

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01811076.2

C12N 15/09

C07K 14/65

C07K 16/26

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 5/00

[43] 公开日 2005 年 6 月 29 日

[11] 公开号 CN 1633498A

[22] 申请日 2001.4.20 [21] 申请号 01811076.2

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 21 [33] JP [31] 126340/2000

[32] 2000. 7. 3 [33] JP [31] 205587/2000

[32] 2000. 8. 10 [33] JP [31] 247962/2000

[32] 2000. 12. 22 [33] JP [31] 395050/2000

[86] 国际申请 PCT/JP2001/003399 2001.4.20

[87] 国际公布 WO2001/081562 日 2001.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.13

[71] 申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 伊藤康明 铃木伸宏 西一纪

木泽秀树 原田征隆 大仪和宏

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

C12Q 1/68 C12P 21/02 C12P 21/08

A61K 38/17 A61K 38/28 A61K 38/30

A61K 39/395 A61K 45/00 A61P 43/00

A61P 3/00 A61P 19/00 A61P 9/00

A61P 5/00 A61P 25/00 A61P 37/00

A61P 1/16 A61P 11/00 A61P 17/00

G01N 33/50 G01N 33/15

权利要求书 3 页 说明书 91 页 序列表 25 页
附图 18 页

[54] 发明名称 新型胰岛素/胰岛素样生长因子/松
弛素家族多肽及其 DNA

[57] 摘要

本发明涉及①具有与 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸相同或基本相同的多肽(A 链); ②具有与 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸相同或基本相同的多肽(B 链); ③A 链和 B 链通过二硫键联结形成的多肽或其盐(2 条链); ④编码它们的 DNA 等。本发明多肽以及编码该多肽的 DNA, 可用于诊断、治疗、预防碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、脂肪代谢等)紊乱(如糖尿病等)等疾病。

ATG GCC AGG TAC ATG CTG CTG CTC CTG GCG GTA TGG GTG CTG ACC GGG GAG 54
Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr Gly Glu 18

CTG TGG CCG GGA GGT GAG GCG GCG GCA GCG CCT TAC GGG GTC AGG CTT TGC GGC 108
Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly 36

GGA GAA TTC ATC GGA GCA GTC ATC TTC ACC TGC GGG GGC TCC CCG TGG AGA CGA 162
Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg 54

TCA GAC ATC CTG GCC CAC GAG GCT ATG GGA GAT ACC TTC CCG GAT GCA GAT GCT 216
Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala 72

GAT GAA GAC AGT CTG GCA GGC GAG CTG GAT GAG GCC ATG GGG TCC AGC GAG TGG 270
Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp 90

CTG GGC CTG ACC AAG TCA CCC CAG GGC TTT TAC AGG GGG CGA CCC AGC TGG CAA 324
Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln 108

GGA ACC CCT GGG GTT CTT GGG GGC AGC GGA GAT GTC CTG GCT GGC CTT TCC AGC 378
Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser 126

AGC TGC TGC AAG TGG GGG TGT AGC AAA AGT GAA ATC AGT ACC CTT TGC TAG 429
Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys *** 142

ISSN 1008-4274

1. 一种多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其含有与 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中所述基本相同的序列是指 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列。
3. 一种多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列。
4. 如权利要求 3 所述的多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中所述基本相同的序列是指 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列。
- 10 5. 如权利要求 1 或 3 所述的多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其含有与 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列以及含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列。
6. 一种多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中含有与 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列相同或基本相同序列的多肽、其酰胺或其酯以及含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同序列的多肽、其酰胺或其酯它们通过二硫键相结合。
- 15 7. 如权利要求 5 或 6 所述的多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中所述含有与 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列为 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列，所述含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列为 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列。
- 20 8. 一种 DNA，其中含有编码权利要求 1 或 3 所述多肽的 DNA。
9. 如权利要求 1 或 3 所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其含有与 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列。
- 25 10. 如权利要求 9 所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中所述基本相同的氨基酸序列为 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列。
11. 如权利要求 8 所述 DNA，其中含有编码权利要求 9 所述多肽的 DNA。
- 30 12. 如权利要求 10 所述的 DNA，其中包含 SEQ ID NO:12、SEQ ID

NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:46 或 SEQ ID NO:52 所示的碱基序列。

13. 一种重组载体, 其中包含权利要求 8 所述的 DNA。

14. 一种转化体, 其用权利要求 13 所述重组载体转化而成。

15 15. 一种生产权利要求 1、3 或 6 所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐的方法, 其包含培养如权利要求 14 所述的转化体, 并从中生成权利要求 1、3 或 6 所述的多肽。

16. 一种抗体, 其针对权利要求 1、3 或 6 所述的多肽、其酰胺、或其酯或其盐。

10 17. 一种筛选化合物或其盐的方法, 所述化合物或其盐具有促进或抑制权利要求 1、3 或 6 所述多肽、其酰胺或其酯或其盐的活性, 该方法包括使用权利要求 1、3 或 6 所述的多肽、其酰胺或其酯或其盐。

18. 一种用于筛选化合物或其盐的试剂盒, 所述化合物或其盐具有促进或抑制权利要求 1、3 或 6 所述多肽、其酰胺或其酯或其盐的活性, 其中所述试剂盒包括权利要求 1、3 或 6 所述的多肽、其酰胺或其酯或其盐。

15 19. 一种化合物或其盐, 其具有促进或抑制权利要求 1、3 或 6 所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐的活性, 所述化合物或其盐可通过使用权利要求 17 所述的筛选法或权利要求 18 所述的筛选试剂盒而获得。

20 20. 一种药物, 其包含具有促进或抑制权利要求 1、3 或 6 所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐的活性的化合物或其盐, 所述化合物或其盐可通过使用权利要求 17 所述的筛选法或权利要求 18 所述的筛选试剂盒而获得。

21. 一种药物, 其含有权利要求 1、3 或 6 所述的多肽、其酰胺或其酯、或其盐。

22. 一种药物, 其包含如权利要求 16 所述的抗体。

25 23. 一种预防或治疗如下疾病的药物, 该药物包含①如权利要求 1、3 或 6 所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐; ②如权利要求 19 所述的化合物或其盐; ③如权利要求 16 所述的抗体, 所述疾病包括代谢调节紊乱、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常、组织的纤维变性、循环系统障碍、内分泌障碍、体液平衡异常、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病、血管再生障碍。

30 24. 如权利要求 23 所述的药物, 其中所述药物为治疗或预防肝硬化或肺纤维变性、硬皮症、肾纤维变性或外周动脉疾病的药物。

25. 一种诊断药物，其包含如权利要求 16 所述的抗体。

26. ①如权利要求 1、3 或 6 所述多肽、其酰胺或其酯、或其盐；②通过
使用权利要求 17 所述的筛选法或权利要求 18 所述的筛选试剂盒而获得的、
具有促进或抑制如权利要求 1、3 或 6 所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐的
5 活性的化合物或其盐；或③如权利要求 16 所述的抗体，它们在制备治疗或
预防如下疾病的药物中的应用，所述疾病包括：代谢调节紊乱、抑制组织的
生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常、组织的纤维变性、
循环系统障碍、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统
疾病、血管再生障碍。
- 10 27. 一种治疗或预防如下疾病的方法，该方法包括把①如权利要求 1、3
或 6 所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐；②通过使用权利要求 17 所述的筛
选法或权利要求 18 的筛选试剂盒而获得的、具有促进或抑制如权利要求 1、
3 或 6 所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐活性的化合物或其盐；或③如权利
15 要求 16 所述的抗体投药于哺乳动物，所述疾病包括代谢调节紊乱、抑制组
织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常、组织的纤维变
性、循环系统障碍、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫
系统疾病、血管再生障碍。

新型胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族多肽及其 DNA

5 发明领域

本发明涉及调节机体分泌机能的新型蛋白质及其 DNA 等。更具体地说，本发明涉及新型胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族蛋白质及其 DNA 等。

发明背景

10 生物机体通过细胞间或组织间相互的信息传递，调节整合机体的发育、分化、增殖以及个体稳定性的维持等。在这种调节机体时，很多情况都是由蛋白质因子起着调节作用。例如，现在已经发现了很多有关免疫系统和造血系统中具有分泌功能的因子（液体因子），它们被称为细胞因子。其中包括淋巴因子、单核因子、干扰素、菌落刺激因子、肿瘤坏死因子等。关于这些
15 因子人们正在积极地研究它们与疾病的关系以及用药的方法。

另外，如由内分泌组织产生的肽激素和增殖因子等的液体因子对维持个体的恒常性和生长起着非常重要的作用，关于这方面的作用人们正投入精力研究如何应用到医药方面。

胰岛素 (insulin)、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)、胰岛素样生长因子-II(IGF
20 -I I)、松驰素 H1(relaxin H1)、松驰素 H2(relaxin H2)从其结构特征上来看，它们被认为可形成一组家族液体因子，并且在生物机体内起着各种各样的生理作用，即碳水化合物的代谢调节、促进组织的生长、生殖功能的调节等（《BioScience 用语文库 细胞因子·增殖因子》羊土社 第 108-109 页，1995 年；《激素分子生物学 6 发育和生长因子·激素》学会出版中心 第 1-23 页，1996
25 年）。而且，不断地发现属于同一家族新的分子种（内分泌分子学 第 13 卷，第 2163-2174 页，1999 年）。这些前体蛋白的结构通过具有信号序列-B 结构域-C 结构域-A 结构域的特征，使成熟型分子的 B 结构域和 A 结构域之间通过 2 个二硫键结合。另外在 A 结构域内的 1 个二硫键对维持立体构造和活性的表达非常重要。胰岛素、胰岛素样生长因子、松驰素具有各种生理活性，
30 对于生物体来说，是非常重要的信息传递因子。胰岛素由胰腺 β 细胞分泌，它在肝脏、肌肉、脂肪组织中对能量代谢的调节起着非常重要作用，如具有

促进糖的吸收、促进脂肪酸合成、促进糖原合成等，除此之外还具有细胞增殖作用。胰岛素样生长因子-I 主要合成于肝脏中，对包括骨细胞在内的很多细胞都具有促进细胞增殖和分化的作用。胰岛素样生长因子-II 与胰岛素样生长因子-I 一样具有促进细胞增殖和胰岛素样的作用。这些因子特异性与受体结合而使该受体磷酸化，进而产生其后的一系列的作用。另一方面，近几年来，已经弄清了松弛素具有如产妇产道的松弛、胶原再构建而引起的结缔组织的软化、促进乳腺增殖的分化等主要与生殖功能有关的各种生理作用。例如具有促进分布于子宫、乳腺、肺、心脏等中的血管扩张、心脏的搏动作用、抑制肥大细胞释放组胺、抑制血小板的凝集、调节垂体激素的分泌、调节体液平衡、调节培养系中的乳癌细胞的增殖和分化等（Gen Pharmacol 第 28 卷，第 13-22 页，1997 年）。

对于生物体来说，这些重要的具有蛋白性质和肽性质的因子，过去很早就发现了其作为一种固有的生物活性指标。还有，针对已知生理活性蛋白质的同源性为手段通过克隆技术相继发现了同源性高的类似基因。但是高等生物，尤其是哺乳动物为了维持其健康，除了公知的基因组之外人们普遍认为用现有技术还不能鉴定未知的、具有非常重要的生理作用的体液性因子。

最近，通过使用微机借助于信息情报处理技术，把从 DNA 序列信息中发现的新的基因产物试图应用于生物学、医学、兽医学等方面，也就是说，有关生物信息（Bioinformatics）的各项研究正在不断地展开（Trends in Biotechnology 第 14 卷，第 294-298 页，1996 年）。近年来，由于 cDNA 文库大规模序列成为信息获得的可能，通过累积 EST（expressed sequence tag）的信息等，不断地发现数量巨大的新型基因或者其增补基因，但是还有很多信息是不正确的、断片的序列，而现实中，有关现存的 cDNA 文库所公开的数据库还不能完全覆盖每种生物的全部表达基因。因此，从这些数据中进一步探索全新的有用的基因产物也未必很容易。另一方面，一个生物个体所具有的全部 DNA，即基因组的结构分析已经在若干种的细菌类、真菌类（酵母等）、昆虫、植物中完成了，预计人的基因组的分析还需要几年时间。迄今为止，虽然很多编码分泌蛋白或分泌肽的基因已经被分离，但其数量还不能说已经涵盖了全部基因组。而且人们强烈希望属于胰岛素、胰岛素样生长因子、松弛素家族新物质的早日登场如上面所叙述的迫切希望能够把那些新物质应用到医疗方面。

发明内容

本发明所要解决的问题就是提供一种可用于生物学、医学、兽医学等领域的、属于胰岛素、胰岛素样生长因子、松弛素家族的新型蛋白及其前体蛋白、它们的断片以及编码它们的多核苷酸。本发明的另外所要解决的问题是提供含有所述多核苷酸的重组载体、含有该载体的转化宿主细胞、转导包括所述多核苷酸基因的转基因动物。另外，本发明还提供所述蛋白质或多肽的制备方法、针对所述蛋白质或多肽的抗体、激动剂或拮抗剂、受体以及它们的鉴定方法。本发明所要解决的问题进一步提供含有所述蛋白质、多肽、多核苷酸、拮抗剂、抗体、受体的药物组合物、疾病的治疗方法以及预防方法等。

本发明人为了解决上述课题，经过反复钻研终于在人体内发现了表达的新型基因，又发现了它所编码的蛋白质为属于胰岛素、胰岛素样生长因子、松弛素家族、具有调节生物机体分泌功能的新蛋白质。

本发明人进一步刻苦钻研继发现新的人型调节机体分泌功能的蛋白质之后，又发现了新的大鼠型、该大鼠型变异体、小鼠型以及猪型调节机体分泌功能的蛋白质。

本发明人基于这些发现，经过广泛的研究，总结其研究结果，从而完成本发明。

因此，本发明涉及：

(1) 一种多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其含有与 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列；

(2) (1)中所述的多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中所述基本相同的序列是指 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列；

(3) 一种多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列；

(4) (3)中所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中所述基本相同的序列是指 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列；

(5) (1) 或(3)中所述的多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其含有与 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列以及含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列；

(6) 一种多肽、其酰胺、或其酯、或其盐，其中含有与 SEQ ID NO:7 所

示氨基酸序列相同或基本相同序列的多肽、其酰胺或其酯以及含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同序列的多肽、其酰胺或其酯它们通过二硫键相结合;

(7) (5)或(6)中所述的多肽、其酰胺、或其酯、或其盐, 其中所述含有与
5 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列为 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列, 所述含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列为 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列;

(8) 一种 DNA, 其中含有编码权利要求 1 或 3 所述多肽的 DNA;

10 (9) (1)或(3)中所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐, 其含有与 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列;

(10)(9)中所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐, 其中所述基本相同的氨基酸序列为 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列;

15 (11)(8)中所述 DNA, 其中含有编码(9)中所述多肽的 DNA;

(12)(10)中所述的 DNA, 其中包含 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:46 或 SEQ ID NO:52 所示的碱基序列;

(13)一种重组载体, 其中包含权利要求 8 所述的 DNA;

(14)一种转化体, 其用(13)中所述重组载体转化而成;

20 (15)一种生产(1)、(3)或(6)中所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐的方法, 其包含培养(14)中所述的转化体, 并从中生成(1)、(3)或(6)中所述的多肽;

(16)一种抗体, 其针对(1)、(3)或(6)中所述的多肽、其酰胺、或其酯或其盐;

25 (17)一种筛选化合物或其盐的方法, 所述化合物或其盐具有促进或抑制(1)、(3)或(6)中所述多肽、其酰胺或其酯或其盐的活性, 该方法包括使用(1)、(3)或(6)中所述的多肽、其酰胺或其酯或其盐;

(18)一种用于筛选化合物或其盐的试剂盒, 所述化合物或其盐具有促进或抑制(1)、(3)或(6)中所述多肽、其酰胺或其酯或其盐的活性, 其中所述试
30 剂盒包括(1)、(3)或(6)中所述的多肽、其酰胺或其酯或其盐;

(19)一种化合物或其盐, 其具有促进或抑制(1)、(3)或(6)中所述多肽或

其酰胺或其酯、或其盐的活性，所述化合物或其盐可通过使用(17)中所述筛选法或(18)中所述筛选试剂盒而获得；

(20)一种药物，其包含具有促进或抑制(1)、(3)或(6)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐活性的化合物或其盐，所述化合物或其盐可通过使用(17)中所述筛选法或(18)中所述筛选试剂盒而获得；

(21)一种药物，其含有(1)、(3)或(6)中所述的多肽、其酰胺或其酯、或其盐；

(22)一种药物，其包含(16)中所述的抗体；

(23)一种预防或治疗如下疾病的药物，该药物包含①(1)、(3)或(6)中所述多肽、其酰胺、或其酯、或其盐；②(19)中所述的化合物或其盐；③(16)中所述的抗体，所述疾病包括代谢调节紊乱、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常、组织的纤维变性、循环系统障碍、内分泌障碍、体液平衡异常、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病、血管再生障碍；

(24)(23)中所述的药物，其中所述药物为治疗或预防肝硬化或肺纤维变性、硬皮症、肾纤维变性或外周动脉疾病的药物；

(25)一种诊断药物，其包含(16)中所述的抗体；

(26)①(1)、(3)或(6)中所述多肽、其酰胺或其酯、或其盐；②通过使用(17)中所述的筛选法或(18)中所述的筛选试剂盒而获得的、具有促进或抑制(1)、(3)或(6)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐活性的化合物或其盐；或③(16)中所述的抗体，它们在制备治疗或预防如下疾病的药物中的应用，所述疾病包括：代谢调节紊乱、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常、组织的纤维变性、循环系统障碍、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病、血管再生障碍；

(27)一种治疗或预防如下疾病的方法，该方法包括把①(1)、(3)或(6)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐；②通过使用(17)中所述的筛选法或(18)中所述的筛选试剂盒而获得的、具有促进或抑制(1)、(3)或(6)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐活性的化合物或其盐；或③(16)中所述的抗体投药于哺乳动物，所述疾病包括代谢调节紊乱、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常、组织的纤维变性、循环系统障碍、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病、血管再生障碍。

又, 本发明的 DNA 以及多肽、其酰胺、其酯、或其盐等可用于基础性研究如, 分子量标记、组织标记、染色体作图、遗传病鉴定、引物和探针的设计等。

5 附图说明

图 1 表示本发明新型蛋白质(前体蛋白)的开放读码以及它所编码的氨基酸序列。

图 2 表示在实施例 4 中通过 RT-PCR 分析人型多肽表达组织的结果。图中, 泳道 1 为心脏(heart)、泳道 2 为脑(brain)、泳道 3 为胎盘(placenta)、泳道 4 为肺(lung)、泳道 5 为肝脏(liver)、泳道 6 为骨骼肌肉(skeletal muscle)、泳道 7 为肾脏(kidney)、泳道 8 为胰腺(pancreas)、泳道 9 为脾脏(spleen)、泳道 10 为胸腺(thymus)、泳道 11 为前列腺(prostate)、泳道 12 为睾丸(testis)、泳道 13 为卵巢(ovary)、泳道 14 为小肠(small intestine)、泳道 15 为结肠(colon)、泳道 16 为外周血白血球(peripheral blood leukocyte)、泳道 17 为丘脑下部(hypothalamus)、泳道 18 为海马(hippocampus)、泳道 19 为垂体(pituitary)、泳道 20 为脂肪细胞(adipocyte)、泳道 21 为胎儿脑(fetal brain)、泳道 22 为胎儿肺(fetal lung)、泳道 23 为胎儿肝脏(fetal liver)、泳道 24 为胎儿肾脏(fetal kidney)、泳道 25 为胎儿心脏(fetal heart)、泳道 26 为胎儿脾脏(fetal spleen)、泳道 27 为胎儿胸腺(fetal thymus)、泳道 28 为胎儿骨骼肌肉(fetal skeletal muscle)、泳道 29 为基因组 DNA(genomic DNA)。

图 3 表示本发明每种新的人型·小鼠型·大鼠型·猪型蛋白质(前体蛋白)氨基酸序列的排列。

图 4 表示针对本发明新型多肽 A 链 N 端肽的小鼠抗血清的抗体滴度。

图 5 表示自转导有本发明新型多肽基因的 AtT20 细胞系培养上清液中通过反向-HPLC 分离纯化新型多肽时的吸光值 215nm 及其免疫活性的检测结果。

图 6 表示在人型多肽纯化标样 THP-1 细胞系中促进其细胞内 cAMP 产生作用。

图 7 表示人型多肽融合蛋白用于大肠杆菌表达质粒的构建图。

图中, 「T7/lac0 promoter」表示 T7 启动子及 lac 操纵基因区域, 「Amp」表示抗氨苄西林药物区域, 「ColE1 roi」表示质粒复制起点, 「lac I^q」表

示 lac 阻遏物,「B 链」表示 SEQ ID NO: 16 所示的碱基序列,「A 链」表示 SEQ ID NO: 15 所示的碱基序列,「C 链」表示 SEQ ID NO: 4 所示第 184 位至第 375 位的碱基序列。

图 8 表示从人体新型多肽融合蛋白表达重组大肠杆菌中制备的全部菌体蛋白的 SDS-PAGE 的结果。

图 9 表示在人体新型多肽纯化标样 THP-1 细胞系中的细胞刺激作用。

图 10 表示用胰蛋白酶和 CPB 处理 (16-53)/(110-133) 之后形成的反应物,再通过利用 TSKgelODS-80Ts 柱的 HPLC 分离得到分离类型。

图 11 表示通过大肠杆菌制备的人体新型多肽纯化标样对 THP-1 细胞系促进细胞内 cAMP 产生作用。

图 12 表示通过大肠杆菌制备的人体新型多肽衍生物纯化标样对 THP-1 细胞系促进细胞内 cAMP 产生作用。图中, -●-表示人体新型多肽 (16-42)/(110-133), -□-表示 (16-53)/(110-133), -△-表示 (16-41)/(110-133)。

图 13 表示人体新型多肽 (16-42)/(110-133) 纯化标样在正常人肺的成纤维细胞系 CCD-19Lu 中促进 MMP-1 及 VEGF 基因表达的结果。

图 14 表示人体新型多肽 (16-42)/(110-133) 纯化标样在正常人皮肤成纤维细胞系 NHDF 中促进细胞内 cAMP 产生的作用。

图 15 表示人的新型多肽 (16-42)/(110-133) 纯化标样在大鼠垂体前叶第一代培养细胞中促进细胞内产生 cAMP 的作用。

图 16 表示人的新型多肽 (16-42)/(110-133) 纯化标样对促进 THP-1 细胞 VEGF 基因表达的作用。

图 17 表示转导有各种新型表达多肽载体的 COS-7 细胞培养上清液中的新型多肽的免疫活性。Control 表示转导有原亲本质粒 pCAN618 在 COS-7 细胞培养上清液中的免疫活性, blank 表示在 COS-7 细胞培养上清液中的免疫活性。

图 18 表示转导有新型表达多肽载体的 COS-7 细胞培养上清液中对 THP-1 细胞促进细胞内产生 cAMP 的活性。Control 表示加入了转导有原亲本质粒 pCAN618 在 COS-7 细胞培养上清液时促进 THP-1 细胞内产生 cAMP 的活性, 100mM 新型多肽表示加入了新型多肽纯化标样 100mM 时促进 THP-1 细胞内产生 cAMP 的活性。

具体实施方式

在本发明中,含有与 SEQ ID NO: 7 或 8 所示氨基酸序列相同或基本相同的多肽(下文通常将含有与 SEQ ID NO: 7 或 8 所示氨基酸序列相同或基本相同的多肽统称为"本发明多肽")均可来自人或温血动物(例如,豚鼠、大鼠、小鼠、家鸡、兔子、猪、绵羊、牛、猴子等)细胞中的多肽,还有重组多肽,或者合成多肽。所述细胞如肝细胞、脾细胞、神经细胞、内分泌细胞、神经内分泌细胞、神经胶质细胞、胰腺 β 细胞、骨髓细胞、肾小球膜细胞、朗格罕氏细胞、表皮细胞、上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞、肌细胞、脂肪细胞、免疫细胞(例如,巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、树突状细胞)、巨核细胞、滑膜细胞、软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、乳腺细胞、或间质细胞、或这些细胞的前体细胞、干细胞或癌细胞等;或含此类细胞的组织,所述组织例如脑、脑的任何部分(例如,嗅球、屏状核、大脑基底神经节、海马、丘脑、下丘脑、大脑皮质、延髓、小脑)、脊髓、垂体、胃、胰腺、肾、肝、生殖腺、甲状腺、胆囊、骨髓、肾上腺、皮肤、肌肉、肺、消化道(例如大肠、小肠)、血管、心脏、胸腺、脾、唾液腺、外周血、前列腺、睾丸、卵巢、胎盘、子宫、骨、软骨、关节、骨骼肌等。

又,如果本发明多肽中含有信号多肽时,则可以使该多肽更有效地分泌到细胞外。

那么,所述与 SEQ ID NO: 7 或 8 所示氨基酸序列基本相同的序列,可举例为,具有与 SEQ ID NO: 7 或 8 所示氨基酸序列同源性至少大于 50% 的氨基酸序列,优选同源性约大于 60%,较优选约大于 70%,进一步优选约大于 80%,更优选约大于 90%,最优选约大于 95%。

SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 7 以及 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

那么,所述与 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列基本相同的序列,可举例为,具有与 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列同源性至少大于 50% 的氨基酸序列,优选同源性约大于 60%,较优选约大于 70%,进一步优选约大于 80%,更优选约大于 90%,最优选约大于 95%。

所述具有与本发明 SEQ ID NO: 7 或 8 所示氨基酸序列基本相同的多肽，优选含有与所述 SEQ ID NO: 7 或 8 所示氨基酸序列基本相同的序列，同时优选与 SEQ ID NO: 7 或 8 所示氨基酸序列基本相同的序列具有基本相同性质的多肽等。

- 5 所述与 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列基本相同的序列，更具体地说，可举例为 SEQ ID NO: 19 或 47 所示的氨基酸序列等。

又，所述与 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列基本相同的序列，更具体地说，可举例为 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列或 SEQ ID NO: 49 所示氨基酸序列。

- 10 还有，所述具有与 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列基本相同的多肽，优选含有与所述 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列基本相同的序列，同时优选与含有 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的具有基本相同性质的多肽等。

所述与 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列基本相同的序列，更具体地说，可举例为 SEQ ID NO: 17、23、45、51 所示氨基酸序列。

- 15 所述性质基本相同的例子，如抗原性、由分泌而形成的具有液体因子功能、促进细胞内 cAMP 产生作用等。所谓性质基本相同是指，它们的性质在定性上相同。因此，优选其分泌作用或溶解性或生理作用性质等相同(例如，约 0.1-100 倍，优选约 0.5-10 倍，更优选 0.5-2 倍)。然而，这些性质的程度或多肽分子量等其量化要素可以不尽相同。

- 20 所述含有与 SEQ ID NO: 7、8 或 3 所示氨基酸序列基本相同的多肽可以包括所谓的突变蛋白，如包含下述多肽：(i)SEQ ID NO: 7、8 或 3 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，再优选 1~10 个氨基酸，更优选 1~5 个氨基酸)被缺失；(ii)SEQ ID NO: 7、8 或 3 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，再优选 1~10 个氨基酸，更优选数个(1-5)氨基酸)被附加；(iii)SEQ ID NO: 7、8 或 3 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，再优选 1~10 个氨基酸，更优选数个(1-5)氨基酸)被插入；(iv)SEQ ID NO: 7、8 或 3 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，再优选 1~10 个氨基酸，更优选数个(1~5)氨基酸)被其他氨基酸所取代；以及(v)
- 25 上述氨基酸序列的组合。
- 30

如上所述当氨基酸序列被插入、缺失或取代时，其插入、缺失或取代的位置不作特别限定。但在 SEQ ID NO: 7、8 或 3 它们各自序列号所示氨基酸序列中包括除了半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基。

含有与 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列以及含有
5 与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列的多肽除了含有 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列单链多肽以外，还包含与 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列的多肽（以下，在本说明书中有时简称为 A 链）和含有与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列的多肽（以下，在本说明书中有时简称为 B
10 链）并由该 2 条链构成多肽（以下，在本说明书中有时简称为 2 条多肽链）。

具体地说，所述 2 条多肽链是指，与 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列以及与 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列通过二硫键结合的多肽，并表示在 A 链及 B 链内的半胱氨酸残基通过分子间以及分子内形成二硫键的多肽。所述半胱氨酸残基之间的组合优选
15 如下：例如 A 链的 Cys11（所述 A 链的 Cys11 表示从 SEQ ID NO: 7、19 或 47 所示氨基酸序列 N 末端起第 1 位的半胱氨酸残基。下同）和 B 链的 Cys10（所述 B 链的 Cys10 表示从 SEQ ID NO: 8、21 或 49 所示氨基酸序列 N 末端第 10 位的半胱氨酸残基。下同）结合，并且 A 链的 Cys24 和 B 链的 Cys22 结合，再有 A 链的 Cys10 和 A 链的 Cys15 结合。

20 所述包含与 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列相同或基本相同的多肽（以下，有时简称为前体蛋白。）优选如下所述：①当为 SEQ ID NO: 3 时，在其 N 末端第 26 位（Arg）至第 52 位（Trp）上包含 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列（即编码 B 链的氨基酸序列），并在 SEQ ID NO: 3 的 N 末端第 119 位（Asp）至第 142 位（Cys）上包含 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列（即编
25 码 A 链的氨基酸序列）；

②当为 SEQ ID NO:17 时，在其 N 末端第 25 位（Arg）至第 51 位（Trp）上包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列（即编码 B 链的氨基酸序列），并在 SEQ ID NO: 17 的 N 末端第 118 位（Asp）至第 141 位（Cys）上包含 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列（即编码 A 链的氨基酸序列）；

30 ③当为 SEQ ID NO: 23 时，在其 N 末端第 24 位（Arg）至第 50 位（Trp）上包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列（即编码 B 链的氨基酸序列），并

在 SEQ ID NO: 23 的 N 末端第 117 位 (Asp) 至第 140 位 (Cys) 上包含 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列 (即编码 A 链的氨基酸序列);

④当为 SEQ ID NO: 45 时, 在其 N 末端第 27 位 (Arg) 至第 53 位 (Trp) 上包含 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列 (即编码 B 链的氨基酸序列), 并在 SEQ ID NO: 45 的 N 末端第 117 位 (Asp) 至第 140 位 (Cys) 上包含 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列 (即编码 A 链的氨基酸序列);

⑤当为 SEQ ID NO: 51 时, 在其 N 末端第 24 位 (Arg) 至第 50 位 (Trp) 上包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列 (即编码 B 链的氨基酸序列), 并在 SEQ ID NO: 51 的 N 末端第 151 位 (Asp) 至第 174 位 (Cys) 上包含 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列 (即编码 A 链的氨基酸序列), 并具有 A 链、B 链、2 条链多肽前体的性质。

本发明的多肽 (以下, 把 A 链、B 链、2 条链、前体蛋白统称为本发明多肽) 用本领域已知的描述肽的方法来定义。即, 左末端为 N-末端(氨基端), 右末端为 C-末端(羧基端)。本发明多肽中包括以 SEQ ID NO: 3、7 以及 8 所示的氨基酸序列为主的多肽, 其 C-末端通常为羧基(-COOH)或羧酸根(-COO⁻), 但是 C-末端也可为酰胺(-CONH₂)或酯(-COOR)。

这里 R 代表的酯如 C₁₋₆ 烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、或正丁基等; C₃₋₈ 环烷基包括环戊基和环己基等; C₆₋₁₂ 芳基包括苯基和 α -萘基等; 以及 C₇₋₁₄ 芳烷基包括苯基-C₁₋₂ 烷基如苯甲基、苯乙基等; 或 α -萘基-C₁₋₂ 烷基如 α -萘甲基, 还有通常用作口服给药的酯的三甲基乙酰氧甲基。

当本发明多肽在 C-末端以外的位置上包括羧基(或羧酸酯)时, 它可以酰胺化或酯化, 则这类酰胺或酯也可以包括在本发明所述多肽的范围之内。所述酯基可以与上述 C-末端的酯基相同。

另外, 本发明多肽可以包括下述衍生物, 其中 N-末端氨基酸残基(如甲硫氨酸残基)的氨基用保护基(C₁₋₆ 酰基, 如甲酰基、乙酰基等 C₁₋₆ 烷酰基)保护; 所述 N 末端在体内切割, 形成的谷氨酰基焦谷氨酸化; 所述 C-末端氨基酸残基为高丝氨酸或高丝氨酸内酯; 所述多肽分子中氨基酸侧链上的取代基(例如, -OH, -SH, 氨基、咪唑基、吲哚基、胍基等)受适当基团(C₁₋₆ 酰基, 如甲酰基、乙酰基等 C₁₋₆ 烷酰基)保护, 或结合多肽如通过糖链连接的糖多肽等。

本发明多肽可以是单体，也可以是多聚体，如二聚体、四聚体、六聚体、八聚体等。

作为本发明的多肽或其盐，可以使用与生理上可接受的酸(如无机酸或有机酸)或碱(如碱金属盐)形成的盐，尤其优选生理上可接受的酸加成盐。这样的盐有，与无机酸(例如，盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)形成的盐，或者与有机酸(例如，乙酸、甲酸、丙酸、延胡索酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)形成的盐等。

本发明多肽或它们的盐既可用公知的从前述的人或其它温血动物细胞或组织中纯化多肽(蛋白质)的方法来制备。也可以通过培养含有编码后述的多肽的 DNA 转化体而制备，也可用下述肽合成法来制备。

当从人或哺乳动物组织或细胞中制备多肽或它们的盐时，首先将人或哺乳动物组织或细胞匀浆，然后用酸等抽提，通过反相层析、离子交换层析等多种层析技术的联用来分离纯化该抽提物。

为了合成本发明多肽、或其盐或其酰胺物，可以使用可用于多肽(蛋白质)合成的商用树脂。这类树脂包括氯甲基树脂、羟甲基树脂、二苯甲胺树脂、氨甲基树脂、4-苄氧基苯甲醇树脂，4-甲基二苯甲基胺树脂，PAM 树脂，4-羟甲基甲苯乙酰胺甲基树脂，聚丙烯酰胺树脂，4-(2',4'-二甲氧基苯羟甲基)苯氧基树脂以及 4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨乙基)苯氧基树脂。使用这些树脂时，将那些 α -氨基及侧链上官能团受到相应保护的氨基酸，在树脂上按目标多肽的序列顺序，用本领域公知的各种缩合方法缩合。反应结束时，将多肽从树脂上切除下来，同时除去各种保护基团。然后在高度稀释的溶液中进行分子内二硫键的形成反应，以获得目标多肽、或其酰胺物。

进行上述受保护氨基酸的缩合反应时，可使用多肽合成的多种活化试剂，但优选使用碳二亚胺。所述碳二亚胺有 DCC、N,N'-二异丙基碳二亚胺以及 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基脯氨酰基)碳二亚胺。用这些试剂活化时，直接在树脂上添加受保护的氨基酸及外消旋抑制剂(例如，HOBt, HOObt)，或先将受保护的氨基酸活化为对称酸酐、HOBt 酯或 HOObt 酯，然后添加到树脂上。

适用于受保护氨基酸的活化反应或适用于与树脂的缩合反应的溶剂选自已知可用于多肽(蛋白质)缩合反应的溶剂。这样的溶剂有酰胺类如 N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺以及 N-甲基吡咯烷酮等；卤化烃类如亚甲

基盐酸盐和氯仿等；醇类如三氟乙醇等；亚砷类如二甲亚砷等；醚类如吡啶、二恶烷和四氢呋喃等；腈类如乙腈和丙腈等；酯类如乙酸甲酯和乙酸乙酯等；或者这些溶剂的适当混合物。反应温度从已知适用于多肽(蛋白质)成键反应的范围中选取，通常选约-20℃ - 50℃。活化的氨基酸衍生物通常以过量 1.5 ~ 4 倍的量使用。用茚三酮反应检验所述缩合反应；当所述缩合不充分时，可通过不除去保护基团而重复缩合反应来完成。当即使重复反应后仍未充分缩合时，用乙酸酐或乙酰咪唑将未反应的氨基酸乙酰化，以消除对后续反应的可能负影响。

