



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108026160 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680051667.1

(22)申请日 2016.09.07

(30)优先权数据

92818 2015.09.07 LU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/071126 2016.09.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/042242 EN 2017.03.16

(71)申请人 德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与环境研究中心(有限公司)

地址 德国纽伦堡

(72)发明人 H·利克特

(74)专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

代理人 曹津燕 丁磊

(51)Int.Cl.

G07K 14/71(2006.01)

权利要求书2页 说明书40页
序列表10页 附图37页

(54)发明名称

新型IGFR-样受体及其用途

(57)摘要

本发明提供一种新型IGFR-样受体和用于靶向所述受体的拮抗剂和激动剂。设想将所述拮抗剂和激动剂用作药物,并特别地用于治疗糖尿病。

1. 一种IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列,所述拮抗剂或激动剂用于预防性和/或治疗性治疗糖尿病的方法中。

2. 根据权利要求1所述的拮抗剂或激动剂,其中所述拮抗剂特异性地结合所述IGFR-样受体。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中所述拮抗剂或激动剂选自抗体、siRNA、核酸、适体、肽、蛋白或小分子有机化合物。

4. 根据权利要求3所述的拮抗剂或激动剂,其中所述抗体包含抗体、抗体变体和抗体片段。

5. 根据权利要求3或4所述的拮抗剂或激动剂,其中所述抗体是单克隆或多克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的拮抗剂或激动剂,其中所述抗体是特异性地结合所述IGFR-样受体的表位的单克隆抗体,所述表位包含以下序列:

(i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

(ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

(iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

(iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或

(v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中糖尿病包括1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病、前驱糖尿病、胰岛素抵抗、代谢综合征和葡萄糖耐量受损。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中治疗阻止或逆转胰岛素抵抗。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中治疗阻止或逆转胰岛细胞的去分化。

10. 一种药物组合物,其包含含有对应于SEQ ID NO:1的序列的IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂,其中所述拮抗剂是特异性地结合所述IGFR-样受体的单克隆抗体。

11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其中所述抗体特异性地结合所述IGFR-样受体的表位,所述表位包含以下序列:

(i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

(ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

(iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

(iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或

(v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

12. 一种单克隆抗体,其特异性地结合包含以下序列的IGFR-样受体表位:

(i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

(ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

(iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

(iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或

(v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

13. 一种诊断性结合剂,其能够特异性地结合IGFR-样受体,所述IGFR-样受体包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列,所述诊断性结合剂用于诊断糖尿病或发展糖尿病的风险的方

法中。

14. 一种体外筛选IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供表达所述IGFR-样受体的稳定细胞系;

(b) 使(i)的所述细胞系与候选拮抗剂或激动剂接触;和

(c) 测量IGFR-样受体下游信号传导事件,其中通过增加所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别拮抗剂,和通过减少所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别激动剂;

其中所述IGFR-样受体包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列,和

其中所述下游信号传导事件是InsR磷酸化、AMPK磷酸化、mTOR磷酸化、AKT磷酸化、ERK磷酸化和/或S6K磷酸化。

15. 一种通过权利要求14所述的方法可获得的IGFR-样受体拮抗剂或激动剂,所述IGFR拮抗剂选自抗体、siRNA、核酸、适体、肽、蛋白或小分子有机化合物。

16. 一种用于检测受试者中胰岛细胞退化的体外诊断性方法,所述体外诊断性方法包括以下步骤:

i) 使自所述受试者获得的样品与特异性地结合IGFR-样受体的诊断性结合剂接触;

ii) 检测所述结合剂的结合;

其中所述诊断性结合剂的可检测结合指示所述受试者中胰岛细胞的去分化;

其中所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。

17. 根据权利要求16所述的体外诊断性方法,其中胰岛细胞的去分化指示糖尿病或发展糖尿病的风险。

18. 根据权利要求16或17中任一项所述的体外诊断性方法,其中所述样品是血浆样品。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的体外诊断性方法,其中所述诊断性结合剂是单克隆抗体。

新型IGFR-样受体及其用途

背景技术

[0001] 胰岛素/胰岛素-样生长因子(IGF)构成了参与多种生理和病理过程的调节的配体、细胞-表面受体和结合蛋白的网络。胰岛素/IGF在生命的每个阶段发挥关键的发育和代谢作用。胰岛素/IGF信号传导还有助于调节寿命,而信号传导的失调则与肿瘤相关。虽然胰岛素受体(InsR)和IGF-1受体(IGF1R)共享它们的大部分下游细胞质介质,但是大多数实验及临床证据与以下观点一致:即InsR活化(主要通过胰岛素)主要导致代谢活动,而IGF1R活化(主要通过IGF-1或IGF-2)导致增殖和分化事件(Sarfstein R和Werner H *Endocrinology*.2013 May;154(5):1672-9;Siddle K J *Mol Endocrinol*.2011 Jun 17;47(1):R1-10)。

[0002] InsR和IGF1R属于含有跨膜酪氨酸激酶的受体家族。在这些受体的成熟形式中,它们以由2个胞外 α -亚基和2个具有酪氨酸激酶活性的跨膜 β -亚基组成的异四聚体呈现。IGF-和胰岛素受体均显示出高度的同源性(酪氨酸激酶结构域84%,配体结合结构域45%-65%,总氨基酸序列50%以上)。另外,该受体在基因组结构中显示出显著相似性(Sarfstein R和Werner H,在上述引文中;Arnalez F和Helman L. *Hematol Oncol Clin North Am*.2012 Jun;26(3):527-42)。

[0003] 也存在由一半胰岛素受体和一半IGF受体组成的“杂合体”受体(与IGF1R $\alpha\beta$ 连接的IR $\alpha\beta$)。杂合体以与IGFR相似的亲和力结合IGF,但是以大大低于InsR的亲和力结合胰岛素。目前尚不清楚杂合体受体是否具有独特的生理作用(Sarfstein R和Werner H,在上述引文中;Arnalez F和Helman L.,在上述引文中)。

[0004] 作为由外显子11编码的序列的可选剪接结果,胰岛素受体以两种剪接变体同种型存在;“B”同种型仅识别胰岛素,但是作为肿瘤最常表达的同种型的同种型“A”识别胰岛素及IGF1和2。在发育过程中,两种同种型差异表达,其中InsR-A主要在胎儿组织中表达,而InsR-B主要在成体组织,特别是在肝脏、肌肉和脂肪细胞中表达。IGF1R表现出相反的表达模式,即在肝中不存在,而在脂肪组织中低水平存在和在脑中高水平存在。此外,与IGF1R的有效(potent)的抗凋亡、促存活作用一致,其在大多数肿瘤和恶性细胞中过表达(Pollak M *Nat Rev Cancer*.2012 Feb 16;12(3):159-69;Sarfstein R和Werner H,在上述引文中;Siddle K,在上述引文中)。

[0005] IGF1和IGF2可以以内分泌、旁分泌或自分泌方式表达,在被转化细胞中后者是常见的。肝脏是它们的主要产生部位。相比之下,胰岛素产生局限于胰腺 β -细胞。除了同样以高亲和力结合InsR-A的IGF2之外,胰岛素和IGF以高亲和力与其特异性受体结合,并且以较低亲和力与非-同源受体结合(Pollak M,在上述引文中;Siddle K,在上述引文中)。

