

[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 02819716. X

[51] Int. Cl.

*C07K 16/00 (2006.01)*  
*A01N 37/18 (2006.01)*  
*C12P 21/06 (2006.01)*  
*C12N 15/00 (2006.01)*  
*C12Q 1/68 (2006.01)*  
*A61K 38/16 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1326876C

[51] Int. Cl. (续)

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61P 3/10 (2006.01)*

[22] 申请日 2002.10.4 [21] 申请号 02819716. X

[30] 优先权

[32] 2001.10.5 [33] US [31] 60/327,730

[86] 国际申请 PCT/US2002/031693 2002.10.4

[87] 国际公布 WO2003/040309 英 2003.5.15

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.5

[73] 专利权人 拜尔药品公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 C·潘 J·惠兰

K·B·克莱尔蒙特

[56] 参考文献

WO9111457A1 1991.8.8

审查员 唐 慧

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 孟凡宏

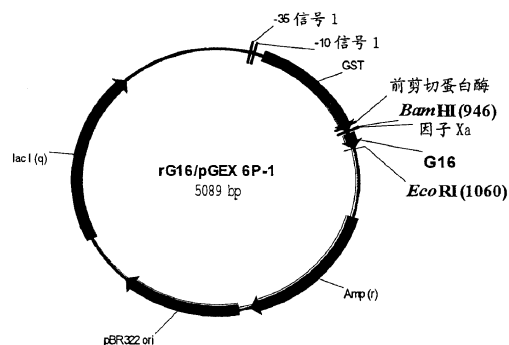
权利要求书 1 页 说明书 51 页 附图 1 页

[54] 发明名称

作为 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素拮抗剂的肽及其在药学上的使用方法

[57] 摘要

本发明提供的多肽既可以作为 GLP-1 受体激动剂,也可作为胰高血糖素拮抗剂。这种多肽可用于治疗 2 型糖尿病或其他代谢紊乱。



1. 一种多肽，其选自 SEQ ID NOs:6-32。
2. 编码权利要求 1 所述多肽的多核苷酸，或其简并变体。
3. 含有权利要求 2 所述多核苷酸的载体。
4. 含有权利要求 3 所述载体的宿主细胞。
5. 一种制备多肽的方法，其包括：
  - a) 在适合表达所述多肽的条件下培养权利要求 4 所述的宿主细胞；和
  - b) 从宿主细胞培养物中回收多肽。
6. 一种药用组合物，其由权利要求 1 所述的多肽和药学上可接受的载体组成。
7. 一种基因治疗组合物，其由权利要求 2 所述的多核苷酸和治疗有效性基因治疗载体组成。
8. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中所述多肽由 SEQ ID NO: 25 所示。
9. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中所述多肽由 SEQ ID NO: 26 所示。
10. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中所述多肽由 SEQ ID NO: 27 所示。
11. 一种纯化抗体，其与权利要求 1 所述的多肽特异性结合。
12. 一种肽在制备用于治疗哺乳动物代谢紊乱的药物中的用途，所述肽是 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素拮抗剂，选自 SEQ ID NOs:6-32。
13. 根据权利要求 12 所述的用途，其中肽选自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27。
14. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述代谢紊乱是 2 型糖尿病。
15. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述肽的治疗有效量为约 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 约 1  $\text{mg}/\text{kg}$ 。
16. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述代谢紊乱是葡萄糖耐量异常的前驱糖尿病状态。

## 作为 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素拮抗剂的肽 及其在药学上的使用方法

### 发明领域

本发明涉及一种新近鉴定的多肽及这种多肽在治疗上的应用，它可作为 GLP-1 受体激动剂，也可作为胰高血糖素拮抗剂。更具体地说，本发明的多肽可用来刺激胰岛素以葡萄糖依赖方式从  $\beta$  胰细胞中释放，同时减少胰高血糖素介导的葡萄糖从肝中的分泌，因此给患有糖尿病、高血糖病、空腹血糖异常、葡萄糖耐受性异常、前驱糖尿病和肥胖症等代谢紊乱的患者提供了一种治疗选择。

### 背景技术

糖尿病的特征是胰岛素分泌异常，患者体内的其它表现是血糖浓度的升高。根据原在性缺陷可以将糖尿病分成两类：1 型糖尿病（胰岛素依赖型糖尿病，IDDM），当患者体内胰腺缺乏产生胰岛素的  $\beta$  细胞时，便会出现 1 型糖尿病，而 2 型糖尿病（非胰岛素依赖型糖尿病，NIDDM）则是在患者  $\beta$  细胞胰岛素分泌异常和/或胰岛素作用发生改变时出现。

1 型糖尿病目前用胰岛素治疗，而大多数 2 型糖尿病则用能刺激  $\beta$  细胞作用或增强患者组织对胰岛素敏感性的药剂来治疗。长时间治疗后，几乎有一半 2 型糖尿病供试者对这些药剂失去应答。因此，必须用胰岛素治疗。目前用来治疗 2 型糖尿病的药物包括  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂（PRECOSE<sup>®</sup>、VOGLIBOSE<sup>™</sup>和 MIGLITOL<sup>®</sup>）、胰岛素致敏剂（例如 Avandia<sup>™</sup>、Actos<sup>™</sup> 和 Rezulin<sup>™</sup>）、胰岛素促泌剂（磺胺尿素类（“SFUs”）和别的作用于  $K^+$  通道的药剂）和 GLUCOPHAGE<sup>™</sup>（盐酸梅氟明）。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂通过延迟消化道对葡萄糖的吸收来减少餐后葡萄糖的释放。这些药物是安全的，能治疗轻度到中度的糖尿病患者。然而，已有文献报导了它们的胃肠道副作用，

而这种副作用限制了这些药物的有效性。

胰岛素致敏剂。胰岛素致敏剂是一些能增强机体对胰岛素应答的药物。噻唑烷二酮类化合物如梵帝雅(Avandia)<sup>TM</sup> (罗格列酮)和爱妥糖(Actos)<sup>TM</sup> 能激活过氧化物酶体增殖物活化的受体(PPAR)- $\gamma$ , 并调节一系列未阐明的基因的活性。在应用了梵帝雅<sup>TM</sup> (罗格列酮)和爱妥糖<sup>TM</sup> 的患者中, 肝脏效应(药物诱导肝毒性和肝中酶水平升高)看起来并不是显著的问题。即便如此, 还是推荐在治疗的第一年每2个月作一次肝酶检测, 以后定期检测。梵帝雅<sup>TM</sup> (罗格列酮)和爱妥糖<sup>TM</sup> 治疗伴随水滞留、水肿和体重增加。研究表明梵帝雅<sup>TM</sup> 并不能和胰岛素一起使用, 因为它会引发心脏衰竭。第一个胰岛素致敏剂药物, 爱妥糖<sup>TM</sup> (屈吉他宗)从市场上撤出, 是因为它能引起肝中酶水平升高, 并诱导肝毒性。

胰岛素促泌剂。磺胺脲素类(SFUs)和非磺胺脲素类药物: 那格列奈(Nateglinide)和 Pepaglinide 通过 ATP-依赖的钾通道作用, 引起不依赖葡萄糖的胰岛素的分泌。这些药物用于伴随轻至中度空腹血糖异常的2型糖尿病的基本治疗。胰岛素促泌剂有局限性, 它有可能诱导低血糖、体重增加以及高的原发性和继发性失败率。10%~20%的最初治疗的病人不能显示出显著的治疗效果(原发性失败)。用胰岛素促泌剂治疗六个月后, 治疗效果又要损失20~30%, 可以通过这点来证明继发性失败。通过5~7年治疗后, 胰岛素治疗是50%的胰岛素促泌剂应答者所必需的(Scheen 等, Diabetes Res. Clin. Pract. 6:533-543, 1989)。那格列奈和 Pepaglinide 是短效药物, 因此必须一天服用三次。它们只是用来控制餐后血糖, 并不用来控制空腹血糖。

GLUCOPHAGE<sup>TM</sup>是一种缩二脲, 它通过减少肝中葡萄糖的输出, 增加外周葡萄糖的吸收和利用来降低血糖。这种药物能有效地降低轻度和中度糖尿病患者的血糖浓度, 而且不会带来体重增加可能诱导低血糖的副作用。然而, GLUCOPHAGE<sup>TM</sup>有许多别的副作用, 包括肠胃消化不良和乳酸酸中毒。70岁以上的糖尿病患者和肾功能不全或肝功能不全的患者禁止服用 GLUCOPHAGE<sup>TM</sup>。最后, GLUCOPHAGE<sup>TM</sup>和胰岛素促泌剂具有一样的原发性和继发性失败率。

在饮食、锻炼和口服给药不足以控制血糖后，开始胰岛素治疗。这种治疗有一些缺点：它需要注射，能导致低血糖，而且它还能引起体重增加。胰岛素诱导低血糖的可能性限制了低血糖被控制的程度。

当前疗法中出现的新问题使得新的治疗 2 型糖尿病疗法成为可能。保持正常胰岛素分泌（即葡萄糖依赖的）的疗法尤其必需。假如胰高血糖素样肽-1(“GLP-1”)能促进胰腺中葡萄糖调节的胰岛素分泌，GLP-1 受体激动剂在治疗这种疾病中就可能有价值。此外，假设胰高血糖素能通过刺激肝糖分解和葡萄糖新生作用提高血糖水平，就能证明胰高血糖素受体拮抗剂在治疗 2 型糖尿病中价值。

GLP-1 和胰高血糖素是结构相关的肽类激素家族，即胰高血糖素/肠促胰激素家族中的成员。在这个家族中，GLP-1(7-36) 和 GLP-1(7-37)（分别是 30 个和 31 个氨基酸）和胰高血糖素（30 个氨基酸）构成了一类高度同源的肽。此外，这两类激素衍生自同一前体前胰高血糖素，通过组织特异性加工，前胰高血糖素在肠内主要生成 GLP-1，而在胰腺中主要生成胰高血糖素。这两类肽的受体有同源性（58% 的相同性），属于 G 蛋白偶连受体家族。

GLP-1 和胰高血糖素在维持全身葡萄糖平衡中起着主要的作用。依赖葡萄糖的胰岛素分泌能调节血浆中葡萄糖的浓度，GLP-1 能降低这种血糖的浓度，而胰高血糖素却能升高血糖浓度。假如 GLP-1 和胰高血糖素确实在维持体内血糖浓度中发挥重要作用，那么鉴定 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂就会引起很大的兴趣。临床研究已经证明灌输 GLP-1 能促进糖尿病患者胰岛素分泌，使血糖浓度保持正常。然而，GLP-1 在体内半寿期很短，能快速降解。此外，GLP-1 在达到或接近治疗剂量时，会产生消化道运动机能副作用。因此，GLP-1 本身作为治疗药剂有显著的局限性。因此，正在对其进行修饰，希望获得具有更高稳定性的肽。GLP-1 受体的非肽类激动剂迄今为止未见有报道。