用于保护初始氨基的保护基团有 Z、Boc、叔戊氧基羰基、异冰片基氧羰基、4-甲氧苄氧羰基、Cl-Z、Br-Z、金刚烷(adamantyl)氧基羰基，三氟乙酰基、邻苯二甲酰基、甲酰基、2-硝基苯基亚硫酰基、二苯硫磷基，以及 Fmoc 等。

羧基可用如下的酯化作用保护，例如烷基酯化(烷基如甲基、乙基、丙基、丁基、叔丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基和 2-金刚烷基等的直链、支链或环状烷基酯)，芳烷基酯化(例如酯化为苄酯、4-硝基苄酯、4-甲氧苄酯、4-氯苄酯以及二苯甲基酯等)，苯甲酰甲基酯化，苄氧羰基酰肼化，叔丁氧羰基酰肼化以及三苯甲基酰肼化等。

丝氨酸的羟基可以通过例如酯化作用或醚化作用来保护。适于酯化作用的基团有低级 C₁₋₆ 烷酰基如乙酰基，芳酰基如苯甲酰基，以及来自碳酸的基团如苄氧羰基和乙氧羰基。适于醚化的基团有苯甲基、四氢吡喃基和叔丁基等。

适于保护酪氨酸中酚羟基的基团有 Bzl, Cl₂-Bzl, 2-硝基苄基、Br-Z 和叔丁基等。

适于保护组氨酸中咪唑基的基团有 Tos, 4-甲氧-2,3,6-三甲基苯磺酰基、DNP、苄氧甲基、Bom、Boc、Trt 和 Fmoc 等。

初始氨基酸中的活化羧基有相应的酸酐、叠氮化物、活化酯(带有醇的酯(如五氯苯酚、2,4,5-三氯苯酚、2,4-二硝基酚、氰甲基醇、对硝基苯酚、HONB, N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基邻苯二甲酰亚胺、HOBt)。将初始物质中待活化氨基酸的氨基活化时，可以使用其相应磷酰胺。

为了除去(脱离)保护基，在氢气流下用 Pd-黑或 Pd-碳等催化剂进行催化还原；用氢氟酸酐、甲磺酸、三氟甲磺酸或三氟醋酸，或这些酸的混合液进

行酸处理；用二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶或哌嗪等碱进行碱处理；以及用液态氨中的钠还原。用上述酸处理除去所述保护基团的反应通常在约-20℃~40℃进行。在酸处理中，添加阳离子清除剂以使反应有效进行，例如使用甲氧基苯、苯酚、硫代甲氧基苯、间甲酚、对甲酚、二甲基硫化物、1,4-丁二硫醇、1,2-乙二硫醇。此外，用苯硫酚处理以除去已知可作为组氨酸中咪唑的保护基团的2,4-二硝基苯基。用作色氨酸中吲哚的保护基团的甲酰基用下述方法去除：在1,2-乙二硫醇、1,4-丁二硫醇等存在时用上述酸进行处理，以及用氢氧化钠稀溶液和稀氨水等碱进行处理。

与起始物质之反应无关的官能团的保护、保护基的选择、该保护基的消除、以及与上述反应有关的官能团的活化，从公知的基团和公知的方法中适当选择。

获得酰胺化多肽的其它方法有，如先将羧基末端氨基酸的 α -羧基酰胺化而加以保护；然后，将肽(多肽)链从氨基侧延伸至预期长度。然后，制备只将其中N-末端 α -氨基的保护基团除去的多肽以及只将其中C-末端羧基的保护基团除去的多肽。将这两种多肽浓缩在上述溶剂的混合液中。浓缩反应的细节同上。对浓缩所得被保护多肽进行纯化后，通过上述方法除去所有的保护基团，获得所需粗制多肽。该粗制多肽可用各种已知的纯化方法进行纯化。冻干主要级分获得所需多肽的酰胺物。

将羧基末端氨基酸的 α -羧基与所选醇类缩合获得氨基酸酯，然后用与上述制备酰胺化多肽方法类似的方法获得所需酯化本发明多肽酯。

本发明多肽或它们的盐可通过已知的肽合成方法而制备。就肽合成的方法而言，固相合成或液相合成都可使用。即，将能构成本发明部分肽的部分肽或氨基酸与本发明多肽的其他部分缩合在一起。当产物中包含保护基团时，除去这些保护基团得到所需肽。用来缩合或除去保护基团的公知方法见下列1)~5)。

1)M. Bodanszky 和 M.A. Ondetti: 肽的合成, Interscience Publishers, 纽约(1966)

2)Schroeder 和 Luebke: 肽, Academic Press, 纽约(1965)

3)泉屋信夫等: 多肽合成与实验, 丸善公司(1975)

4)矢岛治明和榊原俊平: 生物化学实验教材 1, 蛋白质化学 IV, 205(1977)

5)矢岛治明主编: 药物开发续篇, 卷 14, 肽合成, 广川书店

反应完成后,可将常规纯化方法如溶剂提取、蒸馏、柱层析、液相层析以及重结晶等进行组合以纯化回收本发明多肽。当用上述方法获得的多肽为游离形式时,可以用公知的方法或其改良方法将所述肽转化为相应盐;当所述多肽以盐形式获得时,可以用公知的方法或改良方法将其转化为游离形式。

编码本发明多肽的 DNA 可为任意 DNA,只要其含有编码本发明多肽氨基酸序列的碱基序列。这类 DNA 也可以是基因组 DNA、所述细胞或组织的 cDNA、合成 DNA。

用于上述文库的载体可以为噬菌体、质粒、粘粒以及噬菌粒中的任意一种。所述 DNA 可以用从上述细胞或组织中制备的总 RNA 或 mRNA 级分通过反转录聚合酶链反应(以下简称为 RT-PCR)直接扩增。

编码本发明多肽的 DNA 可以为任一种 DNA,只要其具有,例如, SEQ ID NO:12、15、16、18、20、22、24、25、26、46、48、50 或 52 所示碱基序列,或其具有能在严谨条件下与 SEQ ID NO: 12、15、16、18、20、22、24、25、26、46、48、50 或 52 所示碱基序列杂交的碱基序列,且具有编码的多肽具有与本发明多肽的活性(如生物活性、免疫原性、经分泌具有体液因子功能、促进细胞内 cAMP 产生等)基本相同,并且其 DNA 编码的多肽具有与本发明多肽性质基本相同。

在严谨条件下与 SEQ ID NO: 12、15、16、18、20、22、24、25、26、46、48、50 或 52 所示碱基序列能杂交的 DNA,分别为与 SEQ ID NO: 12、15、16、18、20、22、24、25、26、46、48、50 或 52 所示碱基序列至少具有约 60% 同源性的 DNA,优选至少约 70%,更优选至少约 80%。

又,在严谨条件下所述与 SEQ ID NO: 12、15、16、18、20、22、24、25、26、46、48、50 或 52 所示碱基序列能杂交的 DNA,其具有能在严谨条件下与 SEQ ID NO: 12、15、16、18、20、22、24、25、26、46、48、50 或 52 所示碱基序列进行杂交的碱基序列,且具有编码的多肽具有与本发明多肽的活性(如生物活性、免疫原性、经分泌具有体液因子功能、促进细胞内 cAMP 产生等)基本相同,并且其 DNA 编码的多肽具有与本发明多肽性质基本相同。

可以用公知方法或其改良方法进行所述杂交反应,例如,分子克隆,第 2 版;J. Sambrook 等,冷泉港实验室出版社,(1989)中所述方法。也可以按照所附说明书使用文库商品。该杂交反应优选在高度严谨的条件下进行。

此处的高度严谨条件是，例如钠离子的浓度约为 19-40mM，优选约 19-20mM，而温度约为 50-70℃，优选约 60-65℃。

所述编码本发明多肽的 DNA，可以使用含 SEQ ID NO: 12、15、16、18、20、22、24、25、26、46、48、50 或 52 所示碱基序列的 DNA。

5 更具体地说，可举例如下：

(I) 所述编码 A 链（人型多肽，其中含有 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:15 所示碱基序列的 DNA 等，

(II) 所述编码 A 链（大鼠型多肽，其中含有 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:20 所示碱基序列的 DNA 等，

10 (III) 所述编码 A 链（小鼠型多肽，其中含有 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:25 所示碱基序列的 DNA 等，

(IV) 所述编码 A 链（猪型多肽，其中含有 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:48 所示碱基序列的 DNA 等，

(V) 所述编码 B 链（人型多肽，其中含有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:16 所示碱基序列的 DNA 等，

(VI) 所述编码 B 链（大鼠型多肽，其中含有 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:22 所示碱基序列的 DNA 等，

(VII) 所述编码 B 链（小鼠型多肽，其中含有 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:26 所示碱基序列的 DNA 等，

20 (VIII) 所述编码 B 链（猪型多肽，其中含有 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:50 所示碱基序列的 DNA 等，

(IX) 所述编码 2 条链多肽（人型）以及前体蛋白（人型多肽，其中含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:12 所示碱基序列的 DNA 等，

25 (X) 所述编码 2 条链多肽（大鼠型）以及前体蛋白（大鼠型多肽，其中含有 SEQ ID NO:17 或 51 所示的氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:18 或 52 所示碱基序列的 DNA 等，

(XI) 所述编码 2 条链多肽（小鼠型）以及前体蛋白（小鼠型多肽，其中含有 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列）的 DNA，其 DNA 包含 SEQ ID NO:24 所示碱基序列的 DNA 等，

30 (XII) 所述编码 2 条链多肽（猪型）以及前体蛋白（猪型多肽，其中

含有 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列)的 DNA,其 DNA 包含 SEQ ID NO:46 所示碱基序列的 DNA 等。

对完全编码本发明多肽的 DNA 进行克隆时,可以用含有本发明多肽之部分碱基序列的合成型 DNA 引物按公知的 PCR 进行扩增,或通过与编码
5 本发明多肽之部分或完整区的标记的 DNA 片段或合成 DNA 片段杂交来筛选已插入合适载体中的 DNA。杂交反应可以根据分子克隆第二版(J. Sambrook 等,冷泉港实验室出版社,1989)描述的方法进行。也可用商品化的文库根据所附说明书进行杂交。

DNA 碱基序列的转换可根据众所周知的方法如 ODA-LA PCR 法、
10 Gapped duplex 法或 Kunkel 法或其改进方法,使用 PCR 或众所周知的商品化试剂盒如 MutanTM-super express Km(宝酒造株式会社)、MutanTM-K(宝酒造株式会社)进行。

已经克隆的编码本发明多肽的 DNA,根据需要,或者单独使用或者经限制酶消化后或连接一接头之后使用。该 DNA 可能在其 5'端包含 ATG 作为
15 翻译起始密码子,而在其 3'端有 TAA、TGA 或 TAG 作为翻译终止密码子。这些翻译起始和终止密码子也可用合适的合成型 DNA 接头加上。

本发明多肽的表达载体可通过以下方法生产,例如,(a)从编码本发明多肽的 DNA 上切下所需 DNA 片段,(b)将该 DNA 片段连接到一合适载体上的启动子下游或者连接到适当编码保护肽的碱基序列的下游。

20 可以使用的载体包括来自大肠杆菌的质粒(例如,pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、来自枯草杆菌的质粒(例如,pUB110、pTP5、pC194)、来自酵母的质粒(例如,pSH19、pSH15)、噬菌体如 λ 噬菌体等、动物病毒如反转录病毒、痘苗病毒、杆状病毒等以及 pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo、pET-1、pET-2、pET-3、pET-4、pET-5、pET-11 等。

25 本发明所使用的启动子可以是任意启动子,只要它能同所用基因表达宿主匹配。在使用动物细胞作为宿主时,启动子有 SR α 启动子、SV40 启动子、LTR 启动子、CMV 启动子、HSV-TK 启动子、 β -肌动蛋白等。

在这些启动子中,优选 CMV(巨细胞病毒)启动子、SR α 启动子、 β -肌动蛋白等。如果宿主为大肠杆菌属的细菌,优选的启动子有 trp 启动子、lac
30 启动子、recA 启动子、 λ PL 启动子、lpp 启动子、T7 启动子等。在使用枯草杆菌属的细菌作宿主时,优选的启动子有 SPO1 启动子、SPO2 启动子、

penP 启动子等。在用酵母作宿主时, 优选的启动子有 PHO5 启动子、PGK 启动子、GAP 启动子、ADH 启动子等。在用昆虫细胞作宿主时, 优选的启动子有多角体蛋白启动子、P10 启动子等。

当使用 T7 启动子表达系时, 作为 T7 启动子可以使用 T7DNA 上的 17 种启动子(J. L. Oakley et al, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A, 74: 4266-4270(1979), J.J. Dunn 等, J. Mol. Biol., 166: 477-535(1983))中的任意一种, 但优选 $\phi 10$ 启动子(A. H. Rosenberg et al, Gene, 56: 125-135(1987))。

作为载体优选在上述载体中将 T7 启动子、T7 终止子重组而构建的载体, 如此所述的载体包括 pET-1、pET-2、pET-3、pET-4、pET-5、pET-11(A. H. Rosenberg, Gene, 56: 125-135(1987))。

除了前述的实例, 根据需要, 表达载体还可使用包含增强子、剪接信号、poly A 加尾信号、选择标记、SV40 复制起始子(下文通常简称为 SV40ori)等。选择标记的例子包括, 二氢叶酸还原酶(下文通常缩写为 dhfr)基因[甲氨喋呤(MTX)抗性]、氨苄西林抗性基因(下文通常缩写为 Amp^r)、新霉素抗性基因(下文通常缩写为 Neo^r, Geneticin 抗性)等。尤其是, 当 CHO(dhfr⁻)细胞缺少 dhfr 基因并用 dhfr 基因作为选择标记时, 使用无胸腺嘧啶脱氧核苷的培养基可以筛选重组型体细胞。

根据需要, 可在本发明多肽的 N-端加上同宿主匹配的信号序列。在用大肠杆菌属细菌作宿主时, 可以使用的信号序列为 Pho A 信号序列、OmpA 信号序列等; 当用枯草杆菌属的细菌作宿主时, 可以使用的信号序列为 α -淀粉酶信号序列、枯草杆菌蛋白酶信号序列等; 在用酵母作宿主时, 可以使用的信号序列为 MF α 信号序列、SUC2 信号序列等; 在用动物细胞作宿主时, 可以使用的信号序列为胰岛素信号序列、 α 干扰素信号序列、抗体分子信号序列等。

使用含有如此构建的编码本发明多肽的 DNA 序列的载体, 可获得转化体。

可以使用的宿主的实例有, 属于大肠杆菌属的细菌、属于枯草杆菌属的细菌、酵母、昆虫细胞、昆虫以及动物细胞等。

大肠杆菌属的细菌有, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)K12 DH1(美国国家科学院院刊, 60, 160(1968))、JM103(核酸研究, 9, 309(1981))、JA221(分子生物学杂志, 120, 517(1978))、HB101(分子生物学杂志, 41, 459(1969))、C600(遗传

学, 39, 440(1954))等。

当利用 T7 启动子表达系时, 作为其转化体的宿主包括整合有 T7 RNA 聚合酶基因 (F. W. Studier et al, J. Mol. Biol. 189: 113-130 (1986)) 的大肠杆菌, 例如 MM294、DH-1、C600、JM109、BL21 或者把 T7 RNA 聚合酶基因
5 因与其它质粒形成的重组型大肠杆菌等。优选使用把 T7 RNA 聚合酶基因重组到 λ 噬菌体经过溶原化 MM294 系、BL21 系以及 BL21 (DE3) 系等。此时, 作为 T7 RNA 聚合酶基因的启动子可以使用其表达被异丙基-1-硫基- β -D-吡喃半乳糖 (IPTG) 诱导的 lac 启动子。

枯草杆菌属的细菌有, 枯草杆菌 MI 114(基因, 24, 255(1983))、207-221(生
10 物化学杂志, 95, 87(1984))等。

酵母有, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AH22、AH22R⁻、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913、NCYC2036、巴斯德毕赤酵母(*pichia pastoris*)KM71 等。

就昆虫细胞而言, 病毒为 AcNPV 时有草地夜蛾幼虫 (*Spodoptera frugiperda*, Sf) 的细胞株、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 中肠的 MG1 细胞、粉纹
15 夜蛾卵的 High FiveTM 细胞、甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 的细胞、*Estigmena acrea* 的细胞等; 病毒为 BmNPV 时有家蚕 (*Bombyx mori*) 的 N 细胞 (BmN 细胞) 等。可用的 Sf 细胞有 Sf9 细胞 (ATCC CRL1711)、Sf21 细胞 (这两种细胞均由 Vaughn, J.L. et al. 在 In Vivo, 13, 213-217(1977) 中描述)。

20 作为昆虫的例子, 可以使用家蚕的幼虫 (前田等, 自然, 315, 592(1985))。

动物细胞包括猴 COS-7 细胞、Vero、中华仓鼠细胞 CHO (以下简称 CHO 细胞)、dhfr 基因缺陷的中华仓鼠细胞 CHO (以下简称 CHO(dhfr⁻) 细胞)、小鼠 L 细胞、小鼠 AtT-20 细胞、小鼠骨髓瘤细胞、大鼠 GH3、人 FL 细胞等。

大肠杆菌属的细菌可以根据美国国家科学院院刊, 69, 2110(1972) 或基因,
25 17, 107(1982) 中描述的方法进行转化。

枯草杆菌属的细菌可以根据分子及普通遗传学, 168, 111(1979) 中描述的方法进行转化。

酵母可以根据酶学方法, 194, 182-187(1991) 或美国国家科学院院刊, 75, 1929(1978) 中描述的方法进行转化。

30 昆虫细胞或昆虫可以根据生物/技术, 6, 47-55(1988) 中描述的方法进行转化。

动物细胞的转化可以根据《细胞工程学增订版 8, 细胞工程学实验最新技术》秀润出版社, 263-267(1995)或病毒学, 52, 456(1973)中描述的方法进行。

由此, 可以获得用含有本发明多肽之编码 DNA 的表达载体转化的转化体。

- 5 当培养宿主为大肠杆菌、枯草杆菌的转化体时, 用于培养的培养基为液体培养基, 该培养基含有转化体生长所必需的物质例如碳源、氮源、无机物等。碳源包括葡萄糖、糊精、可溶性淀粉、蔗糖等。氮源包括无机或有机物质如铵盐、硝酸盐、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白、酵母提取液、肉汁、黄豆饼粉、马铃薯抽提物等。无机物又包括氯化钙、磷酸二氢钠、氯化镁等。此外, 10 在培养基中也可加入酵母提取液、维生素、促生长因子等。培养基的 pH 值优选约 5-8。

- 用于培养大肠杆菌属细菌的培养基优选为, 加有葡萄糖和酪蛋白水解物的 M9 培养基(Miller, 分子遗传学实验杂志, 431-433, 冷泉港实验室, 纽约, 1972)。必要时可以在培养基中加入试剂如 3β -吲哚基丙烯酸, 来有效激活 15 启动子。

 当用大肠杆菌属的细菌作为转化宿主时, 转化体通常在大约 15-43℃培养约 3-24 小时。必要时培养物可以进行充气或搅拌。

 当用枯草杆菌属的细菌作为转化宿主时, 转化体通常在大约 30-40℃培养约 6-24 小时。必要时培养物可以进行充气或搅拌。

- 20 当用酵母作为宿主时, 转化体培养在, 例如 Burkholder 氏基本培养基(Bostian, K.L.等, 美国国家科学院院刊, 77, 4505(1980))或加了 0.5% 酪蛋白水解物的 SD 培养基(Bitter, G.A.等, 美国国家科学院院刊, 81, 5330(1984))上。优选培养基 pH 值调节到大约 5-8。转化体通常在大约 20-35℃培养约 24-72 小时。根据需要, 培养物可以进行充气或搅拌。

- 25 当用昆虫细胞或昆虫作为宿主时, 转化体培养在, 例如 Grace's 昆虫培养基(Grace, T.C.C., 自然, 195, 788(1962))上, 其中添加有固相化 10%牛血清等适当添加剂。优选培养基 pH 值调节到大约 6.2-6.4。转化体通常在大约 27℃培养大约 3-5 天。根据需要, 培养物可以进行充气或搅拌。

- 当用动物细胞作为宿主时, 转化体培养在, 例如含有大约 5-20%胎牛血清的 MEM 培养基(科学, 122, 501(1952))、DMEM 培养基(病毒学, 8, 30 396(1959))、RPMI 1640 培养基(美国医学会杂志, 199, 519(1967))、199 培养

基(Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950))等中。优选培养基 pH 值调节到大约 6-8。转化体通常在大约 30-40℃培养大约 15-60 小时。根据需要,培养物可以进行充气或搅拌。

如上所述,本发明的多肽可以产生在转化体的细胞内、细胞膜或细胞外。

5 可以根据下述方法从上述培养物中分离纯化本发明的多肽。

在培养后,用众所周知的方法收集转化体或细胞,悬浮在一合适的缓冲液中,从中抽提本发明的多肽。然后用众所周知的方法破碎转化体或细胞,如超声处理、溶菌酶处理和/或反复冻融等,然后离心、过滤,获得本发明多肽的粗提物。由重组物产生的多肽在菌体中形成包含体时,通过离心收集菌体后,通过超声等处理破碎菌体,把得到的包含体用变性剂(如 2-8M 盐酸胍、5-9M 尿素等)处理,通过溶化作用可以抽提多肽。当所述多肽分泌在培养液中时,在培养结束后,用众所周知的方法从转化体或细胞中经分离而收集上清。

15 上清或包含在所获抽提物中的多肽可通过将已知的分离和纯化方法适当组合来进行纯化。这些众所周知的分离纯化方法包括,利用溶解性差异的方法如盐析、溶剂沉淀等;主要利用分子量差异的方法如透析、超滤、凝胶过滤、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳等;利用电荷差异的方法如离子交换层析等;利用特异性亲和力差异的方法如亲和层析等;利用疏水性差异的方法例如反相高效液相色谱等;利用等电点差异的方法如等电聚焦电泳。

20 当如此获得的多肽为游离形式时,可用众所周知的方法或其改良法将其转换为盐。相反,当获得的多肽为盐时,可用众所周知的方法或其改良法将其转换为游离形式或另一种盐形式。

重组产生的多肽,在纯化前或纯化后,可用相应蛋白修饰酶或蛋白分解酶等处理,或者通过化学反应从而使多肽经适当修饰,部分除去一段多肽。25 其中所述酶的例子包括胰酶、胰凝乳蛋白酶、精氨酸内肽酶、激素原转变酶 1(PC1)、激素原转变酶 2(PC2)、羧肽酶 B、蛋白激酶、糖苷酶等。所述化学反应包括利用溴化氰(CNBr)而进行的切割反应等。

抽提的目标蛋白或分离纯化的目标蛋白根据需要可以进行蛋白质折叠。折叠的进行可根据[《蛋白质折叠》(R. H. Pain 编, 245-279 (1995)) Springer Verlag, 东京]所描述的公知方法或其类似方法实施。其实施可通过不含抽提30 试剂(如胍盐酸盐、尿素之类的促溶剂、n-月桂基甲基甘氨酸、SDS 之类的

表面活性剂等),或在含低浓度的抽提试剂的缓冲液中经过一次或多次稀释或者经过半透膜的透析,以及通过使用凝胶过滤的缓冲液置换等进行。此时,为了防止目标蛋白的凝集,可以添加精氨酸、聚乙烯乙二醇、中性表面活性剂等。为了使蛋白质形成二硫键,可以进行空气氧化,或者添加氧化还原缓冲液等。在氧化还原缓冲液中有,以谷胱甘肽、半胱氨酸、二硫苏糖醇、2-巯基乙醇或半胱胺为主的缓冲液。

当分别产生了本发明多肽,即 A 链以及 B 链时,可以用二硫键使之结合。例如分别把编码 A 链和 B 链的 DNA 片段连接于 lacZ (β -半乳糖苷酶)基因,用大肠杆菌作宿主制备 β -半乳糖苷酶+A 链、 β -半乳糖苷酶+B 链形成的结合蛋白,然后用溴化氰或酶处理将 A 链和 B 链从结合蛋白上切割下来。被切割的 A 链和 B 链在还原状态下进行混合,逐渐使之氧化可被转换为一种 A 链和 B 链通过二硫键连接的蛋白质。优选 A 链和 B 链的连接状态为,例如 A 链的 Cys11 和 B 链的 Cys10 形成二硫键,并且 A 链的 Cys24 和 B 链的 Cys22 形成二硫键,而且 A 链的 Cys10 和 A 链的 Cys15 形成二硫键。此时的转换条件可以按照,如胰岛素分子的制备方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 卷, 106 (1979)]进行。

由此产生的本发明多肽或它们的盐的存在与否,可通过利用特异性抗体的酶免疫分析法或蛋白质印迹法等进行测定。

针对本发明的多肽、其酰胺或其酯或其盐(以下,有时简称为本发明的多肽)的抗体,只要所述抗体能够识别本发明多肽,多克隆抗体或单克隆抗体均可。

针对本发明多肽的抗体可使用本发明多肽作为抗原,根据本领域公知的抗体或抗血清的制备方法进行制备。

[单克隆抗体的制备]

25 (a) 产生单克隆抗体细胞的制备

将本发明的多肽,单独或与载体或稀释剂一起给药于温血动物体内能产生抗体的部位。为了增加给药后抗体的产量,可给予福氏完全或不完全佐剂。有效给药通常为每 2-6 周一次,一共 2-10 次。使用的温血动物包括猴子、兔子、狗、豚鼠、小鼠、大鼠、绵羊、山羊、家鸡,优选小鼠和大鼠。

30 在制备产生单克隆抗体细胞时,从抗原免疫的温血动物如小鼠中选择抗体滴度比较明显的动物,在最后一次免疫的 2-5 天后取脾脏或淋巴结,使其

中产生抗体的细胞与同种或异种动物的骨髓瘤细胞融合, 获得产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。抗血清中抗体滴度的测定可以通过使抗血清与标记的随后所述的多肽反应, 然后测定标记试剂同抗体的结合活性。可以根据 Koehler 和 Milstein(自然, 256, 495, 1975)的方法进行融合。融合加速剂的例子为聚乙二醇(PEG)、仙台病毒等, 优选 PEG。

温血动物骨髓瘤细胞的例子包括 NS-1、P3U1、SP2/0 和 AP-1 等, 其中优选 P3U1。所用抗体产生细胞(脾脏细胞)同骨髓瘤细胞的比例优选约为 1: 1 到 20: 1, 加入浓度约为 10%-80%的 PEG(优选 PEG 1000-6000)。然后在 20-40℃保温。为了有效实施细胞融合, 优选 30-37℃保温约 1-10 分钟。

- 10 可以用各种方法筛选产生单克隆抗体的杂交瘤。所述这些方法可举例为: 将作为抗原的多肽直接或与载体一起吸附至一种固相(如微量反应板), 将杂交瘤上清加入到该固相中, 然后加入标记的放射性物质或酶的抗免疫球蛋白抗体(如果用小鼠细胞作融合, 则用抗小鼠的免疫球蛋白抗体)或蛋白 A, 检测结合到固相上的单克隆抗体; 另一方法为, 将杂交瘤上清加入到
- 15 附有抗免疫球蛋白抗体或蛋白 A 的固相中, 加入标记的放射性物质或酶的多肽, 检测结合到固相上的单克隆抗体。

- 单克隆抗体的筛选可以根据众所周知的方法或其改进方法进行。一般地, 在含有 HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶)的动物细胞培养基中进行筛选。可以使用任何筛选和生长培养基, 只要杂交瘤可以在其中生长。例如,
- 20 可以使用含有 1%-20%, 优选 10-20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基、含有 1%-10%胎牛血清的 GIT 培养基(和光纯药工业株式会社)、或者无血清的杂交瘤培养基(SFM-101, 日水制药株式会社)作为筛选或生长培养基。通常在含 5%CO₂ 的条件下于 20-40℃(优选 37℃)培养约 5 天-3 周(优选 1-2 周)。杂交瘤培养上清液中抗体滴度的测定同上述抗血清中抗体滴度测定方法相同。

- 25 (b)单克隆抗体的纯化

- 单克隆抗体的分离和纯化可根据公知方法, 例如免疫球蛋白的分离和纯化方法(如盐析、乙醇沉淀、等电点沉淀、电泳、离子交换剂(如 DEAE)吸附和去吸附、超离心、凝胶过滤、或一种特异性纯化方法, 其包括仅收集与结合了抗原的固相、蛋白 A 或蛋白 G 等已活化吸附剂相结合的抗体并使之分
- 30 离以获得该抗体)。

[多克隆抗体的制备]

本发明多克隆抗体的制备用众所周知的方法或其改进方法进行。例如，用与上述生产单克隆抗体相似的方法生产免疫原(多肽抗原)或配制免疫原与载体蛋白形成的复合物并用其免疫温血动物。从已免疫的动物中收集产物，其中含有本发明多肽的抗体，分离和纯化该抗体。

5 在由免疫原和载体蛋白组成的用于免疫温血动物的复合物中，对载体蛋白的类型和载体同半抗原的混合比率无限定，只要能针对与载体一起交联而免疫的半抗原有效产生抗体。例如，牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或匙孔螺血蓝蛋白与半抗原以载体比半抗原重量比约 0.1-20，优选约 1-5 的比率偶联。

10 不同的缩合剂可用于偶联载体和半抗原。戊二醛、碳二亚胺、马来酰亚胺活化的酯和含有巯基或二硫代吡啶基活化的酯试剂可用于偶联。

将缩合产物单独或与载体或稀释剂一起给药于温血动物体内能产生抗体的部位。为了增加给药后抗体的产量，可给予福氏完全或不完全佐剂。大约每 2-6 周给药一次，共 3-10 次。

15 多克隆抗体从用上述方法免疫的温血动物的血液、腹水等(优选血液)中收集。

抗血清中多克隆抗体滴度的测定同上述测定血清抗体滴度的方法相同。可以根据上述用于分离和纯化单克隆抗体的免疫球蛋白分离纯化方法来分离和纯化多克隆抗体。

20 另外，利用本发明多肽也可以按照 Nat. Biotechnol, 14, 845-851. (1996); Nat Genet. 15, 146-156. (1997); PNAS, 97 (2), 722-727 (2000) 等描述的方法制备人的抗体。

具有与编码本发明多肽的 DNA (下文，有时称作本发明 DNA) 互补或基本互补的碱基序列的反义 DNA 可为任一种反义 DNA，只要其含有与本发明 DNA 互补或基本互补的碱基序列，并能抑制该 DNA 的表达。

25 与本发明 DNA 基本互补的碱基序列，包括具有与互补于本发明 DNA 之碱基序列(即本发明 DNA 互补链)的全部或部分碱基序列至少约 70%，优选至少约 80%，更优选至少约 90%，最优选至少约 95% 同源性的 DNA。尤其是在本发明 DNA 互补链的全部碱基序列中，优选反义 DNA 具有与编码本发明多肽上 N-末端区的部分碱基序列(如起始密码子附近的碱基序列等)的互补链至少约 70% 同源性，优选至少约 80% 同源性，更优选至少约 90%，

30

最优选至少约 95%。这些反义 DNA 可以使用公知的 DNA 合成装置生产合成。

当本发明多肽包含信号肽时，它能有效地分泌到细胞外，并作为一种液体因子发挥着重要生物活性的作用，如生物机体的调节等。

5 下面阐述：本发明多肽；本发明 DNA；针对本发明多肽或其盐的抗体(以下通常简称为本发明抗体)以及反义 DNA 的用途。

(1)由于本发明多肽在组织中能够进行特异性表达，所以可将其用作组织标记。也就是说，它作为一种标记可来检测组织的分化、病变、癌转移等。也可用来提取相应的受体、结合多肽等。另外，它作为本领域公知的用于高
10 产量筛选的组群，可用来研究生物活性。

(2)与本发明多肽相关的各种疾病的预防药物与治疗药物

因为本发明多肽它是以液体因子形式存在于生物体内，如后面将要叙述的实施例中所描述的那样，它具有促进 MMP-1（间质金属蛋白酶-1）或者 VEGF（血管内皮细胞增殖因子）的表达作用，因此当本发明多肽，或本发
15 明 DNA 等发生异常或缺陷，或者当表达水平异常减少或亢进时，将导致各种疾病的发生。如碳水化合物等能源代谢调节（糖代谢、脂质代谢等）紊乱（如糖尿病、肥胖症等）、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常（如硬皮症等）、组织的纤维变性（如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等）、循环系统障碍（外周动脉疾病、心肌梗塞或
20 心功不全等）、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病（如过敏、炎症、自体免疫性疾病等）、血管再生障碍疾病等。因此本发明多肽以及本发明的 DNA 可以用作预防或治疗如下疾病的药物。所述疾病包括：碳水化合物等能源代谢调节（糖代谢、脂质代谢等）紊乱（如糖尿病、肥胖症等）、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组
25 织的形成异常（如硬皮症等）、组织的纤维变性（如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等）、循环系统障碍（外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等）、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病（如过敏、炎症、自体免疫性疾病等）、血管再生障碍疾病等。

还有，为了与其他胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族多肽形成一个
30 家族，本发明多肽当其他家族多肽或其 DNA 等产生异常或缺陷时，或者其表达水平异常减少或产生亢进时，可以通过与其他家族的互补作用，进一步

在表达水平没有发现异常时,可以通过本发明多肽独特的药理作用可作为治疗或预防各种疾病的药物等,所述疾病包括:碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性
5 性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等。

如上所述,本发明多肽进一步优选由1组A链内二硫键和2组A链和
10 B链之间二硫键而形成,但可允许2组二硫键的A链单独或具有1组的二硫键的B链单独的分子种存在。后者的A链或B链单独的分子种也可用作治疗或预防各种疾病的药物,所述疾病包括:代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺
15 纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等。

例如,当生物体内本发明多肽很少或缺失时,当患者不能使其细胞内信息传递充分或正常地发挥作用时,本发明DNA可以通过以下3种方式充分地或正常地为该患者提供本发明多肽的作用:(a)给予该患者本发明DNA,以便在体内表达本发明多肽;(b)将本发明DNA插入细胞中,表达本发明多肽之后,通过将该细胞转移给该患者或(c)直接将本发明多肽投药于该患者体内。

25 当本发明DNA用作上述预防或治疗药物时,该DNA本身可单独使用,或插入合适载体如反转录病毒载体、腺病毒载体或腺伴随病毒载体后按常规方法给药于人或其它温血动物。本发明DNA也可以以裸露DNA的形式给药,或与生理学上承认的用于促进吸收的辅助剂等的载体一起制成药剂并给药以便于其被基因枪摄入或通过含有水凝胶的导管。

30 当本发明多肽用作所述治疗或预防药物时,优选所用纯度至少90%,优选95%以上,更优选98%以上,最优选99%以上。例如,本发明的多肽可以

- 以片剂(必要时加糖衣)、胶囊、酏剂、微胶囊等剂型口服,或以可注射型制剂如,与水或其它可药用液体形成的无菌溶液或悬浮制剂经非胃肠道给药。例如,将本发明的多肽与生理学上可接受的已知载体、调味剂、赋形剂、载色剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂等制成符合制药规定的要求的常用单位剂型。
- 5 控制制剂中的活性成分使得在给定范围内获得合适剂量。可与片剂、胶囊等混合的添加剂包括,粘和剂如明胶、玉米淀粉、西黄耆胶、金合欢胶等;赋形剂如结晶纤维素;膨胀剂如玉米淀粉、明胶和藻酸;润滑剂如硬脂酸镁;甜味剂如蔗糖、乳糖和糖精;调味剂如薄荷、akamono oil 或樱桃。当单位剂型为胶囊形式时,可进一步将液体载体如油和脂肪同上述添加剂一起使用。
- 10 可根据常规制药方法制备注射用无菌组合物,例如将活性成分与天然植物油如芝麻油和椰子油等溶解或悬浮在载体,如注射用的水中来制备药物。用于注射的液体介质的例子包括,生理盐水、及包含葡萄糖和其它辅助制剂(如D-山梨醇、D-甘露醇和氯化钠等)的等渗溶液,并可以进一步同合适的助溶剂如醇(如乙醇等)、聚醇(如丙二醇和聚乙二醇等)、非离子表面活性剂(如聚山梨酸酯 80TM 和 HCO-50 等)等结合使用。油性介质有橄榄油、芝麻油、大豆油、花生油、棉籽油、玉米油等植物油、丙二醇等,它们可与助溶剂如苯甲酸苄酯和苯甲醇结合使用。此外,上述的治疗或预防制剂可进一步与缓冲液(例如磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液等)、镇静剂(例如苯扎氯胺和盐酸普鲁卡因等)、稳定剂(如人血清白蛋白、聚乙二醇等)、防腐剂(例如苯甲醇、酚等)、抗氧化剂等结合使用。由此制备的注射液体一般装在合适的安瓿中。
- 20