[0006] 配体结合诱导InsR和IGF1R结构的构象改变并活化它们的内在酪氨酸激酶活性。尽管胰岛素和IGF具有不同的生理作用,但是它们采用相同的信号传导通路。InsR和IGF1R的下游信号传导主要通过MAPK/Ras-Raf-Erk通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/AKT/mTOR(PI3K/AKT)通路和Janus激酶/信号转导子(transducer)和转录激活子(JAK/STAT)通路引导(channeled)。最终,IGF1R的活化导致细胞增殖增加和细胞凋亡降低,而通过胰岛素结合的

InsR活化促进脂质、蛋白质和碳水化合物的储存和合成并抑制它们分解和释放至循环中。胰岛素增加能量储存或利用的第一步涉及由促进性葡萄糖转运蛋白Glut4介导的葡萄糖向细胞的调节转运(Chang等人, *Mol Med.* 2004 Jul-Dec; 10 (7-12): 65-71.)。胰岛素表达限于专门化的胰腺β细胞,在正常情况下,其由循环葡萄糖水平紧密调节。胰岛素刺激的典型胰岛素-敏感器官(肝脏、肌肉和脂肪组织)的葡萄糖摄取降低了循环葡萄糖水平。因此,β-细胞为葡萄糖“恒温器”,其感测葡萄糖并释放胰岛素以将生理葡萄糖水平保持在相对较窄的范围内。精制(delicately)平衡的InsR信号传导通路的破坏导致胰岛素分泌失控或受损、血糖水平失调并最终导致胰腺β细胞破坏或功能丧失,即通常称为糖尿病的病症(Pollak M,在上述引文中;Siddle K,在上述引文中;Sarfstein R和Werner H,在上述引文中;Arnalez F和Helman L.,在上述引文中)。

[0007] 糖尿病影响了全球成人人口的8.3%,并以惊人的速度增长,是当今时代最常见的疾病之一。预计糖尿病患者的人数将从2013年的3.82亿增加到2035年的5.92亿,表示净增长为55%。其中占据全部糖尿病病例近90%的2型糖尿病(T2D)是主要形式(Hameed等人, *World J Diabetes.* 2015 May 15; 6 (4): 598-612)。

[0008] 1型糖尿病(T1D)是全世界数百万人患上的自身免疫性障碍,并且其是胰腺内郎格罕氏胰岛(islets of Langerhans)中产生胰岛素的β-细胞的器官特异性免疫破坏的结果。一旦这些细胞遭到破坏,患有1型糖尿病的患者失去血糖控制,这可导致急性病症(例如酮症酸中毒和严重低血糖症)和继发性并发症(包括心脏病、失明和肾功能衰竭)。一般认为1型糖尿病是遗传易感性、很大程度上未知的环境因素和随机事件综合发展的结果,然而,仍在继续阐释控制疾病开始和进展的精确的免疫学、遗传学和生理学事件。

[0009] 早期2型糖尿病(T2D)是由导致高胰岛素血症的典型胰岛素靶器官的胰岛素抵抗(即,通常由过量热量摄入诱导的正常胰岛素靶细胞的胰岛素摄取降低)引起的。起初,这些增加的胰岛素水平足以克服胰岛素抵抗并避免高胰岛素血症。然而,不仅由于胰岛素抵抗增加,还由于胰腺β细胞的胰岛素输出降低,最终出现了高胰岛素血症。

[0010] 糖尿病治疗的主要目标是控制血糖水平。通常通过施用胰岛素以及饮食改变和锻炼来控制T1D。然而,终身需要在营养摄入后注射胰岛素可能严重降低了患者的生活质量。此外,适当的胰岛素注射剂量和时间安排可能很困难。由于缺乏与致病过程可靠相关的生物标志物,严重损害了T1D的治愈或预防,从而导致诊断时β细胞数量显著减少。目前大多数1型糖尿病临床试验的目标是最好通过诱导免疫耐受来改善功能性残余β-细胞群,同时维持保护性免疫响应。通过定义可知,由于在治疗之前的显著β-细胞破坏,这几乎不能“治愈”所述疾病。因此,优选在疾病发作时表达的可靠的生物标志物是非常需要的。其它方法致力于移植胰腺或胰腺β-细胞从而重构分泌胰岛素的功能。然而,这一技术受到供体器官短缺的阻碍。对于T2D,除了胰岛素之外,还可以使用其他非胰岛素治疗剂(包括合成的降血糖剂),但其实际效果、施用方便往往受到限制,并且可能引起不良反应。

[0011] 可用的糖尿病治疗剂的安全性问题和副作用,以及迄今为止测试的任何试剂均无法永久缓解疾病,使得对可调节该疾病的具体干预措施的兴趣提高。

[0012] 本发明的目的在于满足本领域的需求。

发明内容

[0013] 本发明的发明人观察到由人KIAA1324基因编码的蛋白(也称为雌激素诱导的基因121蛋白(Q6UXG2))特别是在胰腺中与IGF-1R、IGF-2R和InsR共定位。雌激素诱导的基因121蛋白被赋予调节自体吞噬和促进应激下细胞存活的功能。本领域还已知由雌激素诱导的基因121编码的变体蛋白并将其命名为MABA-1(WO 2007/005987)。MABA-1与由雌激素诱导的基因121编码的蛋白在一个位置不同。由于MABA-1阻断蛋白质而导致癌细胞的生长抑制,因此确定MABA-1在癌症中起作用。然而,一切都是未知的,更无法推测所述蛋白在代谢中的作用。本申请的发明人首次将这一作用归因于所述蛋白。

[0014] 由于其结构域结构与IGFR的结构域结构类似,本申请的发明人确定该蛋白的受体功能并因此称该蛋白为IGFR-样受体。本申请的发明人还观察到其IGFR-样受体在垂体、下丘脑和胰岛细胞中的最高表达,所述垂体、下丘脑和胰岛细胞构成了控制食物摄取和代谢的内分泌轴。

[0015] 此外,本申请的发明人阐明无论是基因敲低还是基因敲除IGFR-样受体均导致InsR和IGFR1的磷酸化增加以及AMPK磷酸化增加,AMPK是一种下游信号传导组分,当IGFR或InsR或两者传递信号(如结合胰岛素)时变为有活性的。因此,IGFR-样似乎负调节InsR和/或IGFR-介导的信号传导。此外,根据本发明的内容,即由KIAA1324基因编码的蛋白质实际上起IGFR-样受体的作用,本申请的发明人通过检查全基因组关联研究(GWAS)发现KIAA1324基因中的SNP与2型糖尿病、LDL胆固醇和/或冠状动脉疾病紧密相关。

[0016] 综上,被本申请的发明人确定IGFR2和/或InsR调节剂功能的由人KIAA1324基因编码的蛋白在代谢中,特别是在胰岛素信号传导中并且还可能在LDL胆固醇代谢中以及在诸如冠心病之类的疾病中起作用。由于人们相信,除了IGFR和InsR之外,胰岛素信号传导中没有其它参与者,因此上述发现具有重要的意义。由于其对IGFR和/或InsR的假定负调节作用,本发明的IGFR-样受体似乎是调节剂的有吸引力的靶标,并由此可为如用于治疗糖尿病、LDL胆固醇相关的障碍以及冠状动脉疾病,特别是II型糖尿病的药物提供了新途径。

[0017] 因此,所述受体的拮抗剂开启了逆转如在II型糖尿病发病机制中常见的胰岛素抵抗的新的和迫切需要的可能性,而激动剂可用于阻断胰岛素信号传导。引人注目的是,本申请的发明人还表明IGFR-样受体与胰腺中 β 细胞去分化相关,所述去分化是疾病发作的早期事件,其最终导致 β 细胞破坏或功能丧失。因此,IGFR-样受体还是一种有前途的诊断性工具,其能够在 β 细胞不可挽回的损失之前早期诊断并治疗糖尿病,由此可能为I型糖尿病的治疗铺平道路。

