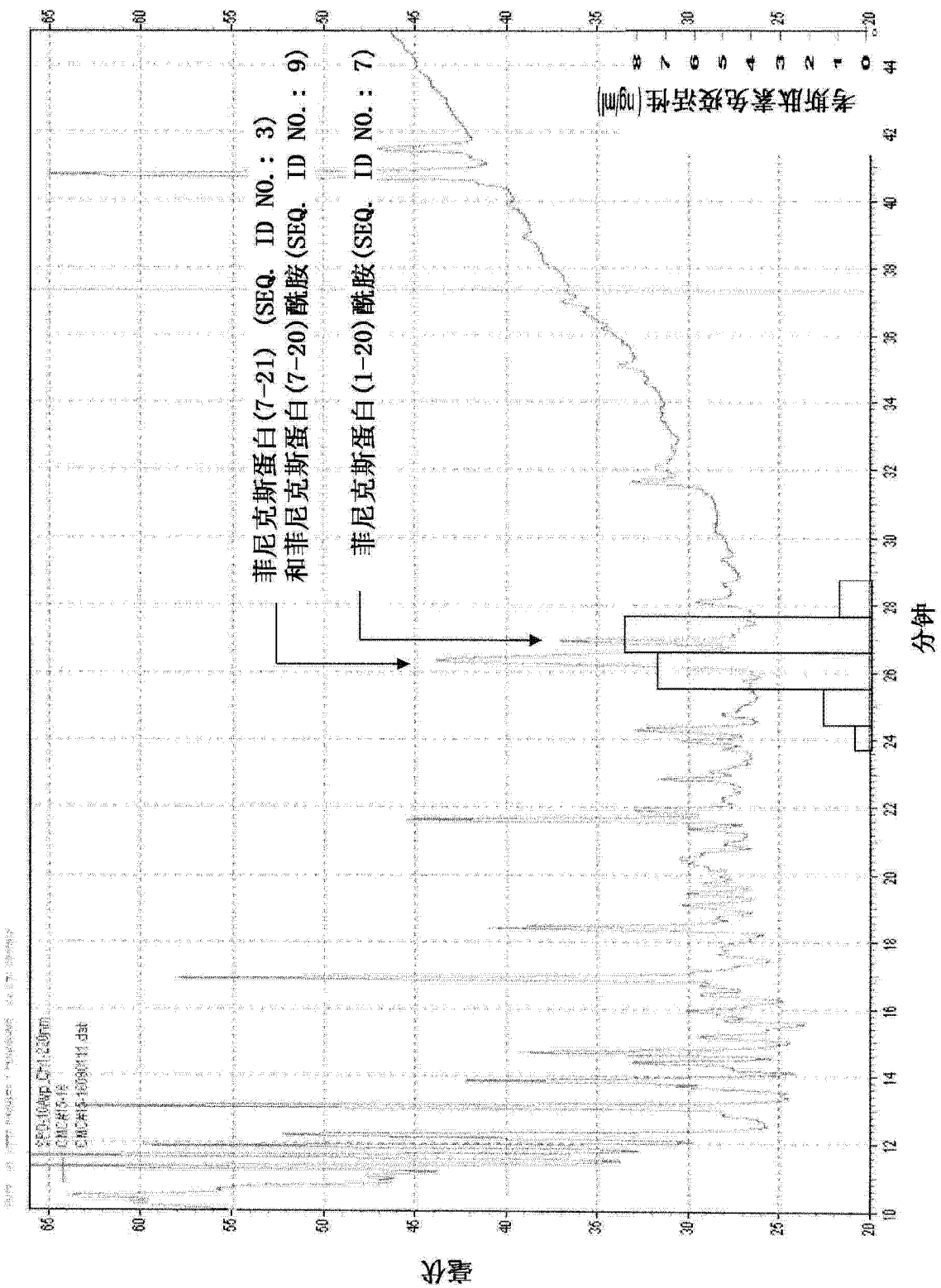

菲尼克斯蛋白(7-21) (SEQ. ID NO.: 3)
和菲尼克斯蛋白(7-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 9)
菲尼克斯蛋白(1-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 7)
考斯胜素免疫活性(ng/ml)
分钟
毫伏