在患有糖尿病的大鼠中鉴定出了胰高血糖素的肽类似物，它可作为胰高血糖素的拮抗剂，减轻高血糖。然而，肽类胰高血糖素的拮抗剂还没超出临床前开发的范畴。在科学文献和专利文案中介绍了许多结构各异的非肽类胰高血糖素受体拮抗剂。然而，在体鉴定胰高血糖

素受体的小分子抑制剂取得的成功有限。在临床研究中唯一已知的有活性的胰高血糖素拮抗剂是一种称作 BAY27-9955 的化合物。胰高血糖素拮抗剂可能的副作用是导致低血糖。

因为在 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂单独给药时，可能会伴随副作用，用组合疗法具有优势，既能保持所需的低血糖，又能减少副作用。然而同时给药时，要求单一的制剂和转移方法来获得两种肽的合适药物动力学图谱。这可能是开发这种疗法的主要障碍。

根据前面所述，单一的、在体内既可作 GLP-1 激动剂又可作为胰高血糖素拮抗剂的治疗用肽可能是存在的。

### 发明概述

本发明提供了一种新的多肽，它既能作 GLP-1 受体激动剂，也可作胰高血糖素受体拮抗剂，对可被具有 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂活性的药剂改善的疾病和状况有效。本发明的多肽为一些病人提供了一种新的疗法，如患代谢紊乱、葡萄糖耐受性异常、肥胖症的患者，代谢紊乱是由内源胰岛素分泌下降所引发的疾病，尤其是 2 型糖尿病，而葡萄糖耐受性异常是一种前驱糖尿病状态，在这种状态中，胰岛素分泌或空腹血糖异常有轻微变化。

本发明的一个方面是选自下列一组多肽：SEQ ID NOS: 6-32，以及具 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂功能的多肽片段、衍生物和变体，它们的水平和 SEQ ID NOS:6-32 所示的多肽基本相同（统一叫“本发明的多肽”）。

本发明的别的实施方案包括编码本发明多肽的多核苷酸以及重组表达多肽所必需的载体和宿主细胞。

本发明的另一方面提供了治疗受本发明中多肽影响的哺乳动物，包括人糖尿病和/或其他疾病和状况的方法。这些方法包括对哺乳动物施用治疗有效剂量的本发明中任一多肽。

本发明也提供制备本发明中多肽的重组方法和合成方法。

### 附图简述

图 1 是一种典型的质粒限制性图谱，质粒中含有 GST-肽融合多核苷酸编码序列。

#### 优选实施方案详述

本发明提供了一种具 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂功能的新多肽，及其片段、衍生物和类似物。本发明的多肽在体内既能作 GLP-1 受体激动剂，也能作胰高血糖素的受体拮抗剂，用于预防和/或治疗如糖尿病、低血糖、糖耐量减低、空腹血糖异常和肥胖症等疾病和状况。

GLP-1 和胰高血糖素是结构相关的肽类激素家族，既胰高血糖素/肠促胰激素家族中的成员。下列的堆叠排序显示的是一级结构关系：

胰高血糖素	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO:1)
GLP-1 (7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:2)
GLP-1 (7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:3)

氨基酸的单字母缩写可以在 Zubay, Biochemistry 第二版, MacMillan 出版社, 纽约, 第 33 页中找到。这些多肽在保持全身葡萄糖平衡中起着一定的作用。GLP-1 能降低血糖浓度，而胰高血糖素则升高血糖浓度。

假如 GLP-1 能促进胰腺中葡萄糖调节的胰岛素分泌，GLP-1 受体激动剂就可能在治疗代谢紊乱和别的疾病中有潜在的价值。而且，假设胰高血糖素通过刺激肝糖分解和葡萄糖新生作用提高血糖水平，胰高血糖素受体就能证明在治疗疾病中有价值。

本发明提供了一种新的多肽，它既能用作 GLP-1 受体激动剂，也能用作胰高血糖素受体拮抗剂。不局限于理论，我们相信本发明的多肽在体内能够刺激胰岛素以葡萄糖依赖方式从  $\beta$  胰细胞中释放，同时减少胰高血糖素介导的葡萄糖分泌。

#### GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂多肽

本发明提供的多肽既能用作 GLP-1 受体激动剂，也能用作胰高血糖素受体拮抗剂。在一个或多个体外或体内测定 GLP-1 受体活化的实验中，这种多肽的 GLP-1 受体激动剂成分能激活 GLP-1 受体。

在一个或多个体外或体内测定胰高血糖素受体活性抑制的实验中，本发明的多肽表现出胰高血糖素受体拮抗剂的活性。这种试验的例子包括，但不仅限于检测对胰高血糖素介导之胞内 cAMP 上升的抑制作用的体外实验，检测胰高血糖素介导的葡萄糖从培养的肝细胞中释放的体外实验，或如下面具体实施例所介绍的胰高血糖素刺激葡萄糖产生的体内实验。

本发明优选的多肽选自(1)SEQ ID NOS:6-32 和(2)以及具 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂功能的多肽片段、衍生物和变体，它们的功能水平和 SEQ ID NOS:6-32 所示的多肽基本相同。

本发明的多肽可以是天然的多肽，重组的多肽或合成的多肽。

片段，衍生物，变体和类似物

肽片段、衍生物、变体和类似物基本保持和 SEQ ID NOS:6-32 所示的多肽同样的生物功能或活性。“基本同样的生物功能或活性”是指全长多肽活性的约 30%~100% (即 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%) 或更多。

衍生物

衍生物包括经化学修饰的、具有附加结构和/或功能的本发明多肽。例如，可以在多肽中加入聚乙二醇 (PEG) 或脂肪酸来改善它的半寿期。也可构建具有靶向特异性或其他附加活性的融合多肽，这在下面会更详细地加以介绍。

衍生物既可通过天然加工如转录后加工或化学修饰技术进行修饰，这两类技术都是本领域众所周知的技术。可以在多肽的任何部位进行修饰，包括多肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基端。在一个给定的多肽中，同一类型的修饰在一些位点出现的程度可以相同或不同。此外，一个变体可以包含一个或多个不同类型的修饰。例如，多肽由于泛素化而变成分支状，它们可以是带或不带分支的环状。

别的化学修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素基团的共价连接、核苷酸和核苷酸衍生物的共价连接、脂或脂类衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇、交联、环化、形成二硫键、去甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 $\gamma$ -羧基化、糖基化、形成 GPI 锚、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫化、转运 RNA 介导的向蛋白上添加氨基酸如精氨酰化和泛素化。(参考例如 T. E. Creighton, 蛋白质: 结构和分子特征, 第二版, W.H. Freeman and Company, New York (1993); 蛋白质的翻译后共价修饰, B. C. Johnson, ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol* 182:626-46 (1990); Rattan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62, 1992)。

衍生物也包括和其他多肽, 例如人血清白蛋白相融合的成熟多肽, 以改进其药物动力学特性。可以用本领域技术人员熟知的任何技术融合两种多肽。例如, 编码人血清白蛋白的 DNA 和编码本发明多肽的 DNA 序列可以克隆到本领域技术人员熟知的任何哺乳动物表达载体中。本发明多肽位于其他多肽的 N 末端是优选的, 因为一个自由的 N-端组氨酸是 GLP-1 受体活性所必需的 (Kawa, *Endocrinology* Apr;124(49):1768-73, 1989)。然后通过将载体转化合适的宿主细胞, 如 HKB 细胞或 CHO 细胞, 表达融合蛋白, 从而产生重组的融合蛋白。

优选的衍生物包括连接了一个 PEG 基团或脂肪酸基团的本发明多肽(SEQ ID NOS:6-32)。举例来说, PEG 基团可以是分子量大于 22kDa 的 PEG, 分子量介于 25 kDa~100 kDa (如 25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 kDa) 是优选的, 而分子量介于 35 kDa~45 kDa(如 35、36、37、38、39、40、41、42、43、44 或 45 kDa)是更优选的。PEG 化的多肽例子是那些含有一个连接到 SEQ ID NOS:19 或 SEQ ID NOS:25 的 31 位半胱氨酸残基的 PEG 的多肽。参看 SEQ ID NO:27 和表 2。此外, 也可在 SEQ ID NO:25 的 31 位上连接一个 43 kDa 的 PEG 基团。参看 SEQ ID NO:27 和表 2。可以用本领域众所周知的方法将 PEG 基团加到本发明多肽的半胱氨酸残

基上，参考实施例 19。

其他优选的衍生物含有一个连接到多肽上的脂肪酸基团。举例来说，脂肪酸基团可以是  $C_{12}$  和  $C_{20}$  之间的脂肪酸，优选的是  $C_{14}$  到  $C_{18}$  之间的脂肪酸，而最优选的是  $C_{16}$  脂肪酸。这种多肽的例子是 SEQ ID NOS:28-32，它包含一个连接在多肽的亮氨酸残基上的  $C_{16}$  脂肪酸基团，参考表 2。可以通过本发明众所周知的方法，如脂肪酸酰化将脂肪酸基团加到本发明多肽的亮氨酸残基上(Knudsen *et al.*, *J. Med. Chem.* 43:1664-1669, 2000)。

变体是对 SEQ ID NOS:6-32 中氨基酸序列作了一个或多个氨基酸序列变化的本发明中的多肽。变体也包括通过修饰的肽键相互连接的氨基酸，即肽等配物(isosteres)，也包括除了 20 个天然存在的氨基酸以外的其他氨基酸。

优选的变体优选在非基本氨基酸残基处有一个或多个保守氨基酸取代(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个取代)。“非基本”氨基酸残基是蛋白质中野生型序列改变，但又不改变蛋白质生物功能的残基。而“基本”的氨基酸是蛋白质生物功能所必需的。保守氨基酸取代是用具有相似侧链的氨基酸取代蛋白上的氨基酸。具有相似侧链的氨基酸家族本领域已有定义。这些家族包括具碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 $\beta$  分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。对保守的氨基酸或位于蛋白质保守结构域的氨基酸不能进行非保守的取代。

SEQ ID NO:34 所示的多肽共有序列的保守氨基酸取代优选地发生在第 11、12、16、17 或 18 位。第 11 位优选的是 R、S、A、K、G 或 T，而更优选的是 R、A、G 或 S。第 12 位优选的是 K、N、R、H、A、S 或 Q，而更优选的是 K、A、S 或 N。第 16 位优选的是 K、R、V、I、L、M、F、W、Y、A、S、T、N、Q、G 或 H，而更优选的是 K、V、I、F、A、S 或 N。第 17 位优选的是 D、E、H、K、R、