[0018] 因此,本发明提供一种分离的编码IGF受体(IGFR)-样受体的DNA序列,所述IGF受体(IGFR)-样受体能够与针对SEQ ID NO:1的IGFR-样受体的抗体反应,其中所述抗体特异性地结合以下序列的至少一个表位:

[0019] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2); 和/或

[0020] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3); 和/或

[0021] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4); 和/或

[0022] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5); 和/或

[0023] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0024] 特别地,所述分离的DNA序列可编码包含对应于SEQ ID NO:1的序列的IGFR-样受

体。

[0025] 所述分离的DNA序列可特别包含对应于SEQ ID NO:7 (NM_0200775.4)的序列。

[0026] 本文还提供一种包含本文所述的DNA序列的载体。所述载体可进一步包含与编码所述IGFR-样受体的DNA序列可操作地连接的基因调节元件。还设想包含所述载体的宿主细胞。

[0027] 本文进一步提供能够特异性地结合IGFR-样受体的结合剂,所述包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列的IGFR-样受体用作用于糖尿病或发展糖尿病的风险的诊断性标志物。

[0028] 本文还提供了本发明的IGFR-样受体的拮抗剂和激动剂,所述IGFR-样受体包含例如对应于SEQ ID NO:1的序列。通常设想将所述拮抗剂和激动剂用作药物。具体而言,本文提供的拮抗剂和激动剂旨在用于预防性和/或治疗性治疗糖尿病的方法中。然而,拮抗剂是优选的。

[0029] 设想所述拮抗剂和激动剂特异性地结合所述IGFR-样受体并可特别选自抗体、siRNA、核酸、适体、肽、蛋白或小分子有机化合物等等。所述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。

[0030] 特别地,优选地为单克隆抗体的抗体可以是特异性地结合所述IGFR-样受体的表位的抗体(如单克隆抗体),所述表位包含以下序列或由以下序列组成:

[0031] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

[0032] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

[0033] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

[0034] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID NO.:5);和/或

[0035] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0036] 在本文提供的诊断性和/或治疗性用途中,设想糖尿病包括1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病、前驱糖尿病、胰岛素抵抗、代谢综合征和葡萄糖耐量受损。

[0037] 采用IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂(拮抗剂是优选的)的治疗可以阻止或逆转胰岛素抵抗和/或逆转胰腺β细胞的去分化和/或功能丧失。

[0038] 本文还提供一种包含IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂(拮抗剂是优选的)的药物或药物组合物。在一个优选的实施方式中,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列或由对应于SEQ ID NO:1的序列组成。在一个优选的实施方式中,所述拮抗剂或激动剂是特异性地结合所述IGFR-样受体的单克隆抗体。

[0039] 特别地设想所述优选的单克隆抗体结合所述IGFR-样受体的表位,所述表位包含以下序列或由以下序列组成:

[0040] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

[0041] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

[0042] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

[0043] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID NO.:5);和/或

[0044] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0045] 本文进一步提供一种单克隆抗体,其特异性地结合以下序列的IGFR-样受体表位:

[0046] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

[0047] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

- [0048] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4); 和/或
- [0049] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID NO.:5); 和/或
- [0050] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。
- [0051] 本文还提供一种IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂的体外筛选测定,所述方法包括以下步骤:
- [0052] (a) 提供表达所述IGFR-样受体的稳定细胞系;
- [0053] (b) 使(i)的所述细胞系与候选拮抗剂或激动剂接触;和
- [0054] (c) 测量或检测IGFR-样受体下游信号传导事件,其中通过抑制所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别拮抗剂,和通过促进所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别激动剂;
- [0055] 在一个优选的实施方案中,所述IGFR-样受体包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列。
- [0056] 本文还提供一种通过体外筛选测定可获得的IGFR-样受体拮抗剂或激动剂,所述IGFR-样受体拮抗剂或激动剂选自抗体、siRNA、核酸、适体、肽、蛋白或小分子有机化合物。
- [0057] 此外,本发明提供一种用于检测受试者中胰岛细胞退化的体外诊断性测定,所述体外诊断性测定包括以下步骤:
- [0058] i) 使所述受试者的样品,如血浆样品,与特异性地结合IGFR-样受体的诊断性结合剂,如单克隆抗体接触;
- [0059] ii) 检测所述结合剂的结合;
- [0060] 其中所述结合剂的可检测结合指示受试者中胰岛细胞的去分化;和其中所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。
- [0061] 设想所述诊断性结合剂,特别地其可以是本发明的抗体,比如单克隆抗体,特异性地结合如以下序列的IGFR-样受体表位:
- [0062] (i) TSKRTPDGFDVPLKT (SEQ ID NO.:2); 和/或
- [0063] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3); 和/或
- [0064] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4); 和/或
- [0065] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5); 和/或
- [0066] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。
- [0067] 设想胰岛细胞的去分化指示糖尿病或发展糖尿病的风险。
- [0068] 所述诊断性结合剂优选地可以为组合物形式,比如诊断性组合物。因此,本发明还提供包含如文本所述的诊断性结合剂的诊断性组合物,可选地,该诊断性组合物进一步包含用于检测所述诊断性结合剂与其靶标(即本文所述的IGFR-样受体)的结合的工具。
- [0069] 本发明还涉及本发明的结合剂的用途和特别地本发明的抗体在用于体外检测胰岛细胞退化中的用途。还考虑了这些抗体用于制备治疗性或诊断性组合物的用途。
- [0070] 本文还提供一种治疗糖尿病的方法,所述方法包括向受试者施用IGFR-样受体拮抗剂或激动剂,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。

附图说明

- [0071] 当结合非限制性实例和附图考虑时,参照详细描述将更好地理解本发明。附图阐

释了本发明的方法的实施方案。

[0072] 图1:说明书中所列序列的描述.序列ID NO:1代表IGFR-样受体长转录物,加红色下划线的为预测的生长因子结构域,加绿色下划线的为甘露糖-6-磷酸受体结合结构域,加黑色下划线的是跨膜区,和加蓝色下划线的是细胞质区。加下划线突出的粗体字符是对应于序列ID NO:2-6的5个表位,抗体针对这些表位。

[0073] 图2:在胰腺中接近IGF-1、IGF-2和胰岛素配体的IGFR-样受体的表达.E14.5小鼠胚胎的Genepaint.org原位杂交显示胰腺中IGFR-样受体mRNA的特异性表达(B)。IGF1和IGF2mRNA在接近胰腺上皮的组织中表达(A,C),而胰岛素mRNA存在于胰腺的内分泌区室中(D)。