图 61

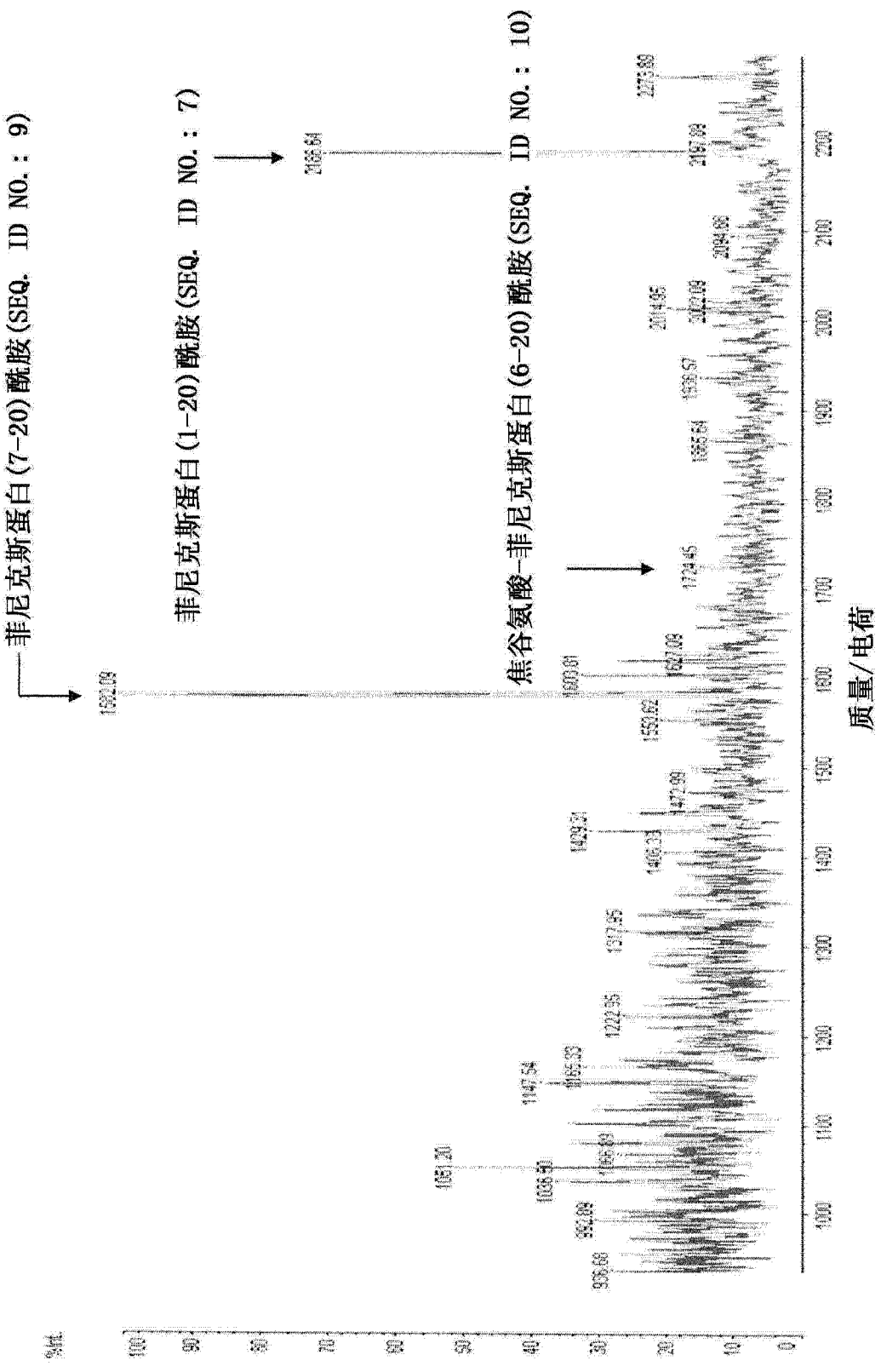

菲尼克斯蛋白(7-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 9)
菲尼克斯蛋白(1-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 7)
焦谷氨酸-菲尼克斯蛋白(6-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 10)
质量/电荷