本发明 DNA 所插入的载体用与上述类似的方法制成制剂,这类制剂通常经非胃肠道途径给药。如此所获制剂安全、低毒,因此可用于温血动物(例如,人、大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、鸟、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴等)。

- 本发明多肽的剂量依赖于病症、受试者和给药方法等而异;例如口服给药
- 25 本发明多肽治疗代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如
- 30 过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等时,一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.01-1000mg/天,优选大约 1-1000mg/天,更优选

10-500mg/天,再优选 10-200mg/天。当非胃肠道给药时,该多肽一次投药量依赖于给药受体、症状等而变,例如在治疗代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等时,成年人(体重 60kg)优选活性成分静脉注射患部或周身,其注射剂量为大约 0.001-500mg/天,优选大约 0.01-500mg/天,更优选大约 0.1-200mg/天,再优选大约 0.1-100mg/天。对于其它动物种类,可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

(2)筛选可作为疾病治疗药物的候选化合物

由于本发明多肽是以液体因子形式存在于生物体内,因此具有促进本发明多肽功能(活性)的化合物或其盐可作为以下各种疾病的治疗或预防药物而使用:例如碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等。

另一方面,具有抑制本发明多肽功能(活性)的化合物或其盐可作为治疗或预防起因于本发明多肽过量产生导致疾病的药物。

因此,本发明多肽可作为一种试剂,用于筛选具有促进或抑制本发明多肽功能(活性)的化合物或其盐。

25 即,本发明提供

(1)一种筛选方法,其用于筛选具有促进本发明多肽或其盐的功能(活性)的化合物或其盐(下文通常简称为促进剂),或者其用于筛选具有抑制本发明多肽或其盐的功能(活性)的化合物(下文通常简称为抑制剂),其特征为,该筛选法包括应用本发明多肽或其盐。

30 本发明筛选用试剂盒包含本发明多肽或其盐。

所述以包括应用本发明多肽为特征的、筛选具有促进或抑制本发明多肽

或其盐的功能（活性）的化合物或其盐的方法，具体地说，包括如下筛选方法：使本发明多肽与组织、细胞或它们的膜级分之间的结合特性改变的化合物（促进或抑制本发明多肽活性的化合物）或其盐的方法，该方法特征为：

- 5 (i)使本发明多肽与由本发明多肽所结合的组织、细胞或它们的膜级分接触时和(ii)使本发明多肽以及待测化合物与由本发明多肽结合的组织、细胞或它们的膜级分接触时进行比较。

在本发明的筛选方法中，在上述所说的(i)使本发明多肽与由本发明多肽所结合的组织、细胞或它们的膜级分接触的时候和(ii)使本发明多肽以及待测化合物与由本发明多肽所结合的组织、细胞或它们的膜级分接触的时候测定并比较配体与由本发明多肽所结合的组织、细胞或它们的膜级分结
10 合的结合量、细胞的刺激活性、组织的反应性等。

更具体地说，本发明的筛选方法为：

- ①一种筛选本发明多肽和由本发明多肽所结合的组织、细胞或它们的膜级分之间的结合特性改变的化合物（促进或抑制本发明多肽活性的化合物）或其盐的方法，该方法特征为：(i)使标记的本发明多肽与由本发明多肽所结合的组织、细胞或它们的膜级分接触时和(ii)使标记的本发明多肽以及待测化合物与由本发明多肽结合的组织、细胞或它们的膜级分接触的时候，测定并比较标记的本发明多肽与由本发明多肽所结合的组织、细胞或它们的膜级分的结合量；
15

- 20 ②一种筛选本发明多肽和针对本发明多肽受体之间特性改变的化合物（促进或抑制本发明多肽活性的化合物）或其盐的方法，该方法特征为：使标记的本发明多肽与含有本发明多肽受体的细胞或该细胞膜级接触时和，使标记的本发明多肽以及待测化合物与含有本发明多肽受体的细胞或该细胞膜级接触时测定并比较标记的本发明多肽针对该细胞或该膜级分的结合量；

- 25 ③一种筛选本发明多肽和针对本发明多肽受体之间特性改变的化合物（促进或抑制本发明多肽活性的化合物）或其盐的方法，该方法特征为：使标记的本发明多肽与通过培养含有编码本发明多肽受体 DNA 的转化体并在细胞膜上表达的、针对本发明多肽受体接触的时候和，使标记的本发明多肽以及待测化合物与通过培养含有编码本发明多肽受体 DNA 的转化体并在细胞膜上表达的、针对本发明多肽受体接触的时候，测定并比较标记的本发明多肽针对本发明多肽受体结合的结合量；
30

④一种筛选本发明多肽和针对本发明多肽受体之间特性改变的化合物（促进或抑制本发明多肽活性的化合物）或其盐的方法，该方法特征为：使
5 明多肽受体的细胞接触的时候，测定并比较通过本发明多肽受体介导的细胞
刺激活性（如促进或抑制以下各种活性包括花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、
细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、
细胞膜电位变化、细胞内蛋白磷酸化、c-fos 的激活、细胞外液 pH 的降
低、NO 产生、该细胞特有形成的生理活性物质的产生等）以及；

10 ⑤一种筛选本发明多肽和针对本发明多肽受体之间特性改变的化合物
（促进或抑制本发明多肽活性的化合物）或其盐的方法，该方法特征为：使
激活本发明多肽受体的化合物（如本发明多肽）与通过培养含有编码本发明
多肽受体 DNA 的转化体并在细胞膜上表达的、针对本发明多肽受体接触的
时候和，使激活本发明多肽受体的化合物及待测化合物与通过培养含有编码
15 本发明多肽受体 DNA 的转化体并在细胞膜上表达的、针对本发明多肽受体
接触的时候，测定并比较通过本发明多肽受体介导的细胞刺激活性（如促进
或抑制以下各种活性包括花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释
放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位
变化、细胞内蛋白磷酸化、c-fos 的激活、细胞外液 pH 的降低、NO 产生、
20 该细胞特有形成的生理活性物质的产生等）。

⑥编码本发明多肽受体的 DNA 可以通过以下方法获得。将本发明多肽
用 ^{125}I 等放射性同位素或荧光素等的荧光物质或生物素等标记，检测由该标
记物特异性结合的细胞系、组织、器官等。下面用公知方法从所述的细胞、
组织和器官中提取 mRNA 合成 cDNA，然后克隆于用于动物细胞的表达载体
25 上。再将其转入到 COS7 细胞中，在该转化体细胞中上面所述的标记物是否
结合作为指标，进而可以筛选出由编码本发明多肽受体的 DNA 重组的转换
体细胞（表达克隆）。

⑦另外，制备一种混和引物，该引物具有与胰岛素受体家族结构相同特
征（如酪氨酸酶结构域等的氨基酸序列），通过进行 RT-PCR 可以获得属于
30 胰岛素受体家族新的受体 cDNA 片断。然后将得到的 DNA 序列以此为模板
进行 5' -RACE 和 3' -RACE PCR 反应，获得全长的 cDNA。再将其导入上

述的用于动物细胞表达的载体，在适当的动物培养细胞中如 CHO 细胞或 COS7 细胞等进行表达，通过确认本发明多肽的特异性结合，可以证实其为编码本发明多肽受体的 DNA。

以下更具体地说明本发明的筛选方法：

- 5 首先，应用于本发明筛选方法的本发明多肽结合的组织、细胞或它们的膜级分等，也就是说，作为本发明多肽的受体，只要其能特异性与本发明多肽结合的均可，但优选人、温血动物的脏器、培养细胞或它们的膜级分等。但是使用来源于人的脏器是非常困难的事情，所以人的重组体就适合用大量表达的人体重组受体等。

- 10 利用所述本发明多肽的制造方法等以制备本发明多肽的受体。

在本发明的筛选方法中，当使用含有本发明多肽受体的细胞或该细胞膜级分等时，可以按照后面阐述的制备方法进行。

当使用含有本发明多肽受体的细胞时，可以使用戊二醛或福尔马林等固定。其固定方法可以按照本领域公知的方法进行。

- 15 所述含有本发明多肽受体的细胞是指，已经表达本发明多肽受体的细胞系，它们可以是以大肠杆菌、枯草杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等作为宿主细胞的转化体细胞。所述获取已经表达本发明多肽受体细胞的方法，包括同前面所述的用本发明多肽表达载体转化形成的转化体的制造方法相同。

- 20 所述膜级分是指，用众所周知的方法破裂细胞并进行分级分离而制备的含有大量细胞膜的级分。细胞破裂的有效方法包括用 Potter-Elvehjem 匀浆器挤压、用 Waring blender 或 Polytron(Kinematica)破裂、超声破裂、用 French press 等加压使细胞通过细嘴喷射而破裂。细胞膜组分分离主要通过离心力来实现，如分级离心和密度梯度离心。例如，细胞破碎液在低速(500-3000rpm)离心一段时间(通常为 1-10 分钟)，得到的上清在高速(15000-30000rpm)通常
25 离心 0.5-2 小时。由此获得的沉淀部分用作细胞膜级分。细胞膜级分富含表达的本发明多肽的受体蛋白以及膜成分如细胞来源的磷脂或膜蛋白。

- 30 在含有本发明多肽受体的细胞和细胞膜级分中，其受体含量优选 10^3 - 10^8 分子/细胞，更优选 10^5 - 10^7 分子/细胞。随着表达量的增加，单位细胞膜级分的配体结合活性(比活)增加，因而不但可以构建高敏感筛选体系，而且可以大量地测定同一批的样品。

为了实施前面所述的方法①-③来筛选具有改变本发明多肽和本发明多

肽受体之间的结合特性的化合物（促进或抑制本发明多肽活性的化合物），使用适当的本发明多肽受体级分和标记的本发明多肽等。所述本发明多肽受体级分优选本发明多肽的天然组织或细胞受体级分或者与其具有等同活性的重组型受体级分等。此处术语“等同活性”是指在配体结合活性同天然受体蛋白所拥有的活性同等，所述标记的配体可以使用标记的本发明多肽等。例如可以利用 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ 荧光色素、生物素、 β -半乳糖苷酶或过氧化物酶等标记的本发明多肽。

更具体地，为了筛选具有改变本发明多肽和本发明多肽受体之间的结合特性的化合物，首先，将含有本发明多肽受体的细胞或其膜级分悬浮于本方法的相应的缓冲液中，制备标准受体制剂。可以使用任何缓冲液，只要它不干扰配体-受体结合。此类缓冲液包括 pH 值约 4-10（优选 6-8）的磷酸盐缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。为了降低非特异结合，可任选在缓冲液中加入表面活性剂如 CHAPS、Tween-80TM (Kao-Atlas)、毛地黄皂甘、脱氧胆酸等。为了抑制蛋白酶对受体或配体的降解，可加入蛋白酶抑制剂如 PMSF、亮抑蛋白酶肽、E-64 (Peptide Institute)、抑肽素等。将一定量(5000-500000cpm)的经过标记的本发明多肽加入到 0.01-10ml 的受体溶液中，同时允许含有 10^{-10} — 10^{-6}M 的待测化合物。为了测定非特异性结合(NSB)，需提供一个含有过量未标记的本发明多肽的反应管。在约 0-50℃ (优选 4-37℃) 反应 20 分钟-24 小时(优选 30 分钟-3 小时)。在反应完成后，反应混合物用玻璃纤维滤纸等过滤，用适量的相同缓冲液洗涤。然后用液闪仪或 γ -计数器测定在玻璃纤维滤纸中的残留放射活性。当不存在拮抗物时的数值(B_0)中减去非特异结合值(NSB)而得到数值(B_0 -NSB)再乘以 100%，此时可以选择特异的结合量(B -NSB)，例如低于 50%待测化合物作为具有拮抗抑制能力的候选物质。

为了实施前面所述的方法④-⑤来筛选具有改变本发明多肽和本发明多肽受体之间的结合特性的化合物（促进或抑制本发明多肽活性的化合物），可以使用公知方法或市售的测定用试剂盒测定通过本发明多肽受体介导的细胞刺激活性（如促进或抑制以下各种活性包括花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白磷酸化、c-fos 的激活、细胞外液 pH 的降低、NO 产生、该细胞特有形成的生理活性物质的产生等）。更具体地，首先在多孔平板上培养含有本发明多肽受体的细胞等。当进行筛选之前，

用新鲜培养基或合适的非细胞毒性缓冲液替换培养基，然后添加待测化合物等保温一段时间。然后提取细胞或回收上清液，对得到的产物用适当方法定量。很难检测细胞刺激活性的指示物质(例如花生四烯酸)的产生，因为细胞中存在降解酶，故在分析前可加入该降解酶的抑制剂。检测 cAMP 产生的抑制等活性时，细胞中基础生产水平可通过毛喉素等提高，因此可检测对提高的基础生产的抑制效应。另外，对于细胞外液的 pH 降低来说，使用微量分析仪 (Cytosensor™) 测定其酸性率的变化。

测定细胞刺激活性而进行筛选时，需要的细胞是已经适当表达了本发明多肽受体。所述表达了本发明多肽受体的细胞优选天然细胞系或前面所述的本发明多肽受体表达细胞系等。

所述待测化合物包括，例如肽、蛋白、非肽化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取液、植物提取液、动物组织提取液等。

用于筛选具有使本发明多肽和本发明多肽受体之间的结合特性发生改变的化合物(促进或抑制本发明多肽活性的化合物)或其盐的试剂盒，包含本发明多肽以及本发明多肽所结合的对象(即本发明多肽受体、含有本发明多肽受体的细胞、或者含有本发明多肽受体的细胞膜级分等)。

通过使用本发明筛选法或筛选用试剂盒获得的化合物或其盐是一种具有使本发明多肽和本发明多肽受体之间的结合特性发生改变(促进或抑制结合)的化合物(促进或抑制本发明多肽活性的化合物)，具体地说，所述通过本发明多肽受体介导具有细胞刺激活性的化合物或其盐(所说的本发明多肽受体的激动剂)、或者是不具细胞刺激活性的化合物(所说的本发明多肽受体的拮抗剂)。所述该化合物例如肽、蛋白、非肽化合物、合成化合物、发酵产物等，它们即可以是新的化合物也可以是已知的化合物。

评价所述本发明多肽受体的激动剂或本发明多肽受体的拮抗剂具体地按照如下的(i)和(ii)进行。

(i)当得到一种具有使本发明多肽和本发明多肽受体之间的结合特性发生改变(尤其是抑制结合)的化合物之后，测定该化合物是否通过本发明多肽受体介导并具有细胞刺激活性。具有细胞刺激活性的化合物或其盐可以说是本发明多肽受体的激动剂，不具有细胞刺激活性的化合物或其盐可以说是本发明多肽受体的拮抗剂。

(ii)(a)使含有本发明多肽受体的细胞与待测化合物接触，测定本发明多

肽受体介导的细胞刺激活性。具有细胞刺激活性的化合物或其盐可以说是本发明多肽受体的激动剂。

- (b) 当使活化本发明多肽受体的化合物与含有本发明多肽受体的细胞(如针对本发明多肽或本发明多肽受体的激动剂)接触的时候,和当使活化
5 本发明多肽受体的化合物及待测化合物与含有本发明多肽受体的细胞接触的时候,测定并比较本发明多肽受体介导的细胞刺激活性。能够降低细胞刺激活性的化合物或其盐可以说是本发明多肽受体的拮抗剂,该活性的降低是由于激活本发明多肽受体的化合物的存在。

- 本发明多肽受体激动剂与针对本发明多肽受体的多肽所具有的生理活
10 性具有同样的作用,因此本发明多肽受体激动剂与本发明多肽一样低毒安全适用于医药。

反之,本发明多肽受体拮抗剂能够抑制针对本发明多肽受体的本发明多肽所具有的生理活性,因此本发明多肽过剩的时候,它可以抑制这种活性,进而低毒安全适用于医药。

- 15 通过本发明筛选法或筛选用试剂盒获得的化合物或其盐是从,例如肽、蛋白、非肽化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取液、植物提取液、动物组织提取液、血浆等筛选出来的化合物,它是一种具有促进或抑制本发明多肽功能的化合物。

所述该化合物之盐同上述本发明多肽所使用的盐相同。

- 20 当将通过使用本发明筛选法或筛选用试剂盒获得的化合物用作上述治疗或预防药物时,可以按照常规方法进行实施。例如,含有本发明多肽的药物可以制成片剂、胶囊、酏剂、微胶囊、无菌溶液、悬浮液剂型等。

如此所获制剂安全、低毒,因此可对温血动物(例如,人、大鼠、小鼠、兔子、绵羊、猪、牛、马、鸟、猫、狗、猴等)给药。

- 25 所述化合物或其盐的剂量依赖于该化合物的作用、病症、受试者和给药方法等而异;例如当以代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、
30 动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等为治疗目的口

服给药能够促进本发明多肽之机能的化合物时,一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.01-1000mg/天,优选大约 0.1-1000mg/天,更优选 1.0-200mg/天,最优选 1.0-50mg/天。当非胃肠道给药时,该化合物一次投药量依赖于给药受体、症状等而变,例如在给药能够促进治疗代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等之机能的化合物时,成年人(体重 60kg)优选静脉注射,剂量为大约 0.01-30mg/天,优选大约 0.1-20mg/天,更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类,可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

另一方面,当口服给药能够抑制本发明多肽之机能的化合物时,一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.1-1000mg/天,优选大约 0.1-1000mg/天,更优选 1.0-200mg/天,最优选 1.0-50mg/天。当非胃肠道给药时,该化合物一次投药量依赖于给药受体、症状等而变,例如在给药能够抑制本发明多肽之机能的化合物时,成年人(体重 60kg)优选静脉注射,剂量为大约 0.01-30mg/天,优选大约 0.1-20mg/天,更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类,可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

20 (3)本发明多肽或其盐的定量

针对本发明多肽的抗体(下文通常简称为本发明抗体)能特异性识别本发明的多肽,因此可用于定量测试样品溶液中的本发明多肽,尤其是通过夹心免疫分析进行定量。因此,本发明提供了下述的定量方法:

25 (i)一种定量待测样品液中本发明多肽的方法,其包括,使本发明的抗体与待测样品液以及标记的本发明多肽进行竞争反应,测定与该抗体结合的本发明标记性多肽的比率;和,

(ii) 一种定量待测样品液中本发明多肽的方法,其包括,同时或先后使所述待测样品液与固定在固相载体上的本发明抗体以及标记的本发明其它抗体反应,测定固相载体上标记试剂的活性。

又,除了使用本发明多肽的单克隆抗体(下文,通常称作本发明单克隆抗体)定量本发明多肽之外,也可通过组织染色来检测本发明多肽。为此,可用抗体本身或使用抗体分子的F(ab')₂、Fab'或Fab片段。

对利用本发明抗体进行本发明多肽的定量方法没有特别的限制;可以使用任何方法,只要它涉及以下方法,即根据待测样品液中相应抗原含量(例如多肽的量),用化学或物理方法检测抗体、抗原或抗体-抗原复合物的量,然后根据含已知量抗原的标准溶液制备的标准曲线来计算。优选的方法为,例如比浊法、竞争法、免疫测定法和夹心法;就敏感性和特异性而言,特别优选后面将要描述的夹心法。

10 用于分析方法的标记试剂的例子为放射性同位素、酶、荧光物质和化学发光物质等。同位素的例子包括[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]等。优选酶的例子为稳定、具有高比活的酶,包括β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、苹果酸脱氢酶等。荧光物质的例子包括荧光胺、异硫氰酸荧光素等。化学发光物质的例子包括鲁米诺、鲁米诺衍生物、萤光素、光泽精等。此外,也可使用生物素-链霉素系统来对抗原或抗体标记。

在固定抗原或抗体时,可以使用物理吸附。作为替代方法,也使用传统上来固定多肽或酶的化学结合。载体的例子包括,固相多糖如琼脂糖、葡聚糖、纤维素等;合成树脂如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、硅;或玻璃等。

在夹心法中,待测样品溶液与本发明的固定化单克隆抗体反应(第一反
20 应),然后与本发明的标记的其它单克隆抗体反应(第二反应),测定固相载体上的标记试剂活性,由此可以测定待测样品中本发明多肽的量。第一和第二反应可以以相反次序进行,或同时或有间隔的先后进行。标记试剂的类型和固定的方法同上述的相同。在夹心法免疫分析中,用于标记的抗体和用于固相的抗体未必是一个种类的抗体,也可使用两种或多种抗体的混合物来改善
25 测定的灵敏度等。

在根据本发明的夹心方法测定本发明多肽时,优选用于第一和第二反应的单克隆抗体与本发明多肽的结合位点彼此不同。也就是说,在第一和第二反应用的抗体为,当第二反应的抗体识别本发明多肽的C端区域时,优选在第一反应中使用能识别除C端区域以外的位点,如N端区域的抗体。

30 本发明的单克隆抗体可用于除夹心法以外的其它分析方法,例如竞争法、免疫测定法、比浊法等。

在竞争法中，待测溶液中的抗原和标记抗原竞争与抗体反应，然后将未反应的标记抗原(F)及结合于抗体的标记抗原(B)分离(即 B/F 分离)，测定 B 或 F 的标记量，从而可以测定待测溶液中的抗原量。在此类方法的反应中，有一种液相方法和一种固相方法，前者使用可溶性抗体，加入针对第一抗体的第二抗体后，用聚乙二醇来有效分离 B/F；后者可用固定的抗体作为第一抗体，或用可溶性抗体作为第一抗体但第二抗体为固相抗体。

在免疫测定法中，待测溶液中的抗原和固相抗原竞争性地与一定量的标记抗体反应，然后使液相与固相分离；或待测溶液中的抗原与过量标记抗体反应，然后加入固相抗原，使未反应的标记抗体与该固相结合，然后使液相与固相分离。随后，测定两相的标记量，来测定待测溶液中的抗原量。

在比浊法中，测定抗原-抗体在凝胶或溶液中反应产生的固相沉淀的量。即使待测溶液中抗原量很少且仅获得小量的沉淀，利用激光散射的激光比浊法也可以实施。

本发明应用这些免疫分析方法中任何一个进行分析时，不需要任何特殊条件和操作。除了每种方法的常规条件和操作外，本领域技术人员可构建测定本发明多肽的分析系统。

所述常规技术的细节，参见如入江宽(编)：“放射免疫分析”(1974，讲谈社，日本)；入江宽(编)：“放射免疫分析，续编”(1979，讲谈社，日本)；石川荣治等(编)：“酶免疫分析”(医学书院，1978)；石川荣治等(编)：“酶免疫分析，第二版”(医学书院，1982)；石川荣治等(编)：“酶免疫分析，第三版”(医学书院，1987)；“酶学方法”卷 70(免疫化学技术(A))；同上，卷 73(免疫化学技术(B))；同上，卷 74(免疫化学技术(C))；同上，卷 84(免疫化学技术(D：选择性免疫分析))；同上，卷 92(免疫化学技术(E：单克隆抗体及普通免疫分析方法))；同上，卷 121(免疫化学技术(I：杂交瘤技术及单克隆抗体))(Academic Press 出版)等)。

如上所述，使用本发明的抗体可高度敏感地定量本发明多肽。

此外，使用本发明的抗体可定量本发明多肽的浓度，从而当检出本发明多肽浓度的增加或减少时，能够诊断出如下各种疾病或者将来对这些疾病的高度易感性：例如碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、组织的生长·增殖·分化抑制、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变

性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等。

本发明抗体可用于检出体液或者组织等待检标本液中存在的本发明多肽。又可用于抗体柱的制作,该抗体柱可用于纯化本发明多肽;检出各纯化组分中的本发明多肽;对被检细胞内本发明多肽的行踪进行分析等。

(4)基因诊断制剂

例如,本发明的DNA作为一种探针可以检出温血动物(例如,人、大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、鸡、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴等)中编码本发明多肽的DNA或mRNA的异常(基因异常),因此,本发明的DNA可用作基因诊断制剂,用于诊断DNA或mRNA的损伤、突变,或其表达量的减少、和/或该DNA或mRNA的增加或过表达。进行染色体作图用于研究遗传疾病。

上述基因诊断通过使用本发明的DNA,用本领域公知的Northern杂交分析或PCR-SSCP分析来完成(Genomics, 5, 874-879(1989); 美国科学院学报, 86, 2766-2770(1989))、DNA微列阵(Science, 270, 467-470(1995))等。

例如,当用Northern杂交分析、DNA微列阵检出表达量的减少时和PCR-SSCP分析、DNA微列阵检出DNA突变时,能够很大程度地诊断出如下各种疾病:例如碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、组织的生长·增殖·分化抑制、生殖功能降低、结合组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等。

(5)含有反义DNA的药物

反义DNA能与本发明DNA互补地结合并抑制该DNA的表达,因此反义DNA能够抑制生物体内本发明多肽或本发明DNA,因此它可用作治疗或预防起因于本发明多肽表达过剩的各种疾病。

当将所述反义DNA用作上述各种疾病的治疗或预防药物时,同前所述含有本发明DNA的各种疾病的治疗或预防药物一样可以实施。

例如,当反义 DNA 用作上述预防/治疗药物时,反义 DNA 可单独使用,或插入合适载体如反转录病毒载体、腺病毒载体或腺伴随病毒载体后按常规方法给药。该反义 DNA 可以以裸露 DNA 的形式给药,或与生理学上承认的用于促进吸收的辅助剂等的载体一起制成药剂并给药以便于其被基因枪
5 摄入或通过含有水凝胶的导管。

该反义 DNA 的剂量因患病特征、给药对象、以及给药方式等不同,例如将本发明反义 DNA 制成吸入剂在气管内局部给药,一般成年人(体重 60kg),每天给药约 0.1-100mg。

该反义 DNA 也可用于诊断寡核苷酸探针,其目的是检查组织或细胞中是否有本发明 DNA 的存在或者该 DNA 的表达情况。
10

(6)含有本发明抗体的药物

本发明抗体具有中和本发明多肽活性的作用,例如,该抗体可用作治疗或预防起因于本发明多肽表达过剩的各种疾病。

上述各种疾病的治疗药物或预防药物含有本发明抗体,其可直接以原始
15 液体制剂或以适当剂型的药用组合物,对哺乳动物(例如,人、大鼠、兔子、绵羊、猪、牛、猫、狗、猴等)经过口服或非口服形式给药。本发明抗体的剂量依赖于给药受体、症状和给药方法等而异;本发明抗体静脉注射的一次剂量为每天大约 0.01-20mg/kg 体重,优选大约 0.1-10mg/kg 体重,更优选 0.1-5mg/kg 体重,一天 1-5 次,优选一天 1-3 次。其他非胃肠道给药或经口
20 给药均依据此量。症状特别严重者根据其病症可以增加使用量。

本发明的抗体可以直接给药或者制成适当的药用组合物给药。所述药用组合物包含上述抗体或它们的盐和可药用载体、稀释剂或者赋形剂。这种组合物可以为适于经口或非胃肠道给药的剂型。

即,适于经口给药的组合物包括固体型制剂或液体型制剂,具体地有片剂(包括糖衣片、薄膜包衣片剂)、丸剂、颗粒剂、粉剂、胶囊(包括软胶囊)、糖浆、乳剂、悬浮剂等。这种组合物可以通过公知的方法生产,其制剂通常包括制药领域常规使用的载体、稀释剂或赋形剂。例如用于片剂的载体或赋形剂有乳糖、淀粉、蔗糖、硬脂酸镁等。
25

适于非胃肠道给药的组合物有针剂、栓剂等,针剂包含的剂型有:静脉注射剂、皮下注射剂、皮内注射剂、肌肉注射剂、点滴注射剂等。这类注射剂根据公知方法,例如将所述抗体或它们的盐溶解、悬浮或者乳化于无菌水
30

性溶液或无菌油性溶液而制备。注射用水溶液有生理盐水、包含葡萄糖及其它辅助制剂的等渗溶液，并还可以进一步与合适的助溶剂如醇(如乙醇)、聚醇(如丙二醇和聚乙二醇)、非离子表面活性剂(如聚山梨酸酯 80TM、HCO-50(加氢的蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加成化合物)等结合使用。油性溶液包括植物油如，橄榄油、芝麻油、大豆油、花生油、棉籽油、玉米油，除此之外还有丙二醇，它们可与助溶剂如苯甲酸苄酯和苯甲醇结合使用。由此制备的注射液一般装在合适的安瓿中。用于直肠给药的栓剂通过将所述抗体或它们的盐与一般的栓剂基质混合而制备。

上述口服或非口服的药用组合物，最好制成适合于活性成分投药剂量的用药剂型。其投药剂型包括，片剂、丸剂、胶囊、注射制剂(安瓿)、栓剂等，每个单位剂型通常含有上述抗体 5-500mg，注射剂优选含 5-100mg，其他制剂优选含有 10-250mg。

此外，前面所述各种组合物也可含有其它活性成分，只要与上述抗体的结合不发生不利的相互作用。

15 (7)转基因动物

本发明提供一种非人哺乳动物，其具有编码外源性本发明多肽的 DNA(以下简称为本发明外源性 DNA)或其 DNA 变体(通常简称为本发明外源性 DNA 变体)。

即，本发明提供：

- 20 (1)一种非人哺乳动物，其具有本发明外源性 DNA 或其 DNA 变体；
- (2)(1)中所述非人哺乳动物，其为啮齿动物；
- (3)(2)中所述啮齿动物，其为小鼠或大鼠；以及
- (4)一种重组载体，其含有本发明外源性 DNA 或其 DNA 变体，并能在哺乳动物中表达。

25 具有本发明外源性 DNA 或其 DNA 变体的非人哺乳动物(以下简称为本发明转基因动物)可如下产生：将所需 DNA 转染至未受精卵、受精卵、精子以及含有相应原始细胞的胚细胞等，优选它们处于非人哺乳动物发育过程中胚胎发生期(更优选单细胞或受精卵细胞期，一般在 8 细胞期以前)，可用方法有磷酸钙法、电脉冲法、脂转染技术、凝集法、显微注射法、粒子枪法、DEAE-葡聚糖法等。可根据这些转基因法将本发明外源 DNA 转移至体细胞、活器官、组织细胞等，对转化体进行组织培养或细胞培养。可以进一步地根

30

据公知细胞融合法使这些细胞与所述胚细胞融合而产生本发明的转基因动物。

非人哺乳动物的例子有：猴、牛、猪、绵羊、山羊、兔子、狗、猫、豚鼠、仓鼠、小鼠、大鼠等，就构建人类疾病的动物模型而言，优选个体发育以及生命周期比较短，容易繁殖的啮齿动物，主要是小鼠(例如，其纯种系有 C57BL/6 系、DBA2 系等；杂种系有 B6C3F₁ 系、BDF₁ 系、B6D2F₁ 系、BALB/c 系、ICR 系等)或大鼠(例如，Wistar, SD 等)等。

能够在哺乳动物中进行表达的重组载体中的[哺乳动物]除了所述非人哺乳动物外还包括人等。

10 所说本发明外源性 DNA 并不是非人哺乳动物本来具有的 DNA，而是指从哺乳动物中分离并提取的本发明 DNA。

所述本发明的 DNA 变体包括因本发明原始 DNA 的碱基序列发生变异(例如，突变等)产生的 DNA，具体地说，包括碱基添加、缺失、用其它碱基置换产生的 DNA，还有异常 DNA。该异常 DNA 是指能表达异常的本发明多肽的 DNA，例如，所述 DNA 表达的多肽可抑制本发明多肽的正常功能。

15 本发明外源性 DNA 可以来自任一哺乳动物，不论是与靶动物同种还是异种均可。当把本发明 DNA 转移至靶动物体中时，优选使用 DNA 构建体，其中使该 DNA 连接在能于该靶动物中表达该 DNA 的启动子下游。例如，转移本发明的人源 DNA 时，以高水平表达本发明 DNA 的转基因动物可如下制备：选择携有与所述人源 DNA 高度同源的本发明 DNA 的非人哺乳靶动物，以及能在该靶动物中对来源于各种哺乳动物(如兔、狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠等)的 DNA 进行表达的各种启动子，将所述本发明人源 DNA 连接于所述各种启动子的下游形成 DNA 构建体(如载体等)，然后显微注射至所述靶动物的受精卵中，如小鼠受精卵。

25 本发明多肽的表达载体有：大肠杆菌质粒、枯草杆菌质粒、酵母质粒、噬菌体如入噬菌体、反转录病毒如鼠白血病病毒、动物病毒如痘苗病毒或杆状病毒。其中优选使用大肠杆菌质粒、枯草杆菌质粒、或酵母质粒。

进行上述 DNA 表达调节的启动子通常使用如下的启动子：①来自病毒(如，人类猿病毒、巨细胞病毒、鼠白血病病毒、JC 病毒、乳腺癌病毒、脊髓灰质炎病毒等)DNA 的启动子；②来自各种哺乳动物(人、兔子、狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠等)的启动子，例如下述蛋白启动子：白蛋白、胰

岛素 II、尿空斑蛋白(uroplakin)II、弹性蛋白酶、促红细胞生成素、内皮素、肌酸激酶、胶原原纤维酸性蛋白、谷胱甘肽 S-转移酶、血小板衍生的生长因子 β 、角蛋白 K1、K10 以及 K14、I 型及 II 型胶原蛋白、cAMP 依赖性蛋白激酶 β I 亚单位、肌营养不良蛋白、抗酒石酸碱性磷酸酶、心房利钠激素、

5 内皮受体-酪氨酸激酶(缩写为 Tie2)、Na/K-ATP 酶、神经微丝轻链、金属硫蛋白 I 及 II A、金属蛋白酶 1 组织抑制剂、MHC I 类抗原(H-2L)、H-ras、肾素、多巴胺 β -羟化酶、甲状腺过氧化物酶(TPO)、多肽链延伸因子 1 α (EF-1 α)、 β -肌动蛋白、 α 及 β -肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链 1 及 2、髓磷脂基质蛋白、甲状腺球蛋白、Thy-1、免疫球蛋白、H 链可变区(VNP)、血清淀粉

10 样蛋白 P 成分、肌红蛋白、肌钙蛋白 C、平滑肌 α -肌动蛋白、前脑啡肽原 A、加压素等。其中最好使用能在全身高效表达的巨细胞病毒启动子、人多肽链延伸因子 1 α (EF-1 α) 启动子、人及家鸡 β -肌动蛋白启动子等。

优选上述载体在转基因动物中有终止目标 mRNA 转录的序列(一般称为终止子), 例如, 可以使用来自病毒以及各种哺乳动物的各种 DNA 的序列,

15 优选使用类人猿病毒的 SV40 终止子。

此外, 为了更进一步提高外源目标 DNA 的表达, 可根据不同目的将各种 DNA 的剪接信号、增强子区、真核 DNA 内含子的一部分连接在该启动子区的 5' 上游、或启动子区和翻译区之间或翻译区的 3' 下游。

该翻译区可以通过常规基因工程方法构建能在转基因动物中进行表达的 DNA 构建体, 其中将所述 DNA 连接至所述启动子下游, 必要时还同时位于转录终止位点的上游。

20

在受精卵细胞阶段转移本发明外源 DNA 必须保证靶哺乳动物的所有胚细胞及体细胞中都存在该外源 DNA。在转基因 DNA 之后产生的动物的胚细胞中所述本发明外源性 DNA 的存在表明该动物的所有后代均在其胚细胞及