[0074] 图3:IGFR-样受体基因敲除小鼠在出生后早期以正常体重死亡.EUCOMM等位基因的示意图(A)。EUCOMM等位基因是knockout first,具有条件性潜力的报告子标记的插入(启动子驱动盒)(Skarnes WC等人,2011;Nature)。在关键外显子上游染色体3的位置108489484插入L1L2_Bact_P盒(Build GRCm38)。所述盒由FRT位点、然后是lacZ序列和loxP位点组成。该第一loxP位点之后是处于人 β -肌动蛋白启动子控制下的新霉素、SV40 polyA、第二FRT位点和第二loxP位点。在靶向的外显子下游在位置108488602处插入第三loxP位点。关键的外显子侧翼是loxP位点。“conditional ready”(floxed)等位基因可通过在携带该等位基因的小鼠中的flp重组酶表达创建。之后的cre表达得到基因敲除小鼠。如果在无flp表达下出现cre表达,则将创建报告子基因敲除小鼠(<http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:4436415>)。IGFR-样受体基因敲除小鼠在出生时表现出正常外观,但如通过其胃中缺乏牛奶所示不能进食(B,星号),它们昏睡并表现出呼吸窘迫、代谢功能障碍的迹象。不同阶段的孟德尔比率表明三种基因型直到出生的正态分布,然而在出生后直至离乳期,存活的基因敲除小鼠的百分比显著降低。在离乳期发现只有少数幸存者,这可能因为补偿机制和/或在插入的盒周围剪接导致不完全敲除(C)。直方图描述在P0时基因敲除小鼠与野生型和杂合的同窝对照相比的正常体重(D)。

[0075] 图4:IGFR-样受体KO小鼠的胰腺中的生长、增殖和内分泌分化.胰腺切片的共焦图像显示了如通过使用胰岛素抗体的免疫荧光标记的 β -细胞所示(绿色)的在E16.5时的正常内分泌分化(在E14.5和E18.5时获得了类似的结果,未示出)。如通过引入EdU显示胰腺上皮的正常增殖(红色)。在E14.5、E16.5和E18.5时EdU阳性细胞相对于总细胞数的定量(由DAPI染色)显示基因敲除和野生型胰腺之间的增殖无显著性差异(计数来自一个胰腺/阶段的不同区域的至少三个切片,误差线代表平均值的标准误差(SEM))。

[0076] 图5:出生前IGFR-样受体KO小鼠中的胰腺基因表达.实时qPCR显示,在E18.5时与野生型对照相比,选择的对基因敲除胰腺的内分泌 β -细胞分化、成熟、增殖和功能重要的基因的相对mRNA表达的适度变化。在这个阶段,胚胎仍然依赖于母体营养。(N=4,误差线代表SEM)。将肌动蛋白用作进行归一化的持家基因。

[0077] 图6:当胎盘营养供给中断并且InsR-A转为InsR-B,出生后的IGFR-样受体KO小鼠中的胰腺基因表达的改变。如通过实时qPCR所示,当出生后立即与野生型对照相比,在基因敲除的胰腺中,选择的对内分泌 β -细胞分化(Foxa2、Pdx1、Pax6、Neurod1、Nkx2-2、Nkx6-1)、成熟(MafA、MafB、Ucn3)、增殖(Ccnd1、Ccnd2、Cdk4、Cdkn1a、Cdkn1b)和功能(Slc2a2、Slc30a8、Gjd3、Kcnj11、Smarca1、Abcc8)重要的基因的相对mRNA表达显著改变。(N=2,误差

线代表SEM)。

[0078] 图7:在胰腺和Min6小鼠胰岛素瘤细胞中IGFR-样受体介导的Akt和AMPK信号传导。整个胰腺组织裂解物的蛋白质印迹法显示采用磷酸化特异性抗体的Akt和AMPK磷酸化(A)。显著数量的突变型胚胎显示Akt(mt 2,3,5,6)和AMPK磷酸化(mt 1,2,3)增加(A)。在(B)中类似的,如蛋白质印迹法所示在Min6细胞中IGFR-样受体的基因敲低导致Akt磷酸化增加。用靶向IGFR-样受体mRNA的siRNA或作为对照的无意义(scrambled) siRNA转染Min6细胞。

[0079] 图8:IGFR-样受体的基因敲低对Min6细胞中胰岛素/IGF信号传导的影响。如通过采用针对IR/IGF1R的磷酸化特异性抗体的蛋白质印迹法所示,Min6胰岛素瘤细胞中IGFR-样受体的基因敲低导致正常生长条件下的IR/IGF1R磷酸化增加,并且似乎不依赖于饥饿条件。IR和IGF1R以及IRS-2(IR信号传导下游的衔接子分子)的总水平未改变,而在基因敲低样品中IGFR-样受体大大降低,证明了siRNA基因敲低的效率(A)。下游信号传导分子比如AKT和mTOR的蛋白质印迹分析,所述分子是通常由于IR激活而被磷酸化的重要分子。Min6细胞中的IGFR-样受体基因敲低导致Akt和mTOR的磷酸化增加,而ERK和S6PR的磷酸化未增加。如磷酸化-S6RP的时间依赖性降低所示,当与其时间匹配的对照相比时,饥饿条件似乎对IGFR-样受体基因敲低样品中的Akt、mTOR和ERK磷酸化没有影响(B)。

[0080] 图9:IGFR-样受体在胰腺的内分泌细胞、导管细胞和外分泌细胞中的定位。采用针对IGFR-样受体(绿色)、胰岛素抗体(红色)和E-钙粘蛋白(青色)的抗体染色的E18.5胰腺切片的共焦图像显示了IGFR-样受体在与胰岛素部分共定位的外分泌和内分泌区室内的免疫定位。细胞核用DAPI染色。

[0081] 图10:Min6细胞中的IGFR-样受体的亚细胞定位。采用针对IGFR-样受体和GM130(高尔基体标志物)的抗体染色的Min6细胞的免疫荧光图像显示,与IGF2R类似,IGFR-样受体在高尔基体复合物中部分定位。

[0082] 图11:饥饿时IGFR-样受体定位。用IGFR-样受体(红色)和GM130(绿色)标记的Min6细胞免疫荧光的共焦图像显示,与正常生长条件相比时,在饥饿2h后集中在顺面高尔基体(cis-Golgi)区域的IGFR-样受体的重新分布。

[0083] 图12:AP-2结合和分选信号在IGFR-样受体中的位置。附图显示了SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12和部分SEQ ID NO.1的氨基酸序列。

[0084] 图13:饥饿条件下IGFR-样受体与AP-2的相互作用。蛋白质印迹分析显示,如通过采用针对IGFR-样受体和衔接蛋白 β 的抗体的免疫沉淀所证明的那样,在饥饿时Min6细胞中的衔接蛋白 β 亚基(AP2复合物的一部分)与IGFR-样受体一起共免疫沉淀。在正常饥饿条件下几乎没有衔接蛋白 β 共沉淀。

[0085] 图14:营养缺乏时,是IGFR-样受体而非InsR被转运至细胞。表面生物素化然后是中抗生物素蛋白pulldown和蛋白质印迹法证明在饥饿条件下IGFR-样受体的表面表达降低是时间依赖性降低,而Min6细胞中IR没有减少。

[0086] 图15:在基础条件下,IGFR-样受体基因敲低很可能不改变自噬相关蛋白的蛋白质表达。自噬相关分子的蛋白质印迹分析表明在正常生长条件下,Min6细胞中IGFR-样受体基因敲低时表达无明显变化。

[0087] 图16:在小鼠糖尿病胰岛(diabetic islet)和外分泌组织中IGFR-样受体的表达。野生型(<120mg/dL葡萄糖)和糖尿病(>500mg/dL葡萄糖)成人胰腺的LSM图像显示内分泌

和外分泌区室的糖尿病胰腺中IGFR-样受体抗体的免疫反应性增加,其中所述成人胰腺采用针对IGFR-样受体(红色)、胰岛素(青色)和E-钙粘蛋白(绿色)(A)以及IGFR-样受体(红色)、胰高血糖素(青色)和尿皮质素3(绿色)(B)的抗体染色.通过糖尿病胰腺中染色的胰岛素和尿皮质素3降低证明糖尿病状态.右侧的图像代表用白色方块标记的区域的放大率更高。