图 62

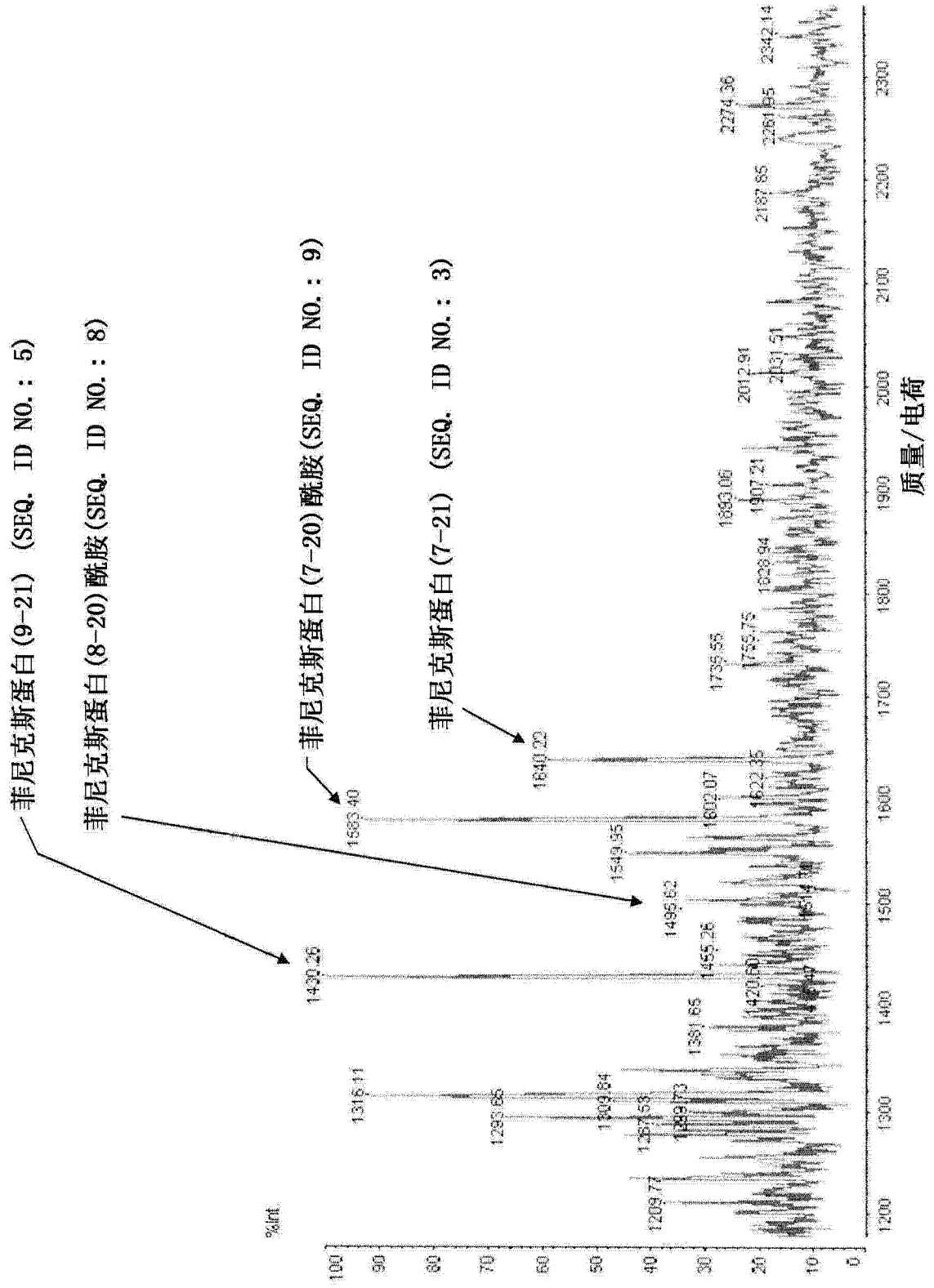

菲尼克斯蛋白(9-21) (SEQ. ID NO.: 5)
菲尼克斯蛋白(8-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 8)
菲尼克斯蛋白(7-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 9)
菲尼克斯蛋白(7-21) (SEQ. ID NO.: 3)
%Int.
质量/电荷