F、I、L、M、Y、V、W、A、S、T、N、Q 或 G，而更优选的是 R、A、L、M、V、S、H、E 或 Q。第 18 位优选的是 K、R、F、I、L、Y、V、M、A、G 或 H，而更优选的是 K、R、F、I、L、Y 或 A。在 11、12、16、17 和 18 位上的组合取代，包括在这些位点上的任意 1、2、3 或 4 个上的取代都是可考虑的。

变体也包括由于突变所致的氨基酸序列不同的多肽。通过筛选重组文库可以鉴定既可以作 GLP-1 受体激动剂，也可作为胰高血糖素拮抗剂的变体。举例来说，通过本领域众所周知的方法进行筛选，发现在一个或多个位点（即在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 位）发生取代的多肽突变体是 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素拮抗剂，下面的实施例中将作详细介绍。

#### 类似物

类似物包括多肽前体（propolypeptide），其中多肽前体包含本发明多肽的氨基酸序列。可以通过天然的体内加工过程或本领域众所周知的技术，如酶切或化学剪切从多肽前体中间切掉多余的氨基酸，生成本发明的活性多肽。

#### 片段

和本发明的多肽，包括具 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素拮抗剂活性的全长衍生物、变体或类似物相比，片段较短。

#### 多核苷酸

任何编码本发明多肽的多核苷酸都可用来表达多肽。多核苷酸可以只包含多肽的编码序列，也可包含额外的编码和/或非编码区。

通过本领域众所周知的方法可以整体或部分合成编码本发明多肽的多核苷酸（例如参考 Caruthers 等, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215 - 23, 1980; Horn 等, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-32, 1980）。然后将编码多肽的多核苷酸克隆到表达载体中表达多肽，或克隆到克隆载体中扩增多核苷酸。

产生一些含有非天然存在之密码子的、编码多肽的核苷酸是有利

的，这一点本领域的技术人员都很清楚。例如，选择某个原核或真核宿主的偏爱密码子可以增加多肽表达的效率，或产生具有所需特性，如半寿期比天然存在序列长的 RNA 转录物。

出于多种原因，通过本领域众所周知的方法将本发明公开的多核苷酸序列加以改造来改变编码多肽的序列。这些原因包括，但不仅限于修饰多肽或 mRNA 产物的克隆、加工和/或表达的变异。通过对 DNA 片段进行随机分段和 PCR 重组以及合成的寡核苷酸来改造核苷酸序列。例如，利用定点诱变插入新的限制位点、改变糖基化类型、改变密码子偏爱性、产生剪接变体、导入突变等等。

### 载体

本发明还包括含有一个或多个编码本发明多肽的核苷酸序列的克隆载体和表达载体。核苷酸序列可以正向或反向插入。可以通过不同的方法将 DNA 插入载体。总之，通过本领域众所周知的方法可以将 DNA 序列插入合适的限制性酶切位点，这在 Sambrook 等,分子克隆：实验手册 (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL)，第二版 (冷泉港, N.Y., 1989)中作有详细介绍。这些技术和其他方法属于本领域技术人员的能力范围。

克隆载体的例子包括但不限于 pBR322、pUC18、pUC19、pSport 和 pCRII。

在这个实施方案的优选方面，表达载体进一步包括调节序列，如操纵地连接在编码序列上的启动子。大量合适的表达载体和启动子都是本领域技术人员众所周知的，并可通过商业途径获得。举例来说有下面的表达载体。细菌表达载体包括但不限于 pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen 公司)、pBS、phagescript、psiX174, pBluescript SK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene 公司)、pTRC99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、PRIT5 (Pharmacia 公司)。真核表达载体包括但不限于 pWLneo、pSV2cat、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene 公司)、pSVK3、pBPV、pMSG、PSVL (Pharmacia 公司)。然而，只要克隆和表达载体在所需的宿主中能复制和存活，就都能使用。利用 CAT(氯霉素转移酶)表达载体或其他带选择标记的载体可以从所需的

基因中选择启动子区。pKK232-8 和 pCM7 是两个合适的载体。具体命名的细菌启动子包括 *lacI*、*lacZ*、T3、T7、*gpt*、 $\lambda$  P<sub>R</sub>、P<sub>L</sub> 和 *trp* 启动子。真核启动子包括 CMV 即早启动子、胸腺嘧啶核苷激酶启动子、SV40 早期和晚期启动子、逆转录病毒的 LTRs 和金属硫蛋白-I 启动子。合适的载体和启动子的选择是本领域普通技术人员所具有的能力。

表达载体也包括一个起始翻译的核糖体结合位点、一个转录终止位点和扩增表达的合适序列。表达载体可以包括一个能提供表型特征、用于选择转化的宿主细胞的基因，如用于真核细胞的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性基因，或用于大肠杆菌的四环素或氨基青霉素抗性基因。

## 文库

在一个实施方案中，变体文库通过核酸水平上的组合突变产生，由嵌合基因文库编码。举例来说，通过酶将合成的寡核苷酸混合物连接到基因序列中，构建成一个变体文库，一套简并的变体氨基酸序列以单个多肽的形式表达，或者以包含这套序列的更大融合蛋白的形式表达（例如用于噬菌体展示）。

可通过许多方法，利用简并寡核苷酸序列来产生变体文库。简并基因序列的化学合成可以在自动的 DNA 合成仪上进行，然后把合成的基因连入合适的载体中。使用一套简并基因可以在一个混合物中提供一套编码所需的类似物序列的所有序列。合成简并寡核苷酸的方法在本领域众所周知（例如参考 Narang, *Tetrahedron* 39:3 (1983); Itakura 等, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984); Itakura 等., *Science* 198:1056 (1984); Ike 等., *Nucleic Acid Res.* 11:477, 1983)。

筛选通过点突变或截短构建的重组文库的基因产物和 cDNA 文库中具有选择特性的基因产物的几个技术在本领域众所周知。这些技术可用于快速筛选通过对本发明的多肽进行组合突变而构建的基因文库。应用最广的，用于大型基因文库筛选的高通量分析技术，典型地包括把基因文库克隆进可复制的表达载体，用产生的载体文库转化合适的宿主细胞，然后在所需活性的检测便于编码基因的载体分离的条

件下表达重组基因，其中的基因产物得以检测。递推集团诱变(REM)是一种能增强文库中功能性突变体频率的技术，可以和筛选技术联用来鉴定所需变体。

### 宿主细胞

本发明还提供含有上述载体的宿主细胞。宿主细胞可以是高等真核细胞，如哺乳动物细胞，或低等真核细胞，如酵母细胞。此外，宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞。

宿主细胞可以通过本发明的载体进行遗传工程化（转导、转化或转染）。载体可以是各种形式，如质粒、病毒颗粒或噬菌体。工程化的宿主细胞可以在适于活化启动子或选择转化子的常规营养培养基中培养。合适培养条件，如温度和 pH 的选择，是本领域普通技术人员众所周知的。

举例来说，代表性的合适宿主包括，但不限于细菌细胞，如大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、链霉菌；真菌细胞，如酵母；昆虫细胞，如果蝇 S2 细胞，夜蛾 Sf9 细胞；哺乳动物细胞如 CHO、COS 或黑色素瘤细胞。合适宿主的选择属于本领域技术人员的能力范围。

把构建好的载体导入宿主细胞可以通过许多方法实现，如磷酸钙转染、二乙氨基葡聚糖介导的转染、电穿孔法(Davis 等., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986)。可用常规的方式使用宿主细胞中的构建体来产生由重组序列编码的基因产物。

### 蛋白的表达

在合适启动子的控制下，可以在哺乳动物细胞、酵母、细菌或其他细胞中表达成熟的蛋白。也可以利用衍生于本发明 DNA 构建体的 RNA，采用无细胞翻译系统来产生这种蛋白。用于原核和真核宿主的合适克隆载体和表达载体在上文和 Sambrook 等, 分子克隆: 实验指南, 第二版, (冷泉港, N.Y., 1989)中作有介绍。

通过在表达载体中插入增强子，可以增强真核生物中编码本发明多肽的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件，大小通常是 10 bp~300 bp，作用在启动子上增强它的转录。举例来说，增强子包括

位于复制起点的 SV40 增强子 (100 bp ~270 bp)、巨细胞病毒早期启动子增强子以及腺病毒增强子。总之,重组表达载体包括复制起点、选择标记和启动子,选择标记如大肠杆菌的氨苄青霉素抗性基因和酿酒酵母 TRP1 基因,而启动子则来源于一个指导下游结构基因高表达的基因。这样的启动子来源于编码糖酵解酶如 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK)、 $\alpha$  因子、酸性磷酸酶或热激蛋白的操纵子。异源结构序列和翻译、起始或终止序列同时协调地组装在一起,优选的是能指导翻译的蛋白分泌到周质空间或胞外培养基中的前导序列。异源序列也可以编码融合蛋白,它包括 N-末端鉴定肽,该肽能产生一些所需的特征,如增加稳定性或简化所表达重组蛋白的纯化。

转化到合适的宿主株,并生长到合适的细胞密度后,用合适的手段将启动子去阻遏(如温度改变或化学诱导),细胞再培养一段时期。典型地通过离心收集细胞,通过一些物理或化学方法将其破碎。将粗提取物保存以进一步纯化。在表达中应用的微生物细胞可以通过任何常规的方法破碎,包括超声波处理、机械破碎或使用细胞破碎试剂。

可以用不同的哺乳动物细胞培养系统来表达重组蛋白。举例来说,哺乳动物表达系统包括 Gluzman, *Cell* 23:175 (1981)介绍的猴肾成纤维细胞 COS-7 细胞系,以及其他能表达相容载体的细胞系,如 C127、3T3、CHO、HeLa 和 HBK 细胞系。

### 蛋白的纯化

本发明的多肽可以用本领域众所周知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化,包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阳离子或阴离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用色谱法、亲和层析、羟磷灰石层析以及凝集素层析。最后的纯化可以采用高压液相层析 (HPLC)。

本发明的多肽可以用下面具体实施例中介绍的常规方法分离。纯化的多肽至少有 70%的纯度。换句话说,分离的多肽中基本上没有细胞物质,含有少于 30%的非多肽物质(干重)。优选的,制备的多肽纯度是 85%~99%(即 85%、87%、89%、91%、93%、95%、96%、97%、98%和 99%)。制备的多肽纯度可以用本领域众所周知的方法来检测,如 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、质谱和液相层析。