25 体细胞中含有本发明外源性 DNA。继承了这种本发明外源性 DNA 的动物后代在其所有胚细胞及体细胞中应携有本发明外源性 DNA。

已转移有正常的本发明外源性 DNA 的非人哺乳动物通过杂交证实该外源 DNA 的稳定维持后, 可作为携有该 DNA 的动物在一般饲养环境下传代。

在本发明受精卵细胞阶段中外源 DNA 的转移必须保证靶哺乳动物的所有

30 所有胚细胞及体细胞中都存在过量外源 DNA。在转移 DNA 之后产生的动物胚细胞中所述本发明外源性 DNA 的过量存在意味着产生的动物后代均在其所

有胚细胞及体细胞中含有过量本发明外源性 DNA。继承了这种本发明外源性 DNA 的动物后代在所有胚细胞及体细胞中应保持有过量的本发明外源性 DNA。

5 通过获得一对同源染色体上都有导入的 DNA 的纯合体动物，再通过它们的雌雄动物杂交其所有的后代就可以维持过量的该 DNA。

具有正常本发明 DNA 的非人哺乳动物通过正常的本发明 DNA 高效表达，并促进内源性正常 DNA 的功能最终将导致本发明多肽机能亢进病，这时，该动物可以作为这种疾病的病理模型动物使用。例如，使用本发明的正常 DNA 转基因动物，可以阐明本发明多肽发生功能亢进病症、与本发明多肽有关的疾病的病理机制以及研究这些疾病的治疗方法。

10 又，由于含有正常的本发明外来 DNA 的哺乳动物具有游离的本发明多肽增加症状，因此这种动物也可用于筛选与本发明多肽有关的疾病的治疗药物。

另一方面，具有异常的本发明外源性 DNA 的非人哺乳动物通过杂交确定外源性 DNA 的稳定维持之后，可以在一般饲养环境下传代。还可通过将外源目标 DNA 重组到所述质粒中而将该 DNA 作为起始材料使用。带有启动子的 DNA 构建体可以通过一般 DNA 工程学方法制备而成。在受精卵细胞阶段中本发明的异常 DNA 的转基因必须保证靶哺乳动物的所有胚细胞及体细胞中都存在该异常 DNA。在转基因 DNA 之后产生的动物的胚细胞中所述本发明异常 DNA 的存在表明该动物的所有后代均在其胚细胞及体细胞中保持本发明异常 DNA。继承了这种本发明外源性 DNA 的动物后代在其所有胚细胞及体细胞中应携有本发明异常 DNA。通过获得一对同源染色体上都有导入的 DNA 的纯合体动物，再通过它们的雌雄动物杂交，其所有的后代就可以维持该 DNA。

25 由于具有本发明异常 DNA 的非人哺乳动物可使该异常 DNA 高效表达，通过抑制内在的正常 DNA 功能，最终将导致该动物发生本发明多肽的功能失活型不适应病症，因而该动物可作为相应疾病的模型动物使用。例如，利用本发明的异常 DNA 转基因动物，可以阐明本发明多肽的功能失活型不适应病症以及研究这些疾病的治疗方法。

又, 本发明异常 DNA 高效表达的转基因动物可作为动物模型用于阐明本发明多肽的功能失活型不适应病症中本发明异常多肽对正常多肽的功能的抑制(显性失活作用)作用。

5 由于携有本发明之异常外源 DNA 的哺乳动物中游离形式的本发明多肽增加, 因此这类动物也可用于筛选本发明多肽的功能失活型不适应症的治疗药物。

上述 2 种转基因动物的其它可能应用包括:

①作为组织培养的细胞来源;

10 ②通过直接分析本发明转基因动物组织中的 DNA 或 RNA, 或者间接分析该 DNA 所表达的多肽组织, 来阐述它们与被本发明多肽特异性表达或活化的多肽的关联性;

③用标准组织培养技术培养的含有所述 DNA 的组织细胞, 研究难以培养的组织中细胞的功能;

④用上述③中细胞筛选能够提高该细胞功能的药物;

15 ⑤分离纯化本发明多肽的变体并制备其抗体。

用本发明的转基因动物可以研究与本发明多肽有关的疾病的临床症状, 其中包括本发明多肽的功能失活型不适应症, 同时在与本发明多肽有关的疾病模型中还能得到各器官中更详细的病理学发现, 从而开发新治疗方法, 以及用于研究和治疗与该疾病相关的继发性疾病的方法。

20 从本发明转基因动物中取出各种器官, 切碎后, 用胰蛋白酶等多肽酶(蛋白)分解可以得到游离的转基因细胞, 然后建立培养细胞系。本发明的转基因动物还可用于专门产生本发明多肽的细胞, 研究这些细胞的特殊性、其与细胞凋亡、分化或增殖的关系, 或者这些特性中的信号传导机制, 从而研究其中的任何异常性, 因此本发明的转基因动物可以为研究本发明多肽并阐明其作用提供有用的研究材料。

25 为了利用本发明转 DNA 基因动物, 开发与本发明多肽相关的疾病(包括本发明多肽的功能失活型不适应症)的治疗药物, 可利用上述检查法以及定量法提供有效而快速的药物筛选法。还可利用本发明转基因动物或能表达本发明外源性 DNA 的载体, 研究并开发与本发明多肽有关的疾病的基因治疗方法。

30

(8)基因敲除实验动物

本发明提供携有无活性的本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞及在本发明 DNA 的表达中有缺陷的非人哺乳动物。

即, 本发明提供

- (1)携有无活性的本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞;
- 5 (2)第(1)所述胚胎干细胞, 其中通过导入报道基因(例, 大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因)使该 DNA 灭活;
- (3)第(1)所述胚胎干细胞, 其为抗新霉素;
- (4)第(1)所述胚胎干细胞, 其中所述非人哺乳动物为啮齿动物;
- (5)第(4)所述胚胎干细胞, 其中所述啮齿动物为小鼠;
- 10 (6)对本发明 DNA 的表达有缺陷的非人哺乳动物, 其中本发明 DNA 不具活性;

(7)第(6)所述非人哺乳动物, 通过导入报道基因(例, 大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因)使该 DNA 灭活, 该报道基因能在本发明 DNA 的启动子控制下表达;

- 15 (8)第(6)所述非人哺乳动物, 其为啮齿动物;
- (9)第(8)所述非人哺乳动物, 其中所述啮齿动物为小鼠, 以及
- (10)一种对本发明 DNA 的启动子活性具有促进或抑制作用的化合物或其盐的筛选方法, 包括给第(7)所述动物投与待测化合物, 并检测报道基因的表达。

- 20 所谓携有无活性本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞是指, 通过对本发明 DNA 进行人工突变而抑制该非人哺乳动物表达所述 DNA, 或通过使该 DNA 编码的本发明多肽活性基本丧失, 从而使该 DNA 基本上不具有表达本发明多肽的能力(下文有时称本发明的基因敲除 DNA)的非人哺乳动物胚胎干细胞(简称 ES 细胞)。

- 25 非人哺乳动物可以使用前述的动物。

对本发明 DNA 进行人工突变的方法包括, 可根据基因工程学方法对该 DNA 序列的一部分或全部进行缺失、插入或用其它 DNA 置换。通过这些变异, 可以利用诸如读码框的移动, 或启动子或外显子功能的破坏来制备本发明的基因敲除 DNA。

- 30 携有无活性本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞(下文简称携有无活性本发明 DNA 的 ES 细胞或本发明的基因敲除 ES 细胞)可如下获得: 分

离所选非人哺乳动物所具有的本发明 DNA, 在其外显子部分插入抗药基因如抗新霉素基因、抗潮霉素基因, 或插入报道基因如 lacZ(β -半乳糖苷酶基因)、cat(氯霉素乙酰转移酶基因)以破坏外显子的功能, 或在外显子之间的内含子上插入能够终止基因转录的 DNA 序列(如, polyA 加尾信号等)以抑制完整 mRNA 的合成, 将如此构建的含有被破坏的上述 DNA 的序列(下文简称为靶载体)通过同源重组整合至该动物的染色体上。对如此获得的 ES 细胞用本发明 DNA 上或其附近的 DNA 序列作为探针进行 Southern 杂交分析, 或用上述靶载体上的 DNA 序列和另一种位于本发明 DNA 附近但不包括在上述靶载体中的 DNA 序列作为引物进行 PCR, 从而筛选本发明的基因敲除 ES 细胞。

通过同源重组使本发明 DNA 失活的亲本 ES 细胞可以是上述已建立的细胞株, 也可以是根据 Evans 及 Kaufma 方法的改良法建立的细胞株。例如, 目前常用的小鼠 ES 细胞是 129 系 ES 细胞, 但其免疫学背景不十分清楚, 故优选使用遗传免疫学背景清晰的纯系 ES 细胞等, 例如, 其中所述 BDF₁ 小鼠(C57BL/6 和 DBA/2 的 F₁ 代)是使 C57BL/6 通过与 DBA/2 杂交而改良其卵数少的特点。BDF₁ 小鼠其优点卵数多且卵饱满, 具有 C57BL/6 小鼠的背景, 因此用其 ES 细胞产生病理模型小鼠时, 通过再与 C57BL/6 小鼠进行回交可以使其遗传背景恢复为 C57BL/6 小鼠的背景。

当建立 ES 细胞时, 一般使用受精后第 3.5 天的胚泡, 本发明优选在 8 细胞胚期采集胚胎并培养至胚泡, 通过使用此胚泡可以更有效地获得大量的初期胚。

虽然可以利用的 ES 细胞无所谓性别, 但是通常雄性 ES 细胞比较容易形成生殖细胞系的嵌合体。为了减少培养时的繁杂过程最好尽快判断雌雄性。

ES 细胞的雌雄判断方法有, 用 PCR 法扩增并检测 Y 染色体上性决定区的基因。如果使用这种方法, 只需一个菌落(约 50 个)的 ES 细胞就足以进行性别分析, 而进行核型分析则需要约 10^6 个细胞; 因此可在培养初期根据对性别的鉴定对 ES 细胞进行第一次筛选, 及早选出雄性细胞, 从而大大缩短培养初期的时间。

可用 G 带法确定染色体数而完成第二次选择。优选所获得的 ES 细胞染色体数为正常数的 100%, 但经物理操作建立细胞系很难获得具有正常染色

体数的细胞时, 优选对 ES 细胞的基因实施基因敲除后, 再克隆成正常细胞(如, 染色体数为 $2n=40$ 的小鼠体细胞)。

这样所得的胚胎干细胞通常繁殖能力强, 但个体发育能力低, 因此必须传代。例如, 在适当饲养细胞如 STO 成纤维细胞上, 在有 LIF (1-10000U/ml) 的情况下, 在 CO_2 培养箱(优选约 5% CO_2 和约 95% 空气, 或约 5% CO_2 、约 5% O_2 和 90% 空气)内约 37℃ 培养所述胚胎干细胞系, 传代时, 可用胰酶/EDTA 溶液(通常约 0.001-0.5%胰酶/约 0.1-5mM EDTA, 优选约 0.1%胰酶/1mM EDTA)处理以获得单细胞, 然后接种至新鲜制备的饲养细胞。通常每 1-3 天传代一次, 并在传代时观察细胞, 将形态异常的细胞除去。

ES 细胞在适当条件下, 在单层培养中长至高密度, 或在悬浮培养中形成细胞集团后, 它们可自发分化成各种类型的细胞, 如头顶肌细胞、内脏肌细胞、心肌细胞等[M. J. Evans 及 M. H. Kaufman, 自然, 292, 154(1981); G. R. Martin, 美国国家科学院院刊, 78, 7634(1981); T. C. Doetschman 等, 胚胎学和实验形态学杂志 87, 27(1985)], 从本发明分化的 ES 细胞得到对本发明 DNA 的表达有缺陷的细胞, 它们可用于体外进行本发明多肽的细胞生物学研究。

可用公知方法测定所选动物的 mRNA 量, 并间接比较表达量, 从而使本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物与正常动物有所区别。

非人哺乳动物的例子如前述。

对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物而言, 可将如上制备的靶载体导入小鼠胚胎干细胞或小鼠卵细胞, 然后通过同源重组使小鼠胚胎干细胞或小鼠卵细胞染色体上的本发明 DNA 被靶载体上的已失活的本发明 DNA 序列所取代, 从而完成对本发明 DNA 的基因敲除。

以位于本发明 DNA 内或附近的一段 DNA 序列作为探针通过 DNA 杂交分析, 或以靶载体上的一段 DNA 序列以及不包含在该靶载体中的另一 DNA 序列为引物通过 PCR 分析, 可以鉴定携有本发明已破坏的 DNA 的基因敲除细胞。当使用非人哺乳动物胚胎干细胞时, 对其中所含本发明 DNA 已失活的一个细胞系通过同源重组进行克隆; 在适当时期如 8 细胞期将所得已克隆的细胞注射至, 例如非人哺乳动物胚胎或胚泡中。将所得嵌合体胚胎移植到非人哺乳动物的假妊娠子宫。所得动物是由具有正常的本发明 DNA 位点的细胞和具有人工突变的本发明 DNA 位点的细胞构成的嵌合体。

当该嵌合体动物的部分生殖细胞中本发明 DNA 位点发生突变后, 可从这种嵌合动物与正常动物交配得到的子代群体中, 通过毛色(coat color)鉴定等方法, 筛选以下个体, 其所有组织均由具有突变的本发明 DNA 位点的细胞组成。所得个体通常在本发明多肽的杂合子表达中有缺陷。通过这些杂合体的交配后代可获得本发明多肽的纯合子表达有缺陷的个体。

使用卵细胞时, 可将 DNA 溶液显微注射至细胞核内, 获得一种非人哺乳类转基因动物, 其中已将靶载体导入其染色体上。可根据同源重组从这些非人哺乳类转基因动物中筛选本发明 DNA 位点上有变异的个体。

如上述, 针对本发明 DNA 的基因敲除个体的杂交后代在证实了带有此基因敲除后, 可通过常规培养条件进行繁衍。

可按照常规方法获得并维持繁殖系。即通过含有所述非活性 DNA 的雌雄动物交配, 可以获得两条同源染色体上都具有该非活性 DNA 的纯合体。对于母本动物来说, 在 1 个正常个体、多个纯合体的状态下饲养, 就能更有效地得到这种纯合体动物。通过雌雄杂合体的杂交, 可繁殖并传代具有该非活性 DNA 的纯合体以及杂合体动物。

本发明 DNA 已失活的非人哺乳动物胚胎干细胞在产生本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物方面十分有用。

由于本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物丧失了由本发明多肽诱导所得的各种生物活性, 故可作为本发明多肽的生物活性失活的疾病模型, 并因此有利于阐明这些疾病的原因及研究其治疗方法。

(8a) 对本发明 DNA 之缺失或损伤等所致疾病能进行有效预防或治疗的化合物的筛选方法

可用本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物筛选对本发明 DNA 之缺失或损伤所致疾病(碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等)进行筛选有效预防/治疗的化合物。

即，本发明提供对本发明 DNA 之缺失或损伤等所致疾病能进行有效预防/治疗的化合物的筛选方法，其特征为，对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物施用一种待测化合物，观察和测定该动物的变化。

5 可用于所述筛选方法的本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物实例如上所述。

所述待测化合物如多肽、蛋白质、非多肽化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取液、植物提取液、动物组织提取液、血浆等，它们既可为新化合物也可为已知化合物。

具体地，用待测化合物处理本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物，与
10 未处理的对照动物比较，以动物的各个器官、组织、疾病的症状变化为指标，可以评价此待测化合物的治疗/预防效果。

所述用待测化合物处理对象动物的方法，可以口服给药、静脉注射，可以根据待测动物的症状和待测化合物的性质等适当地进行选择。另外，待测化合物的给药量还可以根据投药途径、待测化合物的性质等进行适当选择。

15 当筛选针对胰腺机能障碍具有治疗或预防效应的化合物时，对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物进行糖耐量试验，在试验前或试验后给予待测化合物，定时地测定该动物的血糖值以及重量的变化等。

用该筛选法得到的化合物是从上述的待测化合物中选出的化合物，对因本发明多肽的缺陷、损伤引起的疾病(碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、
20 脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、
25 血管再生障碍疾病等)具有治疗或预防效应，所以这种化合物可以用作治疗和预防这些疾病的药物，既安全又毒性低。另外，如上述筛选的化合物所衍生的化合物也可以使用。

用上述筛选法得到的化合物可以与生理上可接受的碱(如碱金属盐)或酸(如无机酸或有机酸)形成盐而使用，优选为生理上可接受的酸加成盐。这
30 样的盐有，与无机酸(例如，盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)形成的盐，与有机

酸(例如, 乙酸、甲酸、丙酸、延胡索酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)形成的盐等。

含有用上述筛选法所得的化合物或其盐的药物, 可以用类似于制备含上述本发明多肽的药物的方法进行制备。

- 5 如此得到的制剂安全、低毒, 因此可以对哺乳动物投药, 例如人、大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴子等。

该化合物或其盐的剂量依赖于病症、受试者和给药方法等而异; 例如经口投与该化合物用于治疗代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等时, 一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.01-1000mg/天, 优选 0.1-1000mg/天, 更优选大约 1.0-200mg/天, 最优选 1.0-50mg/天。非胃肠道给药时, 一次投药量依赖于给药受体、症状等而变, 例如, 以针剂注射该化合物用于治疗代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、组织的生长·增殖·分化抑制、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等时, 成年人(体重 60kg)的剂量为大约 0.01-30mg/天, 优选大约 0.1-20mg/天, 更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类, 可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

- 25 (8b) 筛选具有促进或抑制本发明 DNA 中启动子之活性的化合物的方法

本发明提供筛选能促进或抑制本发明 DNA 中启动子之活性的化合物或其盐的方法, 其特征为, 对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物给予待测化合物, 并检测报道基因的表达。在上述筛选方法中, 本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物选自上述本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物, 该动物中通过导入报道基因使本发明 DNA 失活, 而该报道基因是在本发明 DNA 的启动子控制下表达。用于筛选的具体待测化合物实例同上。报道基因实例

同上，优选 β -半乳糖苷酶基因(lacZ)、可溶性碱性磷酸酶基因或荧光素酶基因等。

由于本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物之中，本发明 DNA 以报道基因取代，而报道基因又受本发明 DNA 启动子的调控而出现，因此追踪报道基因编码物质的表达可以检测启动子活性。

例如，当用大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(lacZ)取代编码本发明多肽的 DNA 区的一部分时，原本表达本发明多肽的组织中，表达了 β -半乳糖苷酶以代替本发明多肽。因此，用试剂 β -半乳糖苷酶的底物如 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖吡喃糖苷(X-gal)染色可以很容易地观察到本发明多肽在动物体内的表达状态。具体地，选取本发明多肽缺陷型小鼠或其经戊二醛等固定的组织切片，用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后，用含有 X-gal 的染色液在室温或 37℃左右反应约 30 分至 1 个小时，之后将组织标本用 1mM EDTA/PBS 溶液洗涤，停止 β -半乳糖苷酶反应并观察其颜色。或者，可按照常规法检测编码 lacZ 的 mRNA。

用该筛选法得到的化合物或其盐是从上述待测化合物中选出的、具有促进或抑制本发明 DNA 启动子活性的化合物。

用上述筛选法得到的化合物可以形成盐，所述盐可以优选使用与生理上可接受的碱(如碱金属盐)或酸(如无机酸或有机酸)形成盐，尤其优选为生理上可接受的酸加成盐。这样的盐有，与无机酸(例如，盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)形成的盐，或与有机酸(例如，乙酸、甲酸、丙酸、延胡索酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)形成的盐等。

由于具有促进本发明 DNA 启动子的活性的化合物或其盐，可促进本发明多肽的表达，或可促进本发明多肽的功能，因此它们可作为安全、低毒性药物用于治疗或预防如下所述疾病：如碳水化合物等能源代谢调节(糖代谢、脂质代谢等)紊乱(如糖尿病、肥胖症等)、组织的生长·增殖·分化抑制、生殖功能降低、结缔组织的形成异常(如硬皮症等)、组织的纤维变性(如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等)、循环系统障碍(外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等)、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病(如过敏、炎症、自体免疫性疾病等)、血管再生障碍疾病等)等。

再者，由上述筛选得到的化合物进而衍生的化合物同样可以使用。

含有用上述筛选法所得的化合物或其盐的药物，可以用类似于制备含上述本发明多肽或其盐的药物的方法进行制备。

如此得到的制剂安全、低毒，因此可以对哺乳动物给药，例如人、大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴子等。

该化合物或其盐的剂量依赖于病症、受试者和给药途径等而异；例如经口投药促进本发明 DNA 启动子活性的化合物用于治疗代谢调节（糖代谢、脂质代谢等）紊乱（如糖尿病、肥胖症等）、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常（如硬皮症等）、组织的纤维变性（如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等）、循环系统障碍（外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等）、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病（如过敏、炎症、自体免疫性疾病等）、血管再生障碍疾病等时，一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.01-1000mg/天，优选 0.1-1000mg/天，更优选大约 1.0-200mg/天，最优选 1.0-50mg/天。非胃肠道给药时，一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如，以针剂注射促进本发明 DNA 启动子活性的化合物用于治疗代谢调节（糖代谢、脂质代谢等）紊乱（如糖尿病、肥胖症等）、组织的生长·增殖·分化抑制、生殖功能降低、结缔组织的形成异常（如硬皮症等）、组织的纤维变性（如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等）、循环系统障碍（外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等）、动脉硬化、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病、免疫系统疾病（如过敏、炎症、自体免疫性疾病等）、血管再生障碍疾病等时成年人(体重 60kg)的剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

相反，经口服给予抑制本发明 DNA 启动子活性的化合物时，一般成年人(体重 60kg)正常剂量为大约 0.1-1000mg/天，优选大约 1.0-200mg/天，更优选 1.0-50mg/天。非胃肠道给药时，一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如，以针剂注射抑制本发明 DNA 启动子活性的化合物时，成年人(体重 60kg)的剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

在说明书和附图中，碱基和氨基酸的代码使用 IUPAC-IUB 生化命名委员会规定的或本领域通用的代码，如下述例示。对于有光学异构体的氨基酸，除非特别说明，均指 L 形式。

- DNA : 脱氧核糖核酸
- 5 cDNA : 互补的脱氧核糖核酸
- A : 腺嘌呤
- T : 胸腺嘧啶
- G : 鸟嘌呤
- C : 胞嘧啶
- 10 RNA : 核糖核酸
- mRNA : 信使核糖核酸
- dATP : 脱氧腺苷三磷酸
- dTTP : 脱氧胸腺嘧啶三磷酸
- dGTP : 脱氧鸟苷三磷酸
- 15 dCTP : 脱氧胞嘧啶三磷酸
- ATP : 腺苷三磷酸
- EDTA : 乙二胺四乙酸
- SDS : 十二烷基硫酸钠
- Gly 或 G : 甘氨酸
- 20 Ala 或 A : 丙氨酸
- Val 或 V : 缬氨酸
- Leu 或 L : 亮氨酸
- Ile 或 I : 异亮氨酸
- Ser 或 S : 丝氨酸
- 25 Thr 或 T : 苏氨酸
- Cys 或 C : 半胱氨酸
- Met 或 M : 甲硫氨酸
- Glu 或 E : 谷氨酸
- Asp 或 D : 天冬氨酸
- 30 Lys 或 K : 赖氨酸
- Arg 或 R : 精氨酸

- His 或 H : 组氨酸
Phe 或 F : 苯丙氨酸
Tyr 或 Y : 酪氨酸
Trp 或 W : 色氨酸
5 Pro 或 P : 脯氨酸
Asn 或 N : 天冬酰胺
Gln 或 Q : 谷氨酰胺
PGlu : 焦谷氨酸
Hse : 高丝氨酸
10 另外, 在本说明书中, 频繁使用的取代基、保护基以及试剂用下列符号表示。
- Me : 甲基
Et : 乙基
Bu : 丁基
15 Ph : 苯基
TC : 四氢噻唑-4(R)-酰胺基
Tos : 对甲苯磺酰基
CHO : 甲酰基
Bzl : 苄基
20 Cl₂-Bzl : 2,6-二氯苄基
Bom : 苄氧甲基
Z : 苄氧羰基
Cl-Z : 2-氯苄氧羰基
Br-Z : 2-溴苄氧羰基
25 Boc : 叔丁氧基羰基
DNP : 二硝基苯酚
Trt : 三苯甲基
Bom : 叔丁氧基甲基
Fmoc : N-9-芴基甲氧基羰基
30 HOBt : 1-羟基苯并三唑
HOObt : 3,4-二羟基-3-羟基-4-氧基-1,2,3-苯并三嗪

HONB :1-羟基-5-降冰片烯基-2,3-二羧基亚胺

DCC :N,N'-二环己基碳二亚胺

本说明书序列表中的序列编号(SEQ ID NO:)分别表示如下:

5

[SEQ ID NO:1]

表示实施例1中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:2]

表示实施例1及实施例3中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:3]

10

表示本发明新前体蛋白质(人型)的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:4]

表示在实施例1和实施例2中检验的编码本发明新前体蛋白质(人型)的cDNA片段的碱基序列。

[SEQ ID NO:5]

15

表示实施例2及实施例4中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:6]

表示实施例4中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:7]

表示新多肽A链(人型)的氨基酸序列。

20

[SEQ ID NO:8]

表示新多肽B链(人型)的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:9]

表示实施例2中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:10]

25

表示实施例2中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:11]

表示实施例2中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:12]

表示在实施例3中得到的编码本发明新前体蛋白质(人型)的cDNA片段中的开放读框(ORF)碱基序列。

30

[SEQ ID NO:13]

表示实施例3中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:14]

表示实施例3中所使用的引物碱基序列。

[SEQ ID NO:15]

5 编码A链(人型)DNA的碱基序列。

[SEQ ID NO:16]

表示编码B链(人型)DNA的碱基序列。

[SEQ ID NO:17]

表示新前体蛋白质(大鼠型)的氨基酸序列。

10 [SEQ ID NO:18]

表示编码SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的DNA碱基序列。

[SEQ ID NO:19]

表示A链(大鼠型·小鼠型)氨基酸序列。

[SEQ ID NO:20]

15 表示编码A链(大鼠型)氨基酸序列的DNA碱基序列。

[SEQ ID NO:21]

表示B链(大鼠型·小鼠型)氨基酸序列。

[SEQ ID NO:22]

表示编码B链(大鼠型)氨基酸序列的DNA碱基序列。

20 [SEQ ID NO:23]

表示本发明新前体蛋白质(小鼠型)的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:24]

表示编码SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的DNA碱基序列。

[SEQ ID NO:25]

25 表示编码A链(小鼠型)氨基酸序列的DNA碱基序列。

[SEQ ID NO:26]

表示编码B链(小鼠型)氨基酸序列的DNA碱基序列。

[SEQ ID NO:27]

表示后述实施例5所使用的引物R1的碱基序列。

30 [SEQ ID NO:28]

表示后述实施例5所使用的引物R2的碱基序列。

- [SEQ ID NO:29]
表示后述实施例 5 所使用的引物 L1 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:30]
表示后述实施例 5 所使用的引物 R8 的碱基序列。
- 5 [SEQ ID NO:31]
表示后述实施例 5 所使用的引物 R9 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:32]
表示后述实施例 5 所使用的引物 R6 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:33]
10 表示后述实施例 5 所使用的引物 R7 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:34]
表示后述实施例 5 所使用的引物 U1 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:35]
表示后述实施例 5 所使用的引物 U2 的碱基序列。
- 15 [SEQ ID NO:36]
表示后述实施例 6、实施例 7 所使用的引物 UP 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:37]
表示后述实施例 6 所使用的引物 RL 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:38]
20 表示后述实施例 7 所使用的引物 ML 的碱基序列。
- [SEQ ID NO:39]
表示后述实施例 6 所得到的包括大鼠 ORF 的 DNA 碱基序列。
- [SEQ ID NO:40]
表示后述实施例 7 所得到的包括小鼠 ORF 的 DNA 碱基序列。
- 25 [SEQ ID NO:41]
在后述实施例 5 中证实的编码大鼠型前体 DNA 中，表示其第 1 外显子
区域的碱基序列。
- [SEQ ID NO:42]
在后述实施例 5 中证实的编码大鼠型前体 DNA 中，表示其第 2 外显子
30 区域的碱基序列。
- [SEQ ID NO:43]

在后述实施例 5 中证实的编码小鼠型前体 DNA 中，表示其第 1 外显子区域的碱基序列。

[SEQ ID NO:44]

5 在后述实施例 5 中证实的编码小鼠型前体 DNA 中，表示其第 2 外显子区域的碱基序列。

[SEQ ID NO:45]

表示本发明新前体蛋白质（猪型）的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:46]

表示编码 SEQ ID NO:45 所示氨基酸序列的 DNA 碱基序列。

10 [SEQ ID NO:47]

表示 A 链（猪型）氨基酸序列。

[SEQ ID NO:48]

表示编码 A 链（猪型）氨基酸序列的 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:49]

15 表示 B 链（猪型）氨基酸序列。

[SEQ ID NO:50]

表示编码 B 链（猪型）氨基酸序列的 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:51]

表示本发明新前体蛋白质（大鼠型变异体）的氨基酸序列。

20 [SEQ ID NO:52]

表示编码 SEQ ID NO:51 所示氨基酸序列的 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:53]

表示后述实施例 8 所使用的有义链引物 ex1F1 的碱基序列。

[SEQ ID NO:54]

25 表示后述实施例 8 所使用的反义链引物 ex1R1 的碱基序列。

[SEQ ID NO:55]

表示从后述实施例 8 所得到的猪型前体蛋白 N 端起包括信号肽到 B 链肽编码该部分的 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:56]

30 表示后述实施例 8 所得到的 PCR 产物的碱基序列。

[SEQ ID NO:57]

表示后述实施例 8 所使用的寡 DNA (PORex1F1) 的碱基序列。

[SEQ ID NO:58]

表示后述实施例 8 所使用的寡 DNA (PORex1F2) 的碱基序列。

[SEQ ID NO:59]

- 5 在后述实施例 8 证实的编码猪型前体的 DNA 中, 表示其第 1 外显子区域的碱基序列。

[SEQ ID NO:60]

在后述实施例 8 证实的编码猪型前体的 DNA 中, 表示其第 2 外显子区域的碱基序列。

- 10 [SEQ ID NO:61]

表示在后述实施例 9 证实的编码大鼠型前体变异体包括开放读框 (ORF) DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:62]

- 15 表示在后述实施例 9 证实的编码大鼠型前体变异体一部分的 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:63]

表示在后述实施例 9 证实的通过 SEQ ID NO:62 所示 DNA 碱基序列编码的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:64]

- 20 表示后述实施例 19 所使用的有义链引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:65]

表示后述实施例 19 所使用的反义链引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:66]

表示后述实施例 19 所使用的有义链引物的碱基序列。

- 25 [SEQ ID NO:67]

表示后述实施例 19 所使用的反义链引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:68]

表示编码后述实施例 19 所得到的结合蛋白的 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:69]

- 30 表示后述实施例 19 所得到的结合蛋白的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:70]

表示后述实施例 23 所使用的有义链的引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:71]

表示后述实施例 23 所使用的反义链引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:72]

5 表示后述实施例 23 所使用的 TaqMan 探针的部分寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:73]

表示后述实施例 23 所使用的有义链的引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:74]

表示后述实施例 23 所使用的反义链引物的碱基序列。

10 [SEQ ID NO:75]

表示后述实施例 23 所使用的 TaqMan 探针的部分寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:76]

表示后述实施例 23 所使用的有义链的引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:77]

15 表示后述实施例 23 所使用的反义链引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:78]

表示后述实施例 23 所使用的 TaqMan 探针的部分寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:79]

表示后述实施例 29 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

20 [SEQ ID NO:80]

表示后述实施例 29 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:81]

表示后述实施例 29 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:82]

25 表示后述实施例 29 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:83]

表示后述实施例 29 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:84]

表示后述实施例 30 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

30 [SEQ ID NO:85]

表示后述实施例 30 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:86]

表示后述实施例 30 所使用的合成 DNA 的碱基序列。

随后实施例 1 描述的大肠杆菌转化体 (*Escherichia coli*)INVαF'/pVH7U5Lh 于 2000 年 4 月 12 日保藏于日本国茨城县茨城市东 1-1-3 的
5 的通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-7130, 于 2000 年 4 月 18 日保藏于日本国大阪府大阪市十三本町 2-17-85 的财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO 16423。随后实施例 3 描述的大肠杆菌转化体(*Escherichia coli*) INVαF'/pVHNC5Lh 于 2000 年
10 4 月 18 日保藏于通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-7139, 于 2000 年 4 月 18 日保藏于日本国大阪府大阪市十三本町 2-17-85 的财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO 16424。在随后实施例 6 得到的质粒 pVHUPTr 于 2000 年 7 月 3 日保藏于日本国茨城县茨城市东 1-1-3 的
15 通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-7204。在随后实施例 6 得到的大肠杆菌转化体(*Escherichia coli*)TOP10/pVHUPTr 于 2000 年 7 月 17 日保藏于日本国大阪府大阪市十三本町 2-17-85 的财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO16455。在随后实施例 7 得到的质粒 pVHUPTrm 于 2000 年 7 月 3 日保藏于日本国茨城县茨城市东 1-1-3 的
20 通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-7205。在随后实施例 7 得到的大肠杆菌转化体(*Escherichia coli*)TOP10/pVHUPTrm 于 2000 年 7 月 17 日保藏于日本国大阪府大阪市十三本町 2-17-85 的财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO16454。在随后实施例 9 得到的大肠杆菌转化体 (*Escherichia coli*)TOP10/pVHABDr 于 2000 年 8 月 10 日保藏于日本国茨城县茨城市东
25 1-1-3 的通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-7268。于 2000 年 8 月 3 日保藏于日本国大阪府大阪市十三本町 2-17-85 的财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO16461。在随后实施例 19 得到的大肠杆菌转化体(*Escherichia coli*)BL21-Gold (DE3) /pETVHMMh 于 2001 年 2 月 1 日保藏于日本国大阪府大阪市十三本町 2-17-85 的财团法人
30 发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO16531。在随后实施例 14 得到的杂交瘤 HK4-144-10 于 2001 年 3 月 26 日保藏于茨城县茨城市东 1-1-3 的日本国经济

产业省产业技术综合研究所生命工学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-7520。

实施例

下面, 用实施例详述本发明, 但并非限制本发明的范围。使用大肠杆菌(*Escherichia coli*)进行基因操作按“分子克隆”的方法进行。

实施例 1 克隆编码新多肽的 cDNA

编码本发明新多肽的 cDNA 可以按照如下所述的 PCR 方法制得。首先以 SEQ ID NO: 1 所示的寡 DNA (CTGGCGGTATGGGTGCTGAC) 作为有义链, 以 SEQ ID NO: 2 所示的寡 DNA (ACTGGGGCATTGGTCCTGGTG) 作为反义链, 各自制备下列混合液 (50 μ l): 包括 5pmol、100mM Tris-盐酸缓冲液 (pH9.0) 5 μ l、500mM 氯化钾溶液 5 μ l、25 mM 氯化镁溶液 3 μ l、2.5 mM 脱氧核糖核酸溶液 4 μ l、以 Human Testis polyA⁺RNA(Clontech) 为 DNA 模板制备的 cDNA 溶液 1 μ l、以及 TaKaRa TaqTM 0.5 μ l。使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造 (株)) 首先在 95 $^{\circ}$ C 静止 1 分钟, 再以 95 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分为一个反应周期, 共扩增 35 个周期循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延长 10 分钟, 在这样的 PCR 反应程序中进行。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳最后的反应液, 用溴乙锭染色, 通过分子量标记的换算在 0.45kb 附近位置上确认为通过 PCR 反应而扩增得到的 DNA 相对应的染色带。接着用 GENE CLEAN APIN KIT (BIO101) 回收该 DNA 片段, 再用 pCR (注册商标) 2.1 (In Vitrogen) 克隆 TA, 将该质粒转入到大肠杆菌 INV α F' 感受态细胞中用以确定碱基序列。在含有氨苄西林 LB 琼脂培养基上出现的抗氨苄西林药物的转化体菌落中, 从该菌落中选择插入外源 DNA 片段的质粒克隆, 制备该质粒 DNA、pVH7U5Lh。为了鉴定所插入的 DNA 碱基序列, 以 pVH7U5Lh 为 DNA 模板, 将上述的 SEQ ID NO: 1 所示的寡 DNA 和 SEQ ID NO: 2 所示的寡 DNA 作为序列引物, 按照说明书的要求用 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造 (株)) 进行包括 ABI PRISMTM BigDye 终止子循环测序 (Terminator Cycle Sequencing) FS 备好的反应试剂盒 (Ready Reaction Kit) (Perkin-Elmer) 的序列反应, 然后, 将该反应材料用 DNA 序列仪 ABI PRISMTM 377 (Perkin-Elmer) 进行分析。