图 63

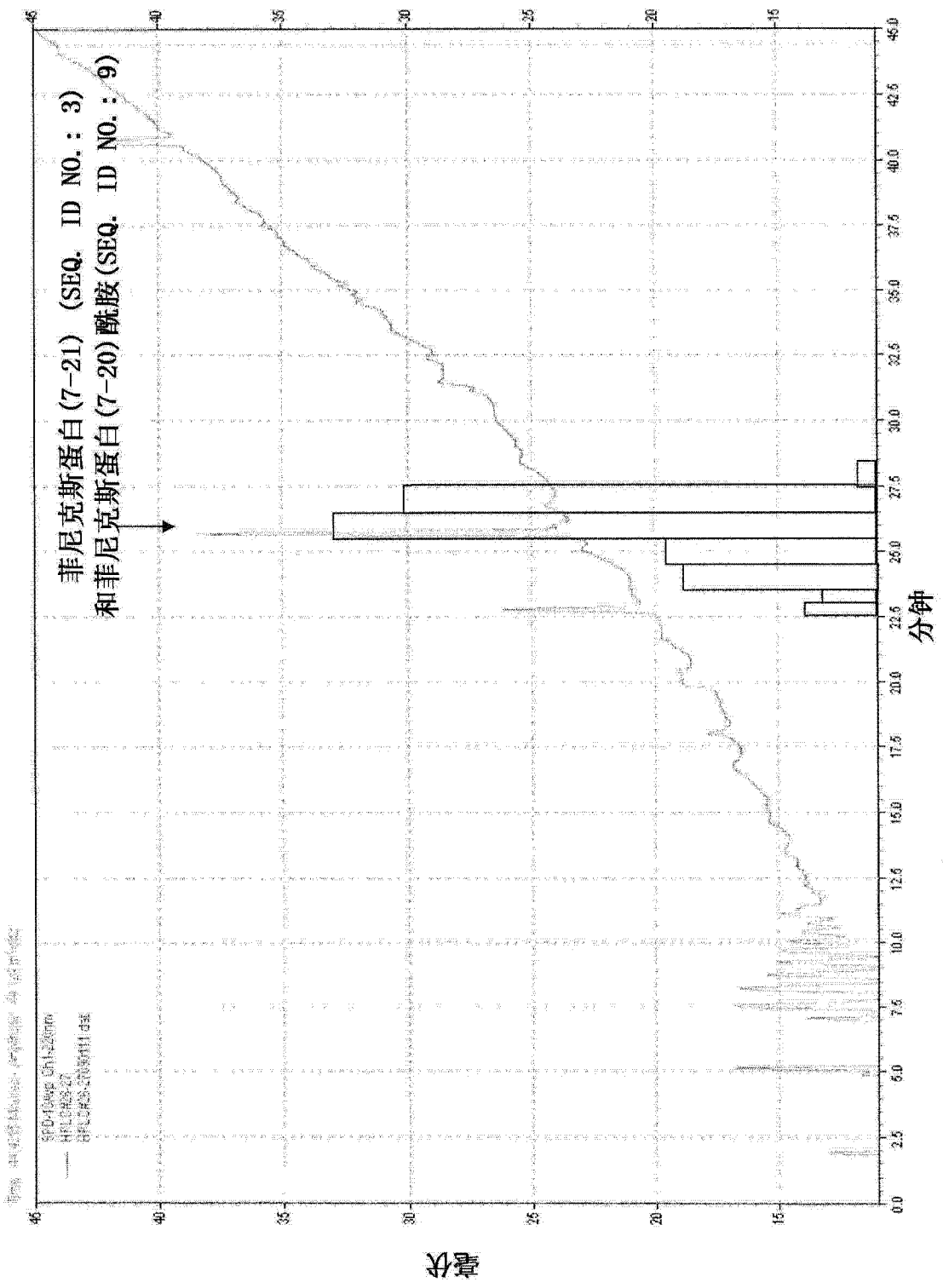


图 64

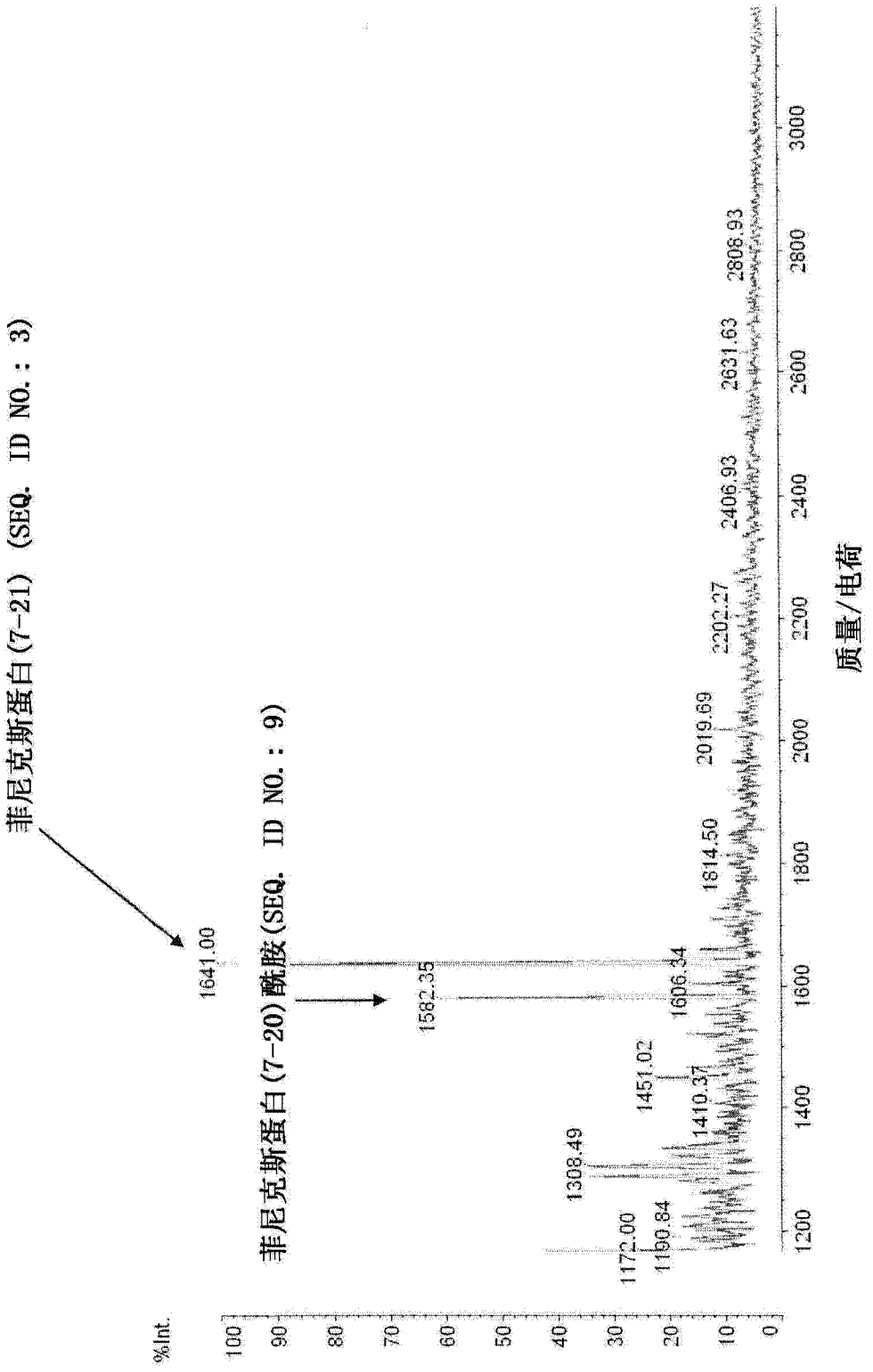

菲尼克斯蛋白(7-21) (SEQ. ID NO.: 3)
菲尼克斯蛋白(7-20)酰胺(SEQ. ID NO.: 9)
1641.00
1582.35
1606.34
1614.50
2019.69
2202.27
2406.93
2631.63
2806.93
1308.49
1451.02
1410.37
1172.00
1190.84
%Int.
质量/电荷