### 翻译后修饰

根据重组生产方法中使用的宿主，本发明的多肽可以用哺乳动物或其他真核的碳水化合物糖基化，也可以不糖基化。本发明的多肽还包括起始甲硫氨酸残基。

### 化学合成

此外，本发明的多肽可以通过化学合成的方法来合成其氨基酸序列，如用固相合成进行直接合成肽（参看，Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 – 2154, 1963; Roberge 等, *Science* 269, 202 – 204, 1995）。可以手工或自动化合成多肽。例如，可以用应用生物系统 431A 肽合成仪(Perkin Elmer) 自动化合成多肽。此外，可以单独合成多肽的片段，然后通过化学方法组合成长分子。

可以用制备性的高效液相色谱基本上纯化新合成的多肽（例如，参看 Creighton, 蛋白质：结构和分子原理，WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983）。可以通过氨基酸分析或通过 Edman 降解法来证实本发明合成的多肽的组成（参看 Creighton, 同上）。另外，在直接合成和/或联合使用化学方法或其他蛋白的序列形成变体多肽或融合多肽的过程中，可以改变多肽氨基酸序列的任何一部分。

### 药学上的应用

本发明的多肽可以用来治疗 2 型糖尿病（非胰岛素依赖的糖尿病）和/或预防具有葡萄糖耐受性异常、空腹血糖异常、低血糖和/或肥胖的供试者发展成 2 型糖尿病。

### 药用组合物

本发明的多肽可以和一种合适的药用载体联合使用，形成一种可肠胃给药的组合物。这种组合物包括治疗有效量的多肽和药用上可接受的载体或赋形剂。药用上可接受的载体包括，但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇以及它们的组合物。制剂应该和给药模式相匹配。

药学上的组合物可以用常规的方法给药，如口服、体表接种、静脉注射、腹膜内注射、肌肉注射、皮下注射或皮内给药。药用组合物以对特定指征进行治疗和/或预防的有效量给药。合适的剂量是每天至少约 3.5 ng/kg 到约 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重的活性多肽（即并不包括 PEG 或脂肪酸基团的重量）。在大部分情况下，考虑给药方式、症状等的话，剂量是每天约 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重到约 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重。这个数量并没考虑到体内通过生物方法获得的肽，在这种情况下，或多或少可用来保持所需的有效剂量。剂量的确定是本领域普通技术人员所熟知的，它只需要常规的筛选。

本发明的多肽也可以和别的用于治疗糖尿病的药物联合使用。合适的药剂包括胰岛素、胰岛素致敏剂和盐酸二甲双胍。

### 试剂盒

本发明也提供药用的包装或试剂盒，里面含有装满一种或若干种本发明药用组合物成分的容器。一个由政府机构开具的用来调节药物或生物产品的制造、使用或销售的通知，以及政府机构批准的文书和包装或试剂盒装在一起。

### 基因治疗

本发明的多肽也能在体内表达，这种方法通常叫“基因治疗”。因此，举例来说，通常可以用编码多肽的多核苷酸（DNA 或 RNA）对离体的细胞进行工程化，然后把这工程化的细胞提供给需要用多肽治疗的病人。这种方法是本领域众所周知的。例如，细胞可以利用含有编码本发明多肽的 RNA 的逆转录病毒颗粒，通过本领域众所周知的技术加以工程化。

在一个优选的实施方案中，含有本发明多肽的 DNA 用于糖尿病之类代谢紊乱的基因治疗。根据这个实施方案，在诊断的同时或诊断后立即将含有编码本发明多肽的 DNA 的基因治疗提供给需要治疗的病人。

利用基因治疗进行的多肽的局部转移可以给目的区域，如胰腺提供治疗药剂。例如，用胰腺特异的启动子构建一种  $\beta$  细胞胰腺肿瘤小

鼠模型。

体外基因疗法和体内基因疗法都可以考虑使用。一些把潜在的治疗药剂转入确定的细胞群落的方法是已知的。参见 Mulligan, *Science* 260:926-31,1993. 这些方法包括:

1) 直接的基因转移。参见 Wolff 等, “向小鼠肌肉中的体内直接基因转移”, *Science* 247:1465-68,1990;

2) 脂质体介导的 DNA 转移。参见 Caplen 等, “脂质体介导的 CFTR 基因向膀胱纤维化患者的 Nasal 上皮细胞中的转移”, *Nature Med.* 3: 39-46, 1995; Crystal, “基因作为一种药物”, *Nature Med* 1: 15-17,1995; Gao and Huang, “用作有效转染哺乳动物细胞的一种新的阳离子脂质体药剂”, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179: 280-85,1991;

3) 逆转录病毒介导的 DNA 转移。参见 Kay 等, “血友病 B 的体内基因转移: 在因子 IX 缺陷的狗中持续的部分纠正”, *Science* 262: 117-19, 1993; Anderson, “人类基因治疗”, *Science* 256:808-13,1992.

4) DNA 病毒介导的 DNA 转移。这样的 DNA 病毒包括腺病毒(优选 Ad-2 或 Ad-5 为基础的载体)、疱疹病毒(优选单纯疱疹病毒为基础的载体)和细小病毒(优选“缺陷”或没自主复制能力的细小病毒为基础的载体,更优选的是腺伴随病毒为基础的载体,最优选的是 AAV-2 为基础的载体)。

### 基因治疗载体系统

转化目的基因的特定载体系统的选择取决于多种因素。一个重要的因素是目的细胞群落的天然属性。尽管逆转录病毒载体已经被广泛的研究,并在许多基因治疗中得以使用,但这些载体一般并不适合感染不分裂的细胞。此外,逆转录病毒有潜在的致癌性。然而,最近在慢病毒载体领域的进展可能会解决这些局限性。

本领域技术人员都会意识到,根据实施方案,可以采用含有本发明多肽的适合基因治疗的任何载体。构建这种载体的技术是已知的。参见 Anderson, *Nature* 392 25-30, 1998; Verma 和 Somia, *Nature* 389 239-242, 1998. 利用已知的技术可以把载体导入靶位点。

合适的基因治疗载体包括一个或若干个启动子。可以采用的合适

启动子包括，但不限于病毒启动子（如逆转录病毒 LTR、SV40 启动子、腺病毒主要晚期启动子、呼吸道合胞病毒启动子、B19 细小病毒启动子和 Miller 等，*Biotechniques* 7(9): 980-990, 1989 中介绍的人巨细胞病毒（CMV）启动子）、胞内启动子（如组氨酸启动子、pol III 启动子和  $\beta$ -肌动蛋白启动子，以及诱导型启动子（如 MMT 启动子、金属硫蛋白启动子和热激蛋白启动子）。选择合适的启动子是本领域技术人员熟知的。

### 逆转录病毒

上文提及的产生逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒，包括但不限于莫洛尼鼠类白血病病毒、脾脏坏死病毒、逆转录病毒如劳斯肉瘤病毒、禽类白血病病毒、人类免疫缺陷病毒、乳癌病毒。在一个实施方案中，逆转录病毒质粒载体衍生自莫洛尼鼠类白血病病毒。

逆转录病毒质粒载体被用来转导包装细胞系，形成生产细胞系。可以被转染的包装细胞系包括，但不限于 PE501、PA317、 $\Psi$ -2、 $\Psi$ -AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、 $\Psi$ CRE、 $\Psi$ CRIP、GP+E-86、GP+envAm12 以及如 Miller, “人类基因治疗”，1: 5-14, 1990 中介绍的细胞系。载体可以通过本领域任何已知的手段转导细胞系。这样的手段包括，但不限于电穿孔、使用脂质体以及  $\text{CaPO}_4$  沉淀。在另一个选择方案中，逆转录病毒质粒载体可以包裹进脂质体，或和脂类偶连，然后施用于宿主。生产细胞系产生感染性的逆转录病毒载体颗粒，颗粒中包含编码本发明多肽的核酸序列。这种逆转录病毒载体颗粒可以用来在体外或体内转导真核细胞。真核细胞将会表达编码本发明多肽的核酸序列。能被转导的真核细胞包括，但不限于胚胎干细胞、胚胎瘤细胞、造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、成肌细胞、角质细胞、内皮细胞和支气管上皮细胞。

### 腺病毒和腺伴随病毒

腺病毒的优点是，有范围很广的宿主，能感染休眠或末端分化细胞，如神经元或肝细胞，而且不致癌。腺病毒不会整合到宿主基因组中。它们位于染色体外，减少了插入诱变的风险。Ali 等，1994, 373

页。

腺伴随病毒表示出和以腺病毒为基础的载体相似的优点。然而，AAVs 能位点特异地整合到人 19 号染色体 (Ali 等, 1994, 377 页)。

### 转核(transkaryotic)疗法

和基因治疗不同的方法是转核疗法，其中在体外处理患者的细胞，重新导入患者体内后，诱导显性染色体基因产生目的蛋白。转核疗法补充个体活化所必需的正常基因成分。把能激活新生基因的启动子或其他外源调节序列在离体状态下导入患者染色体 DNA 中，培养并挑选活性的、能产生蛋白的细胞，然后重新把激活的细胞导入患者，认为这些细胞在体内会充分确立。然后“激活的基因”在很长的时间内，也许是患者的一生都制造目的蛋白。美国专利 Nos.5641670 和 5733761 详细公开了这个概念。

为了让本发明被更好地理解，提出了下列实施例。这些实施例只是证明，而不是以任何方式限制本发明的范围。所有的专利、专利出版物，以及在本公开内容中引用的参考文献一并引入作为本发明的参考。

### 实施例

#### 实施例 1

#### 多肽合成方法学

可以遵照下面的一般方法合成本发明的多肽。多肽合成可以利用 Rapp-Polymere PEG-polystyrene 树脂在连续的流体状态下，通过 FMOC/t-Butyl ( Peptide Synthesis Protocols(1994), Volume 35 by Michael W. Pennington & Ben M. Dunn) 策略进行。在合成完成时，肽从树脂上切下，并用 TFA/DTT/H<sub>2</sub>O/Triisopropyl silane ( 88/5/5/2 ) 去保护。利用冰冷的二乙醚把肽从剪切混合物中沉淀出来。用冷的乙醚将沉淀洗三遍，然后溶解在 5% 的乙酸中，最后冷干。在 Waters ALLIANCE® 系统 ( Waters Corporation, Milford, MA ) 上，利用含 3%TFA 的水/乙腈为梯度，其中乙腈为 0% 至 100%，用 YMC-pack ODS-AQ 柱 ( YMC, Inc., Wilmington, NC ) 进行反向层析，并通过