其结果表明, 在 pVH7U5Lh 中, 编码下列碱基序列: SEQ ID NO: 4 所示的第 49 位至第 494 位的碱基序列, 也就是说在由 SEQ ID NO: 3 所示的 142 个氨基酸组成的新多肽之中, 除了 N 末端的 9 个氨基酸残基之外, 编码相当与 C 末端的 133 个氨基酸残基序列的区域。在该氨基酸序列中, 发现了

5 胰岛素/胰岛素样生长因子/松弛素家族所具有的一级结构特征(通过 N 末端的疏水区域、碱性氨基酸残基所包裹, 并且含有 Cys 残基的 A 链(SEQ ID NO: 7) 及 B 链 (SEQ ID NO: 8))。

将如此获得的质粒 pVH7U5Lh 导入到大肠杆菌 INVαF' 中, 获得大肠杆菌转化体(*Escherichia coli*) INVαF'/pVH7U5Lh。

10

实施例 2 解析编码新多肽 cDNA 的 5'RACE 及 3'RACE

通过以下要领实施 5'RACE(Rapid Amplification of cDNA End)PCR 和 3'RACE PCR 并对编码新多肽 cDNA 的全长进行分析。对于 RACE PCR 的 DNA 模板来说, 使用 MarathonTM-Ready cDNA Human Testis (Clontech)。以

15 实施例 1 得到的 pVH7U5Lh 插入到 DNA 序列中, 以此为模板, 在 5'RACE PCR 第一次 PCR 反应中, 分别使用了反义链: SEQ ID NO: 9 所示的寡 DNA 引物, 有义链引物为 MarathonTM-Ready cDNA Human Testis 所附的 AP1。在嵌套式聚合酶反应 (nested PCR) 中, 各使用了反义链: SEQ ID NO: 10 所示的寡 DNA 引物, 有义链引物为 MarathonTM-Ready cDNA Human Testis 所

20 附的 AP2。反应条件完全按照试剂盒上所附的说明书进行, PCR 循环第一次为 35 次, 后续的嵌套式聚合酶反应 (nested PCR) 为 20 次。用 2.0%琼脂糖凝胶分离扩增的 PCR 片段, 再电泳析出回收之后, 将 SEQ ID NO: 10 所表示的合成 DNA 用于序列引物, 直接确定了该 PCR 片段的碱基序列。其结果显示: SEQ ID NO: 4 所示的第 1 位至第 48 位的碱基序列以及 SEQ ID NO:

25 3 所示的第 1 位至第 9 位的氨基酸序列为新合成的序列。

按照以下要领实施以实施例 1 中得到的插入 DNA 序列的 pVH7U5Lh 为模板的 3'RACE PCR, 在第一次 PCR 反应中, 以 SEQ ID NO: 5 所示的寡 DNA 为有义链引物, 以 MarathonTM-Ready cDNA Human Testis 所附的 AP1 为无义链引物, 在后续的嵌套式聚合酶反应 (nested PCR) 中, 又以 SEQ ID

30 NO: 11 所示的寡 DNA 为有义链引物, 以 MarathonTM-Ready cDNA Human Testis 所附的 AP2 为无义链引物。用 2.0%琼脂糖凝胶电泳最后的反应液, 用

溴乙锭染色,恰好在 0.7kb 位置上检测到 RACE PCR 产物的染色带。进而利用 Quick Gel Extraction Kit (Qiagen)回收并纯化该 DNA 片断,用 pCRTM2.1-Topo(In Vitrogen)克隆 TA,将该质粒导入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 株的感受态细胞以测定碱基序列。在含有氨苄西林 LB 琼脂培养基上

5 出现的抗氨苄西林转换体菌落中,并从菌落中选择插入外源 DNA 片断的质粒克隆 4,再从同一克隆中制备各种质粒之后来确定 DNA 插入片断的碱基序列。从结果可知,在所有的克隆质粒中,均插入下列 DNA 片断:继 SEQ ID NO: 4 所示第 413 位至第 1061 位的碱基序列之后,进一步在其 3'端附加了 poly A 序列,所述碱基序列是以 SEQ ID NO: 11 所示嵌入引物(nested

10 primer)为起点。以上结果表明,SEQ ID NO: 4 的开放可读框已经被确定,从该开放可读框编码的 SEQ ID NO: 3 所示蛋白质的特征(由信号序列、碱性氨基酸残基所包裹并且 A 链(SEQ ID NO: 7)及 B 链(SEQ ID NO: 8)均具有 Cys 残基)上来看,本发明新型蛋白质是一种具有调节机体分泌功能的新前体蛋白质,其属于胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族(图 1)。

15

实施例 3 克隆编码新型多肽(前体多肽)的全长 cDNA

按照以下 5'RACE 方法获得编码本发明新型多肽(前体多肽)的全长 cDNA。

用 5'RACE 系统(GIBCO BRL)通过以实施例 1 得到的 pVH7U5Lh 插入 DNA 序列为模板制作的 SEQ ID NO: 13 所示寡 DNA (GGGCAGGGGTCTCTGTGT)为引物,通过反转录而制备了 cDNA 溶液,该反转录是以 Human Testis polyA⁺ RNA (Clontech)为模板而进行的。再以制备的 cDNA 为模板,以 5'RACE 系所附的 AAP 作为有义链引物,以 SEQ ID NO: 13 所示寡 DNA 作为反义链引物进行第一次 PCR 反应。然后再以实施

20 例 1 中得到的 pVH7U5Lh 插入 DNA 序列为模板制作的 SEQ ID NO: 14 所示寡 DNA (TTCAAAGCATCTCCGTCCAGC)为有义链引物,以前面所述的 SEQ ID NO: 2 所示寡 DNA (ACTGGGGCATTGGTCCTGGTG)为反义引物,进行嵌套式聚合酶反应(nested PCR)。用 1.0%琼脂糖凝胶电泳最后的反应液,用溴乙锭染色,恰好在 0.5kb 位置上检测到染色带。接着用 GENE

25 CLEAN APIN KIT (BIO101)回收该 DNA 片段,用 pCR(注册商标)2.1(In Vitrogen)克隆 TA,将该质粒转入到大肠杆菌系 INV α F'感受态细胞中用以

30

确定碱基序列。在含有氨苄西林 LB 琼脂培养基上出现的抗氨苄西林药物的转化体菌落中，从该菌落中选择插入外源 DNA 片段的质粒克隆，制备该质粒 DNA、pVHNC5Lh。为了确定所插入的 DNA 碱基序列，以 pVHNC5Lh 为 DNA 模板，将上述的 SEQ ID NO: 14 所示的寡 DNA
5 (TTCAAAGCATCTCCGTCCAGC) 和 SEQ ID NO: 2 所示的寡 DNA (ACTGGGGCATTGGTCCTGGTG) 作为序列引物，按照说明书的要求用 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造 (株)) 进行包括 ABI PRISM™ BigDye 终止子循环测序 (Terminator Cycle Sequencing) FS 备好的反应试剂盒 (Ready Reaction Kit) (Perkin-Elmer) 的序列反应，然后，将该反应材料用 DNA 序列仪 ABI PRISM™ 377 (Perkin-Elmer) 进行分析。
10

以上实验结果证明，在 pVHNC5Lh 里，包含 SEQ ID NO: 4 所示第 1 位至第 494 位的碱基序列，即包含开放可读框 (ORF)，该开放可读框 (ORF) 编码 SEQ ID NO: 3 所示的由全部 142 个氨基酸组成的新型多肽 (图 1)。

将由上述得到的质粒 pVHNC5Lh 导入到大肠杆菌 INCαF' 并获得转化体
15 Escherichia coli INCαF'/pVHNC5Lh。

实施例 4 分析新型多肽在组织中表达的分布

通过下列 PCR 法研究新型多肽在组织中的表达。首先，以 SEQ ID NO: 5 所示寡 DNA (CCGGATGCAGATGCTGATGAA) 为有义链引物，以 SEQ ID
20 NO: 6 所示寡 DNA (TGGTCAAAGGGCAGGGTTGG) 为反义链引物，各自制备下列混合液 25 μl: 它包括 2.5pmol、100mM Tris-盐酸缓冲液 (pH9.0) 2.5 μl、500mM 氯化钾溶液 2.5 μl、25 mM 氯化镁溶液 1.5 μl、2.5 mM 脱氧核糖核酸溶液 2 μl、作为 DNA 模型的 Human multiple tissue cDNA (MTC™) panels (Clontech) 各种组织不同的 cDNA 溶液各 1 μl、以及 TaKaRa Taq™
25 0.25 μl，使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造 (株))，首先在 95℃ 静置 1 分钟后，再以 95℃ 30 秒、66℃ 1 分、72℃ 1 分为一个反应周期，共扩增 35 个周期进行 PCR 反应。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳最后的反应液，用溴乙锭染色，确定扩增产物的产生与否。其结果证实：编码新型多肽的 DNA 也就是 0.45kbDNA 片段，该片段主要是从胎盘、肺、睾丸、垂体等溶液中
30 检测出来的，由此可证明本发明新型多肽在该组织中进行了表达 (图 2)。

实施例 5 对编码新型多肽（前体多肽）的大鼠相似物和小鼠相似物的染色体基因和 cDNA 序列进行分析

为了克隆由 cDNA 编码的在实施例 3 得到的人体新型多肽（前体多肽）大鼠相似物和小鼠相似物，首先，根据下述的基因组步移法（genome walking）来分析两种动物的染色体基因结构。用大鼠染色体 DNA Rat Genome Walker™ Kit（Clontech）作为被检材料，同时用小鼠染色体 DNA Mouse Genome Walker™ Kit（Clontech）作为被检材料。在该方法中，除了作为 PCR 反应的酶为 TaKaRa Taq™（宝酒造（株））之外，其它各自按照试剂盒说明书的要求进行实施。当第一次向 5'上游方向进行基因组步移的时候，首先，把编码 SEQ ID NO: 12 所示人体新型多肽（前体多肽）cDNA 的碱基序列作为问题提出来并从已经公开的 EST（Expressed Sequence Tag）数据库中寻找，寻找到的 EST、AW523625 以及 AW521175 碱基序列被为包含 cDNA 3' 侧的部分区域，该 cDNA 编码多肽的大鼠相似物，再以所述序列为模板合成 3 种寡 DNA 序列 [R1（SEQ ID NO: 27）、R2（SEQ ID NO: 28）、R3（SEQ ID NO: 29）]，作为特异引物（gene specific primer），其中所述 3 种序列与上述碱基序列的一部分碱基序列互补。其结果，在大鼠染色体 DNA 的 1st PCR 反应中使用 L1，在嵌套式聚合酶（nested PCR）反应中使用 R2，而在小鼠染色体 DNA 的 1st PCR 反应中使用 R1，在嵌套式聚合酶（nested PCR）反应中使用 R2，从而各自获得了特异的扩增 DNA 片断。关于这些 DNA 片段可以依据已经叙述的实施例方法进行确定，它们来自以末端引物（AP2）为末端侧的每个基因组的碱基序列，再以该序列为模板，继续第二次向 5'上游方向进行基因组步移从而设计了新的特异引物。也就是共有 4 种寡 DNA，即在大鼠染色体 DNA 的 1st PCR 反应中使用 R8（SEQ ID NO: 30），在接下一个 PCR 反应中使用 R9（SEQ ID NO: 31），而在小鼠染色体 DNA 的 1st PCR 反应中使用 R6（SEQ ID NO: 32），在嵌套式聚合酶（nested PCR）反应中使用 R7（SEQ ID NO: 33）。用这些引物再次以同样的条件对 Rat Genome Walker™ Kit、Mouse Genome Walker™ Kit 每个 DNA 标样进行 PCR 反应，大鼠和小鼠均从新获得了特异扩增 DNA 片段。因此，在前一次基因组步移法得到的 DNA 片段同时确定每个扩增 DNA 片段的碱基序列，比较并分析了与实施例 3 中得到的编码本发明人体新型多肽（前体多肽）cDNA 的碱基序列之间的同源性。

其结果表明, 新型多肽(前体多肽)的大鼠相似物是从以上实验证明的基因组碱基序列和上述已经公开的 EST (AW523625 以及 AW521175) 中得出, 其作为一种通过 SEQ ID NO: 18 所示 420 个碱基 DNA 编码的 SEQ ID NO: 17 所示的 140 个氨基酸残基组成的多肽, 另外, 还表明该基因在大鼠染色体上由 2 个外显子(exon)所构成其中包含 1 个中间序列, 在 420 个碱基中, 第 1 个外显子由 SEQ ID NO: 41 所示 184 个碱基编码, 而第 2 个外显子由 SEQ ID NO: 42 所示 236 个碱基所编码。该多肽与人体新型多肽(前体多肽)一样都具有胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族的序列特征, 即由信号序列和碱性氨基酸残基所包裹并且 A 链(SEQ ID NO: 19)及 B 链(SEQ ID NO: 21)均具有 Cys 残基。另外, 该大鼠新型多肽与人体新型多肽具有 75.0% 的同源性。

还有, 小鼠通过从上述实验也被认为是本申请新型多肽相似物基因的 5' 侧区域的序列, 进一步将 3' 侧的序列和 mRNA 的表达一起用于研究而进行 3'RACE PCR。在 RACE PCR 模板 DNA 中, 用 MarathonTM-Ready cDNA Mouse Testis (Clontech) 作为特异序列, 通过第一次基因组步移法得到的第 2 外显子的序列中设计 2 种寡 DNA[U1 (SEQ ID NO: 34)、U2 (SEQ ID NO: 35)]并分别进行了化学合成。在 1st PCR 反应里, U1 为有义链引物, MarathonTM-Ready cDNA Mouse Testis 所附 AP1 为反义链引物, 在嵌套式聚合酶(nested PCR)反应里, U2 为有义链引物, MarathonTM-Ready cDNA Mouse Testis 所附 AP2 为反义链引物。这些 PCR 反应的结果, 获得最终扩增产物的单一 DNA 片段, 通过已知方法决定碱基序列, 此时在该 DNA 片段里包含起点 U2 至小鼠第 2 外显子区域的终止密码子, 而且在其 3' 侧非翻译区域的末端存在有 poly A 信号序列和 poly A 序列。从该 cDNA 部分序列和在本实施例中得到的小鼠染色体上 DNA 片段的一级结构上来看, 新型多肽(前体多肽)小鼠相似物为, 由 SEQ ID NO: 24 所示 423 个碱基 DNA 所编码的、并由 SEQ ID NO: 23 所示 141 个氨基酸残基所组成的多肽, 另外, 还表明该基因同大鼠一样, 在染色体上由 2 个外显子(exon)所构成其中包含 1 个中间序列, 在 423 个碱基中, 第 1 个外显子由 SEQ ID NO: 43 所示 187 个碱基编码, 而第 2 个外显子由 SEQ ID NO: 44 所示 236 个碱基所编码。该多肽不仅具有与人体新型多肽得结构特征, 同时还与上述大鼠新型多肽一样都具有胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族的序列特征, 即在该小鼠多肽

里包含由信号序列和碱性氨基酸残基所包裹并且 A 链 (SEQ ID NO: 19) 及 B 链 (SEQ ID NO: 21) 均具有 Cys 残基。另外, 该小鼠新型多肽与人体新型多肽、大鼠新型多肽之间的同源性分别为 77.3%, 92.1%, A 链及 B 链的氨基酸序列完全与上述的大鼠相同。

5

实施例 6 克隆一种编码新型多肽 (前体多肽) 的大鼠相似物全长 cDNA

按照以下要领实施 PCR 反应并获得编码本发明新型多肽大鼠相似物全长的 cDNA。

首先, 以在实施例 5 中得到的新型多肽小鼠相似物基因的 5' 侧非翻译区
10 域的碱基序列为模板化学合成的寡 DNA (UP (SEQ ID NO: 36)) 为有义链引物, 以实施例 5 所述公开 EST、AW523625 以及 AW521175 碱基序列为模板化学合成的寡 DNA (RL (SEQ ID NO: 37)) 为反义链引物, 各自制备下列混合液 50 μ l: 它包括 5pmol、100mM Tris-盐酸缓冲液 (pH8.3) 5 μ l、500mM 氯化钾溶液 5 μ l、25 mM 氯化镁溶液 3 μ l、2.5 mM 脱氧核糖核酸溶液 4 μ l、
15 从模板 DNA 的 SD 大鼠 (9 周龄) 睾丸的总 RNA 制备的 cDNA 溶液 4 μ l、以及 TaKaRa TaqTM 0.5 μ l。然后对该混合液使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造 (株)), 首先在 95 $^{\circ}$ C 静止 1 分钟后, 再以 95 $^{\circ}$ C 30 秒、67 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分为一个反应周期, 共扩增 40 个周期, 进一步在 72 $^{\circ}$ C 10 分的反应程序中进行 PCR 反应。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳最后的反应液, 用溴乙锭染色,
20 通过分子量标记的换算在 0.45 附近的位置上通过 PCR 反应扩增的 DNA 确定所对应的染色带。接着用 GENE CLEAN APIN KIT (BIO101) 回收该 DNA 片段, 用 pCR (注册商标) 2.1-TOPO (In Vitrogen) 克隆 TA, 将该质粒转入到大肠杆菌 TOP10 菌株的感受态细胞 (In Vitrogen) 中以确定碱基序列。在含有氨苄西林 LB 琼脂平板培养基上培养而出现的抗氨苄西林药物的转化
25 体菌落中, 从该菌落中选择插入外源 DNA 片段的质粒克隆, 制备该质粒 DNA、pVHUPTr, 确定插入的 DNA 片段碱基序列。

以上实验结果证明, 在 pVHUPTr 里, 包含 SEQ ID NO: 39 所示 470 个碱基对的 DNA 片段, 该片段包括由 SEQ ID NO: 18 所示 420 个碱基所组成的开放可读框 (ORF), 所述开放可读框编码由 SEQ ID NO: 17 所示 140 个
30 氨基酸所组成的新型多肽前体大鼠相似物。

将上述得到的质粒 pVHUPTr, 其中的 DNA 编码大鼠新型多肽(前体多肽), 导入到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10 菌株, 获得了转化体 *Escherichia coli* TOP10/pVHUPTr。

5 实施例 7 克隆一种编码新型多肽(前体蛋白质)的小鼠相似物全长 cDNA

按照以下要领实施 PCR 反应并获得编码本发明新型多肽小鼠相似物全长的 cDNA。

首先, 以在实施例 5 中得到的新型多肽小鼠相似物基因的 5' 侧非翻译区域的碱基序列为模板化学合成的寡 DNA (UP (SEQ ID NO: 36)) 作为有义链引物, 再以实施例 5 所得到的小鼠 cDNA 部分序列为模板化学合成的寡 DNA (ML (SEQ ID NO: 38)) 为反义链引物, 各自制备下列混合液 50 μ l: 它包括 5pmol、100mM Tris-盐酸缓冲液 (pH8.3) 5 μ l、500mM 氯化钾溶液 5 μ l、25 mM 氯化镁溶液 3 μ l、2.5 mM 脱氧核糖核酸溶液 4 μ l、DNA 模板 MarathonTM-Ready cDNA Mouse Testis (Clontech) 4 μ l、以及 TaKaRa TaqTM 0.5 μ l。然后对该混合液使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造 (株)) 首先在 95 $^{\circ}$ C 静止 1 分钟后, 再以 95 $^{\circ}$ C 30 秒、67 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分为一个反应周期, 共扩增 40 个循环周期, 进一步在 72 $^{\circ}$ C 10 分的反应程序中进行 PCR 反应。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳最后的反应液, 用溴乙锭染色, 通过分子量标记的换算在 0.45kb 附近的位置上通过 PCR 反应扩增的 DNA 确定所对应的色带。接着用 GENE CLEAN APIN KIT (BIO101) 回收该 DNA 片段, 用 pCR (注册商标) 2.1-TOPO (In Vitrogen) 克隆 TA, 将该质粒转入到大肠杆菌 TOP10 菌株的感受态细胞 (In Vitrogen) 中以确定碱基序列。在含有氨苄西林 LB 琼脂平板培养基上培养而出现的抗氨苄西林药物的转化体菌落中, 从该菌落中选择插入外源 DNA 片段的质粒克隆, 制备该质粒 DNA、pVHUPTrm, 确定插入的 DNA 片段碱基序列。

以上实验结果证明, 在 pVHUPTrm 里, 包含 SEQ ID NO: 40 所示 475 个碱基对的 DNA 片段, 该片段包括由 SEQ ID NO: 24 所示 423 个碱基所组成的开放可读框 (ORF), 所述开放可读框编码由 SEQ ID NO: 23 所示 141 个氨基酸所组成的新型多肽前体小鼠相似物。

将携带编码本发明所得小鼠新型多肽(前体蛋白质)质粒 pVHUPTM 导入大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10 菌株,获得了转化体 *Escherichia coli* TOP10/pVHUPTM。

5 实施例 8 对编码新型多肽(前体蛋白质)猪的相似物染色体基因的分析

首先,按照下述 PCR 法获取编码部分猪型新型多肽(前体蛋白质)的 DNA 片断。也就是说,制备一种 40 μ l 的混合液,该混合液不仅包含 20pmol 的 SEQ ID NO: 53(ex1F1)所示寡 DNA 的有义链引物和 20pmol 的 SEQ ID NO: 54(ex1R1)所示寡 DNA 的无义链引物,而且,还包含 20 μ l 的 Premix TaqTM(Ex TaqTM Version 宝酒造(株)),以及 1 μ l 的猪型基因 DNA((Clontech)、#6651-1)作为模板 DNA,再使用热循环仪(GeneAmpTM PCR system model 9700 (PE Biosystems))循环 30 个周期,即先在 94 $^{\circ}$ C 下进行 2 分钟,然后以 94 $^{\circ}$ C 10 秒、55 $^{\circ}$ C 10 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒的循环进行。进一步在 72 $^{\circ}$ C 延长 1 分钟 30 秒反应,在这样一种程序中进行 PCR 反应。用 2.0%琼脂糖凝胶使最后反应液电泳,然后用溴乙锭染色,确定一条染色带其对应于通过 PCR 扩增形成的 DNA。使用 QIA quick Gel Extraction Kit(Qiagen)回收该 DNA 片断,用 pCRTM2.1-Topo(In Vitrogen)克隆 TA,将该质粒导入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 的感受态细胞(东洋纺织(株))以确定碱基序列。在含有氨苄西林 LB 琼脂培养基上出现的抗氨苄西林转换体菌落中,选择插入外源 DNA 片断的质粒克隆,再次在含有氨苄西林的条件下培养,以该培养的克隆制备得到的该质粒 DNA 为模板,以市售的引物 DNA(PRM-007, PRM-008(东洋纺织(株)))为序列引物,按照所附商品说明 ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(PE Biosystems)的条件在热循环仪(GeneAmpTM PCR system model 9700(PE Biosystems))上确定插有 DNA 的碱基序列,然后用 DNA 测序仪 ABI PRISMTM 377(PE Biosystems)分析反应材料。

其结果证实,该 PCR 产物在两末端具有所述的引物,并且在其内侧不仅包含 SEQ ID NO: 55 所示的碱基序列,其碱基序列编码猪型前体蛋白质 N 末端经由信号肽至 B 链肽的 DNA 片断,该 DNA 片断为 SEQ ID NO: 56 所示 239 个碱基对的 DNA 片断。接着,关于编码猪型前体蛋白质的染色体基因,通过所述碱基序列进一步进行 genome walking 以研究 3' 下游区的构造。

针对上述猪型基因 DNA 用 Universal Genome Walker™ Kit(Clontech)加工的 genome walking 文库 DNA 作为被检材料,其操作方法遵循实施例 5 中的 Rat Genome Walker™ Kit 和 Mouse Genome Walker™ Kit(Clontech)。首先分别进行 gene specific primer 的化学合成,它包括相当于 SEQ ID NO: 56 所示碱基

5 序列一部分的 2 种寡 DNA(PORex1F1(SEQ ID NO: 57)、PORex1F2(SEQ ID NO: 58)),在 1st PCR 反应中先使用 PORex1 F1,然后在 nested PCR 反应中使用 PORex1F2。就这些反应所得各种扩增的 DNA 片断来说,遵循所述方法确定碱基序列,起点部位为 PORex1F2 引物序列,并在比较编码人、小鼠和大鼠前体蛋白的 cDNA 碱基序列之间的同源性的同时分析它们各自的碱

10 基序列。结果表明,从确定的基因组一级构造上来看,新型多肽(前体蛋白质)的猪型相似物为由 SEQ ID NO: 45 所示的 140 个氨基酸残基所组成的多肽,所述多肽是由 SEQ ID NO: 46 所示 420 个碱基 DNA 编码的;另外该基因由 2 个外显子(exon)所组成其中包括 1 个中间序列,在 420 个碱基中,第 1 个外显子由 SEQ ID NO: 59 所示 193 个碱基编码,而第 2 个外显子由

15 SEQ ID NO: 60 所示 227 个碱基所编码。该多肽与人体新型多肽(前体蛋白质)一样都具有胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族的序列特征,即在该猪型多肽里包含由信号序列、碱性氨基酸残基所包裹并且 A 链(SEQ ID NO: 47)及 B 链(SEQ ID NO: 49)均具有 Cys 残基。另外,该猪型新型多肽与人体前体蛋白、小鼠前体蛋白和大鼠前体蛋白之间氨基酸水平的同源性分别

20 为 77.1%, 70.0%, 67.1%。

实施例 9 克隆一种编码大鼠肠系膜脂肪组织新型多肽(前体蛋白质)变异体的全长 cDNA

按照以下要领实施 PCR 反应获得编码大鼠肠系膜脂肪组织新型多肽(前

25 体蛋白质)变异体全长的 cDNA。

首先,在实施例 6 中使用的寡 DNA 之中,以 UP (SEQ ID NO: 36)为有义链引物,以 RL (SEQ ID NO: 37)为反义链引物,各自制备下列混合液 50 μ l: 它包括 5pmol、100mM Tris-盐酸缓冲液 (pH8.3) 5 μ l、500mM 氯化钾溶液 5 μ l、25 mM 氯化镁溶液 3 μ l、2.5 mM 脱氧核糖核酸溶液 4 μ l、

30 以大鼠肠系膜脂肪组织总 RNA 为 DNA 模板而制备的 cDNA 溶液 1 μ l、以及 TaKaRa Taq™ 0.5 μ l。然后对该混合液使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler

MP (宝酒造 (株)), 首先在 95℃ 静止 1 分钟后, 以 95℃ 30 秒、67℃ 1 分、72℃ 1 分为一个反应周期, 共扩增 35 个循环周期, 然后进一步在 72℃ 10 分的反应程序中进行 PCR 反应。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳最后的反应液, 用溴乙锭染色, 通过分子量标记的换算在 0.6kb 附近的位置上通过 PCR 反应扩增的 DNA 确定所对应的色带。接着用 GENE CLEAN APIN KIT (BIO101) 回收该 DNA 片段, 用 pCR (注册商标) 2.1-TOPO (In Vitrogen) 克隆 TA, 将该质粒转入到大肠杆菌 TOP10 菌株的感受态细胞 (In Vitrogen) 中以确定碱基序列。当含有氨苄西林 LB 琼脂培养基上出现抗氨苄西林药物的转化体菌落时, 在该菌落中选择插入外源 DNA 片段的质粒克隆, 制备该质粒 DNA、pVHABDr。以 pVHABDr 为 DNA 模板, 市售的引物 DNA (PRM-007, PRM-008 (东洋纺织 (株))) 为序列引物, 按照所附商品说明 ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) 的要求, 在热循环仪 (GeneAmp™ PCR system model 9700 (PE Biosystems)) 上测定插有 DNA 的碱基序列, 然后用 DNA 测序仪 ABI PRISM™ 377 (PE Biosystems) 分析反应材料。

以上实验结果证明, 在 pVHABDr 里, 插有 SEQ ID NO: 61 所示 572 个碱基对的 DNA 片段, 该片段包括开放可读框 (ORF), 所述开放可读框编码由 SEQ ID NO: 51 所示 174 个氨基酸组成的新型多肽 (前体多肽) 变异性, 而所述变异性又由 SEQ ID NO: 52 所示 522 个碱基所组成的 DNA 编码而来。该多肽变异性具有胰岛素/胰岛素样生长因子/松驰素家族的序列特征, 也就是说, 与实施例 5 和 6 中所述的新型多肽 (前体多肽) 大鼠型相似物完全一样, 具有由信号序列和碱性氨基酸残基所包裹并且 A 链 (SEQ ID NO: 19) 及 B 链 (SEQ ID NO: 21) 均具有 Cys 残基, 同时还具有如下所述的构造, 即在实施例 5 所述地新型多肽 (前体多肽) 大鼠型相似物的第 1 外显子和第 2 外显子之间有 1 个中间序列并插有一种多肽, 该多肽由来自于该中间序列的一部分, 由 SEQ ID NO: 62 所示 102 碱基组成的 DNA 所编码并由 SEQ ID NO: 63 所示 34 个氨基酸残基组成。

将如此得到的质粒 pVHABDr 导入到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10 菌株, 获得了转化体 *Escherichia coli* TOP10/pVHABDr。

30

实施例 10 建立人体新型多肽基因表达 AtT20 细胞系

用限制性内切酶 EcoRI 消化在实施例 3 中得到的质粒 pVHNC5Lh, 所述该质粒中插有编码新型多肽的 DNA 片段, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳最终的反应溶液, 然后从该凝胶上回收 2 条带其为 0.15kb 和 0.35kb。通过 EcoRI 消化哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1 (-) (Invitrogen), 用 Calf intestine alkaline phosphatase (宝酒造 (株)) 进行脱磷酸化反应, 将反应后的最后溶液再用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 然后从该凝胶上回收相当于约 5.5kb 的泳带。用 DNA Ligation Kit ver.2 (宝酒造 (株)) 使上述的 DNA 片段进行联结反应, 把其反应液加入到 coli JM109 Competent Cells (宝酒造 (株)) 中使之转化。从得到的抗氨苄西林药物的菌落中筛选一种质粒克隆, 该质粒在载体插入部位的 CMV 启动子一端插入 0.15kb EcoRI 片段, 在 polyA 信号一端插入 0.35kb EcoRI 片段, 共插入了 0.5kb 的 DNA 片段。用 Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) 从再培养的菌体中大量地建立所述的质粒。

利用 Lipofectin (GIBCO-BRL), 按照所附使用说明书方法将上述的质粒转导至小鼠脑垂体肿瘤细胞系 AtT20 (大日本制药)。在含有 10%FCS、青霉素 (100 单位/ml)、链霉素 (100 μ g/ml) 以及 G418 (500 μ g/ml) 的 DMEM 中筛选能够生长的菌落并得到人体新型多肽基因表达 AtT20 细胞系。

实施例 11 制备一种包含新型多肽 (人型) A 链 N 端肽的免疫原及其免疫

制备上述实施例 3 所得到的新型多肽 (人型) A 链 N 端肽 AspValLeuAlaGlyLeuSerSerSerCys (SEQ ID NO: 7 的 N 端 (1-10)) 部分序列: 按照公知方法合成的) 和血青蛋白 (KLH) 的复合物作为免疫原, 也就是说, 使 20mg 的 KLH 溶解于 2.0ml 的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH6.7), 与含有 2.8mg 的 N-(γ -顺丁烯二酰亚胺丁酰氧) 琥珀酰亚胺 (GMBS) 的 DMSO 溶液 200 μ l 混合, 室温下反应 30 分钟。通过经过含有 2mMEDTA 的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH6.5) 平衡的 Sephadex G-25 柱除去过量的 GMBS 试剂之后, 将导入有顺丁烯二酰亚胺的 KLH (5mg) 和溶解于 0.1ml 的 DMSO 中的 A 链 N 端肽 (0.84mg) 混合, 4 $^{\circ}$ C 下过夜反应。反应后在 4 $^{\circ}$ C 下用生理盐水透析 2 天。

给 8 周龄的 BALB/C 小鼠 (雌性), 同时皮下注射完全福氏佐剂和免疫上述的 A 链 N 端肽-KLH 复合物 (约 0.1mg/只)。3 周后与不完全福氏佐剂一起追加同样量的免疫原, 并在 1 周后采血。

实施例 12 西洋辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 A 链 N 端肽的制备

使上述的 A 链 N 端肽和 HRP(用于酶免疫测定法,Boehringer Mannheim)偶联,作为酶免疫测定法(EIA)的标记物。也就是说,在 2.3ml 的 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.7)中溶解 23mg 的 HRP,并与含有 1.6mg GMBS 的 DMF 溶液(0.23ml)混合,室温反应 30 分钟后,上样于经过含有 2mM EDTA 的 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.5)平衡的 Sephadex G-25 柱。再混合已制备的携有顺丁烯二酰亚胺的 KLH (2.3mg)和 A 链 N 端肽(1mg),4℃下反应 1 天。反应完成后,通过用 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.5)平衡的 Ultrogel AcA54(Pharmacia)Sephadex G-25 柱分离,得到 HRP 标记的 A 链 N 端肽。

实施例 13 经过 A 链 N 端肽免疫的小鼠抗血清抗体滴度的测定

按照以下方法测定小鼠抗血清中的抗体滴度。首先,在 96 孔微量平板的小个孔里分别注入 0.1ml 的 0.1M 碳酸缓冲液(pH9.6)其中包含抗山羊小鼠免疫球蛋白抗体(IgG 级分,Cappel),4℃下静置 24 小时以制备抗小鼠免疫球蛋白抗体结合微量平板。接着用磷酸生理盐水缓冲液(PBS、pH7.4)洗涤平板,为了封闭孔中剩余的结合部位再分别向每个小孔中注入 0.3ml 的 25%封闭剂(雪印乳业)和含有 0.05%NaN₃ 的 PBS (pH7.2),4℃下至少处理 24 小时。

在抗小鼠免疫球蛋白抗体结合微量平板的每小孔里,加入用缓冲液-EC[0.2%BSA、0.4M NaCl、0.4%封闭剂、0.05%CHAPS (3-(胆胺丙基(二甲胺基)丙烷磺酸)、2mM EDTA 以及含有 0.05%NaN₃ 的 0.02M 磷酸缓冲液(pH7.0)]稀释的小鼠抗血清 0.14ml,4℃下反应 16 个小时。然后用 PBS (pH7.4)洗涤该平板,再加入上述实施例 12 制备的 HRP 标记 A 链 N 端肽(0.1ml),4℃下反应 1 天,所述 HRP 标记 A 链 N 端肽是用缓冲液-C[1%BSA、0.4M NaCl 以及含有 2mM EDTA 的 0.02M 磷酸缓冲液(pH7.0)]稀释 1000 倍而成。接着用 PBS (pH7.4)洗涤该平板,测定固相上的酶活性,该测定是通过在室温下加入 0.1ml 的 TMB 微孔过氧化物酶底物系(KIRKEGAARD & PERRY LAB. Funakoshi 药品处理)反应 5 分钟。加入 0.1ml 的 1M 磷酸终止反应,用平板读取仪(MTP-120 Corona 或 Multiskan Ascent、Labsystems