[0088] 图17:采用针对IGFR-样受体的细胞内和细胞外结构域的抗体检测胰岛细胞中的IGFR-样受体.蛋白质印记实验表明在胰岛细胞裂解物中特异性识别了~130kDa的蛋白条带,而通过针对细胞外结构域SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的抗体在HEK细胞裂解物中不存在该蛋白条带.通过比较,在全部野生型和杂合的胰腺裂解物中,针对细胞内结构域SEQ ID NO 2的抗体特异性识别了相同的条带,但是在突变型胚胎中未特异性识别相同的条带,以及在胰岛细胞中特异性识别了相同的条带但是在HEK细胞中未特异性识别相同的条带。

[0089] 图18:人郎格罕氏岛(islets of Langerhans)中的IGF3R表达.郎格罕氏岛的共焦图像显示在高尔基体区室中典型的IGFR-样受体分布和与IGF2R及胰岛素的部分共定位,其中所述郎格罕氏岛来自人供体并采用针对IGFR-样受体(红色)、IGF2R(M6PR)(绿色)和胰岛素(青色)的抗体免疫荧光标记。

[0090] 图19:在胞外结构域、CRD和CTD中KIAA1324/IGFR-样编码SNP。

[0091] 图20:KIAA1324标记SNP与胰岛素敏感性(A)、脂肪因子和炎症(B)和胰岛素原转化(C)的关联。

[0092] 图21:胰岛素通路中IGFR-样受体功能的假设模型.建议的机制示意图,通过该机制IGFR-样受体可执行其功能.在一种假设中,IGFR-样受体可作为IR信号传导和再循环的调节剂.当胰岛素与IR结合时,该复合物的结合以时间和剂量依赖的方式触发IGFR-样受体的募集,而这又依次将该复合物靶向早期核内体/溶酶体区室,在该处配体将被降解并且IR与IGFR-样受体一起重新导向质膜.另一种假设是胰岛素配体与IGFR-样受体的直接结合可能触发该复合物的内化和溶酶体中胰岛素的降解,因此IGFR-样受体作为消除(deplet)某些情况下释放的过量细胞外周的胰岛素的清除剂分子.最后,IGFR-样受体可能通过正确的指导和运输分泌小泡参与胰岛素颗粒的生物发生和成熟。

[0093] 图22:IGFR-样受体指示人胰腺β细胞功能障碍.采用针对IGFR-样受体(红色)和胰岛素(绿色)的抗体染色的人胰腺切片的LSM图像.被DAPI(蓝色)染色的细胞核显示,与非糖尿病(4.6%HbA1c值)患者相比,糖尿病(6.9%HbA1c值)患者中胰岛素减少和IGFR-样受体表达增加(HbA1c用作糖尿病状态的指征,定义为血浆中糖化血红蛋白HbA1c的百分比;正常范围:<5.9%)。

[0094] 图23:IGFR-样受体基因敲除和基因敲入策略以研究细胞培养物和小鼠中的受体功能.(1)以核心启动子和转录起始侧为靶点的CRISPR/Cas9介导的基因敲除策略的示意图.(2)通过移除翻译终止序列并将Venus框内与IGFR-1开放阅读框融合的Venus荧光报告子CRISPR/Cas9-介导的基因敲入融合物的示意图.IGFR-1基因位于小鼠染色体3的108455694-108536536。

[0095] 图24:在野生型和基因敲除Min6细胞中的IGFR-样受体亚细胞定位.采用针对IGFR-样受体(红色)和胰岛素(绿色)的抗体染色的Min6细胞的免疫荧光图像.采用DAPI(蓝色)使细胞核染色。

[0096] 图25:在Min6细胞中的IGFR-样受体基因敲除确认。(A) IGFR-1转录起始侧周围的基因组PCR显示大片的纯合内部缺失。(B) 蛋白质印迹法证实了IGFR-1无效突变,并且表明在基因敲除的Min6克隆中IGFR-1蛋白完全不存在,这证实了免疫细胞化学的结果。

[0097] 图26:Min6细胞中的IGFR-样受体基因敲除.磷酸化胰岛素受体(IR)和下游信号传导分子如AMPK、AKT和mTOR的蛋白质印记分析,所述分子是通常由于IR活化而磷酸化的重要分子。Min6细胞中的IGFR-样受体基因敲除导致IR磷酸化增加,并由此使AMPK磷酸化增加,但是未使Akt或mTor磷酸化增加。在生长条件下(10%FCS和高葡萄糖)培养Min6对照和基因敲除克隆。

[0098] 图27:IGFR-样Venus融合物基因敲入Min6细胞系.将IGFR-1与Venus荧光报告子在框架中N-末端融合,且在高尔基体和反面高尔基体(trans-Golgi)区域显示了内源性的IGFR-1(抗-IGFR-1,红色)和IGFR-1-Venus(抗-GFP检测Venus,绿色)的共定位。可以采用使用这种基因敲入Min6细胞系的高内涵筛选方法,鉴定通过跨膜结构域(TM)或生长因子受体富半胱氨酸结构域(CRD)(IPR009030)或反面高尔基体、高尔基体、溶酶体和质膜区室中的细胞内定位改变而抑制同源和异源二聚化的小分子化合物和生物制剂。

[0099] 图28:在自人诱导的多能干细胞(iPSC)分化的PDX1⁺/NKX6.1⁺内分泌祖细胞中IGFR-1强烈上调。

[0100] 图29:采用针对IGFR-样受体的胞外结构域的抗体检测小鼠Min6胰岛素瘤细胞和人MCF7乳腺癌细胞中的IGFR-样受体.蛋白质印记实验表明通过针对胞外结构域SEQ ID NO:4(EIG-B 18B2和10D9)和SEQ ID NO:6(EIG-D 26D7)的抗体在Min6(弱)和MCF7(强)细胞裂解物中特异性识别了~130kDa的蛋白条带。EIG-B克隆是在大鼠中针对肽SEQ ID NO:4产生的单克隆抗体,而EIG-D克隆是在小鼠中针对SEQ ID NO:6产生的单克隆抗体。

[0101] 图30:全基因组关联元研究中与2型糖尿病相关的IGFR-样受体.位于染色体1上编码与2型糖尿病相关的IGFR-样受体的人KIAA1324基因;参考www.type2diabetesgenetics.com描绘附图。

[0102] 图31:全基因组关联元研究中IGFR-样受体中的SNP与冠状动脉疾病、LDL胆固醇和2型糖尿病高度相关。放大人染色体1,从109.55-109.85Mb。标有点的蓝色条表示与疾病正相关;相反,没有点的红色条表示负相关。条的尺寸(无、小、中和大)表示显著性;参考www.type2diabetesgenetics.com描绘附图。

具体实施方式

[0103] 本申请的发明人惊奇地发现了一种在胰腺中接近IGF-1、IGF-2和胰岛素配体表达的新型IGFR-样受体,并已证明所述IGFR-样受体负调节InsR和/或IGF1R-介导的信号传导。因此,所述受体的拮抗剂和激动剂开启了逆转如在糖尿病发病机制中常见的胰岛素抵抗的新的和迫切需要的可能性,而激动剂可用于阻断胰岛素信号传导。引人注目的是,本申请的发明人还表明IGFR-样受体与胰腺中β细胞去分化相关,所述去分化是疾病发作的早期事件,其最终导致β细胞破坏或功能丧失。因此,IGFR-样受体还是一种有前途的诊断性工具,其能够在β细胞不可挽回的损失之前早期诊断并治疗糖尿病。