图 65

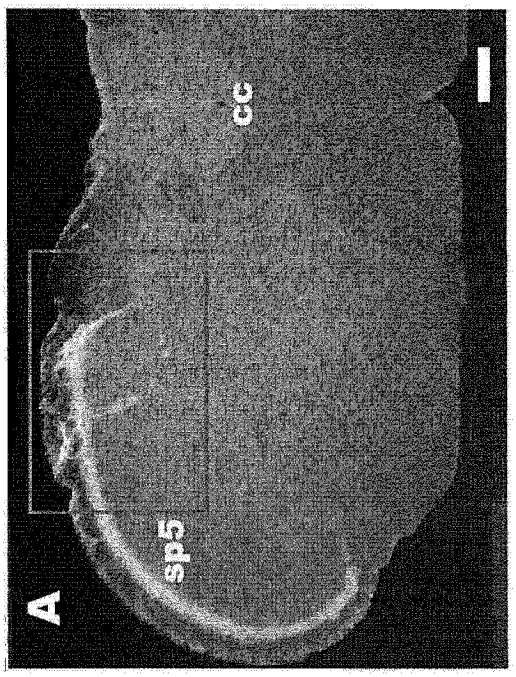


图 66A

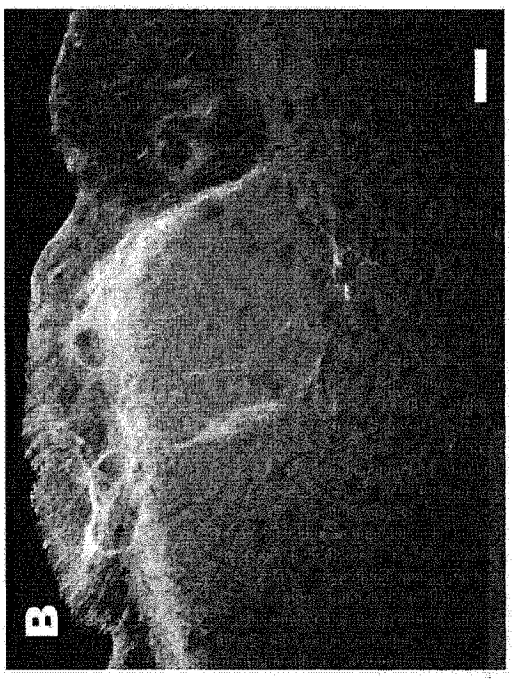


图 66B

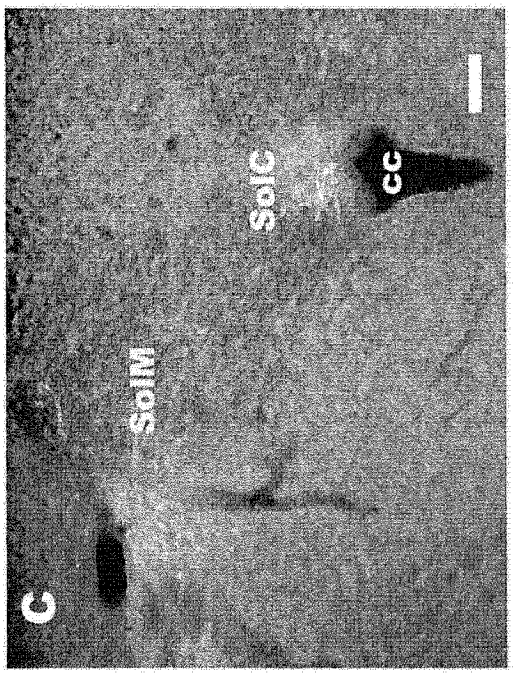


图 66C

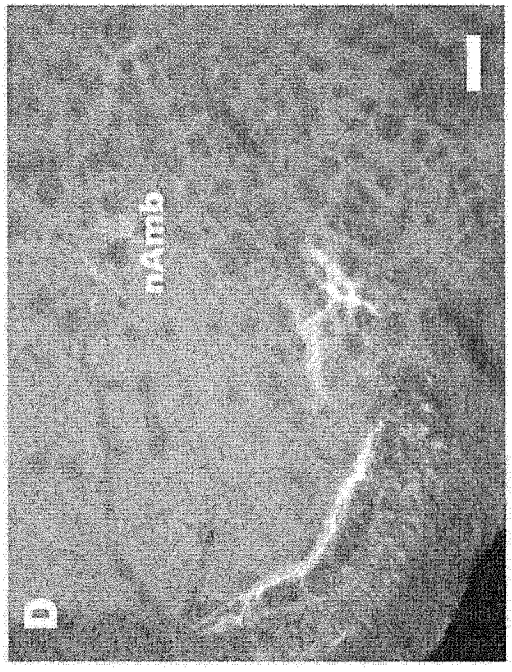


图 66D

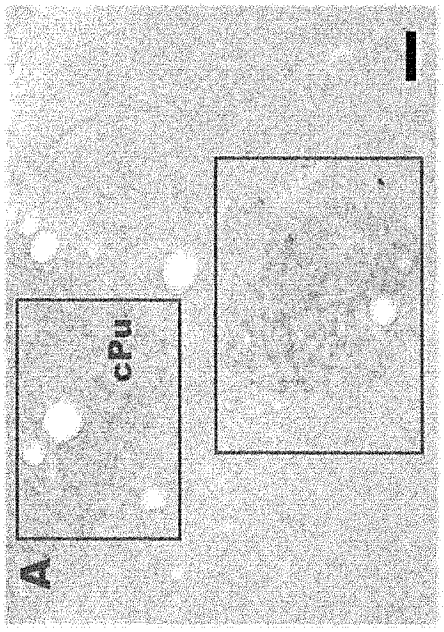


图 67A

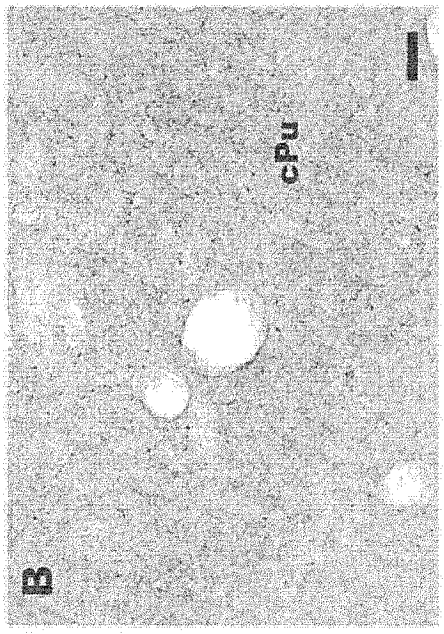


图 67B

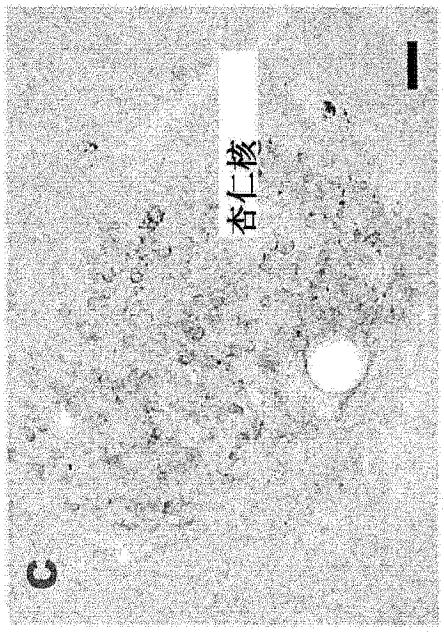


图 67C