)检测 450nm 的吸光值 (Abs.450)。结果如图 4 所示。经过免疫的 8 只小鼠均显示了 A 链 N 端肽抗体滴度的升高。

实施例 14 抗 A 链 N 端肽单克隆抗体的制备

- 5 对在实施例 13 中显示比较高的抗体滴度小鼠 No.1 和 No.7 进行最终免疫该免疫通过作为 KLH 的静脉内注射 A 链 N 端肽-KLH (0.08-0.1mg) 而完成。最终免疫经过 3 天, 摘除小鼠脾脏, 用不锈钢筛网压迫过滤, 并悬浮于 Eagle's Minimum Essential medium (MEM), 得到脾脏细胞悬浮液。用 BALB/C 小鼠骨髓瘤细胞 P3-X63.Ag8.U1 (P3U1) 作融合细胞 (Current Topics in
- 10 Microbiology and Immunology 81, 1 (1978))。细胞融合按照原始方法[Natura 256, 495 (1975)]进行。也就是, 用不含血清的 MEM 洗涤脾脏细胞及 P3U1 各 3 次, 使之混合达到脾脏细胞的数量与 P3U1 之间的比值为 6.6: 1, 再 750 转离心 15 分钟, 使细胞沉淀。彻底除去上清液, 轻轻倒出沉淀加 0.3ml 的 45%聚乙二醇 (PEG) 6000 (Kochlight), 37℃水槽中静止 7 分钟进行融合。
- 15 把 MEM 渐渐地添加到融合后的细胞, 一直加到 MEM 总共为 15ml 时, 再 750 转离心 15 分钟, 除去上清液。把这个细胞沉淀物悬浮于含有 10%牛胎儿血清的 GIT 培养基 (和光纯药) (GIT-10%FCS) 里使 P3U1 达到每 1ml 里有 2×10^5 个细胞, 在 24 多孔盘 (Linbro) 的每个小孔里各自播种 1ml, 共播种 168 个小孔。播种后, 在 37℃温度下 5%的 CO₂ 温箱中培养细胞。24 小时
- 20 后开始 HAT 选择培养, 该培养是通过在每个小孔内各自加入 1ml 的、含有 HAT (次黄嘌呤 1×10^{-4} M、氨嘌呤 4×10^{-7} M、胸腺嘧啶脱氧核苷 1.6×10^{-3} M) 的 GIT-10%FCS 培养基 (HAT 培养基)。该 HAT 选择培养在培养开始的 5 天、8 天之后, 倾去 1ml 废液, 然后继续添加 1ml HAT 培养基, 在细胞融合后的第 9 天取其上清液。
- 25 按照实施例 13 所述的方法进行上清液中的抗体滴度测定。即在抗小鼠免疫球蛋白抗体结合微量平板的每个小孔里, 加入 0.07ml 培养上清液和 0.07ml 的缓冲液-EC, 4℃下过夜反应。然后用缓冲液-C 稀释 1000 倍的 HRP 标记的 A 链 N 端肽 (0.1ml) 在没有标记的 A 链 N 端肽 (0.002mM) 的存在下或不
- 30 按照实施例 13 所述的方法测定固相上的酶活性。其结果, 168 个孔中被确认为具有特异性抗体滴度的有 31 个孔, 冷冻保存杂交瘤。关于 5 个孔的杂交

瘤即 No.14、No.43、No.144、No.146 以及 No.149，通过稀释法进行克隆。当克隆时，加入 BALB/C 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞使之每个孔达到 5×10^5 个细胞。克隆后，根据同样方法测定了培养上清液中的抗体滴度，在下列编号中筛选出阳性克隆：由 No.14 33 个孔中筛选 2 个孔，由 No.43 28 个孔中
5 筛选 1 个孔，由 No.144 25 个孔中筛选 23 个孔，No.149 58 个孔中筛选 15 个孔，No.146 288 孔中筛选 7 个孔。

从这些克隆中筛选出 No.144-10（杂交瘤 HK4-144-10）作为抗 A 链 N 端肽单克隆抗体产生杂交瘤。

10 实施例 15 杂交瘤的小鼠腹水以及单克隆抗体的纯化

注入杂交瘤 No.144-10 使小鼠腹水。首先向小鼠（BALB/C, 雌性）腹腔内注射 0.5ml 矿物油，然后针对该小鼠腹腔内注射（ $1-3 \times 10^6$ cell/只）杂交瘤之后，6-20 天后采取含有抗体的小鼠腹水。从该腹水中用蛋白 A 柱纯化单克隆抗体。也就是把约 25ml 的腹水用等量的结合缓冲液（3.5M NaCl、含
15 有 0.05% NaN_3 的 1.5M 甘氨酸（pH9.0））稀释以后，再上样于事先用结合缓冲液平衡的重组子蛋白 A-琼脂（Repligen）柱，用洗提缓冲液（含有 0.05% NaN_3 的 0.1M 枸橼酸缓冲液，pH3.0）析出特异性抗体。用 PBS(pH7.4) 的洗提液 4℃下，透析 2 天，然后用 0.22 μm 过滤器（Millipore）除菌过滤，4℃或-80℃下保存。将得到的单克隆抗体命名为 HK4-144-10。

20

实施例 16 自 AtT20 培养上清中纯化新型多肽（人型）

在含有 10%FCS 的 DMEM 或含有 5%FCS 的 OPTI-MEM 中添加 0.5mg/ml 的 G418，用该培养基培养实施例 10 所述新型多肽（人型）前体表达 AtT20。将 2L 量的培养上清通过结合有 HK4-144-10 的 Tresyl Toyopearl 固相（3.2ml
25 ），用 PBS(pH7.4)洗涤之后，再用 10ml 的 60%乙腈析出，该乙腈包含 0.1%TFA（三氟乙酸）。结合有 HK4-144-10 的 Tresyl Toyopearl 固相按照所添附的使用说明书使 125mg 的 HK4-144-10 与 5g 的 AF-Tresyl Toyopearl(TOSOH)结合。将洗提液冻干后，溶解于 0.5ml 的 40%乙腈，该乙腈包含 0.1%TFA（三氟乙酸），进而用含有 0.1%TFA 的乙腈（40%）并用其平衡的 TSK G3000PW 柱（7.8
30 $\times$ 300mm, TOSOH)的凝胶过滤分离，流速为 0.25ml/min，收集 2 分钟的作为级分 1。

根据竞争法-EIA 研究每个级分的免疫活性,该方法采用了上面所述实施例 15 的单克隆抗体、HK4-144-10 以及实施例 12 所述的 HRP 标记的 A 链 N 端肽。也就是说,在抗小鼠免疫球蛋白抗体结合微量平板上,加入通过含有 0.05%的 CHAPS 缓冲液-C(缓冲液-CC)稀释为 3ng/ml 的 HK4-144-10(0.05ml 5)、通过缓冲液-CC 进行梯度稀释(0, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10ng/ml)的 A 链 N 端肽或者通过缓冲液-CC 稀释 250 倍的所述凝胶过滤级分(0.05ml)、以及 HRP 标记的 A 链 N 端肽(用缓冲液-CC 稀释 6000 倍)(0.05ml)(, 4 °C 下反应 1 天。反应后, PBS(pH7.4) 洗涤, 根据上述实施例 13 所述的方法对固相上的酶活性进行测定。其结果是, 级分 No.19-21 被检测到了新型多 10 肽(人型)的免疫活性(约 1.8nmol), 该数值由 A 链 N 端肽的标准曲线换算而来。

根据同样的操作,除了新型多肽前体(人型)表达 AtT20 以外的培养上清(1L)中大约在 0.8nmol 也检测到了新型多肽(人型)的免疫活性。

接着用 TSK ODS-80TS 柱(4.6 × 250mm, TOSOH)从总量为 3L 的培养上清 15 中分离部分被纯化的新型多肽(人型)(其免疫活性大约在 2.6nmol)。洗提液的乙腈浓度的增高是在 40 分钟内以 17%-38%的梯度浓度(含有 0.05%TFA)而成。流速为 1ml/min, 收集 0.5 分钟作为级分 1, UV 峰值的吸光值为 215nm, 并用所述竞争法-EIA 检测出免疫活性。其结果如图 5 所示。主要的 UV 峰值 No.1、No.2 以及 No.3 分别与免疫活性级分编号 No.56、No.64 以及 No.65 一 20 致。关于这些级分进行了质谱分析(LCQduo、ThermoQuest)以及氨基酸序列分析(491cLC、Applied Biosystems)。其结果是, 从级分编号为 No.56 的质谱分析上来看, 得到了分子量为 2459.9 的值, 从氨基酸分析上也得到了 A 链 N 端肽、AspValLeuAlaGlyLeuSerSerSer (SEQ ID NO: 7 的 N 端(1-10)部分序列)。该分子量比 A 链还原型的分子量 2463.8 约小于 4, 因此可知, 25 对于级分编号 No.56 来说, 其氧化型 A 链为单独分离出来的。另一方面, 从级分编号 No.64 的质谱分析上来看, 得到了分子量为 5500.5 的值, 从氨基酸分析上也得到了混合序列, 即 B 链 N 端肽、ArgAlaAlaProTyrGlyValArgLeu (SEQ ID NO: 8 的 N 端(1-9)部分序列)以及 A 链 N 端肽、AspValLeuAlaGlyLeuSerSerSer (SEQ ID NO: 7 的 N 端(1-9)部分序列)。 30 该分子量大致与新型多肽(人型)的分子量 5500.4 一致, 所述多肽由包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 A 链和包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序

列的 B 链所组成，由此可知，级分编号 No.64 就是所述该新型多肽（人型）本身所分离出来的。还有，从级分编号 No.65 的质谱分析上来看，至少有 2 种成分被检测出来，主要成分的分子量为 5343.7，次要成分的分子量为 5272.8。新型多肽（人型）B 链的 N 端缺失氨基酸 Arg，以及又缺失了 Ala 的分子量各自为 5344.2 和 5273.1，与所看到的分子量大致相同，由此可推测主要成分为 B 链的 N 端缺失了氨基酸 Arg，而次要成分又进一步缺失 Ala。

上述结果证实：在 AtT20 细胞中，由新型多肽前体（人型）分泌并产生了一种新型多肽，实际上该多肽由包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 A 链和包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 B 链所组成。其结果又表明，氧化型 A 链可单独分泌产生。

实施例 17 对人体新型多肽纯化标样的人体单核细胞系 THP-1 细胞（大日本制药）的细胞内腺嘌呤核苷环化单磷酸（cAMP）产生的促进作用

下列用作实验的人体新型多肽纯化标样形成如下，按照所述实施例 16 的方法，在新型多肽前体（人型）表达 AtT20 细胞的其他批号培养上清液 3.5L 中经过其他用途纯化得到的新型多肽（人型），冻干包含该多肽的级分，加入 200 μ l 的缓冲液 A(PBS、1%BSA、0.05%CHAPS)溶解（浓度为 3.8 μ M）而成。将人体单核细胞系 THP-1 细胞悬浮于培养基 A(DMEM/F12(1:1)、10mM HEPES(pH7.5)、0.1%BSA、0.1mM3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx))使之细胞密度为 10^6 cell/ml，再将该细胞悬浮液分别注入（200 μ l）到 1.5ml 容积的微量试管中，37℃下温育 1 个小时。进一步用缓冲液 A 稀释，其稀释倍数分别为反应溶液的 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 倍，将这样稀释而成的人体新型多肽纯化标样溶液各为 25 μ l 添加至所述的细胞悬浮溶液中，再进一步把溶解于培养基 A 的毛喉素（和光纯药）溶液（最终浓度为 1 μ M）25 μ l 添加到细胞悬浮液中，然后 37℃下温育 30 分钟。3,000 rpm,5 分钟 4℃下离心使细胞沉淀，倾去上清液后，加 1ml 培养基 A，悬浮细胞，离心分离（3,000 rpm,5 分钟 4℃），弃去上清液后，把细胞悬浮于 250 μ l 的培养基 A 中。把 20%高氯酸溶液 50 μ l 加入该悬浮液之后，4℃下静止 20 分钟。离心分离（15,000 rpm、5 分钟、4℃）后，把 250 μ l 上清液移入到其他的 1.5ml 容积的微量试管中，加入 60mM HEPES、1.5M KOH 溶液，把这种中和了的溶液作为测定 cAMP 的样品。

通过cAMP EIA System(Amersham Pharmacia) 按照试剂盒所附的使用说明测定细胞内 cAMP 的含量。

其结果显示了人体新型多肽纯化标样对 THP-1 细胞的活性是随着浓度的增加细胞内 cAMP 的产生量也随之增大 (图 6)。

5

实施例 18 用微量分析仪分析人体新型多肽纯化标样对 THP-1 细胞系的细胞刺激作用

人体新型多肽纯化标样对 THP-1 细胞系的细胞刺激作用采用下述微量分析仪测定了细胞外的酸化率 (Acidification Rat)。首先, 在含有 10%FCS 的 RPMI 1640 培养基上进行悬浮培养, 将增殖的 THP-1 细胞悬浮于测定培养基 (low buffered RPMI(Molecular Decices, Ltd.)) (1×10^8 cells/ml), 进一步与琼脂糖细胞截留培养基(Molecular Decices, Ltd.)以 3: 1 的比例混合, 然后将混合液各分成 $7 \mu\text{l}$ 并分别注入到胶囊杯的中心处。琼脂糖经过固化后, 浸入到测定培养基中, 保持该状态在胶囊杯之上按照顺序插入垫片、胶囊插入片断, 最后用测定培养基将插入片断完全埋住进而制成了用于测定的胶囊。将该胶囊直接移入到传感器内, 并放在细胞测定微量分析仪 (CytosensorTM Micofysiometer Molecular Decices, Ltd.) 的主机上。传感器内的酸化率的测定以及数据分析均通过该装置中的操作程序 Cytosoft 进行。加速泵设定着测定培养基的流速, 当泵运转时其流速为 $100 \mu\text{l}/\text{min}$, 酸化率的测定以 2 分 30 秒为一个泵周期, 间歇时间为 40 秒。使用的待测材料是, 把实施例 16 得到的人体新型多肽纯化标样溶解于实施例 17 所述缓冲液 A(PBS, 1%BSA, 0.05%CHAPS)之后再用测定培养基稀释至 500 倍。把该稀释液装入设有 2 个程序的细胞测定仪流路, 然后通过切换指示灯将人体新型多肽溶液一定时间

观察到。并检测到该肽的细胞刺激活性。

实施例 19 表达人体新型多肽结合蛋白重组型大肠杆菌菌系的制作

30 以实施例 3 得到的质粒 pVHNC5Lh 为模板, 该质粒编码人体新型多肽
DNA 片断, 以 SEQ ID NO : 64 所示寡

DNA(CCGGATCCAGTCGGGCAGCGCCTTA)为有义链引物,以 SEQ ID NO: 65 所示寡 DNA(ATCTCGACTGCCCCGAAGAACC)为无义链引物,还有以 SEQ ID NO: 66 所示寡 DNA (CAGTCGAATGGATGTCCTGGCTGGC) 为有义链引物,以 SEQ ID NO: 67 所示寡 DNA(CCGGATCCTAGCAAAGGCTACTGATTTCA) 为无义链引物,用 LA-Taq 聚合酶(宝酒造)分别进行 PCR 反应。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳最后的反应液,通过各自的反应产生的 0.3kb 和 0.1kb DNA 片断自凝胶回收。用限制性内切酶 BamHI 和 TaqI 消化这些 DNA 片断,在末端形成 BamHI 和 TaqI 位点。用 BamHI 消化 pET-11a(STRATAGENE)表达载体,再用 Calf intestine phosphatase(酒宝造)进行脱磷酸,然后用 1%琼脂糖凝胶电泳最后的反应液, 5.5kbDNA 片断自凝胶回收。用 DNA Ligation Kit ver.2(宝酒造)将这 3 条 DNA 片断连接,连接后的反应液加入 Escherichia coli JM109 Competent Cells(宝酒造)中使之转化。从所得抗氨苄西林药物的菌落中筛选一种克隆其携有上面所述的由 0.1kb 和 0.3kb 片断直线相连而成的 0.4kbDNA 片断所插入的质粒(pETVHMMh)。该质粒的构建过程如图 7 所示。

确认所插入的 DNA 片断碱基序列后,把该质粒导入 Epicurian Coli BL21-Gold(DE3)Competent Cells (STRATAGENE)中,从而获得人体新型多肽结合蛋白表达的重组型大肠杆菌菌系 Escherichia coli BL21-Gold(DE3)/pETVHMMh。该结合蛋白由 SEQ ID NO: 68 所示全部 399 个碱基序列编码,并由符合下列顺序连接而成的 SEQ ID NO: 69 所示 133 个氨基酸残基所构成,该连接顺序为 14 个氨基酸组成的前导肽序列-Met-B 链-加工蛋白酶识别序列(Arg-Trp-Arg-Arg)-C 链-Met-A 链之顺序。

实施例 20 人体新型多肽结合蛋白表达的重组型大肠杆菌菌系的结合蛋白之表达

37℃下,在含有 50 μg/ml 氨苄西林的 LB 培养基中培养实施例 19 得到的大肠杆菌菌系 Escherichia coli BL21-Gold(DE3)/pETVHMMh,当 OD600 达到 0.5 时添加异丙基-β-D-吡喃半乳糖(IPTG)使之最后浓度为 1mM,再培养 3 个小时。把最后培养液经过离心分离收集菌体,提取所有细菌的蛋白质,然后再用 SDS-PAGE 进行分析。

其分析结果如图 8 所示,17KDa 的蛋白质带在 IPTG 的诱导下被确认为

人体新型多肽结合蛋白。回收本实施例所培养的大肠杆菌菌体作为该结合蛋白的包含体，并使之变性通过回复按照正确的组合使 S-S 键形成，然后再进行 Met 残基 C 末端溴化氰(CNBr)的化学切割，以及通过酶反应把 Arg-Trp-Arg-Arg 序列 C 末端进行限制性分解和由此分解产生的 2 个 Arg 切割反应，从而可以得到人体新型多肽的成熟物。

实施例 22 自人体新型多肽结合蛋白表达的重组型大肠杆菌菌系中制备人体新型多肽及其衍生物

通过实施例 20 所述的方法培养实施例 19 所得大肠杆菌菌系 *Escherichia coli* BL21-Gold(DE3)/ pETVHMMh 的菌体，把该菌体悬浮于破碎缓冲液 (50mM Tris-HCl(pH6.8)、5mMEDTA) 中，超声处理 (1 分×3 次)，然后进行离心分离 (15,000rpm、20 分钟、4℃)。将沉淀物悬浮于洗涤用缓冲液 (50mM Tris-HCl(pH6.8)、5mMEDTA、4%Triton-X-100)，进行离心分离 (15,000rpm、20 分钟、4℃)，将沉淀物再次悬浮于洗涤用缓冲液，同样进行离心分离。将沉淀物悬浮于蒸馏水中，同样离心分离 2 次，如此得到的沉淀物就是含有人体新型多肽结合蛋白的包含体，并将其溶解于可溶性缓冲液 (50mM Tris-HCl(pH6.8)、4M 盐酸胍、5mM 2-巯基乙醇) 中，把该可溶性溶液用再生缓冲液 (50mM Tris-HCl(pH8.0)、5mMEDTA、5mM 还原型谷胱甘肽、0.5mM 氧化型谷胱甘肽、0.8M 精氨酸盐酸盐) 稀释 20 倍，然后 4℃ 下搅拌过夜。离心分离 (15,000rpm、15 分钟、4℃) 该溶液，将得到的上清液用 Sep-Pak C-18(Waters Inc.) 浓缩冻干。根据实施例 16 所述方法用 TSKgel ODS-80Ts 柱对包含人体新型多肽结合蛋白的冻干物分级分离，关于分级得到的主要峰值级分，按照实施例 16 的方法进行了质谱分析，其分析结果为，得到测定分子量的数值与 SEQ ID NO: 69 所示 133 个氨基酸构成的多肽，其中 N 末端缺失 1 个氨基酸 (Met) 的多肽 (2-133) 的理论分子量数值相一致 (质谱分析值: 实测值: 14156.9、理论值 14157.0)。

在 0.1N 盐酸和 5% 溴化氰 (CNBr) 存在的条件下，室温将前述多肽 (2-133) 置于暗处过夜温育使之进行化学分解，根据实施例 16 的方法通过 TSKgel ODS-80Ts 柱由该化学分解产物分级得到的主要分解产物，对该级分按照实施例 16 的方法进行质谱分析，其分析结果，测定分子量的数值与 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列 B 链的 C 末端上附加了 11 个氨基酸 (Arg

ArgSerAspIleLeuAlaHisGluAlaHse)的肽和 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列 A 链所构成的多肽((16-53)/(110-133))的理论分子量数值相一致(质谱分析值: 实测值: 6732.9、理论值 6732.8)。

以所述多肽((16-53)/(110-133))为底物在胰蛋白酶(Boehringer Mannheim)和羧肽酶 B(CPB)(Boehringer Mannheim)存在下(酶/底物(重量比=1/1000)),在含有 0.1M Tris-HCl(pH8.5)的反应液中,37℃温育 45 分钟,根据实施例 16 方法将温育后的反应产物上样于 TSKgel ODS-80Ts 柱进行分级分离(图 10)。关于在 31.681 分钟的时候,分级分离的级分按照实施例 16 的方法进行了质谱分析,正好是测定分子量的数值与 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列 B 链和 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列 A 链所构成的多肽((16-42)/(110-133)),也就是说,与人体新型多肽的理论分子量数值一致(质谱分析值: 实测值: 5500.3、理论值 5500.4)。关于该级分又进行了氨基酸序列分析和还原后所产生的 2 条肽质谱分析。其结果是,经过分析该级分的氨基酸序列得到了 B 链 N 末端序列 ArgAlaAlaProTyr (SEQ ID NO: 8 的 N 末端(1-5)部分序列)和 A 链 N 末端序列 AspValLeuAlaGly(SEQ ID NO: 7 的 N 末端(1-5)部分序列)的混和序列。另外通过该级分还原后所产生的 2 条肽质谱分析而得到的测定分子量的值与 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列 B 链的理论分子量的值(质谱分析值: 实测值: 3043.1、理论值 3042.6)和 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列 A 链的理论分子量的值(质谱分析值: 实测值: 2463.1、理论值 2463.8)一致。

从以上结果显示,用胰蛋白酶和 CPB 处理((16-53)/(110-133))能够得到由 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列 B 链和由 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 A 链组成的多肽((16-42)/(110-133)),即人体新型多肽。

另外,在后面将要叙述的实施例 22 所使用的 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列 B 链的 C 末端上缺失了 1 个氨基酸,这种肽和 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 A 链所构成的多肽((16-41)/(110-133))通过上面的程序同样也能获得副产品。

实施例 22 自人体新型多肽结合蛋白表达的重组型大肠杆菌菌系中制备的人体新型多肽及其衍生物对 THP-1 细胞具有促进细胞内产生 cAMP 的作用

根据实施例 17 所述的方法,研究了自人体新型多肽结合蛋白表达的重组型大肠杆菌菌系中制备的人体新型多肽及其衍生物对 THP-1 细胞内促进 cAMP 的产生效果。衍生物除了研究 ((16-53)/(110-133)) 之外,还研究了 ((16-41)/(110-133))。研究结果显示,人体新型多肽 ((16-42)/(110-133)) (图 11) 及其衍生物 (图 12) 均依人体新型多肽浓度的提高而增加细胞内 cAMP 的产生量。

如果比较人体新型多肽和 B 链 C 末端序列不同的人体新型多肽衍生物的活性强度时,其强弱顺序为 ((16-53)/(110-133)) > ((16-42)/(110-133)) (人体新型多肽) > ((16-41)/(110-133))。

10 结果证实, B 链 C 末端序列的活性非常重要。

实施例 23 人体新型多肽在正常人的肺成纤维细胞系 CCD-19Lu(ATCCCL-210) 中具有促进间质金属蛋白酶 -1(MMP-1)以及血管内皮细胞增殖因子(VEGF)基因表达的作用

15 将正常人的肺成纤维细胞系 CCD-19Lu 悬浮于培养基 B(含有 Earle' s 盐的极限必需培养基 (GIBCO-BRL)、100 μ M MEM 非必需的氨基酸 (GIBCO-BRL)、10%FCS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)中使其细胞密度为 10^6 cells/ml,在 6 孔平板的每个小孔内分别注入 2ml 的该细胞悬浮培养液,37℃下在 5%CO₂ 温箱中培养。当细胞达到汇集状态时用 2ml 的培养基 C (含有 Earle' s 盐的极限必需培养基 (GIBCO-BRL)、100 μ M MEM 非必需的氨基酸 (GIBCO-BRL)、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、0.025%CHAPS、0.2%BSA) 洗涤细胞 2 次,然后各加入 2ml 的培养基 C,37℃下在 5%CO₂ 温箱中培养 24 小时。吸去培养基,各自加入 1ml 的培养基 C 之后,用培养基 C 调制使每个孔中的最终浓度为 2 倍时再分别加入 1ml

20 的人体新型多肽溶液,37℃下在 5%CO₂ 温箱中再培养 24 小时。用 Trisol 试剂 (GIBCO-BRL) 按照厂家指定的约定书要求,从上述处理的细胞中提取总 RNA,然后用 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 2.1(宝酒造),按照试剂盒所附的说明书,通过反转录合成 cDNA。CCD-19Lu 细胞系中的 MMP-1、VEGF 以及看家基因即甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (G3PDH) 基因表达水平的测定是以

25 反转录溶液作为模板并使用 TaqMan PCR Core Reagents Kit with AmpliTaq Gold(Applied Biosystems)根据试剂盒的操作要求,通过 ABI PRISM

30

7700(Applied Biosystems), TaqMan PCR 法进行。此时, 在测定人体 MMP-1 基因表达水平时以 SEQ ID NO: 70 所示寡 DNA 作为有义链引物, 以 SEQ ID NO: 71 所示寡 DNA 作为反义链引物, 并且在 SEQ ID NO: 72 所示寡 DNA 的 5'末端把结合有报告色素 Fam 用作 TaqMan 探针, 在 3' 末端结合有猝灭剂色素 Tamra 用作 TaqMan 探针。在测定人体 VEGF 基因表达水平时以 SEQ ID NO: 73 所示寡 DNA 作为有义链引物, 以 SEQ ID NO: 74 所示寡 DNA 作为反义链引物, 并且在 SEQ ID NO: 75 所示寡 DNA 的 5'末端把结合有报告色素 Fam 用作 TaqMan 探针, 在 3' 末端结合有猝灭剂色素 Tamra 用作 TaqMan 探针。在测定人体 G3PDH 基因表达水平时以 SEQ ID NO: 76 所示寡 DNA 作为有义链引物, 以 SEQ ID NO: 77 所示寡 DNA 作为反义链引物, 并且在 SEQ ID NO: 78 所示寡 DNA 的 5'末端把结合有报告色素 Fam 用作 TaqMan 探针, 在 3' 末端结合有猝灭剂色素 Tamra 用作 TaqMan 探针。

PCR 反应包括如下程序: 首先在 50℃ 下保温 2 分钟, 然后以 90℃ 15 秒以及 60℃ 1 分钟为一个循环周期, 共进行了 40 个循环周期。

其结果是, 人体新型多肽纯化标样使 MMP-1 和 VEGF 的基因表达水平相对于 G3PDH 的基因表达水平增加 (图 13)。由此表明, 在正常人的肺成纤维细胞系 CCD-19Lu 里, 人体新型多肽纯化标样具有促进 MMP-1 和 VEGF 的基因表达的功能。

实施例 24 人体新型多肽纯化标样对 THP-1 细胞系血管内皮细胞增殖因子(VEGF)基因表达的促进作用

按照以下要领研究人体新型多肽纯化标样对 THP-1 细胞系血管内皮细胞增殖因子(VEGF)基因表达的促进作用。

首先, 把处于增殖期的 THP-1 细胞悬浮于含有 10%FCS 的 RPMI-1640 培养基中, 使其细胞密度为 5×10^4 cell/ml, 并且在 24 孔培养板的每个小孔中分别注入 0.4ml。再用相同培养基将人体新型多肽纯化标样稀释至一定的浓度 (与实施例 21 批号相同), 将稀释的人体新型多肽纯化标样分别添加到每个小孔 (0.1ml) 里, 混和之后, 在同一培养板上将该细胞于 37℃ 下培养 24 小时。用 RNease Mini 试剂盒(Qiagen)直接从刚处理过的每个细胞中回收总 RNA, 再用 THERMOSCRIPT™ RT-PCR System(Lifetech Oriental)进行反

转录, 先合成 cDNA。根据实施例 23 所述的方法以 cDNA 为模板进行 TaqMan™ PCR(Applied Biosystems), 用 ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems(Applied Biosystems)检测生成的靶子特异性信号来定量基因的表达。

- 5 其结果如图 16 所示, 人体新型多肽纯化标样使 G3PDH 的基因表达水平相对于的 VEGF 基因表达水平增加, 其活性具有促进 VEGF 基因的表达。

实施例 25 人体新型多肽纯化标样对正常人的皮肤成纤维细胞系 NHDF 细胞具有促进 cAMP 产生的作用

- 将正常人的皮肤成纤维细胞系 NHDF 细胞 (BioWhittaker) 悬浮于培养基 D (成纤维细胞培养基试剂盒 (BioWhittaker)), 其细胞密度为 10^5 cells/ml, 并且在 24 孔培养板的每个小孔中分别注入 1ml 该细胞悬浮液, 37℃ 下 5%CO₂ 温箱中培养 2 天。用实施例 17 的培养基 A (1ml) 洗涤细胞 2 次, 加培养基 A 0.4ml 之后, 37℃ 下 5%CO₂ 温箱中温育 1 个小时。用实施例 17 所述的缓冲液 A 调制人体新型多肽纯化标样 50 μl 使其反应时的最终浓度为 10 倍, 同时将 50 μl 的溶解于培养基 A 中的 10 μM 毛猴素 (和光纯药) 添加于所述的细胞悬浮液, 37℃ 下 5%CO₂ 温箱中温育 30 分钟。用培养基 A (1ml) 洗涤细胞 2 次, 加培养基 A 0.5ml 之后, 再加 100 μl 的 20% 高氯酸溶液, 4℃ 下静止 20 分钟。将该细胞提取液移入到 1.5ml 容量的微量试管中, 进行离心分离 (15,000rpm, 10 分, 4℃)。把 500 μl 的上清液转移到另外的 1.5ml 容量的微量试管中, 加 60mM HEPES, 1.5M KON 溶液进行中和反应并用于测定 cAMP 的样品。通过 cAMP EIA System(Amersham Pharmacia), 按照试剂盒所附说明书测定细胞内 cAMP 的产生含量。

其结果显示的活性是, 人体新型多肽纯化标样对 NHDF 细胞依赖于其浓度的提高而增加细胞内 cAMP 的产量 (图 14)。

25

实施例 26 人体新型多肽纯化标样对大鼠垂体前叶第一代培养细胞具有促进 cAMP 产生的作用

在无麻醉的条件下, 猝死 32 只 Wistar rats (8 周龄、雄性), 摘除垂体前叶, 将垂体前叶放入盛有缓冲液 B (137mM 氯化钠、5mM 氯化钾、0.7mM

- 磷酸氢二钠、25mM HEPES(pH7.3)、50 μ g/ml 硫酸庆大霉素)玻璃皿中,用缓冲液 B 洗涤 1 次。用解剖剪子将其剪为 4 份,再洗涤 2 次,然后将下垂体块放入 30ml 的酶液 I 中(0.4%胶原酶 A(Boehringer Mannheim)、0.4%牛血清蛋白、10 μ g/ml 脱氧核糖核酸酶 I(Sigma)、含有 0.2%葡萄糖的缓冲液 B)一边振荡一边 37℃下保温 1 个小时。用 Komagome 移液管分散组织切块,离心分离(480 $\times$ g、6 分钟)弃去上清液。把沉淀悬浮于 30ml 的酶液 I(含有 0.25%胰酶(Sigma)的缓冲液 B)中,一边振荡一边 37℃下保温 8 分钟。添加 2ml 胎牛血清,再次离心分离(480 $\times$ g、6 分钟)弃去上清液。在沉淀里加入 10ml 的培养基 D(Dulbecco modified Eagle's 培养基(DMEM)其中包括 10%胎牛血清、20mM HEPES(pH7.3)、50U/ml 的青霉素 G、50 μ g/ml 链霉素的)并悬浮,用尼龙膜过滤。用 10ml 的培养基 D 洗涤 2 次,测定细胞数,使该细胞悬浮于培养基 D 中的细胞密度为 1.8×10^5 cells/ml。将细胞悬浮液分别注入到 24 孔平板中的每个小孔内(1ml),37℃下 5%CO₂ 温箱中培养 3 天。用 1ml 培养基 E(使实施例 17 所述的培养基 A 中的 IBMX 浓度为 1mM 的培养基)洗涤细胞 2 次,再加 0.45ml 培养基 E,然后 37℃下 5%CO₂ 温箱中保温 1 个小时。用实施例 17 所述的缓冲液 A 调制人体新型多肽纯化标样溶液 50 μ l 使其反应时的最终浓度为 10 倍,并加入所述细胞悬浮溶液中,然后 37℃下 5%CO₂ 温箱中保温 30 分钟。用 1ml 培养基 E 洗涤细胞 2 次,再加 0.5ml 培养基 E,加 100 μ l 的 20%高氯酸溶液,4℃下静止 20 分钟。将该细胞提取液移入到 1.5ml 容积的微量试管中,离心分离(15,000rpm,10 分,4℃)。把 500 μ l 上述的上清液转移到另外的 1.5ml 容积的微量试管中,加 60mM HEPES,1.5M KON 溶液进行中和反应并用于测定 cAMP 的样品。通过 cAMP EIA System(Amersham Pharmacia),按照试剂盒所附说明书测定细胞内 cAMP 的含量。
- 其结果显示的活性是,人体新型多肽纯化标样对大鼠垂体前叶第一代培养细胞依赖于浓度的提高而增加细胞内 cAMP 的产量。

实施例 27 人体新型多肽纯化标样对小鼠肺泡巨噬细胞具有促进 cAMP 产生的作用

- 小鼠肺泡巨噬细胞通过以下方式获得,在戊巴比妥(Nembutal)(大日本制药)麻醉剂的存在下,用公知方法回收 BALB/C 小鼠(8 周龄、雌性)的

- Hank's(Lifetech Oriental) 肺胞洗涤液。该肺胞巨噬细胞播种于 24 孔培养板中使每孔为 5×10^4 , 37℃下在含有 10%FCS 的 RPMI-1640 培养基中静置 2 个小时, 把细胞播种于培养皿的底部。然后用含有 10%FCS 和 $50 \mu\text{M}$ IBMX 的 RPMI-1640 培养基更换培养基, 向其中加入人体新型多肽纯化标样(根据
- 5 实施例 16 所述的方法由新型多肽前体(人型)表达 AtT20 细胞纯化制备, 再用实施例 17 所述的缓冲液 A 溶解其浓度为 $5.0 \mu\text{M}$), 使其最后浓度达到 100nM, 把细胞静止于 37℃45 分钟。通过 cAMP EIA System(Amersham Pharmacia), 按照试剂盒所附说明书测定如此经过处理的细胞以及细胞内 cAMP 的含量。
- 10 其结果证实, 添加有人体新型多肽纯化标样的小鼠肺胞巨噬细胞与未添加人体新型多肽纯化标样的小鼠肺胞巨噬细胞对照组相比, 导致细胞内 cAMP 的含量大约增加了 1.4 倍。

实施例 28 小鼠单克隆抗体、HK4-144-10 型的亚型确定

- 15 前面所述实施例 15 的小鼠单克隆抗体、HK4-144-10 型的亚型确定通过市售的抗血清(Bio-Rad) EIA 来确定, 即 IgG1、 κ 。

实施例 29 构建人体新型多肽基因动物细胞的表达载体

- 为了使人体新型多肽基因在 COS-7 细胞中进行表达而构建其表达载体。
- 20 为了不让 COS-7 细胞表达处理多肽前体过程所必需的加工酶 PC1, 而将多肽前体 A 链之前的 PC1 识别序列(Arg-Xaa-Xaa-Arg)置换为由加工酶 furin 所能识别加工的序列(Arg-Xaa-Arg-Xaa-Arg-Arg), 进而构建一种同时表达人 furin 的表达质粒。此时, 为了能够获得 furin 表达产物的分泌蛋白质, 除去 C 末端部分的跨膜区域, 为了更简便地进行检测, 在 C 末端导入由 6 个
- 25 氨基酸组成的 His-tag 序列。