[0104] 本申请的发明人最早阐述了如本文所述编码IGFR-样受体的人KIAA1324基因的功能。众所周知,先前被称为UPF0577蛋白KIAA1324或雌激素-诱导基因121(EIG121)蛋白的

KIAA1324的蛋白质产物是癌症标志物,而本申请的发明人首次认为该蛋白质在代谢中具有关键作用。本文所使用的术语“IGFR-样受体”、“IGF-样受体”、“IGF3受体”和“IGF3R”在本文中互换使用。

[0105] 第一方面,本发明因此提供一种分离的编码IGF受体(IGFR)-样受体的DNA序列,所述IGF受体(IGFR)-样受体能够与针对SEQ ID NO:1的IGFR-样受体的抗体反应,其中所述抗体特异性地结合至少一个包含以下序列的表位:

[0106] (i) TSKRTPDGFDVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

[0107] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

[0108] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

[0109] (iv) FQRITTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或

[0110] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0111] 特别地,设想所述分离的DNA序列编码UPF0577蛋白KIAA1324(具有Uniprot Acc.No.Q6UXG2,2015年7月22日的输入版本(entry version)95 (SEQ ID NO:1))或其功能性变体,本文中所述蛋白还被称为“IGFR-样受体”。

[0112] 重要的是,在现有技术中仅知道“EIG121”基因的表达在与雌激素过量相关的肿瘤增殖中的作用。既未预见也不可能预见该基因的蛋白质产物(即本文所述的IGFR-样受体)调节IGFR/IR信号传导并将被结合包含选自SEQ ID NO.1、2、3、4、5或6的序列的表位的抗体特异性地识别,或能够被用于治疗糖尿病的拮抗剂或激动剂靶向。

[0113] 术语“IGFR-样受体”还涵盖本文公开的IGFR-样受体的功能性变体,所述变体与本文所述的IGFR-样受体具有阈值序列同一性或序列同源性。设想所述功能性变体与具有Uniprot Acc.No.Q6UXG2,2015年7月22日的输入版本95 (SEQ ID NO:1)的UPF0577蛋白KIAA1324具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%或100%序列同一性并能够与针对SEQ ID NO:1的IGFR-样受体的抗体反应,其中所述抗体特异性地结合至少一个包含以下序列的表位:

[0114] (i) TSKRTPDGFDVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

[0115] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

[0116] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

[0117] (iv) FQRITTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或

[0118] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0119] 进一步设想,所述功能性变体优选地表现出与UPF0577蛋白KIAA1324相同的性质,即抑制或减少InsR和/或IGF1R-介导的信号传导,特别是如通过所附实例中列出的常规方法可评估的(i) Akt磷酸化和/或(ii) AMPK磷酸化和/或(iii) mTOR磷酸化。本文所使用的术语“%同一性”或“%序列同一性”是指将本发明的多肽的序列与所讨论的序列进行(同源)比对后,配对相同残基相对于这两个序列中较长的那个的残基数的百分比。同一性百分比通过将相同残基数除以残基总数并将结果乘以100来测定。术语“同源性”在本文中以其通常的含义使用,并且包括相同氨基酸以及在两个蛋白的线性氨基酸序列中等同位置处被视为保守取代(例如用天冬氨酸残基交换谷氨酸残基)的氨基酸。优选地,示于SEQ ID NO:1的氨基酸序列优选作为“参考序列”。SEQ ID NO:1显示了人UPF0577蛋白KIAA1324,本文中也称为IGFR-样受体。术语(IGFR-样受体的)“参考序列”和“野生型序列”在本文中互换使用。

可选地,可将具有SWISS-PROT/UniProt数据库登录号Q6UXG2(2015年7月22日的输入版本95)的氨基酸序列用作参考序列。

[0120] 可以采用BLASTP,blastp 2.2.5版(2002年11月16日;参见Altschul,S.F.等人(1997)Nucl.Acids Res.25,3389-3402)测定序列同源性或序列同一性百分比。在本实施方案中,同源性百分比基于包括前肽序列的完整多肽序列的比对(矩阵:BLOSUM 62;空位罚分:11.1),优选地在配对比较中使用野生型蛋白骨架作为参考。BLASTP程序输出的结果表示为以“阳性”(同源氨基酸)数除以程序选定的用于比对的氨基酸总数来计算的百分比。

[0121] 在本发明的上下文中,表述“对应于另一位置的位置”(例如区域、片段、核苷酸或氨基酸位置等等)基于根据核苷酸或氨基酸位置数编号并且然后以最大化序列同一性百分比的方式比对序列的规则。由于并非给定“对应区域”内的所有位置都需要相同,所以对应区域内的非匹配位置可被视为“对应位置”。因此,如本文所使用,提及指定蛋白序列的“对应于氨基酸位置[X]的氨基酸位置”除了提及指定蛋白序列的氨基酸位置外,还代表提及在其他识别的蛋白和结构同系物和家族中等同位置的集合。上述内容加以适当修改也可应用于表述“对应于序列的序列”。即,提及“对应于”指定蛋白序列[X]的序列除了提及指定蛋白序列的序列外,还提及在其他识别的蛋白和结构同系物和家族中的等同序列的集合。

[0122] 术语“InsR”或“IR”是指胰岛素受体并通常包括IR-A(也称为“短同种型”)和IR-B(也称为“长同种型”)同种型。所述InsR以通过二硫键连接的携带胰岛素结合区的2个 α 链和携带激酶结构域的2个 β 链的四聚体出现。InsR是一种通过结合胰岛素、IGF-1和IGF-2而被活化的受体酪氨酸激酶,最终导致通过MAPK/Ras-Raf-Erk通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/AKT/mTOR(PI3K/AKT)通路和/或Janus激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)通路的信号传导。更确切地,与InsR胞外域的 α 链的配体结合诱导受体内结构性改变,导致 β 链的细胞内酪氨酸激酶结构域中的不同酪氨酸残基的自身磷酸化,导致若干细胞内底物(包括胰岛素受体底物(IRS1、2、3、4)、SHC、GAB1、CBL和其它信号传导中间体)的募集和磷酸化。这些磷酸化的蛋白中的每一个作为包含Src-同源-2结构域(SH2结构域)的其它信号传导蛋白(包括PI3K和SHP2的p85调节亚基)的对接蛋白。IRS蛋白的磷酸化导致两个主要信号传导通路的活化:PI3K-AKT/PKB通路,其负责胰岛素的大部分代谢作用;和Ras-MAPK通路,其调节一些基因的表达并与PI3K通路合作以控制细胞生长和分化。PI3K与IRS1上的磷酸酪氨酸的结合导致了并且随后的PI3K活化导致了AKT、AMPK和mTOR的磷酸化和活化,其是调节代谢并整合来自胰岛素的信号的信号传导通路。配体结合后的InsR活化还通过IRS1的磷酸化和GRB2/SOS的募集触发了Ras/RAF/MAP2K/MAPK通路,该通路主要参与介导胰岛素的细胞生长、存活和细胞分化。

[0123] InsR的一个示例性实例是具有Uniprot Acc.No.P06213(2015年7月22日的输入版本216)的人InsR及其变体。优选地,当与其配体,特别是胰岛素结合时,本发明上下文中的胰岛素受体能够诱导(i)Akt磷酸化,和/或(ii)AMPK磷酸化和/或(iii)mTOR磷酸化。