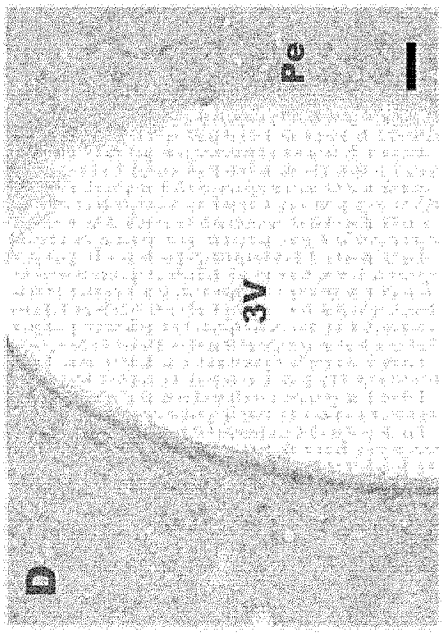


图 67D



图 68A

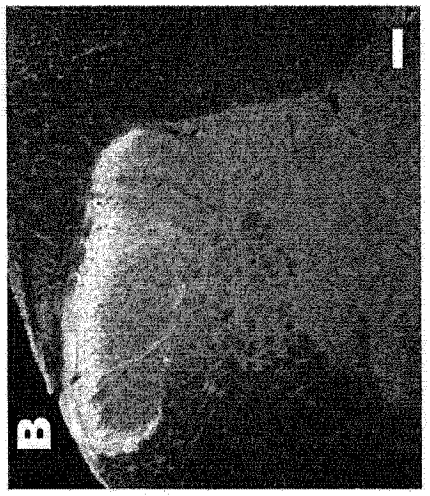


图 68B

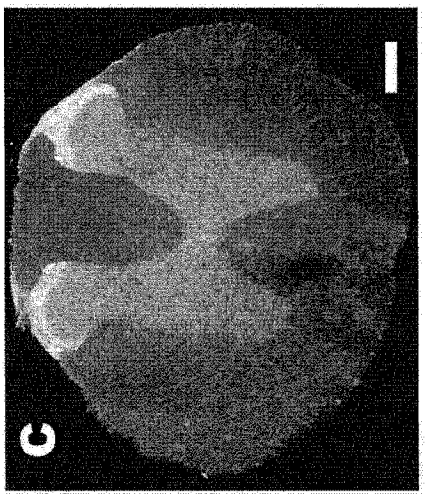


图 68C

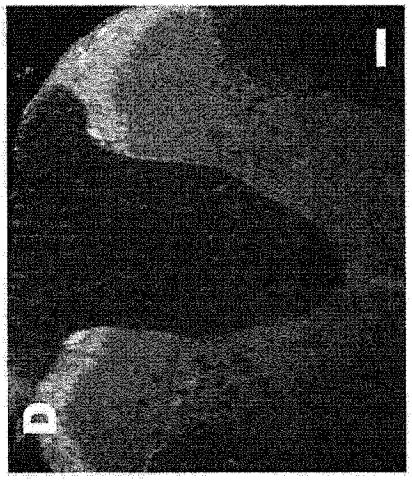


图 68D

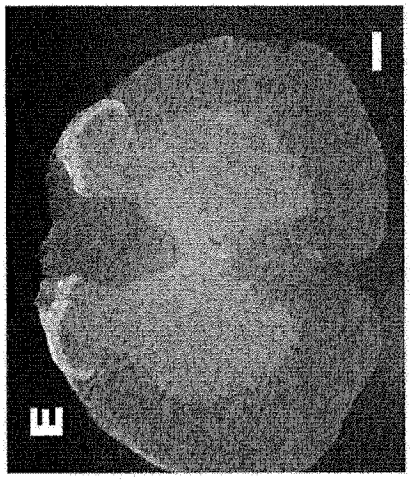


图 68E

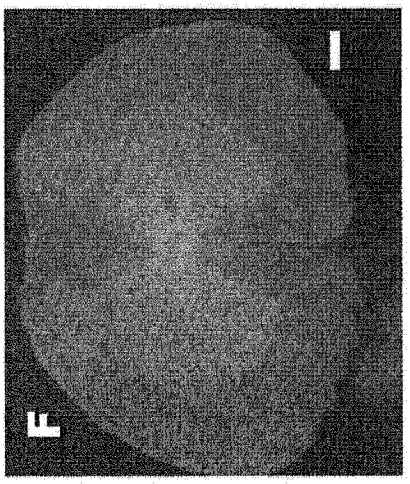


图 68F

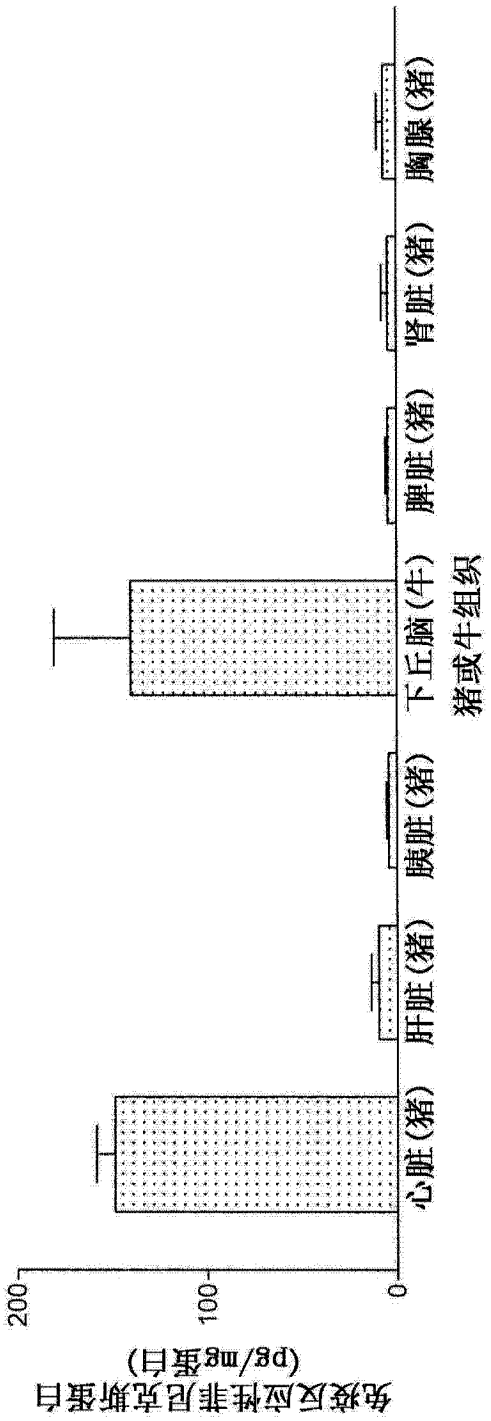

免疫反应性菲尼克斯蛋白
(pg/mg蛋白)
200
100
0
心脏(猪)
肝脏(猪)