- 人 furin cDNA 以人体胰腺的 cDNA(Clontech)为模板, 使用下列所述的合成 DNA 和 Pfu DNA 聚合酶(Stratagene), 进行 PCR 反应(反应条件: 94°C 1 分 $\rightarrow$ (98°C 10 秒 $\rightarrow$ 68°C 3 分 30 秒) $\times$ 25 次 $\rightarrow$ 72°C 10 分 4°C) 获得了 DNA 片段。所述合成 DNA 包括人 furin 蛋白质翻译起始部分的 DNA (SEQ
- 30 ID NO: 79) 和设计成为所连接的氨基酸是以 furin 蛋白质⁵⁹⁵Ala 为末尾并与 His-His-His-His-His-His 序列、终止密码子相连的 DNA (SEQ ID NO: 80)。

用限制性内切酶 BlnI(宝酒造)消化该 DNA 片段,再导入 pCAN618 的 BlnI 部位上,先构建了分泌型 furin His-tag 表达质粒。

接着,以编码人体新型多肽基因的 cDNA 为模板,使用下列所述的合成 DNA 和 Pfu DNA 聚合酶(Stratagene),进行 PCR 反应(反应条件:95℃1 分→(98℃10 秒→68℃35 秒)×25 次→72℃5 分 4℃)获得了不仅包括人体新型多肽基因的 ORF 而且还置换了 ¹¹³Val→¹¹³Arg, ¹¹⁷Ser→¹¹⁷Arg 氨基酸的 DNA 片段。所述合成 DNA 设计成为一种包括位于翻译起始密码子 ATG 之前并包括 MfeI 限制性内切酶位点的 DNA (SEQ ID NO: 81) 和设计成为所编码人体新型多肽基因的 C 末端的序列,接着是终止密码子的 DNA (SEQ ID NO: 82)。用限制性内切酶 MfeI (New England Biolabs) 消化该 DNA 片段,再导入所述的分泌型 furin His-tag 表达质粒的 EcoRI 位点和末端平滑的 NotI 位点上,获得的人体新型多肽前体/furin His-tag 共表达载体 pCAN618/hVH1,3 其具有在 A 链之前还有由 furin 识别加工的序列 (Arg-Leu-Arg-Gly-Arg-Arg)。

同时,作为对照组,不进行氨基酸置换同前所述直接获得人体新型多肽前体蛋白质/furin His-tag 共表达载体。

以编码人体新型多肽基因的 cDNA 为模板,使用下列所述的合成 DNA 和 Pfu DNA 聚合酶(Stratagene),进行 PCR 反应(反应条件:95℃1 分→(98℃10 秒→68℃35 秒)×25 次→72℃5 分 4℃)获得了包括人体新型多肽前提的 ORF 的 DNA 片段。所述合成 DNA 设计成为一种包括位于翻译起始密码子 ATG 之前并包括 MfeI 限制性内切酶位点的 DNA (SEQ ID NO: 81) 和设计成为编码人体新型多肽基因的 C 末端的序列,然后是终止密码子 NotI 限制性内切酶位点的 DNA (SEQ ID NO: 83)。用限制性内切酶 MfeI (New England Biolabs)、NotI (New England Biolabs) 双重消化该 DNA 片段,再导入到所述的分泌型 furin His-tag 表达质粒的 EcoRI 位点和 NotI 位点上,获得人体新型多肽前体/furin His-tag 共表达载体 pCAN618/hVH1,4。

实施例 30 构建小鼠新型多肽基因动物细胞的表达载体

为了使小鼠新型多肽基因在 COS-7 细胞中进行表达,采用实施例 29 所述的同样方法构建表达载体。

首先以编码小鼠新型多肽基因的 cDNA 为模板, 使用下列所述的合成 DNA 和 Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene), 进行 PCR 反应 (反应条件: 95℃ 1 分→(98℃ 10 秒→68℃ 35 秒)×25 次→72℃ 5 分 4℃) 获得了不仅包括小鼠新型多肽前提的 ORF 而且还置换了 ¹¹²Val→¹¹²Arg, ¹¹⁶Ser→¹¹⁶Arg 的 DNA 片段。所述合成 DNA 设计成为一种包括位于翻译起始密码子 ATG 之前并包括 EcoRI 限制性内切酶位点的 DNA (SEQ ID NO: 84) 和设计成为编码小鼠新型多肽基因的 C 末端的序列, 然后是终止密码子 NotI 限制性内切酶位点的 DNA (SEQ ID NO: 85)。用限制性内切酶 EcoRI、NotI (New England Biolabs) 双重消化该 DNA 片段, 再导入实施例 29 所得分泌型 furin/His-tag 表达质粒的 EcoRI 位点和 NotI 位点上, 获得的小鼠新型多肽前体/furin His-tag 共表达载体 pCAN618/mVH1,3 其具有在 A 链之前还有由 furin 识别加工的序列 (RVRGRR)。

同时, 作为对照组, 不进行氨基酸置换同前所述直接获得小鼠新型多肽前体/furin His-tag 共表达载体。

以编码小鼠新型多肽基因的 cDNA 为模板, 使用下列所述的合成 DNA 和 Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene), 进行 PCR 反应 (反应条件: 95℃ 1 分→(98℃ 10 秒→68℃ 35 秒)×25 次→72℃ 5 分 4℃) 获得了包括多肽前体的 ORF 的 DNA 片段。所述合成 DNA 设计成为一种包括位于翻译起始密码子 ATG 之前并包括 EcoRI 限制性内切酶位点的 DNA (SEQ ID NO: 84) 和设计成为编码小鼠新型多肽基因的 C 末端的序列, 然后是终止密码子 NotI 限制性内切酶位点的 DNA (SEQ ID NO: 86)。用限制性内切酶 EcoRI、NotI (New England Biolabs) 双重消化该 DNA 片段, 再导入到实施例 29 所得分泌型 furin/His-tag 表达质粒的 EcoRI 位点和 NotI 位点上, 获得小鼠多肽前体/furin His-tag 共表达载体 pCAN618/mVH1,2。

25

实施例 31 新型多肽成熟物向 COS-7 细胞上清液中进行分泌表达

为了确认新型多肽成熟物是否向 COS-7 细胞上清液进行了分泌表达, 首先向 COS-7 细胞导入实施例 29 和 30 制备的人体多肽前体表达载体, 根据 EIA 测定培养上清液中的成熟肽。在转导实施例 29 制备的表达载体的前一天, 先在 6 孔板上播种 4×10^5 cell/well 表达载体, 然后用含有 10% FBS (Hyclone) 的 DMEM (Gibco-BRL) 于 CO₂ 温箱 (incubator) 中培养 24 小时。实施

上述实施例 29 制备的表达载体和 pCAN618 与 FuGENE6 (Roche Diagnostics) 的转基因之后, 24 小时之后, 更换培养基即, 更换 1ml 的含有 0.1mM4-(2-氨基乙苯磺酰氟化物 (pABSF) (和光纯药) 和含有 0.05%CHAPS (同仁化学) 的 DMEM (Phenol Red) 培养基 (Gibco-BRL), 继续培养 48 个小时。将培养上清液移入 eppendorf 样品试管中进行离心, 除去悬浮的细胞, 将原液直接用于 EIA 测定。EIA 的测定按照实施例 16 的竞争法实施 (图 17)。

其结果证明, 在转导有包括 A 链之前由 furin 识别加工的序列 (RLRGRR) 的人体多肽前体/furin-His-tag 共表达载体的 pCAN618/hVH1,3 的 COS-7 细胞培养上清液中有约 35nM 的免疫反应性的多肽存在, 而在转导有小鼠多肽前体/furin-His-tag 共表达载体的 pCAN618/mVH1,3 的 COS-7 细胞培养上清液中有约 41nM 的免疫反应性的多肽存在。

15 实施例 32 COS-7 细胞培养上清液中的新型多肽对 THP-1 细胞具有促进细胞内 cAMP 产生的作用

在实施例 31 中, 证明了具有免疫反应原性的人体多肽在 COS-7 细胞培养上清液中进行了分泌表达, 因此为了确定该生物活性, 按照实施例 17 所示的方法利用细胞培养上清液原液观察到对 THP-1 细胞具有促进细胞内 cAMP 产生的作用 (图 18)。

20 其结果证实, 当加入转导有包括 A 链之前由 furin 识别加工的序列 (RLRGRR) 的人体多肽前体/furin-His-tag 共表达载体的 pCAN618/hVH1,3 的 COS-7 细胞培养上清液时, 与对照组相比, 对 THP-1 细胞具有促进细胞内 cAMP 产生的作用约为 1.8 倍, 而当加入转导有小鼠多肽前体/furin-His-tag 共表达载体的 pCAN618/mVH1,3 的 COS-7 细胞培养上清液时, 约为 1.6 倍
25 的促进作用; 并证明产生了具有生物活性的新型多肽。

产业上的利用

30 本发明多肽以及编码该多肽的 DNA 可用作治疗、预防或诊断碳水化合物等能源代谢调节 (糖代谢、脂质代谢等) 紊乱 (如糖尿病等)、抑制组织的生长·增殖·分化、生殖功能降低、结缔组织的形成异常 (如硬皮症等)、组

- 织的纤维变性（如肝硬化、肺纤维变性、硬皮症或肾纤维变性等）、循环系统障碍（外周动脉疾病、心肌梗塞或心功不全等）、内分泌障碍、体液平衡紊乱、中枢神经系统疾病以及过敏反应等免疫系统疾病、血管再生障碍疾病等。本发明多肽还可用作试剂，该试剂有效筛选具有促进或抑制本发明多肽活性的化合物或其盐。本发明多肽的抗体还可进一步特异地识别本发明的多肽，因此它可用于检测、定量和中和待测溶液中的本发明多肽。
- 5

序列表

<110> 武田药品工业株式会社 (Takeda Chemical Industries, Ltd.)

<120> 新型胰岛素/胰岛素样生长因子/松弛素家族多肽及其 DNA

<130> P02-0082

<150> JP 12-126340

<151> 2000-04-21

<150> JP 12-205587

<151> 2000-07-03

<150> JP 12-247962

<151> 2000-08-10

<150> JP 12-395050

<151> 2000-12-22

<160> 86

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 1

ctggcggtat gggctgctgac

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

actggggcat tggctcctggt g

21

<210> 3

<211> 142

<212> PRT

<213> 人 (Human)

<400> 3

```

Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr
  1             5             10             15
Gly Glu Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val
      20             25             30
Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly
      35             40             45
Gly Ser Arg Trp Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly
      50             55             60
Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu
      65             70             75             80
Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser
      85             90             95
Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly
      100            105            110
Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys
      115            120            125
Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
      130            135            140

```

<210> 4

<211> 1061

<212> DNA

<213> 人 (Human)

<400> 4

```

ttcaaagcat ctccgtccag catggccagg tacatgctgc tgctgctcct ggcggtatgg      60
gtgctgaccg gggagctgtg gccgggagct gaggcccggg cagcgcccta cggggtcagg      120
ctttgcggcc gagaattcat ccgagcagtc atcttcacct gcgggggctc ccggtggaga      180
cgatcagaca tcctggccca cgaggctatg ggagatacct tcccgatgc agatgctgat      240
gaagacagtc tggcaggcga gctggatgag gccatggggg ccagcgagtg gctggccctg      300
accaagtcac cccaggcctt ttacaggggg cgaccagct ggcaagggaac ccctgggggt      360
cttcggggca gccgagatgt cctggctggc ctttcagca gctgctgcaa gtgggggtgt      420
agcaaaagtg aatcagtag ccttgctag tttaggggt gggcagccgt gggcaccagg      480
accaatgccc cagtcctgcc atccactcaa ctagtgtctg gctgggcacc tgtctttcga      540
gcctcacaca ttcattcatt catctacaag tcacagaggc actgtgggct caggcacagt      600
ctcccgacac cacctatcca accctgccct ttgaccagcc tatcatgacc ctggccccta      660
aggaagctgt gcccctgcct ggtcaagtgg ggaccccccc atcctgacct ctgacctctc      720
cccagcccta accatgcgtt tgccctggcct acacactcca ctgccacaac tgggtcccta      780

```

```

ctctacctag gctggccaca cagagacccc tgcccccttc ccagtccaaa ctgtggccat 840
tgtccccctga ccagctaaaa tcaagcctct gtctcagtc agcctttgca cgcacgcttc 900
ctttgccctg ctttccatcc cctctccctc caactcccct gccagagttc caaggctgtg 960
gaccccagag aaggtggcag gtggccccc taggagagct ctgggcacat tcgaatcttc 1020
ccaaactcca ataataaaaa ttcgaagact ttggcagaga g 1061

```

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 5

```
ccggatgcag atgctgatga a 21
```

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 6

```
tgggtcaaagg gcagggttgg 20
```

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> 人 (Human)

<400> 7

```
Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser
```

1

5

10

15

```
Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
```

20

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> 人 (Human)

<400> 8 Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg 1 5 10 15 Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp 20 25	
<210> 9 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 9 ggtgaagatg actgctcgga tga	23
<210> 10 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 10 ccgcaaagcc tgaccccgta ag	22
<210> 11 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 11 gggggtgtag caaaagtga a	21
<210> 12 <211> 426 <212> DNA <213> 人 (Human)	

<400> 12

```

atggccaggt acatgctgct gctgctcctg gcggtatggg tgctgaccgg ggagctgtgg    60
ccgggagctg aggcccgggc agcgcccttac ggggtcaggc ttgCGGCCG agaattcatc    120
cgagcagtca tcttcacctg cgggggctcc cggTggagac gatcagacat cctggcccac    180
gaggctatgg gagatacctt cccggatgca gatgctgatg aagacagtct ggcaggcgag    240
ctggatgagg ccatggggtc cagcgagtgg ctggccctga ccaagtcacc ccaggccttt    300
tacagggggc gaccagctg gcaaggaacc cctggggttc ttcggggcag ccgagatgtc    360
ctggctggcc tttccagcag ctgctgcaag tgggggtgta gcaaaagtga aatcagtagc    420
ctttgc                                           426

```

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

```

gggcaggggt ctctgtgt                                           18

```

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 14

```

ttcaaagcat ctccgtccag c                                           21

```

<210> 15

<211> 72

<212> DNA

<213> 人 (Human)

<400> 15

```

gatgtcctgg ctggcctttc cagcagctgc tgcaagtggg ggtgtagcaa aagtgaatc    60
agtagccttt gc                                           72

```

<210> 16

<211> 81

<212> DNA

<213> 人 (Human)

<400> 16

cgggcagcgc cttacgggggt caggctttgc ggccgagaat tcacccgagc agtcattctc 60
acctgcgggg gctcccgtg g 81

<210> 17

<211> 140

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 17

Met Ala Thr Arg Gly Leu Leu Leu Ala Ser Trp Ala Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15
Leu Val Leu Gln Ala Glu Ala Arg Pro Ala Pro Tyr Gly Val Lys Leu
20 25 30
Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser
35 40 45
Arg Trp Arg Arg Ala Asp Ile Leu Ala His Asp Pro Leu Gly Glu Phe
50 55 60
Phe Ala Asp Gly Glu Ala Asn Thr Asp His Leu Ala Ser Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ala Val Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln
85 90 95
Val Phe Tyr Gly Gly Arg Ser Ser Trp Gln Gly Ser Pro Gly Val Val
100 105 110
Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Glu
115 120 125
Trp Gly Cys Ser Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys
130 135 140

<210> 18

<211> 420

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 18

atggcaactc gggggctgct gctggcttcc tgggctctcc tcggggctct ggtgctgcag 60
gccgaggcga ggcccgcgcc ctatgggggtg aagctctgcg gtcgggagtt catccgcgcg 120
gtcatcttca cctgcggggg ctcacgatgg cgccgggcgg acatcttgge ccacgacct 180
ctgggggaat tcttcgtga tggagaagcc aatacagacc acctggccag cgaactggac 240
gaagctgtgg gctccagcga gtggctggcc ctgaccaaat cccccaggt cttctatggg 300
ggtcgatcca gctggcaagg gtctcccgga gtggttcggg gcagcagaga tgtgctggct 360
ggcctttcca gcagctgttg cgagtggggc tgtagtaaga gccaaattag cagcttgtgc 420

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rat), 小鼠 (Mouse)

<400> 19

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Glu Trp Gly Cys Ser

1

5

10

15

Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys

20

<210> 20

<211> 71

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 20

gagtgcctggc tggcctttcc agcagctgtt gcgagtgggg ctgtagtaag agccaaatta 60

gcagcttgatg c

71

<210> 21

<211> 27

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rat), 小鼠 (Mouse)

<400> 21

Arg Pro Ala Pro Tyr Gly Val Lys Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg

1

5

10

15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp

20

25

<210> 22

<211> 81

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 22

aggcccgcg cctatgggt gaagctctgc ggtcgggagt tcattccgcg ggtcattcttc 60

acctgcgggg gctcacgatg g

81

<210> 23

<211> 141

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mouse)

<400> 23

```

Met Ala Met Leu Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ser Trp Ala Leu Leu Gly
 1           5           10           15
Ala Leu Gly Leu Gln Ala Glu Ala Arg Pro Ala Pro Tyr Gly Val Lys
          20           25           30
Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly
          35           40           45
Ser Arg Trp Arg Arg Ala Asp Ile Leu Ala His Glu Ser Leu Gly Asp
          50           55           60
Phe Phe Ala Asp Gly Glu Ala Asn Thr Asp His Leu Ala Ser Glu Leu
65           70           75           80
Asp Glu Ala Val Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro
          85           90           95
Gln Ala Phe Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Trp Gln Gly Ser Pro Gly Val
          100          105          110
Val Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys
          115          120          125
Glu Trp Gly Cys Ser Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys
          130          135          140

```

<210> 24

<211> 423

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mouse)

<400> 24

```

atggcaatgc tcgggctgct gctgctggct tcctgggctc tcctcggggc tctggggctg 60
caggccgagg cgaggccggc gccctacggg gtgaagctct gcggtcggga gttcatccgc 120
gcggtcatct tcactgctgg aggtctacga tggcgccggg cggacatctt ggcccacgaa 180
tctctggggg acttcttcgc tgatggagaa gccaatacag accacctggc cagcgagctg 240
gatgaagcgg tgggctccag cgagtggctg gccctaacca aatcccccca ggctttctac 300
ggtggtcgag ccagctggca aggggtcacct ggagtggttc ggggcagcag agatgtgttg 360
gctggccttt ccagcagttg ctgcgagtgg ggctgtagca agagccaaat tagcagcttg 420
tgc                                                    423

```

<210> 25

<211> 72

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mouse)

<400> 25

```

gatgtgttgg ctggcctttc cagcagttgc tgcgagtggg gctgtagcaa gagccaaatt 60

```

agcagcttgt gc	72
<210> 26	
<211> 81	
<212> DNA	
<213> 小鼠 (Mouse)	
<400> 26	
aggccggcgc cctacggggt gaagctctgc ggtcgggagt tcatccgcgc ggtcatcttc	60
acttgccggag gctcacgatg g	81
<210> 27	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 27	
ggctcttact acagccccac tcgcaacagc	30
<210> 28	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 28	
tgctggaaag gccagccagc acatctct	28
<210> 29	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 29	
ggctgctagg ggtatggttg gag	23

<210> 30
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 30
aagggtggcc taatggcttt cggatttc

28

<210> 31
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 31
ttaaaggcca ggcagagggtg ttccactg

29

<210> 32
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 32
cactctcctg attggcctcc tgctgctc

28

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 33
gggtcccgaga aagcttaaag gcaggcagag

30

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 34
ggagaagcca atacagacca cctg

24

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 35
agtggctggc cctaaccaaa tc

22

<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 36
ggtcgcaggc atctcagctg at

22

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 37
cttcccaatc gctcagccca

20

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 38
 cgcttctcca ttgctcaacc ct 22

<210> 39
 <211> 470
 <212> DNA
 <213> 大鼠 (Rat)

<400> 39
 ggtcgcaggc atctcagctg atcatggcaa ctcgggggct gctgctggct tcctgggctc 60
 tcctcggggc tctggtgctg caggccgagg cgaggccgc gccctatggg gtgaagctct 120
 gcggtcggga gttcatccgc gcggtcatct tcacctgcgg gggctcacga tggcgccggg 180
 cggacatctt ggcccacgac cctctggggg aattcttcgc tgatggagaa gccaatacag 240
 accacctggc cagcgaactg gacgaagctg tgggtccag cgagtggctg gccctgacca 300
 aatccccca ggtcttctat gggggtcgat ccagctggca agggctctcc ggagtgggtc 360
 ggggcagcag agatgtgctg gctggccttt ccagcagctg ttgcgagtgg ggctgtagta 420
 agagccaaat tagcagcttg tgctaggatc tgggctgagc gattgggaag 470

<210> 40
 <211> 475
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mouse)

<400> 40
 ggtcgcaggc atctcagctg atcatggcaa tgctcgggct gctgctgctg gcttcctggg 60
 ctctcctcgg ggtctctggg ctgcaggccg aggcgaggcc ggcgccctac ggggtgaagc 120
 tctgcggtcg ggagttcatc cgcgcggtca tcttcacttg cggaggetca cgatggcgcc 180
 gggcggacat cttggccac gaatctctgg gggacttctt cgctgatgga gaagccaata 240
 cagaccacct ggccagcgag ctggatgaag cgggtgggctc cagcgagtgg ctggccctaa 300
 ccaaateccc ccaggctttc tacggtggtc gagccagctg gcaagggtca cctggagtgg 360
 ttcggggcag cagagatgtg ttggctggcc tttccagcag ttgctgcgag tggggctgta 420
 gcaagagcca aattagcagc ttgtgctagg atcagggttg agcaatggag aagcg 475

<210> 41
 <211> 184
 <212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 41

```

atggcaactc gggggctgct gctggcttcc tgggctctcc tcggggctct ggtgctgcag   60
gccgaggcga ggcccgcgcc ctatggggtg aagctctgcg gtcgggagtt catccgcgcg   120
gtcatcttca cctgcggggg ctcacgatgg cgccgggcgg acatcttggc ccacgacct    180
ctgg                                           184

```

<210> 42

<211> 236

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 42

```

gggaattctt cgctgatgga gaagccaata cagaccacct ggccagcgaa ctggacgaag   60
ctgtgggctc cagcgagtgg ctggccctga ccaaateccc ccaggtcttc tatgggggtc   120
gatccagctg gcaagggtct cccggagtgg ttcggggcag cagagatgtg ctggctggcc   180
tttcagcag ctgttgcgag tggggctgta gtaagagcca aattagcagc ttgtgc      236

```

<210> 43

<211> 187

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mouse)

<400> 43

```

atggcaatgc tcgggctgct gctgctggct tcctgggctc tcctcggggc tctggggctg   60
caggccgagg cgaggccggc gccctacggg gtgaagctct gcggtcggga gttcatccgc   120
gcggtcatct tcaattgcgg aggtcacga tggcgccggg cggacatctt ggcccacgaa   180
tctctgg                                           187

```

<210> 44

<211> 236

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mouse)

<400> 44

```

gggacttctt cgctgatgga gaagccaata cagaccacct ggccagcgag ctggatgaag   60
cgggtgggctc cagcgagtgg ctggccctaa ccaaateccc ccaggctttc tacggtggctc   120
gagccagctg gcaagggtca cctggagtgg ttcggggcag cagagatgtg ttggctggcc   180
tttcagcag ttgctgcgag tggggctgta gcaagagcca aattagcagc ttgtgc      236

```

<210> 45

<211> 140

<212> PRT

<213> 猪 (Porcine)

<400> 45

```

Met Ala Lys Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu
1           5           10           15
Ala Gly Glu Leu Trp Leu Arg Thr Glu Ala Arg Ala Ser Pro Tyr Gly
           20           25           30
Val Lys Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys
           35           40           45
Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg Ser Asp Met Leu Ala His Glu Ala Leu
           50           55           60
Gly Asp Val Phe Ser Asp Thr Asp Ser Asn Ala Asp Ser Glu Leu Asp
65           70           75           80
Glu Ala Met Ala Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Glu
           85           90           95
Thr Phe Tyr Gly Val Gln Pro Gly Trp Gln Arg Thr Pro Gly Ala Leu
           100          105          110
Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Asn Cys Cys Lys
           115          120          125
Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
           130          135          140

```

<210> 46

<211> 420

<212> DNA

<213> 猪 (Porcine)

<400> 46

```

atggcctaac gtccactgct gctgctgctg ctggccgtat ggggtgctggc tggggagctg 60
tggctgagga ctgaggcccg ggcgtcacc tatggagtga agctttgcgg ccgtgaattc 120
atccgagcgg tcattctttac ctgcgggggc tcccgggtga gacggtcgga catgctggcc 180
catgaagctc tgggggatgt cttctcagac acagattcca acgcagacag cgagttggac 240
gaggcaatgg cctccagcga atggctggcc ctgaccaagt cccctgagac cttctatggg 300
gttcaaccag gctggcagag aaccctggg gctcttaggg gcagtcgtga tgtcctggct 360
ggcctctcca gcaactgctg caagtggggg tgcagcaaga gtgaaatcag cagcctctgc 420

```

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> 猪 (Porcine)

<400> 47

```

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Asn Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser
1           5           10           15

```

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys

20

<210> 48

<211> 72

<212> DNA

<213> 猪 (Porcine)

<400> 48

gatgtcctgg ctggcctctc cagcaactgc tgcaagtggg ggtgcagcaa gagtgaaatc 60
agcagcctct gc 72

<210> 49

<211> 27

<212> PRT

<213> 猪 (Porcine)

<400> 49

Arg Ala Ser Pro Tyr Gly Val Lys Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg
1 5 10 15
Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp
20 25

<210> 50

<211> 81

<212> DNA

<213> 猪 (Porcine)

<400> 50

cgggcgtcac cctatggagt gaagctttgc ggccgtgaat tcatccgagc ggatcatcttt 60
acctgcgggg gctcccggtg g 81

<210> 51

<211> 174

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 51

Met Ala Thr Arg Gly Leu Leu Leu Ala Ser Trp Ala Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15
Leu Val Leu Gln Ala Glu Ala Arg Pro Ala Pro Tyr Gly Val Lys Leu
20 25 30
Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser
35 40 45

Arg Trp Arg Arg Ala Asp Ile Leu Ala His Asp Pro Leu Gly Glu Cys
 50 55 60
 Gly Gly Lys Ala Met Asp Leu Glu Gln Val Ser Leu Ile Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Arg Asp Val Ala Gly Phe Ser Pro Val His Pro Leu Ser Phe Ala Gly
 85 90 95
 Glu Phe Phe Ala Asp Gly Glu Ala Asn Thr Asp His Leu Ala Ser Glu
 100 105 110
 Leu Asp Glu Ala Val Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser
 115 120 125
 Pro Gln Val Phe Tyr Gly Gly Arg Ser Ser Trp Gln Gly Ser Pro Gly
 130 135 140
 Val Val Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys
 145 150 155 160
 Cys Glu Trp Gly Cys Ser Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys
 165 170

<210> 52

<211> 522

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 52

atggcaactc gggggctgct gctggcttcc tgggctctcc tcggggctct ggtgctgcag 60
 gccgaggcga ggcccgcgcc ctatggggtg aagctctgcg gtcgggagtt catccgcgcg 120
 gtcattctca cctgcggggg ctacgatgg cgccgggchg acatcttgge ccacgacct 180
 ctgggtgagt gcggaggga agcaatggac ctggaacagg tgccttgat cctccagacc 240
 agagatgtag ccggattcag cctgttcat ccactttctt ttgcagggga attcttctgt 300
 gatggagaag ccaatacaga ccacctggcc agcgaactgg acgaagctgt gggctccagc 360
 gagggtctgg cctgaccaa atccccccag gtcttctatg ggggtcgatc cagctggcaa 420
 ggggtctccg gagggttctg gggcagcaga gatgtgctgg ctggccttcc cagcagctgt 480
 tgcgagtgagg gctgtagtaa gagccaaatt agcagcttgt gc 522

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 53

ggragccass mtgtataaat r

21

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 54

cacccakags stcgtgggcc aagatgtc 28

<210> 55

<211> 159

<212> DNA

<213> 猪 (Porcine)

<400> 55

atggccaaac gtccactgct gctgctgctg ctggccgtat ggggtgctggc tggggagctg 60

tggctgagga ctgaggcccc ggcgtcacc tatggagtga agctttgcgg ccgtgaattc 120

atccgagcgg tcatttttac ctgcgggggc tcccggttg 159

<210> 56

<211> 239

<212> DNA

<213> 猪 (Porcine)

<400> 56

tccaggaggc accaaccatc agaaagctgc cttgctgcgt ccactctcac atctcaggca 60

gcccgtccag aatggccaaa cgtccactgc tgctgctgct gctggccgta tgggtgctgg 120

ctggggagct gtgctgagg actgaggccc gggcgtcacc ctatggagtg aagctttgcg 180

gccgtgaatt catccgagcg gtcatttcta cctgcggggg ctcccgggtg agacggtcg 239

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 57

gtgccttgc tgcgtccact ctcacatct 29

<210> 58

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 58

cactctcaca tctcaggcag cccgtccag 29

<210> 59

<211> 193

<212> DNA

<213> 猪 (Porcine)

<400> 59

atggccaaac gtccactgct gctgctgctg ctggccgtat gggtgctggc tggggagctg 60
tggtgagga ctgaggcccg ggcgtcaccc tatggagtga agctttgcgg ccgtgaattc 120
atccgagcgg tcacttttac ctgcgggggc tcccgggtga gacggtcgga catgctggcc 180
catgaagctc tgg 193

<210> 60

<211> 227

<212> DNA

<213> 猪 (Porcine)

<400> 60

gggatgtctt ctcagacaca gattccaacg cagacagcga gttggacgag gcaatggcct 60
ccagcgaatg gctggccctg accaagtccc ctgagacctt ctatggggtt caaccaggct 120
ggcagagaac ccttggggct cttaggggca gtcgtgatgt cctggctggc ctctccagca 180
actgctgcaa gtgggggtgc agcaagagtg aaatcagcag cctctgc 227

<210> 61

<211> 572

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 61

ggtgcaggc atctcagctg atcatggcaa ctgggggct gctgctggct tcctgggctc 60
tcctcggggc tctggtgctg caggccgagg cgaggccgc gccctatggg gtgaagctct 120
gcggtcggga gttcatccgc gcggtcatct tcacctgagg gggtcacga tggcgccggg 180
cggacatctt ggcccacgac cctctgggtg agtgcggagg gaaagcaatg gacctggaac 240
aggtgtcctt gatctccag accagagatg tagccggatt cagccctgtt catccacttt 300
cttttgcagg ggaattcttc gctgatggag aagccaatac agaccacctg gccagcgaac 360
tggacgaagc tgtgggctcc agcgagtggc tggccctgac caaatcccc caggtcttct 420

atgggggtcg atccagctgg caagggtctc ccggagtggg tcggggcagc agagatgtgc 480
 tggttgccct ttccagcagc tgttgcgagt ggggctgtag taagagccaa attagcagct 540
 tgtgctagga tctgggctga gcgattggga ag 572

<210> 62

<211> 102

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 62

gtgagtgcgg agggaaagca atggacctgg aacaggtgtc cttgatcctc cagaccagag 60
 atgtagccgg attcagccct gttcatccac tttcttttgc ag 102

<210> 63

<211> 34

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rat)

<400> 63

Gly Glu Cys Gly Gly Lys Ala Met Asp Leu Glu Gln Val Ser Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Gln Thr Arg Asp Val Ala Gly Phe Ser Pro Val His Pro Leu Ser
 20 25 30
 Phe Ala

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 64

ccggatccat gcgggcagcg cctta 25

<210> 65

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 65
atctcgactg ccccgaaagaa cc 22

<210> 66
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 66
cagtcgaatg gatgtcctgg ctggc 25

<210> 67
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 67
ccggatccta gcaaaggcta ctgatttca 29

<210> 68
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 68
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccatgcgggc agcgccttac 60
ggggtcaggc tttgcggccg agaattcatc cgagcagtca tcttcacctg cgggggctcc 120
cgggtggagac gatcagacat cctggccac gaggctatgg gagatacctt cccggatgca 180
gatgctgatg aagacagtct ggcaggcgag ctggatgagg ccatggggtc cagcgagtgg 240
ctggccctga ccaagtcacc ccaggccttt tacagggggc gaccagctg gcaaggaacc 300
cctgggggtt ttcggggcag ccgaatggat gtcctggctg gcctttccag cagctgctgc 360
aagtgggggt gtagcaaaag tgaaatcagt agcctttgc 399

<210> 69
<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 69

```

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Arg
              5              10              15
Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala
              20              25              30
Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg Ser Asp Ile Leu
              35              40              45
Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala Asp Glu
              50              55              60
Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp
65              70              75              80
Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser
              85              90              95
Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly Ser Arg Met Asp Val Leu
              100             105             110
Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu
              115             120             125
Ile Ser Ser Leu Cys
              130

```

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 70

acggataccc caaggacatc t

21

<210> 71

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 71	
ctcagaaaga gcagcatcga tatg	24
<210> 72	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 72	
cagctccttt ggcttccta gaactgtga	29
<210> 73	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 73	
ccagcacata ggagagatga gc	22
<210> 74	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 74	
ggaacattta cacgtctgcg g	21
<210> 75	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	

<400> 75 agcaagacaa gaaaatccct gtggg	25
<210> 76 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 76 gaaggtgaag gtcggagtc	19
<210> 77 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 77 gaagatggtg atgggatttc	20
<210> 78 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 78 caagcttccc gttctcagcc	20
<210> 79 <211> 54 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223>	

<400> 79
ctccagccta ggcttttgca aaaaccacca tggagctgag gccctggttg ctat 54

<210> 80
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 80
ttatttccta gggaattcat caatggtgat ggtgatgatg gccctgactg gacgtgaggg 60
tcttgc 66

<210> 81
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 81
aacagtcaat tgccaccatg gcaagataca tgctgctgct gctcctggcg gtatgggtgc 60

<210> 82
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 82
tcagcaaagg ctactgattt cacttttgct gcacccccac ttgcaacagg agctgctaag 60
gccagccagg acatcgcggc ggccccgaag cctcccaggg gttccttgcc aggagggtcg 120

<210> 83
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 83

tttattagcg gccgctcagc aaaggctact gatttcactt ttgctacacc cccacttgc 59

<210> 84

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 84

aggcatgaat tcccaccatg gcaatgctcg ggctgctgct gctggcttcc tgggctctcc 60

tcggggctct 70

<210> 85

<211> 120

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 85

caacgcggcc gctagcacia gctgctaatt ttgctcttgc tacagcccca ctgcgagcaa 60

ctgctggaaa ggccagccaa cacatctctc ctgccccgaa cccttccagg tgacccttgc 120

<210> 86

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 86

tcaacgcggc cgctagcaca agctgctaatt ttgctcttgc ctacagcccc actgcgagca 60

ac 62

ATG GCC AGG TAC ATG CTG CTG CTG CTC CTG GCG GTA TGG GTG CTG ACC GGG GAG	54
Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr Gly Glu	18
CTG TGG CCG GGA GCT GAG GCC CGG GCA GCG CCT TAC GGG GTC AGG CTT TGC GGC	108
Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly	36
CGA GAA TTC ATC CGA GCA GTC ATC TTC ACC TGC GGG GGC TCC CGG TGG AGA CGA	162
Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg	54
TCA GAC ATC CTG GCC CAC GAG GCT ATG GGA GAT ACC TTC CCG GAT GCA GAT GCT	216
Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala	72
GAT GAA GAC AGT CTG GCA GGC GAG CTG GAT GAG GCC ATG GGG TCC AGC GAG TGG	270
Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp	90
CTG GCC CTG ACC AAG TCA CCC CAG GCC TTT TAC AGG GGG CGA CCC AGC TGG CAA	324
Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln	108
GGA ACC CCT GGG GTT CTT CGG GGC AGC CGA GAT GTC CTG GCT GGC CTT TCC AGC	378
Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser	126
AGC TGC TGC AAG TGG GGG TGT AGC AAA AGT GAA ATC AGT AGC CTT TGC TAG	429
Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys ***	142