[0124] 术语“IGF-受体1”或“IGF1R”或“IGFRI”在本文中用于指胰岛素-样生长因子1受体酪氨酸激酶。IGF1R以高亲和力结合IGF1并以较低亲和力结合IGF2和胰岛素(INS)。配体结合使受体激酶活化,导致受体自身磷酸化和多种底物(包括胰岛素受体底物(IRS1/2)、Shc和14-3-3蛋白)的磷酸化,最终导致三个主要信号传导通路的活化:PI3K-AKT/PKB通路、Ras-MAPK通路和JAK/STAT通路。活化的IGF1R参与细胞生长和存活控制。因此,尽管InsR和

IGF1R进入类似的信号传导途径,但是InsR介导的信号传导主要调节代谢,而IGF1R信号传导参与细胞生长和存活。

[0125] IGF1R的一个示例性实例是具有Uniprot Acc.No.P08069 (2015年7月22日的输入版本185)的人IGF1R及其变体。优选地,当与其配体,特别是IGF1结合,本发明上下文中的IGF1R能够诱导(i)Akt磷酸化,和/或(ii)AMPK磷酸化和/或(iii)mTOR磷酸化。

[0126] 术语“IGF1”或“IGFI”是指胰岛素-样生长因子I,其是一种结构上和功能上与胰岛素相关,但具有更高的生长促进活性的蛋白质。一个示例性实例是具有Uniprot Acc.No.P05019 (2015年7月22日的输入版本186)的人IGF1。如本文其它地方所述,本发明上下文中的“IGF1”优选地能够结合IGF1受体并诱发IGF1R信号传导。

[0127] 术语“IGF2R”或“IGF2R”或“IGFR1I”在本文用于指胰岛素-样生长因子2/甘露糖-6-磷酸(IGF-2/M6P)受体。所述IGF2R是一种单一的跨膜蛋白,由大的细胞质外(即细胞外)结构域、单个跨膜区域和缺乏固有催化活性的短的细胞质尾部组成。该受体以比IGF-1更高的亲和力结合IGF-2且不结合胰岛素。据报道,IGF2R通过不同位点与溶酶体酶和各种其他含M6P的配体相互作用,并调节细胞外IGF-2浓度,由此通过生长刺激IGF-1受体途径调节信号传导。

[0128] IGF2R的示例性实例是具有Uniprot Acc.No.P11717 (2015年7月22日的输入版本174)的人IGF2R及其变体。

[0129] 术语“IGF2”或“IGFII”是指胰岛素-样生长因子II。一个示例性实例是具有Uniprot Acc.No.P01344 (2015年7月22日的输入版本199)的人IGF2及其变体。本发明上下文中的“IGF2”优选地能够结合IG2受体。

[0130] 本文提供的分离的DNA序列可包含对应于如示于SEQ ID No.:7的人KIAA1324基因(NCBI Gene ID 57535,2015年7月15日更新)序列的序列或其变体。所述人KIAA1324基因的变体可包括直系同源物。直系同源物或直系同源基因是一种这样的基因,所述基因的序列的一部分与已知基因的序列的一部分具有相似性,但在与已知基因不同的物种中发现。直系同源物和已知基因通过垂直传递起源于一个共同始祖的单一基因。

[0131] 如本文所使用,设想人KIAA1324基因的变体或直系同源物编码IGFR-样受体或其功能性变体,即优选地能够抑制或降低InsR和/或IGF1R-介导的信号传导,特别是(i)Akt磷酸化和/或(ii)AMPK磷酸化和/或(iii)mTOR磷酸化,并与人KIAA1324基因(NCBI基因ID 57535,2015年7月15日更新)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性,即与SEQ ID NO:7所示的人KIAA1324基因的编码序列具有序列同一性。所述编码序列是通过将所述人KIAA1324基因(NG_032763.1)的核苷酸222..374、47932..48052、50537..50729、57904..58051、58526..58606、59512..59617、59726..59875、71083..71171、74215..74392、75104..75232、75630..75720、77404..77509、77764..77901、78649..78912、80459..80632、83512..83692、84017..84113、84611..84712、85892..86018、86097..86275、86773..86938、88982..89050连接获得的。

[0132] 如本文所使用,术语“分离的DNA序列”是指从内源性材料纯化的或基本上纯化的DNA分子且包括通过标准纯化技术纯化的DNA以及通过重组技术制备的DNA和化学合成的那些DNA,所述内源性材料包括所述DNA序列所衍生自的细胞和/或生物体中天然地存在的其

它核酸序列、蛋白质、肽、脂质等。

[0133] 载体

[0134] 本发明的核酸还可以是载体的形式、可以存在于载体中和/或可以是载体的一部分。

[0135] 术语“载体”是指用作将(外源)基因材料运送至宿主细胞的媒介物的核酸分子,且其包括但不限于质粒、病毒、粘粒和人工染色体(比如细菌人工染色体(BAC)和酵母人工染色体(YAC))。一般情况下,工程载体包含复制起点、多克隆位点和可选标记物。载体本身通常为核苷酸序列,常常是DNA序列,所述序列包含插入物(转基因)和用作载体“骨架”的较大的序列。载体除了转基因插入物和骨架还包括另外的元件:基因调节元件、遗传标记物、抗生素抗性、报告基因、靶向序列或蛋白质纯化标签。在本发明的上下文中特别设想用于在宿主细胞中表达转基因的表达载体(表达构建体),所述表达载体除转基因外通常包含基因调节序列。

[0136] 一般而言,表达载体是可以在体外和/或体内(即在合适的宿主细胞、宿主生物体和/或表达系统中)提供IGFR-样受体的表达的载体。本领域技术人员将容易理解,所包括的特定载体的选择取决于,如宿主细胞、载体的预期拷贝数、是否设想了IGFR-样受体的瞬时或稳定表达等等。

[0137] “瞬时表达”是将不能自主复制的核酸(例如线性或非线性DNA或RNA分子)或载体导入受体宿主细胞而产生的。转基因的表达通过所引入的序列的瞬时表达发生。

[0138] 然而,如本文所述的核酸序列的“稳定表达”通常是优选的,并且可以通过将核酸序列稳定整合到宿主细胞的基因组中或通过引入包含本发明的核酸序列的载体并能够自主复制到宿主细胞中来完成。

[0139] 特别设想本文提供的载体包含与编码所述IGFR-样受体的DNA序列可操作地连接的基因调节元件。

[0140] 术语“基因调节元件”是指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所需的DNA序列。术语“基因调节元件”包括可控制的转录启动子、操纵子、增强子、沉默子、转录终止子、与宿主细胞蛋白相互作用以进行转录和翻译的5'和3'非翻译区和可以控制基因表达的其它元件,包括起始和终止密码子。基因表达所需的调节区的确切性质从生物体到生物体可能是不同的。例如,原核基因调节元件包括启动子、可选地操纵子序列、和核糖体结合位点(RBS);而真核细胞基因调节元件包括启动子、聚腺苷酸化(poly-A)信号和增强子。

[0141] 设想所述基因调节元件“可操作地连接”至待表达的基因,即使该基因调节元件与待表达的基因处于功能性关系中。例如,若启动子或增强子影响序列的转录,则将其“可操作地连接”至编码核酸序列。“可操作地连接”的DNA序列可以是连续的也可以不是连续的。通常通过在方便的限制性位点或合成的寡核苷酸衔接子或连接子处的接合(ligation)完成连接。