胰脏(猪)
下丘脑(牛)
脾脏(猪)
肾脏(猪)
胸腺(猪)
猪或牛组织

图 69

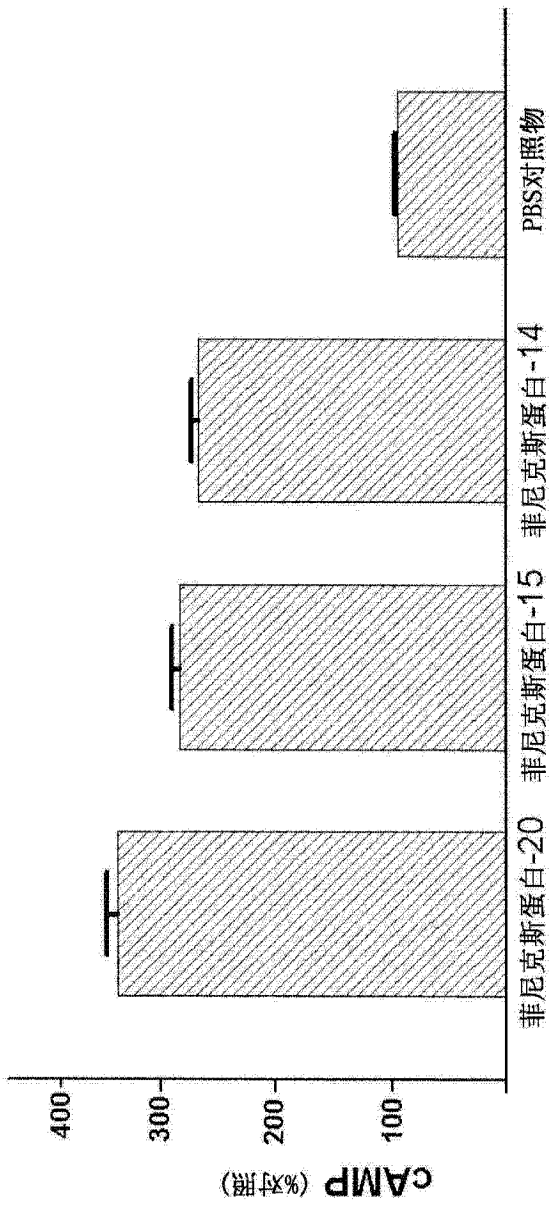

cAMP (%对照)
400
300
200
100
菲尼克斯蛋白-20
菲尼克斯蛋白-15
菲尼克斯蛋白-14
PBS对照物

图 70

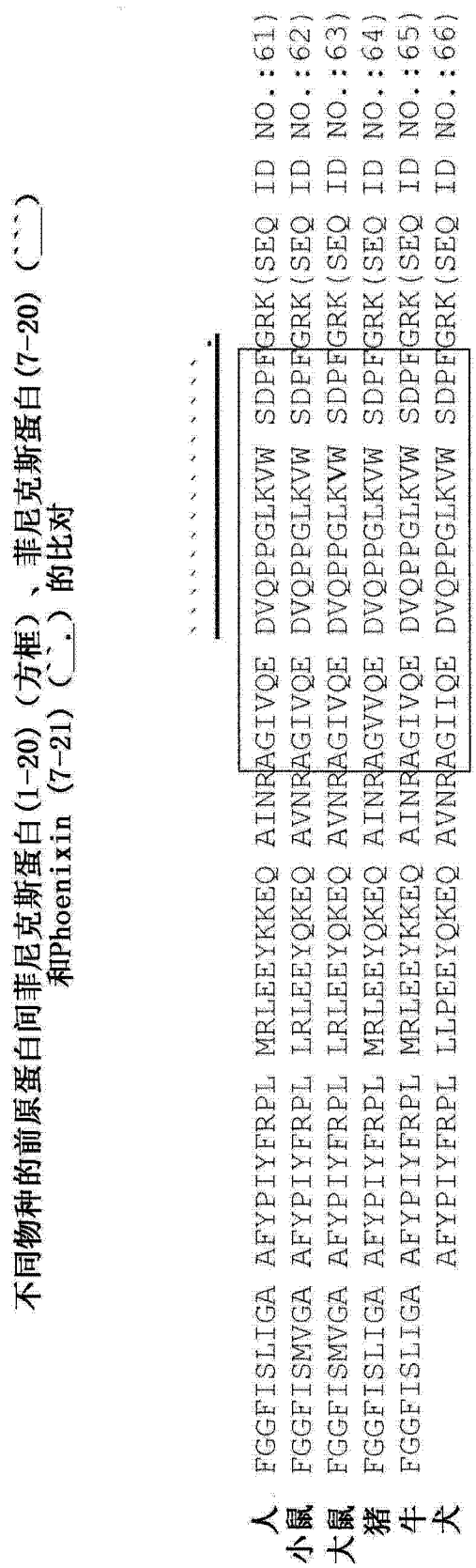

不同物种的前原蛋白间菲尼克斯蛋白(1-20)（方框）、菲尼克斯蛋白(7-20)（___）
和Phoenixin (7-21)（`.`）的比对
人 FGGFISLIGA AFYPIYFRPL MRLEEYKKEQ AINRAGIVQE DVQPPGLKVW SDPFGRK(SEQ ID NO.:61)
小鼠 FGGFISMVGA AFYPIYFRPL LRLEEYQKEQ AVNRAGIVQE DVQPPGLKVW SDPFGRK(SEQ ID NO.:62)
大鼠 FGGFISMVGA AFYPIYFRPL LRLEEYQKEQ AVNRAGIVQE DVQPPGLKVW SDPFGRK(SEQ ID NO.:63)
猪 FGGFISLIGA AFYPIYFRPL MRLEEYQKEQ AINRAGVVQE DVQPPGLKVW SDPFGRK(SEQ ID NO.:64)
牛 FGGFISLIGA AFYPIYFRPL MRLEEYKKEQ AINRAGIVQE DVQPPGLKVW SDPFGRK(SEQ ID NO.:65)
犬 AFYPIYFRPL LLPEEYQKEQ AVNRAGIIQE DVQPPGLKVW SDPFGRK(SEQ ID NO.:66)

图 71