在 VOYAGER DE™ MALDI 质谱仪 (model 5-2386-00, Perseptive Biosystems, Framingham, MA) 上进行 MALDI 质谱分析来证实肽的相同性。基质缓冲液 (含有 3%TFA 的 50/50H<sub>2</sub>O/乙腈) 肽样品以 1/1 比例加入到基质缓冲液中。不符合纯度>95%标准的那些肽在 Waters Delta Prep 4000 HPLC 系统 (Waters Corporation, Milford, MA) 上进行反相层析加以纯化。

## 实施例 2

### 肽的克隆

为了建立一种表达本发明多肽及其突变体的强有力方法, 将编码多肽的核苷酸克隆到 GST 的 C 末端, 中间用一个单因子 Xa 识别位点序列将单体肽和 GST 分开。通过 DNA 序列中含限制性酶切位点紧邻将要克隆的多核苷酸的 5' 端, 将在紧靠待克隆多核苷酸的 DNA 序列的 5' 端含有 *BamH* I 或 *EcoR* I 限制性酶切位点的两个重叠单链 DNA 片段 (70 mers ~90 mers) 相杂交, 然后利用 DNA 聚合酶 1 的大片段 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 合成 DNA 的对应链, 从而合成编码和要获得肽的 DNA 序列相融合的 Xa 因子识别位点的基因。

每个多核苷酸 DNA 序列的选择都是根据每条肽的氨基酸序列推导出来。在有些情况下, 编码肽的多核苷酸可以通过对已用上述方法制备的多核苷酸进行 PCR 诱变来制备。用 *BamH* I 和 *EcoR* I 消化双链产物, 然后连接已用 *BamH* I 和 *EcoR* I 消化的 pGEX-6P-1。

举例来说, 当编码鉴定为 SEQIDNO:7 多肽的 DNA 序列克隆进 pGEX-6P-1 时, 下列的多肽和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST): IEGRHSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 33) 以融合的形式表达, 其中, 前 4 个氨基酸 IEGR 是 Xa 因子识别位点, 而剩余的 31 个氨基酸是鉴定为 SEQIDNO:7 的氨基酸序列。

编码 SEQIDNO:7 中多肽的核酸序列的前六个核苷酸和最后六个核苷酸代表是用来克隆进 pGEX6P-1 (图 1) 中的限制性酶切位点 (*BamH* I 和 *EcoR* I)。在 *EcoR* I 位点 (GAATTC) 前的 "TAATGA" 序列编码的是两个终止密码子。其他 DNA 序列编码 SEQ ID NO:7 融

合序列中的 Xa 因子多肽。

### 实施例 3

#### 肽重组表达和纯化

将含有 GST-肽融合形式的质粒转化 BL21(DE3)细胞，在 37°C 培养至 OD600 达 0.6-1.0，然后用 1 mM IPTG 在 37°C 诱导 2 小时。2 升细胞在 7,700g 离心 15 分钟，-20°C 保存。细胞沉淀重悬在 80 mL B-PER 细菌蛋白抽提试剂和 1x 完全蛋白酶抑制剂中，直到细胞悬液完全匀浆。在室温下，轻轻摇晃匀浆混合物 10 分钟。分别加入终浓度分别为 200 $\mu$ g/mL 和 10 $\mu$ g/mL 的溶酶体和 DNase I,进一步溶解蛋白并减少粘性。混合物再培养 5 分钟。细胞残渣用 27,000g,20 分钟离心下来。上清液和 2 mL 洗过的 Glutathione Sepharose 4B 树脂(Pharmacia)混合，在摇床上 4°C 过夜。用 1,500g, 15 分钟将树脂离心下来，装入空的 Poly-Prep 层析柱，用 30 mL PBS 冲洗，接下来用 10 mL 的 Xa 因子缓冲液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl 和 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 冲洗。肽从柱子上用 60 单位的 Xa 因子剪切下来，Xa 因子溶解在 1 mL 的 Xa 因子缓冲液中，4°C 过夜。洗脱液然后上 C<sub>18</sub> HPLC(Beckman System Gold)，使用 2 mL 的环、流速 1 mL/min，程序如下：5 分钟的缓冲液 A (0.1% TFA/H<sub>2</sub>O)，30 分钟的梯度至 100%的缓冲液 B(0.1% TFA/ACN)，10 分钟的 BufferA，10 分钟梯度，以及 10 分钟的缓冲液 A。收集洗脱峰，通过 10%~20% Tricine-SDS 凝胶电泳筛选。根据从氨基酸序列推测的质量，用质谱证实每个肽的相同性。典型的产量是每升大肠杆菌有大约 50  $\mu$ g 的游离肽。重组肽和合成肽具有同样的活性。

下面的表 2 包含一些根据上述的方案制造的多肽 (实施例 1)，或在下面介绍的重组多肽。

表 2

胰高血糖素	HSQGTFTSDYSKYLDARRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 1)
GLP-	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH <sub>2</sub> (SEQ

1(7-36)	ID NO: 2)
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 3)
G1	HSQGTFTSDYSKYLDARRAQDFVQWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO: 4)
G5	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO: 5)
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO: 6)
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 7)
G55	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO: 8)
G56	HSQGTFTSDYAA YLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO: 9)
G57	HSQGTFTSDYAKYLDARA AKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO: 10)
G58	HSQGTFTSDYAKYLD AKKAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 11)
G59	HSQGTFTSDYARYLDA K KAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 12)
G60	HSQGTFTSDYAKYLDAA KAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 13)
G61	HSQGTFTSDYARYLDA A KAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 14)
G71	HSQGTFTSDYAKYLDARRACEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 15)
G74	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVCGRG (SEQ ID

	NO: 16)
G75	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCRG (SEQ ID NO: 17)
G76	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGCG (SEQ ID NO: 18)
G77	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (SEQ ID NO: 19)
G277	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC(22kD) (SEQ ID NO: 20)
G82	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVRGRG (SEQ ID NO: 21)
G83	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (SEQ ID NO: 22)
G84	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 23)
G85	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVRGRGK (SEQ ID NO: 24)
G185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRGRC (SEQ ID NO: 25)
G2185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRGRC(22kD) (SEQ ID NO: 26)
G4185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRGRC(43kD) (SEQ ID NO: 27)
G87	HSQGTFTSDYAKYLDARRAK(FA)EFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO: 28)
G88	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRK(FA) (SEQ ID NO: 29)
G90	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIK(FA)WLVGRG (SEQ

	ID NO: 30)
G182	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRGK(FA) (SEQ ID NO: 31)
G183	HSQGTFTSDYARYLDARRAK(FA)EFIKWLVGRG (SEQ ID NO: 32)

(FA): 连接在亮氨酸残基上的 C<sub>16</sub> 棕榈酸

(22kD): 连接在半胱氨酸残基上的 22kD PEG

(43 kD): 连接在半胱氨酸残基上的 43 kD PEG

#### 实施例 4

##### RINm5F 细胞膜的制备

用 PBS 冲洗烧瓶中的 RINM5F 细胞，刮在含有蛋白酶抑制剂 (HES) 的 20 mM Hepes-1 mM EDTA-250 mM 蔗糖缓冲液中，用细胞均质器匀浆，然后用 23 号针头重复重悬。500g 离心 5 分钟去除没破碎的细胞和细胞核。用 23 号的针头将沉淀重悬在 HES 缓冲液中，重复离心。将两次离心得到的上清液混合，然后在 40,000xg 离心 20 分钟。得到的质膜沉淀用 23 号针头，然后用 25 号针头重悬在 HES 缓冲液中。细胞膜在使用前储存在 -80°C。

#### 实施例 5

##### 大鼠肝质膜的制备

将大鼠杀死，将肝脏移到冰冻的 TES 缓冲液中 (含蛋白酶抑制剂的 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 255 mM 蔗糖)。确定肝脏湿重，将组织切碎，放入 5 倍体积冰冷的 TES 缓冲液中，并用高速电动研磨机制备匀浆。所有的缓冲液及离心产物保存在 4°C。用手控的细胞均质器捣三次将稀浆进一步匀浆化。把匀浆液通过几层粗棉布，在 25,000xg 离心 10 分钟。沉淀在 22.1 mL TES 中用手控的细胞均质器捣 10 次加以匀浆。加入 27.9 mL 的 2.4 M 蔗糖并混合。然后把匀浆液分装在若干试管中，而每个试管加入 7mL 的 TES 缓冲液。将试管在 120,000xg 离心 60 分钟。从旋转过程中形成的界面中取细胞膜，在 TES 中稀释，在 200,000xg，离心 15 分钟将其浓缩。产生的沉淀

再次用 9.8 mL 的 TES 缓冲液和 10.3 mL 2.4 M 的蔗糖匀浆化, 加入 7 mL TES, 在 18,000 $\times$ g, 离心 30 分钟。从界面上取质膜, 用 TES 稀释, 通过 200,000 $\times$ g, 离心 15 分钟来收集。最终的沉淀重悬在 TES 中。质膜储存在 -80°C 备用。

### 实施例 6

#### 大鼠肝细胞的制备

根据 Berry 和 Friend 的方法加以改进 (*J. Cell. Biol.* 43:506, 1969), 分离肝细胞。一个喂食的雄性 Wistar 大鼠用戊巴比妥钠(55 mg/kg, i.p.)麻醉。把大鼠背向下放置在肝灌流装置(37°C)的盘子中, 四肢用实验带系紧。用 70%乙醇清洗心室表面, 然后用剪子打开腹腔, 暴露肝脏、门静脉、肝动脉以及后腔静脉。在这三个血管周围松弛地放置绷带。插管插入门静脉, 并用绷带系紧。肝脏下面的肝动脉和后腔静脉用绷带打结。打开灌流泵, 立即切断下行主动脉, 使得缓冲液逸出来, 给大鼠放血。迅速打开胸腔, 暴露心脏。插管通过心脏插入上腔静脉, 然后用绷带切断, 完成环绕肝的缓冲液环路。用含有 5%~10%绵羊 RBC 的 Krebs-Henseleit 缓冲液, 在流速为 14 mL/min 的恒定 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 流作用下灌流肝脏。首先灌流非环流系统 5 分钟, 然后再灌流环流系统 30 分钟(用 30 mg 胶原酶)。然后取下肝脏, 在塑料口杯中用剪刀将其切碎, 用尼龙网过滤。通过一系列缓冲液冲洗和离心(690 rpm, 室温, 90 sec)将肝细胞从残渣中分离出来。各份细胞用缓冲液稀释, 用 0.4%锥虫蓝染色和计数。剩余的细胞用缓冲液稀释到每次试验的合适密度。