图 1

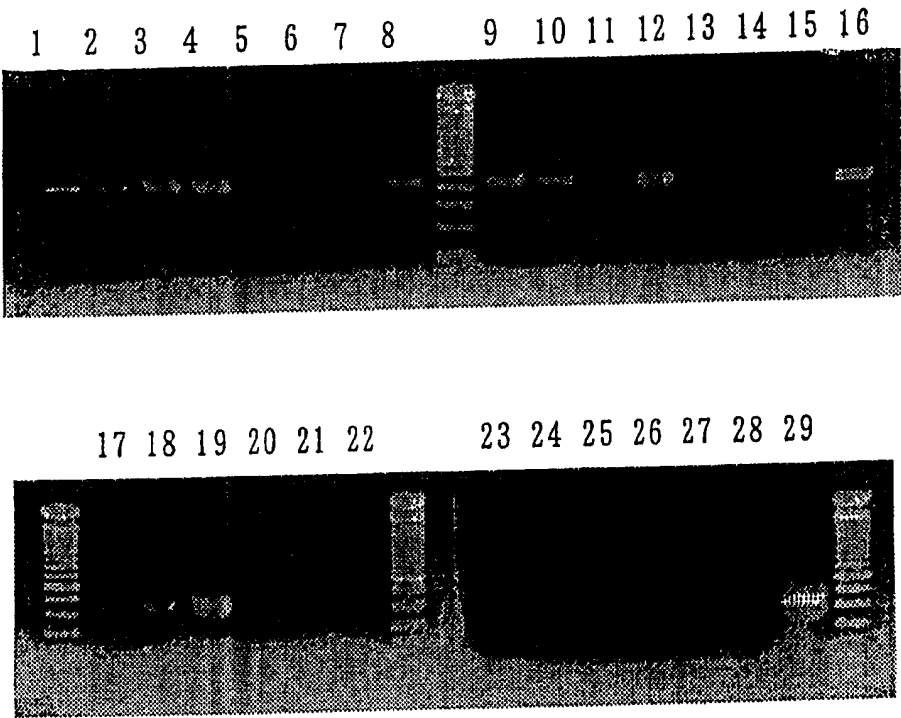


图 2

人体蛋白质	M A - R Y M L L L L L L A V W V L T G E L W P G A E A R A A	28
小鼠蛋白质	M A M L G - - L L L L L A S W A L L G A L G L Q A E A R P A	27
大鼠蛋白质	M A T R G - - L L L L L A S W A L L G A L V L Q A E A R P A	26
猪蛋白质	M A K R P L L L L L L A V W V L A G E L W L R T E A R A S	29
人体蛋白质	P Y G V R L C G R E F I R A V I F T C G G S R W R R S D I	57
小鼠蛋白质	P Y G V K L C G R E F I R A V I F T C G G S R W R R A D I	56
大鼠蛋白质	P Y G V K L C G R E F I R A V I F T C G G S R W R R A D I	55
猪蛋白质	P Y G V K L C G R E F I R A V I F T C G G S R W R R S D M	58
人体蛋白质	L A H E A M G D T F P D A D A D E D S L A G E L D E A M G	86
小鼠蛋白质	L A H E S L G D F F A D G E A N T D H L A S E L D E A V G	85
大鼠蛋白质	L A H D P L G E F F A D G E A N T D H L A S E L D E A V G	84
猪蛋白质	L A H E A L G D V F S D T S N A D S - - E L D E A M A	84
人体蛋白质	S S E W L A L T K S P Q A F Y R G R P S W Q G T P G V L R	115
小鼠蛋白质	S S E W L A L T K S P Q A F Y G G R A S W Q G S P G V V R	114
大鼠蛋白质	S S E W L A L T K S P Q V F Y G G R S S W Q G S P G V V R	113
猪蛋白质	S S E W L A L T K S P E T F Y G V Q P G W Q R T P G A L R	113
人体蛋白质	G S R D V L A G L S S S C C K W G C S K S E I S S S L C	142
小鼠蛋白质	G S R D V L A G L S S S C C E W G C S K S Q I S S S L C	141
大鼠蛋白质	G S R D V L A G L S S S C C E W G C S K S Q I S S S L C	140
猪蛋白质	G S R D V L A G L S S S N C C K W G C S K S E I S S S L C	140

图 3

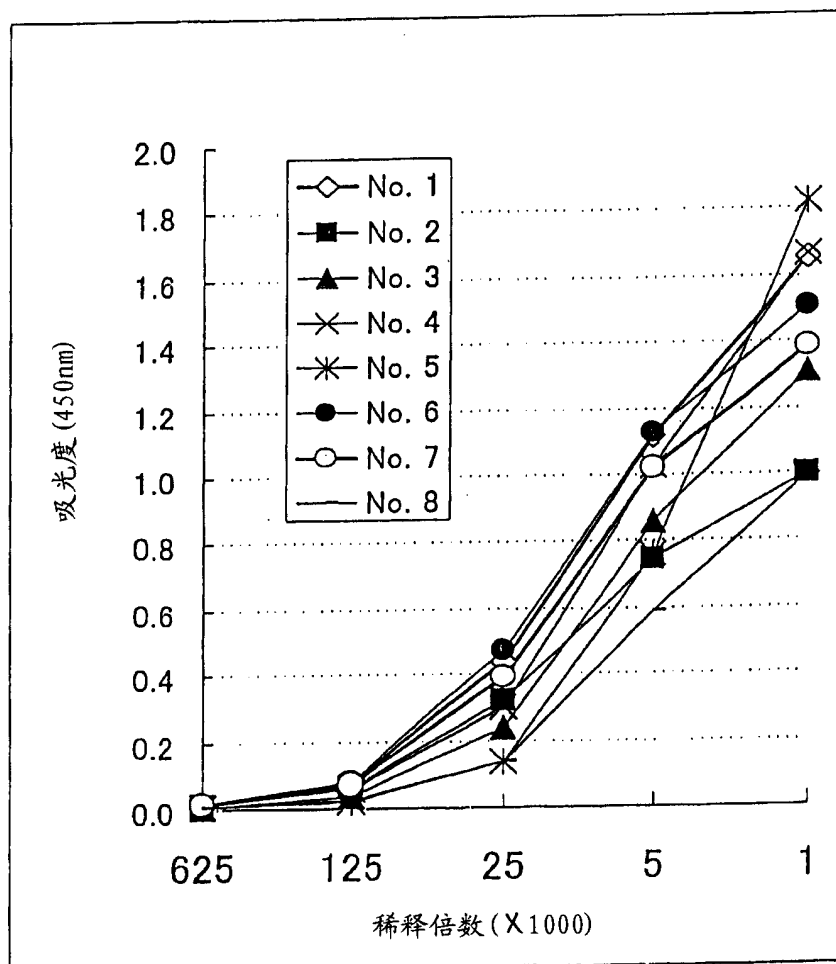


图 4

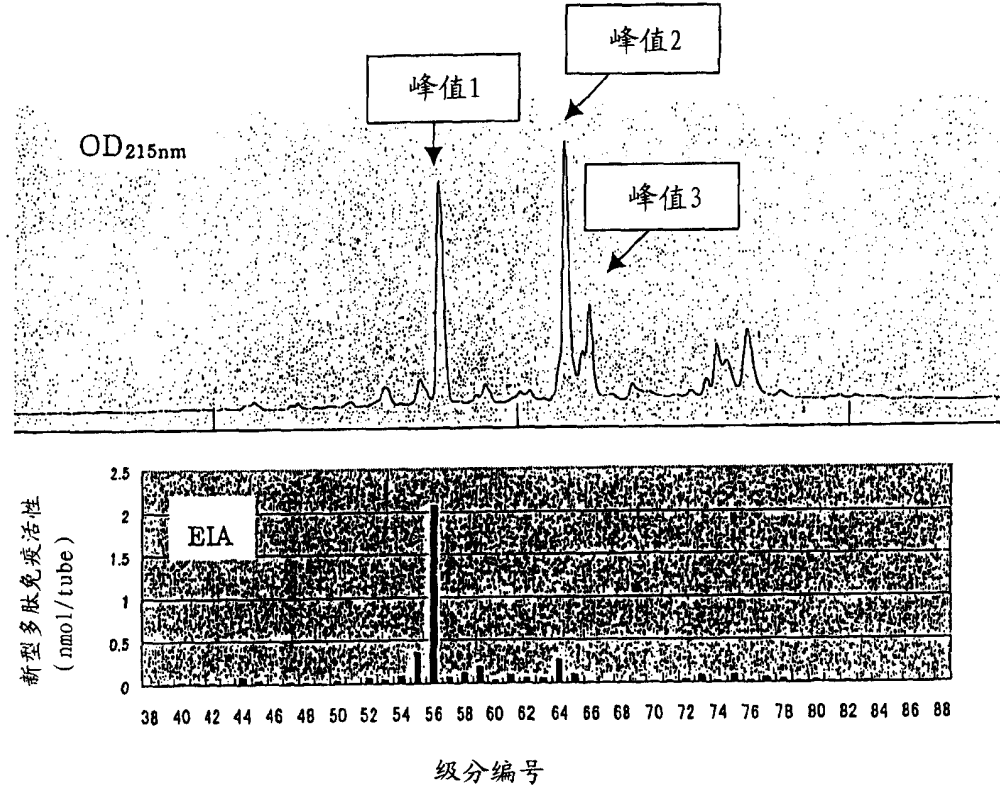


图 5

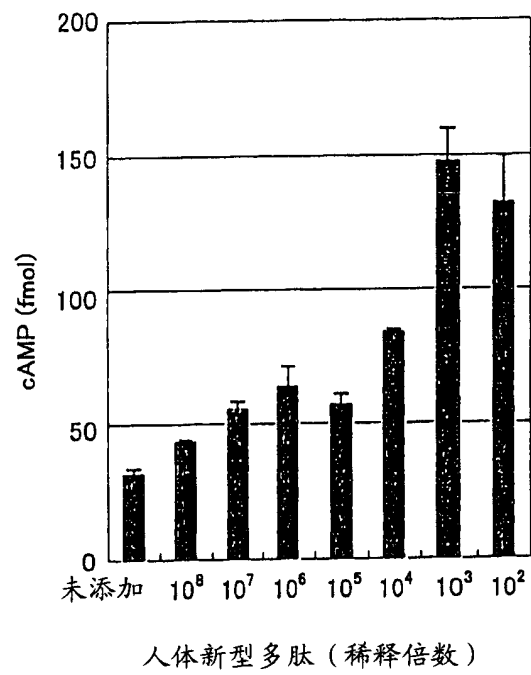


图 6

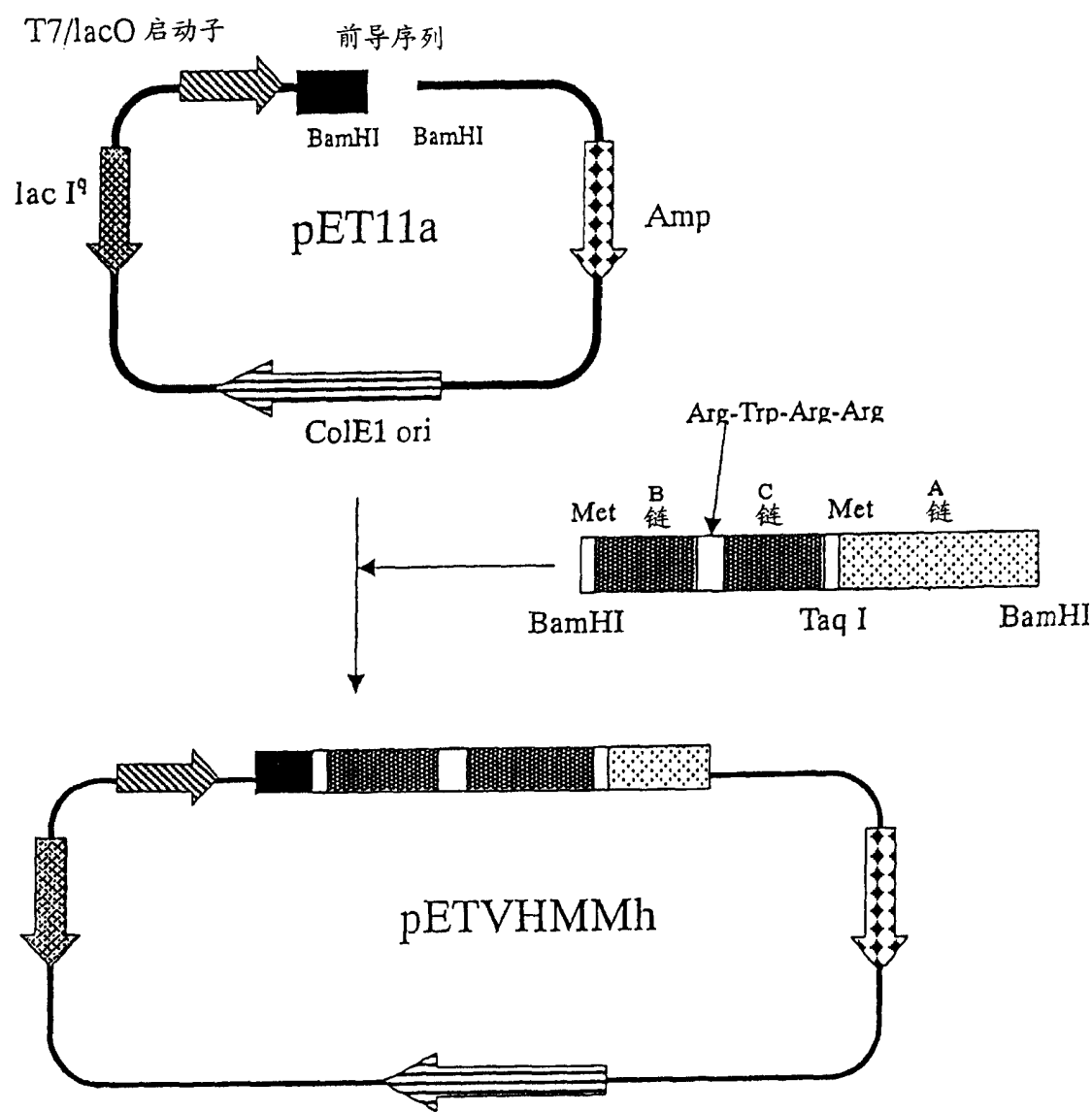


图 7

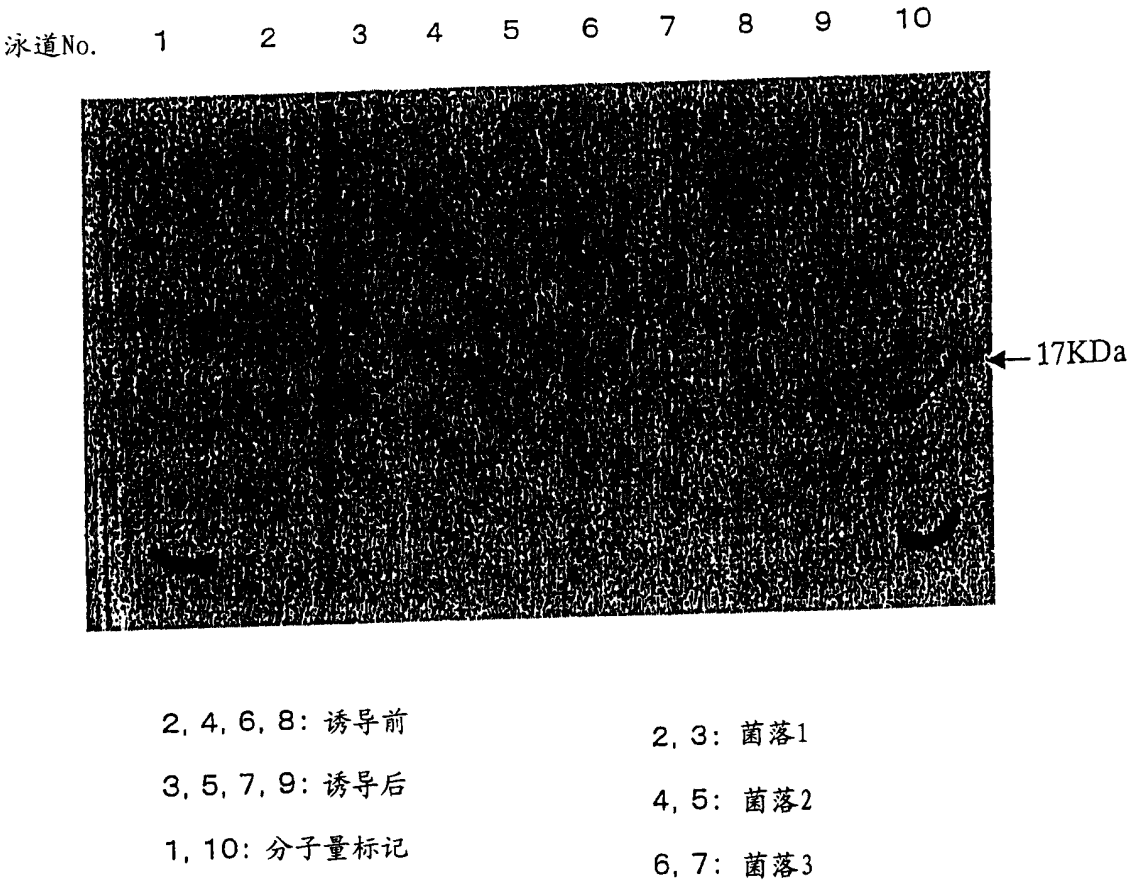


图 8

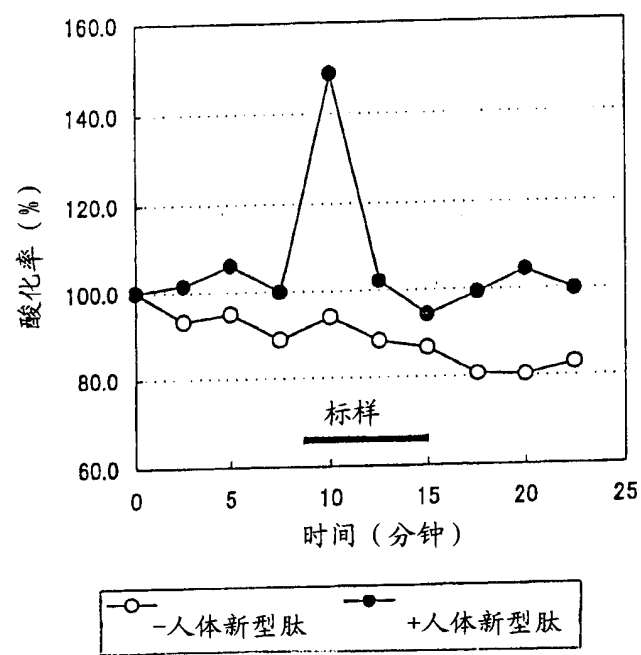


图 9

人体新型多肽

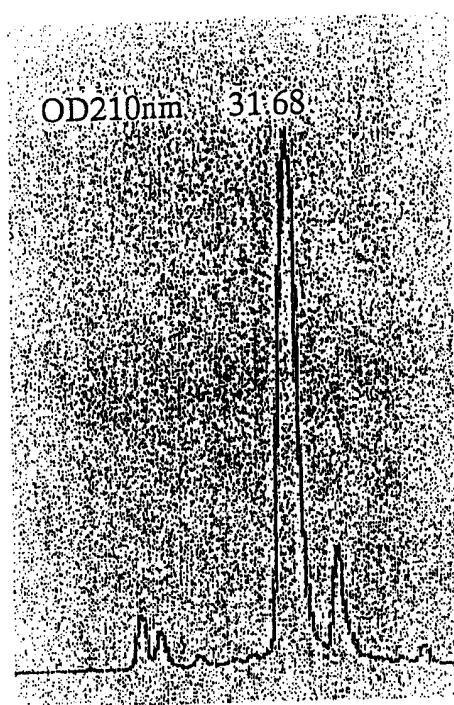


图 10

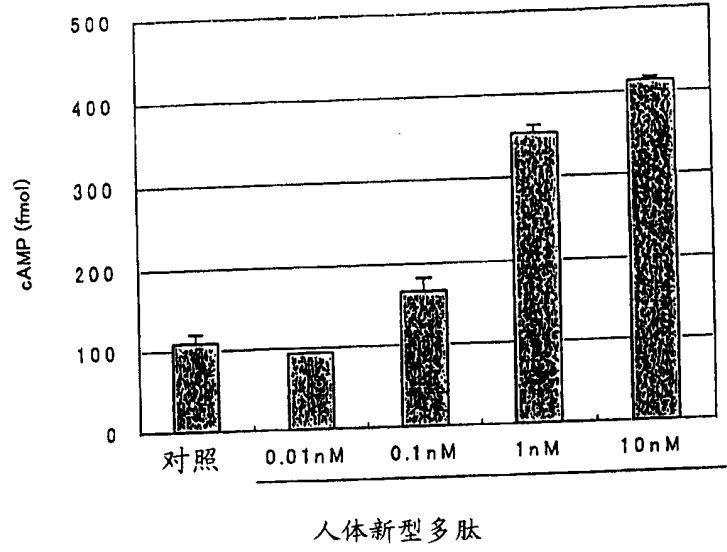


图 11

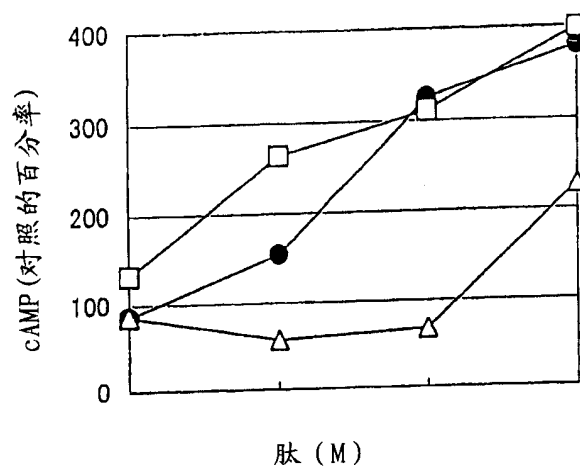


图 12

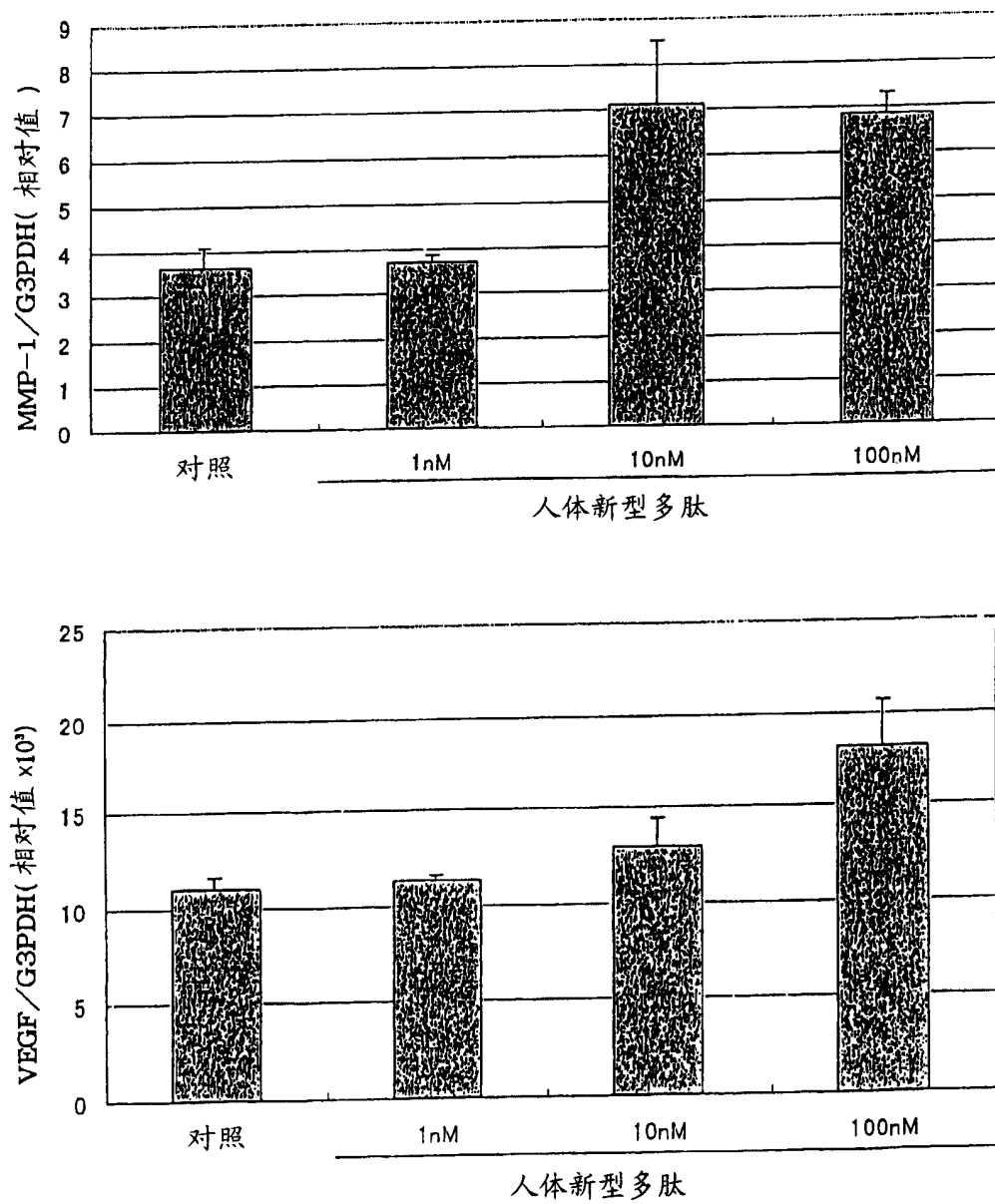


图 13

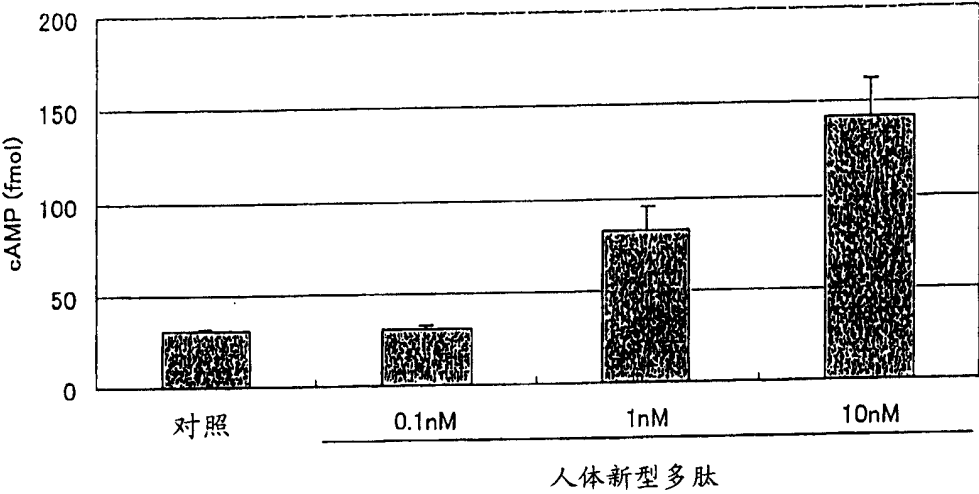


图 14

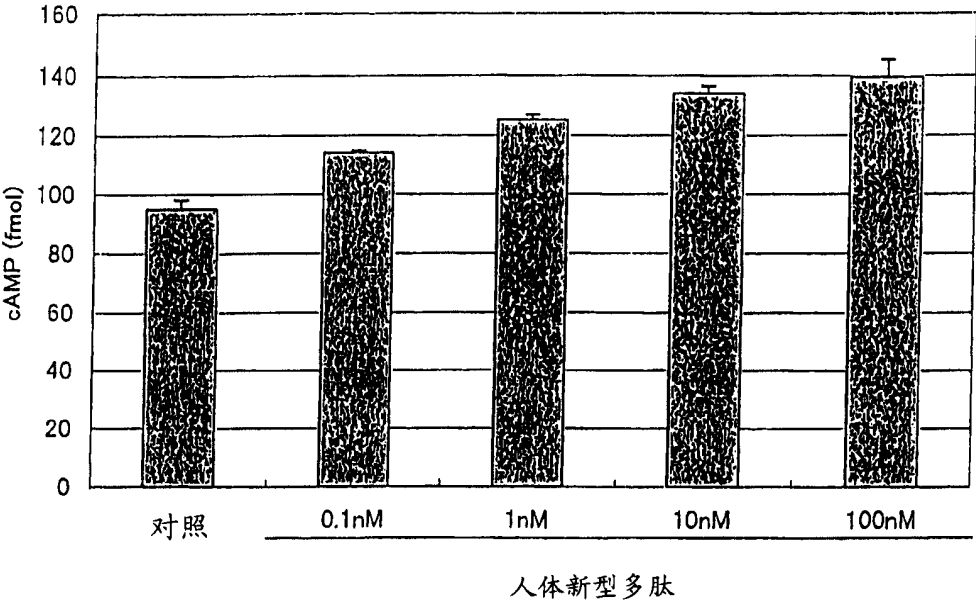


图 15

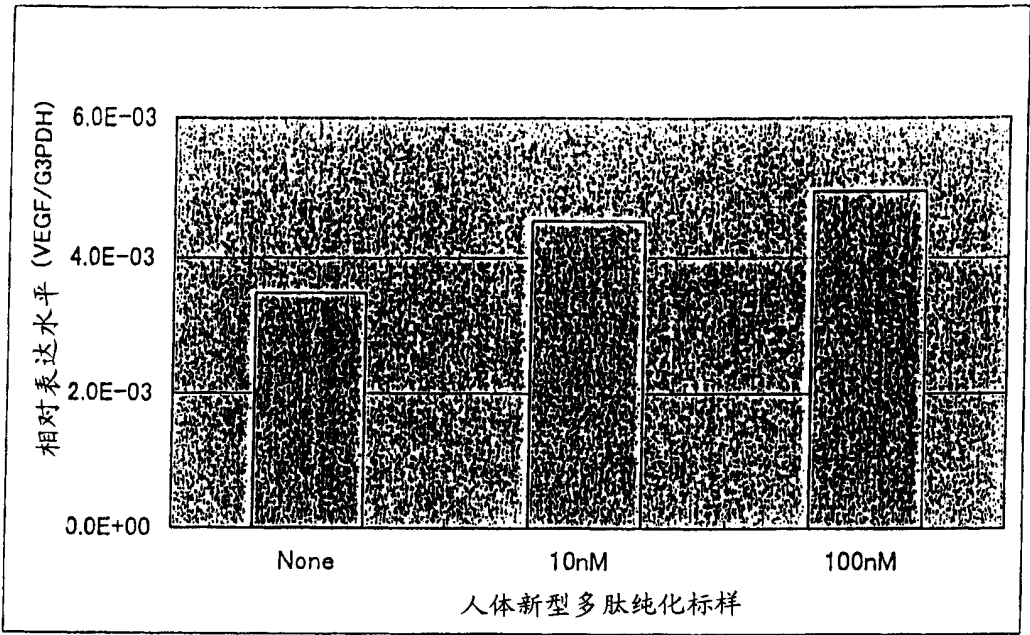


图 16

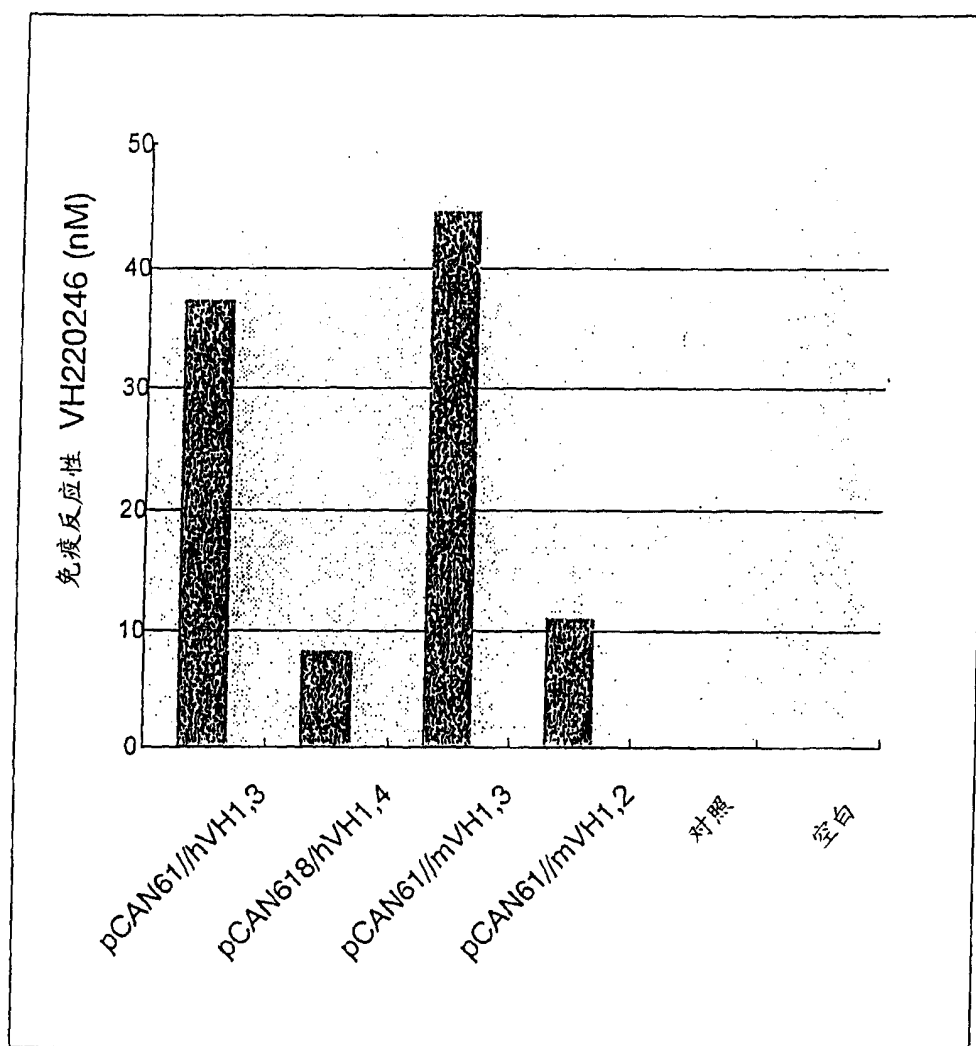


图 17

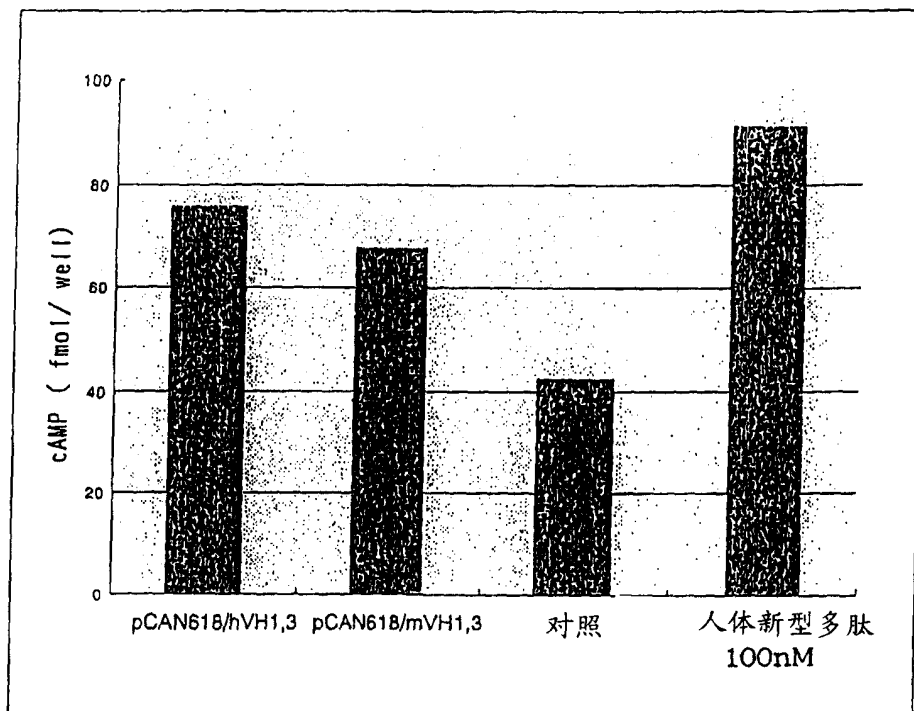


图 18