### 实施例 7

#### 大鼠胰岛分离方案

用 Sprague Dawley 大鼠 (275g~320 g)作为胰岛供应来源。简而言之, 用 10 mL 冷重构的 Liberase RI (Boehringer Mannheim)填充胰腺, 收获, 然后和另外 5 mL 酶溶液在水浴中共培养 30 分钟。用冷的 10%FBS/Hanks 缓冲液将组织悬浮液(Gibco)冲洗两遍, 重悬在 8mL 25%的 Ficoll(Sigma)中, 然后用 23%、20% 和 11% 的 Ficoll 各 5mL

分层。离心后，将 20%这一层的胰岛取出来，用冷的 10% FBS/Hank 缓冲液冲洗两遍，然后重悬在 10% FBS/RPMI 1640 培养基中 (Sigma)。

### 实施例 8

#### 肽对 RINm5F 质膜上的 GLP-1 受体的竞争性结合

本发明的多肽和多肽片段、变体和类似物对 RINm5F 膜竞争性结合的  $IC_{50}$  值典型是约 0.01 nM 至约 20 nM(即 0.01、0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 nM) 本发明多肽衍生物的  $IC_{50}$  值典型是至少 0.01 nM 至约 500 nM(即 0.01、0.1、1、10、50、100、150、200、250、300、350、400、450 或 500 nM)。

本发明一些多肽对 RINm5F 细胞质膜的竞争性结合可以用如下方式检测。96 孔的 GF/C 过滤平板(Millipore, Bedford, MA)用 0.3%PEI 阻断至少 1 小时,然后用结合缓冲液冲洗两遍,结合缓冲液包括 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.5, 1 mg/ml BSA 和 1 mg/ml 杆菌肽。各孔加入用结合缓冲液稀释的 5  $\mu$ g RINm5F 细胞质膜、0.05 $\mu$ Ci  $^{125}$ I 标记的 GLP-1 和浓度范围在  $1 \times 10^{-12}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  的肽。在室温下培养 60 分钟,然后平板用含 1 mg/mL BSA 的冰冷 PBS 冲洗 3 遍。把平板弄干,在各孔中加入闪烁体,然后用 Wallac Microbeta 计数器测定 cpm/孔。

绘制各浓度肽中结合到膜上的  $^{125}$ I 数,用 Prizm 软件进行非线性回归分析,测定  $IC_{50}$ 。表 2 中公开的多肽和从 RINm5F 细胞上分离的质膜上的 GLP-1 受体结合,  $IC_{50}$  在 1.4 nM~248 nM 之间(根据三次试验的最少值确定)。 $IC_{50}$  是使标记的 GLP-1 (7~36) (SEQ ID NO:2) 的最大结合值减少了 50%的多肽浓度。

### 实施例 9

#### 肽对大鼠肝细胞质膜上胰高血糖素受体的竞争性结合

本发明的多肽和多肽片段、变体和类似物对大鼠肝细胞质膜上胰高血糖素受体的竞争性结合的  $IC_{50}$  值典型约 0.01 nM 至约 1000 nM(即 0.1、1、10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000 nM)。

本发明一些多肽对大鼠肝细胞质膜上胰高血糖素受体的竞争性结合可以用如下方式检测。96 孔的 GF/C 过滤平板(Millipore, Bedford, MA)用 0.1%PEI 阻断至少 1 小时, 然后用结合缓冲液冲洗两遍, 结合缓冲液包括 20 mM Tris、2 mM EDTA, pH 7.5、1 mg/ml BSA 和 1 mg/ml 杆菌肽。各孔加入用结合缓冲液稀释的 5  $\mu$ g RINm5F 细胞质膜、0.05 $\mu$ Ci  $^{125}$ I 标记的 GLP-1 和浓度范围在  $1 \times 10^{-12}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  的肽。在室温下培养 60 分钟, 然后平板用含 1 mg/mL BSA 的冰冷 PBS 冲洗 3 遍。把平板弄干, 在各孔中加入闪烁体, 然后用 Wallac Microbeta 计数器测定 cpm/孔。

绘制每种浓度的肽中的结合到膜上的  $^{125}$ I 数, 用 Prizm 软件进行非线性回归分析, 测定  $IC_{50}$ 。表 2 中公开的多肽和从大鼠肝细胞上分离的质膜上的胰高血糖素受体结合,  $IC_{50}$  在 11.7 nM~726 nM 之间(根据三次试验的最少值确定)。 $IC_{50}$  是使标记的 GLP-1 (7-36) (SEQ ID NO:2)的最大结合值减少了 50%的多肽浓度。

#### 实施例 10

利用 cAMP 亲近闪烁检测(SPA), 通过 GLP-1 受体检测肽信号

对于本发明的多肽及多肽片段、变体和类似物, 在 cAMP 亲近闪烁检测中 GLP-1 受体的“激活”是最大活性的诱导, 这种最大活性是天然 GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2)诱导的活性的约 80%至约 200%(即 85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、165%、170%、175%、180%、185%、190%、195%或 200%), 相对活性至少约 4%至约 1000%(即 4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或 1000%)。对于本发明的多肽衍生物, 在 cAMP 亲近闪烁检测中 GLP-1 受体的“激活”是最大活性的诱导, 这种最大活性是天然 GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2)诱导的活性的约 80%至约 200%(即 85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、165%、170%、175%、180%、185%、190%、195% 或 200%), 相对活性至少约 0.5%至约 1000%(即 0.5%、

1%、10%、50%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%)。“相对活性”是指天然 GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2)的  $EC_{50}$  除以本发明多肽的  $EC_{50}$ ，再乘以 100。“ $EC_{50}$ ”是达到最大活性 50%的多肽浓度。

在 cAMP 亲近闪烁检测中，检测本发明一些多肽的 GLP-1 受体的肽信号可以用如下方法检测。以  $1.5 \times 10^5$  细胞/孔的浓度将 RINm5F 细胞铺 96 孔平板，并在 RPMI 1640、5% FBS、抗生素/抗真菌剂 (Gibco BRL) 中  $37^\circ\text{C}$  培养 24 小时。弃去培养基，用 PBS 将细胞冲洗两遍。细胞在含 1% BSA 和  $100 \mu\text{M}$  IBMX 的 HEPES-PBS 中， $37^\circ\text{C}$  培养 15 分钟，肽浓度是  $1 \times 10^{-12} \text{ M}$  -  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 。在肽和脂肪酸交联的实验中，培养缓冲液中可以不含 BSA。弃去培养缓冲液，用裂解试剂裂解细胞，裂解试剂是和 cAMP 亲近闪烁检测直接筛选系统 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) 一起提供的。根据试剂盒中的说明书可以测定裂解物中的 cAMP 的量。

绘制每种浓度的肽中产生的 cAMP 量，用 Prizm 软件进行非线性回归分析，以确定  $EC_{50}$ 。对于表 2 公开的多肽中 GLP-1 受体激活的平均相对活性是 0.6%~76.1%。诱导的最大活性是天然肽 GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2) 的 83%~132% (根据三次试验的最小值测定)。参看表 4。

### 实施例 11

利用 cAMP 亲近闪烁检测 (SPA)，通过胰高血糖素受体检测肽信号

对于本发明的多肽及多肽片段、变体和类似物，在 cAMP 亲近闪烁检测中胰高血糖素受体的“激活”是最大活性的诱导，这种最大活性是由具的天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1) 诱导的活性的约 0% 至约 75% (即 0%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70% 或 75%)，相对活性至少约 0.001% 至约 5% (即 0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4% 或 5%)。对于本发明的多肽衍生物，在 cAMP 亲近闪烁检测中胰高血糖素受体的“激活”是最大活性的诱导，这种最大活性是天然胰高血糖素 (SEQ ID NO:1)

诱导的活性的约 0%至约 40%(即 0%、1%、10%、20%、30%或 40%), 相对活性至少约 0.001%至约 1%(即 0.001%、0.01%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%或 1%)。“相对活性”是指天然胰高血糖素(SEQ ID NO:1)的  $EC_{50}$  除以本发明多肽的  $EC_{50}$ , 再乘以 100。“ $EC_{50}$ ”是能够达到最大活性的 50%的多肽的浓度。

在 cAMP 亲近闪烁检测中, 检测本发明一些多肽的胰高血糖素受体的肽信号可以用如下方法检测。将在含 1% BSA 和 100  $\mu$ M IBMX 的 HEPES-碳酸氢盐-PBS 中的新分离的大鼠肝细胞铺 96 孔平板, 浓度为  $7.5 \times 10^5$  细胞/孔或  $2 \times 10^5$  细胞/孔。在 5%  $CO_2/95\% O_2$ , 37°C 平衡 10 分钟, 加入浓度是  $1 \times 10^{-12}$  M ~  $1 \times 10^{-5}$  M 的肽再平衡 15 分钟。将平板稍离心一下, 弃去培养缓冲液, 用裂解试剂裂解细胞, 裂解试剂是和 cAMP 亲近闪烁检测直接筛选系统(Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ)一起提供的。

根据试剂盒中的说明书可以测定裂解物中的 cAMP 的量。绘制各浓度的肽产生的 cAMP 量, 用 Prizm 软件进行非线性回归分析, 以确定  $EC_{50}$ 。本发明多肽中胰高血糖素受体激活的平均相对活性(在 50% 应答时, 胰高血糖素和多肽浓度的比值  $\times 100$ , 根据三次试验的最小值确定)小于 5%。诱导的最大活性是天然肽胰高血糖素的 28.3%~71.3%(根据三次试验的最小值确定)。

杂合肽抑制胰高血糖素的能力可以用如下方法检测。在 5%  $CO_2/95\% O_2$ , 37°C 平衡 10 分钟, 然后在细胞中加入 10  $\mu$ M 肽, 紧接着再加入次最高浓度的胰高血糖素, 再平衡 15 分钟。细胞裂解和 cAMP 的检测如上文所述进行。

在减掉每个数据点中未刺激肝细胞中产生的 cAMP 量后, 抑制百分比用如下方法计算。抑制百分比是在次最高浓度胰高血糖素和 10  $\mu$ M 肽存在情况下产生的 cAMP 减去单独用次最高浓度胰高血糖素产生的 cAMP, 得到的数除以单独用次最高浓度胰高血糖素产生的 cAMP 量, 再乘以 100 所得到的值。表 2 中公开的多肽的胰高血糖素活性的平均抑制百分比是 11.3%~59%(根据三次试验的最小值确定)。参考表 4。

## 实施例 12

### 从大鼠肝细胞释放的葡萄糖的检测

和大鼠肝细胞中葡萄糖释放的检测一样，对胰高血糖素介导的葡萄糖产量的抑制率典型说至少约 20%至约 100%（即 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%）。

可以用如下方法检测本发明的一些多肽对胰高血糖素介导的葡萄糖产量的抑制。把肝细胞加入平底 96 孔板中 ( $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}/\text{孔}$ )，在培养箱中，在 95%  $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$  气流中  $37^\circ\text{C}$  恒速摇晃预培养 10 分钟。在肝细胞中加入胰高血糖素和肽或者只加入胰高血糖素后，再培养 30 分钟。然后用 15% 的高氯酸裂解细胞，并在 2600 rpm,  $4^\circ\text{C}$  下将平板离心 15 min。上清液用 1 M Tris-HCl (pH 8.0): 2.5 N KOH (45:55) 中和，再次离心。根据己糖激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Methods of Enzymatic Analysis, H.U. Bermeyer, Ed., Academic Press)和平板读数器上的 A340 读数(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)分析得到的上清液中的葡萄糖。

减去每个数据点中未刺激肝细胞中产生的葡萄糖后，计算葡萄糖的产量和抑制百分率。抑制百分率是在 1 nM 胰高血糖素单独存在时产生的葡萄糖减去 1 nM 胰高血糖素和 100 nM 肽存在时产生的葡萄糖，除以 1 nM 胰高血糖素单独存在时产生的葡萄糖，得到的结果再乘以 100。具如 SEQ ID NO:6 所是氨基酸序列的多肽可以将胰高血糖素介导的葡萄糖分泌抑制 47%，这从三个实验中已确定。参看表 2。

## 实施例 13

### 通过灌流大鼠胰岛检测胰岛素分泌

在这个实验中，通过灌流胰岛，可以将胰岛素的分泌至少增加 1.5 倍。本发明多肽的 GLP-1 受体激动剂成分能使灌流胰岛中胰岛分泌增加至少 1.5 至约 10 倍（即 1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 或 10 倍）。

本发明一些多肽介导的灌流大鼠胰岛中胰岛素的分泌可以用如下方法检测。由这些多肽刺激的胰岛素分泌的双相反应可以通过胰岛灌流来检测。在灌流室放入 50 个胰岛，用含 3 mM 葡萄糖的 HEPES-KRB

在 37°C 灌流。60 分钟后，将胰岛暴露在加或不加肽(50 nM)的含 8 mM 葡萄糖的缓冲液中，再灌流 30 分钟。为了确定胰岛素产量，每隔 1 或 5 分钟分部收集灌流产物。用 ELISA 试剂盒 (Alpco Diagnostics, Windham, NH)检测胰岛素。具 SEQ ID NO:6 氨基酸序列的多肽在 50 nM 时，能使灌流胰岛中胰岛素的分泌增加 2 倍，这和用 50 nM GLP-1 增加的倍数相当。

#### 实施例 14

##### 分散的大鼠胰岛细胞中的胰岛素分泌

在这个试验中，分散的大鼠胰岛细胞中胰岛素分泌增加至少 1.5 倍。本发明多肽的 GLP-1 受体激动剂成分能使分散的胰岛中胰岛分泌增加至少 1.5 至约 10 倍（即 1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 或 10 倍）。

本发明各多肽介导的分散的大鼠胰岛中胰岛素的分泌可以用如下方法检测。利用胶原酶通过消化从 SD 大鼠(200g~250g)中分离出兰氏小岛。用胰蛋白酶处理可制备分散的胰岛细胞，接种在 96V 底的平板上，并使之沉淀。细胞在培养基上中培养过夜。弃去培养基，细胞用含 3 mM 葡萄糖的 Krebs-Ringer-HEPES 缓冲液在 37°C 预培养 30 分钟。去掉预培养缓冲液，用含合适浓度葡萄糖(例如 8 mM)的 Krebs-Ringer-HEPES 缓冲液和肽或不加肽在 37°C 刺激细胞一段时间。在一些研究中，也包括合适浓度的 GLP-1。去掉一部分上清，用 SPA 检测胰岛素含量。结果表示成对照的倍数。在浓度为 50 nM 时，具 SEQ ID NO:27 所示氨基酸的多肽能使分散胰岛中胰岛素的分泌增加约 3 倍。参考表 2。

#### 实施例 15

##### 检测喂食的 Wistar 大鼠中胰高血糖素刺激的葡萄糖产量

在这个实验中，胰高血糖素刺激的葡萄糖产量至少被抑制了 20%。本发明多肽的胰高血糖素受体拮抗剂成分能抑制胰高血糖素介导的血糖浓度的升高，喂食的 Wistar 大鼠中胰高血糖素刺激的葡萄糖产量被抑制至少 20%至约 100%（即 20%、30%、40%、50%、60%、

70%、80%、90%或100%)。

可以用如下方法检测喂食的 Wistar 大鼠中胰高血糖素刺激的葡萄糖产量。用异氟烷气简单地将雄性 Wistar 大鼠麻醉，用葡萄糖计检测尾巴血中的血糖。然后把媒介物(0.9% 盐水+ 1% 人白蛋白)、0.29nmol/kg 胰高血糖素、1nmol/kg 本发明的多肽或胰高血糖素+本发明的多肽注射入小鼠尾巴静脉。然后去掉麻醉，在 10 分钟、20 分钟、30 分钟后从尾巴放血。

在葡萄糖曲线中，减去基本葡萄糖水平 (dAUG) 后，通过分析面积来确定葡萄糖被抑制的程度。百分抑制可以这么定义：单由 0.3 nmol/kg 胰高血糖素产生的葡萄糖量减去 0.3 nmol/kg 胰高血糖素和 1 nmol/kg 杂合肽存在时产生的葡萄糖，除以单由 0.3 nmol/kg 胰高血糖素产生的葡萄糖量，再乘以 100。

仅仅胰高血糖素就能增加血糖水平，而仅仅本发明的多肽却对血糖水平没效果。具 SEQ ID NO:6 氨基酸序列的本发明多肽能抑制血糖中胰高血糖素介导的葡萄糖升高 63%。参看表 2。

#### 实施例 16

检测喂食的 Balb/c 大鼠中胰高血糖素刺激的葡萄糖产量

在这个实验中，葡萄糖的产量被抑制了至少约 20%。优选的，本发明多肽的胰高血糖素受体拮抗剂成分能抑制小鼠中胰高血糖素介导的血糖浓度的升高，喂食的 Balb/c 大鼠中胰高血糖素刺激的葡萄糖产量被抑制至少约 20%至约 100% (即 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%)。

可以用如下方法检测喂食的 Balb/c 大鼠中胰高血糖素刺激的葡萄糖产量。把媒介物(0.9% 盐水+ 1% 人白蛋白)或 100 $\mu$ g/kg 衍生的多肽在胰高血糖素刺激前 17 小时通过皮下注射入喂食的雄性 Balb/c 大鼠中。第二天，大鼠尾静脉注射 100 $\mu$ g/kg 胰高血糖素或媒介物之前，禁食两个小时。在注射胰高血糖素之前，用葡萄糖计检测尾巴血中的血糖，15 分钟后再重复一次。

计算每只小鼠每隔 15 分钟葡萄糖的变化。然后从接受各处理的每只小鼠的葡萄糖变化中减去用媒介物处理的群体中葡萄糖的平均变

化,就获得了由胰高血糖素所引发的葡萄糖的变化。百分抑制定义是:单由 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  胰高血糖素所产生的葡萄糖减去由 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  胰高血糖素和 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  杂合肽存在时产生的葡萄糖量,除以单由 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  胰高血糖素所产生的葡萄糖,再乘以 100。参看表 3。

表 3

组别	葡萄糖 (mg/dl)				10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 胰高血糖素 的百分数	抑制率 %
	0 分 钟	15 分 钟	Delta (15-0)	- 媒 介物 delta		
媒介物	92	108	16			
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 胰高 血糖素	95	195	100	84	100	
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 胰高 血糖素+ 100 $\mu\text{g}$ 多肽 (SEQ ID NO:27)	75	150	75	59	69	31

### 实施例 17

在禁食的 Wistar 大鼠的体内葡萄糖耐量试验中,血浆胰岛素水平增加的检测

在这个实验中,血浆中胰岛素水平增加至少约 2 倍。优选的,本发明多肽的胰高血糖素受体拮抗剂成分能增加大鼠中胰岛素分泌,在禁食的 Wistar 大鼠的在体葡萄糖耐量试验中,血浆胰岛素水平增加约 2 至约 5 倍,更优选的是约 2 至约 10 倍,尤为优选的是约 2 至约 20 倍(即 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 倍)。

在禁食的 Wistar 大鼠的在体葡萄糖耐量试验中,血浆胰岛素水平增加可以用本发明的多肽按如下方法检测。雄性 Wistar 大鼠禁食过夜,然后用异氟烷气麻醉。通过尾静脉注射入 0.4 g/kg 的葡萄糖和媒介物(0.9% 生理盐水 + 1% 白蛋白),或加上 1 nmol/kg GLP-1 (阳性

对照), 或加上 1 nmol/kg 本发明的多肽。大鼠眼部放血一分钟, 然后利用 ELISA 试剂盒(Alpco Diagnostics (Windham, NH))检测血浆中的胰岛素。在 1 nmol/kg 的浓度时, 具 SEQ ID NO:6 氨基酸的多肽能促进胰岛素分泌 3-4 倍, 这和 1 nmol/kg GLP-1 获得的效果一样。参看表 2。

### 实施例 18

在腹腔内葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 中, 本发明肽对大鼠或小鼠的效果

在这个试验中, 检测到血糖水平下降了至少约 10%。优选的, 本发明多肽的胰高血糖素受体拮抗剂成分能降低大鼠或小鼠血糖水平, 在大鼠或小鼠的腹腔内葡萄糖耐量试验中, 下降了约 10%至约 60%, 更优选的是约 10%至约 80%, 尤为优选的是约 10%至约 100% (即 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%)。

在大鼠或小鼠的腹腔内葡萄糖耐量试验中, 血糖水平可以用本发明的多肽按如下方法检测。本发明多肽皮下给药后, 检测它们在大鼠或小鼠中的活性。禁食过夜的大鼠或小鼠中皮下注射入对照或肽 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。在给肽前或给衍生的肽后 3~17 小时检测基本的血糖水平, 而且 2 g/kg 的葡萄糖通过腹腔给药的方式注射入大鼠或小鼠。在 15、30 和 60 分钟后检测大鼠血糖水平, 在 30 或 60 分钟后检测小鼠血糖水平。

根据 IPGTT 试验, 本发明的多肽相对媒介物而言, 能显著地降低血糖水平, 在葡萄糖 AUC 中达到 13-54%。这证明肽降低葡萄糖的活性延长, 体内半寿期延长。GLP-1 在体内有非常短的半寿期 (<10 分钟)。在本发明肽给药后 3 小时, 它能降低血糖水平的能力清楚的表明肽正好在这个时间点出现在循环中, 因此, 相对 GLP-1 而言具有更长的半寿期。

### 实施例 19

肽聚乙二醇化

可以用本领域技术人员众所周知的方法进行聚乙二醇化。然而,

在这个例子中，聚乙二醇化是用如下方式完成的，在肽中导入一个唯一的半胱氨酸突变，然后通过肽中巯基和甲氧基-PEG-马来酰亚胺试剂(Inhale/Shearwater)的马来酰亚胺基之间的一个稳定的硫醚键对半胱氨酸进行聚乙二醇化。优选的是在肽的 C 末端导入一个唯一的半胱氨酸残基，从而减少由聚乙二醇化导致的活性下降。

具体来说，2 倍摩尔分子数的 mPEG-mal (分子量 22 kD 和 43 kD) 加入 1mg 的肽(例如，SEQ ID NO:25，它在肽的 C 末端具有突变的半胱氨酸残基)，并溶解在 pH6.0 的反应缓冲液(0.1 M NaPO<sub>4</sub>/ 0.1 M NaCl/ 0.1 M EDTA)中。在室温下反应 0.5 小时后，用 2 倍摩尔分子数的 DTT 或无半胱氨酸的 mPEG-mal 终止反应。将肽-PEG-mal 反应混合物上离子交换层析柱，以除去残余的 PEG 试剂，紧接着上凝胶过滤层析柱，以除去残余的自由肽。用 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF 质谱测定聚乙二醇化位点的纯度、质量和数目。用于聚乙二醇化的 PEG 越小(线性的 22kDa 的 PEG)，降低肽活性的可能性更小，而 PEG 越大，则降低肽活性的可能性就越大。然而，更大的 PEG 将会进一步增加血浆半寿期，以至于一个星期注射一次都有可能(Harris, 等., PEG 化: 改进药代动力学的一个新方法, *Clin. Pharmacokinet* 40:539-551, 2001)。

## 实施例 20

GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素受体拮抗剂多肽的相对能力

表 4 所列的结合到多肽上的 GLP-1 (IC<sub>50</sub> 值) 可以用实施例 8 所述的方法进行测定。相对能力值和百分 GLP-1 活性可以用实施例 10 所述的方法计算。大鼠或小鼠用 100 μg/kg 肽给药，在给药后 3 个小时，葡萄糖水平的降低可以用实施例 18 所述的腹腔内葡萄糖耐量试验来测定。参看表 4。

表 4 所列的结合到肽上的肝细胞膜 (IC<sub>50</sub>) 可以用实施例 9 所示的方法进行测定。胰高血糖素刺激的 cAMP 增加的抑制百分率可以用实施例 11 所述的方法进行测定。大鼠或小鼠用 100 μg/kg 肽给药，在给药后 17 个小时，葡萄糖水平用实施例 15 和 16 及表 4 所报道的方法进行测定。本发明的多肽在体内可以作为 GLP-1 受体激动剂或胰高血糖素受体拮抗剂。

表 4

肽	GLP1				胰高血糖素			
	RIN IC <sub>50</sub> (nM)	相对 能力 (%)	% GLP1 max	体内 IpGTT AUC 的降低 (%) <sup>a</sup>	肝 IC <sub>50</sub> (nM)	% 抑制胰 高血糖素 刺激的 cAMP 增 加	% 胰高 血糖素 降低刺 激的血 糖增加 <sup>b</sup>	
胰高血 糖素					1.8			
GLP- 1	0.4	100	100					
G1	6	6.9	112.1		6.6			
G5	0.5	69.9	109.4		243.1			
G27	2.2	13.4	98.1		69.3	31		
G51	8.2	58.1	91.2		154.1	35.2		
G55	9.8	18.6	115.9		139.2	32.1		
G56	6.6	37.2	114.8		125.3	28.6		
G57	14.7	18.3	132.4		177.5	18.4		
G58	6.9	76.1	99.0		163.5	32.6		
G59	2.1	22.7	101.7		97.5	41.1		
G60	13.8	22.3	95.7		682	21.8		
G61	10.6	12.1	96.0		232	45.2		
G71	5.8	4.3	93.3		25.6	11.3		
G74	4.4	8.4	88.7		21.7	23.7		
G75	7.7	6.6	86.1		54.0	17.1		
G76	10.2	7.7	85		59.1	23.0		
G77	8.9	9.5	92.1		61.1	18.6		

G277	ND	1.8	93.7	46	65.5			
G82	8.1	29.9	97.1		33.6	30.2		
G83	3.2	29.9	89.4		28.6	24.7		
G84	1.4	61.8	113.9		11.7	25.2		
G85	1.5	64.5	95.8		16.1	27.9		
G185	4.5	13.0	103.9		48	32		
G218 5	56.1	6.2	112.7	44	347			
G418 5	248	0.7	98.3	36	547		31	
G87	98.6	6.1	100.4	13	620	59		
G88	109.0	2.3	118.3	16	350			
G90	25.4	0.8	83.5	13	726			
G182	12.6	1.4	104.4	14	220			
G183	158.7	0.6	90.5	27	663			

a = 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  肽给药后 3 小时的小鼠 ipGTT 实验

b = 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  肽给药后 17 小时的小鼠胰高血糖素挑战实验

ND = 未测定

## 序列表

<110> Bayer 药物公司  
Pan, Clark  
Whelan, James  
Clairmont, Kevin B.

<120> 作为 GLP-1 受体激动剂和胰高血糖素拮抗剂的肽及其在药学上的使用方法

<130> MSB-7288-PCT

<140> PCT/US02/31693

<141> 2002-10-04

<150> US 60/327, 730

<151> 2001-10-05

<160> 34

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1                    5                    10                    15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
                  20                    25

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1                    5                    10                    15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                   20                    25                    30

<210> 3  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1                    5                    10                    15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                   20                    25                    30

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (30)..(30)  
 <223> 酰胺化

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1                    5                    10                    15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                   20                    25                    30

<210> 5

<211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (30)..(30)  
 <223> 酰胺化

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Gly  
 1                   5                   10                   15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                   20                   25                   30

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (30)..(30)  
 <223> 酰胺化

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                   20                   25                   30

<210> 7  
 <211> 31  
 <212> PRT

<213> 人

<400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> 酰胺化

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                  20                   25                   30

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> 酰胺化

<400> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                  20                   25                   30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> 酰胺化

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Ala Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                  20                   25                   30

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 12  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
 1                   5                   10                   15

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                   20                   25                   30

<210> 13  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1                   5                   10                   15

Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                   20                   25                   30

<210> 14  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
 1                   5                   10                   15

Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 15  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Cys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
 20 25 30

<210> 16  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Cys Gly Arg Gly  
 20 25 30

<210> 17  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Cys Arg Gly  
                   20                                  25                                  30

<210> 18  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人  
  
 <400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1                          5                                  10                                  15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Cys Gly  
                   20                                  25                                  30

<210> 19  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人  
  
 <400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1                          5                                  10                                  15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys  
                   20                                  25                                  30

<210> 20  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31).. (31)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (31).. (31)

<223> 聚乙二醇化

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys  
                  20                   25                   30

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys  
                  20                   25                   30

<210> 25

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys  
                  20                   25                   30

<210> 26  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31).. (31)  
 <223> 聚乙二醇化

<400> 26

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
 1                    5                    10                    15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys  
                   20                    25                    30

<210> 27  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31).. (31)  
 <223> 聚乙二醇化

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
 1                    5                    10                    15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys  
                   20                    25                    30

<210> 28

<211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (30).. (30)  
 <223> 酰胺化

<400> 28

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
                   20                   25                   30

<210> 29  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> 脂类  
 <222> (31).. (31)  
 <223> 棕榈酸化

<400> 29

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala  
 1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Lys  
                   20                   25                   30

<210> 30  
 <211> 31  
 <212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 脂类

<222> (24).. (24)

<223> 棕榈酸化

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 脂类

<222> (32).. (32)

<223> 棕榈酸化

<400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys  
                  20                   25                   30

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 脂类

<222> (24)..(24)

<223> 棕榈酸化

<400> 32

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 33

<211> 35

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Ile Glu Gly Arg His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys  
1                   5                   10                   15

Tyr Leu Asp Ala Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys  
                  20                   25                   30

Gly Arg Gly  
          35

<210> 34

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(12)

<223> X11 = R, G, S, A, K, 或 T  
 X12 = K, N, R, A, S, H, 或 Q

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16).. (18)

<223> X16 = A, F, S, W, T, H, K, R, V, I, L, M, N, Q, G, 或 Y

X17 = R, A, L, M, V, Q, K, F, I, W, N, D, E, H, S, T, G, 或 Y

X18 = K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G, 或 H

<400> 34

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Xaa Xaa Tyr Leu Asp Xaa  
 1                    5                    10                    15

Xaa Xaa Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                   20                    25                    30

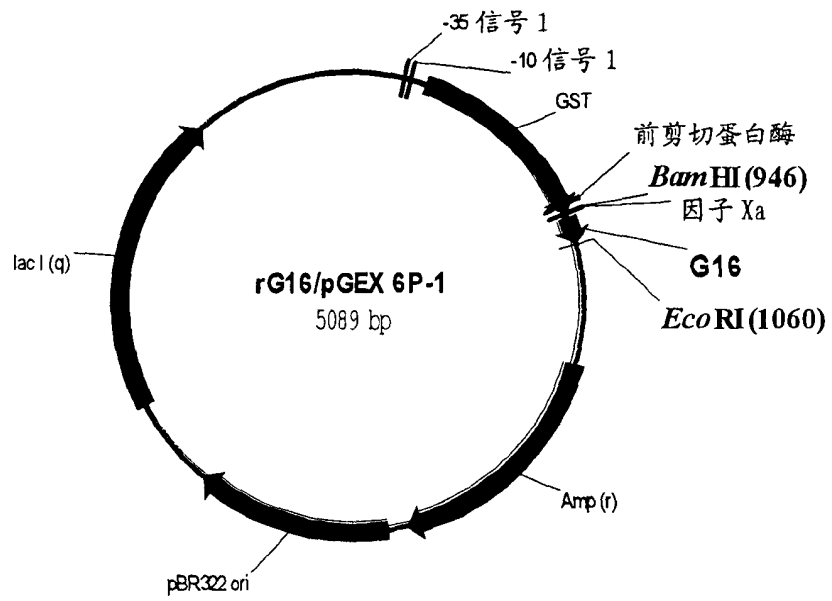


图 1