[0142] 宿主细胞

[0143] 本文进一步提供包含本文所述的载体的宿主细胞。

[0144] 许多宿主细胞均可用于表达编码本文所述的IGFR-样受体的核酸序列。可以采用本领域已知的基因工程方法制备宿主细胞。在下文中也将载体引入受体宿主细胞的过程称为“转化”或“转染”。在本文中这些术语可互换使用。

[0145] 宿主细胞转化通常涉及在细胞壁和/或细胞膜中打开瞬时孔或“洞”以允许摄取材料。转化方案的示例性实例涉及使用磷酸钙、电穿孔、细胞挤压、树突状聚合物、脂质体、比如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺的阳离子聚合物、声孔效应、光学转染、穿刺转染(impalectfection)、纳米粒子(基因枪)、磁性转染(magnetofection)、粒子轰击、碱金属阳离子(铯、铷)、酶消化、玻璃珠搅拌、病毒载体或其他。方法的选择通常取决于被转化的细胞类型、将被引入至细胞的载体和发生转化的条件。

[0146] 如本文所使用,术语“宿主细胞”是指作为本文所述的载体或分离的编码IGFR-样受体的核酸序列的受体的任何细胞或细胞培养物。合适的宿主细胞包括原核或真核细胞,且还包括但不限于细菌、酵母细胞、真菌细胞、植物细胞和动物细胞,比如昆虫细胞和哺乳动物细胞(例如鼠、大鼠、猕猴或人)。

[0147] 例如,可以在细菌中产生IGFR-样受体。除了原核生物外,真核微生物(例如丝状真菌或酵母)是本发明的IGFR-样受体的合适的克隆或表达宿主。示例性实例包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)宿主(如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16045)、*K.wickeramii* (ATCC 24178)、*K.waltii* (ATCC 56500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*) (ATCC 36906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*)、解脂耶氏酵母(EP 402 226)、巴斯德毕赤酵母(EP 183 070);念珠菌(*Candida*)、瑞氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244 234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*) (比如许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*));和丝状真菌(比如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)、和曲霉属(*Aspergillus*)宿主诸如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

[0148] 适于表达本发明的糖基化抗体构建体的宿主细胞也可衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)等宿主。公众可获得多种用于转染的病毒株,例如苜蓿尺蠖(*Autographa californica*) NPV的L-1变体和家蚕(*Bombyx mori*) NPV的Bm-5株。

[0149] 还可将棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、拟南芥和烟草的植物细胞培养物作为宿主。本领域技术人员已知用于在植物细胞培养物中产生蛋白的克隆和表达载体。

[0150] 有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾系(293或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO);小鼠塞托利(*Sertoli*)细胞(TM4);猴肾细胞(CV1, ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);牛鼠(*buffalo rat*)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, 1413 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL5 1);TRI细胞;MRC 5细胞;FS4细胞;和人肝癌细胞(Hep G2)。

[0151] 配体

[0152] 本申请的发明人已经鉴定了本文所述的IGFR-样受体中可具有潜在配体的结合位点的几个结构域,所述结构域尤其可以作为提供本发明的诊断性结合剂和拮抗剂或激动剂的模板。所述结构域包括两个胰岛素-样生长因子结合结构域(结构域1:SEQ ID NO:1的氨基酸273-413;结构域2:SEQ ID NO:1的氨基酸579-659)、甘露糖-6-磷酸受体结合结构域(M6P结构域,SEQ ID NO:1的氨基酸655-857)、跨膜结构域(SEQ ID NO:1的氨基酸908-930)和胞质结构域(SEQ ID No:1的氨基酸932-1013)。所述结构域也可自图1推导得出。因此本发明还涉及特异性地结合上述结构域中的至少之一的结合剂,比如如抗体(单克隆抗体是优选的)。

[0153] 含有胰岛素-样生长因子结合结构域(InterPro Acc.No. IPR009030)的蛋白包括但不限于:结合胰岛素-样生长因子的蛋白(IGFBP1-6)、I型胰岛素-样生长因子受体(IGF-1R)、受体蛋白-酪氨酸激酶ErbB-2、ErbB-3和ErbB-4(ErbB2、-3、-4)、A/B型肝配蛋白(Ephrin)受体、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR-样结合蛋白、CYR61、母系蛋白(Matrilin)-2、-3和-4、 δ -样蛋白1、Cubilin、裂缝(Slit)同源物1和3蛋白质、多种表皮生长因子-样结构域蛋白6、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、WNT1-可诱导的-信号传导通路蛋白2、WNT1-可诱导的-信号传导通路蛋白1、WNT1-可诱导的-信号传导通路蛋白3、含有EGF的腓骨蛋白-样胞外基质蛋白2、低密度脂蛋白受体、前表皮生长因子、补体成分C9、血栓调节蛋白、维生素K依赖性蛋白S、补体成分C8 α 链、尿调节素、弗林蛋白酶(Furin)、骨形态发生蛋白1、巢蛋白(Nidogen)-1、胰岛素受体相关蛋白、腓骨蛋白-1和-2、前蛋白转化酶枯草溶菌素/kexin 6型、结缔组织生长因子、原纤蛋白-1、-2和-3、神经性基因座notch同源物蛋白1、蛋白NOV同源物、CD97抗原、软骨寡聚物基质蛋白、角蛋白、II型角质层Hb3、锯齿状的蛋白-1、蛋白碎屑(crumb)同源物1、丝氨酸蛋白酶HTRA4、丝氨酸蛋白酶HTRA3、低密度脂蛋白受体相关蛋白2、神经性基因座notch同源物蛋白2、肿瘤坏死因子受体超家族成员9、低(Prolow)密度脂蛋白受体相关蛋白1、含有EGF的腓骨蛋白-样胞外基质蛋白1、巢蛋白-2、清除受体F类成员1、粘附G蛋白偶联受体E1、生长停滞特异性蛋白6、角蛋白、I型角质层Ha2、潜在的转化生长因子 β 结合蛋白1、潜在的转化生长因子 β 结合蛋白2、R-脊椎蛋白-1、-2和-4、Sushi、A型血管性血友病因子、含有EGF和正五聚蛋白结构域的蛋白1、尿调节素-样1、Meckelin、眼睛关闭蛋白同源物(Protein eyes shut homolog)、前蛋白转化酶枯草溶菌素/kexin 4型、含有Sushi结构域的蛋白1、富含半胱氨酸与EGF-样结构域蛋白2、肾连蛋白、原钙粘蛋白脂肪4、BMP/视黄酸可诱导的神经特异性蛋白3、细胞外基质蛋白FRAS1、表皮生长因子-样蛋白6、信号肽、含有CUB和EGF-样结构域的蛋白1、信号肽、含有CUB和EGF-样结构域的蛋白3、潜在的转化生长因子 β 结合蛋白4、半椎蛋白-2、 δ 和Notch-样表皮生长因子相关受体、胰岛素-样生长因子结合蛋白样1、丝氨酸蛋白酶HTRA1、前蛋白转化酶枯草溶菌素/kexin 5型、蛋白激酶C-结合蛋白NELL1、血管性血友病因子C和含有EGF结构域的蛋白、清除受体F类成员2、富含半胱氨酸与EGF-样结构域蛋白1、含有Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域的蛋白1、半椎蛋白-1、蛋白激酶C-结合蛋白NELL2、神经性基因座notch同源物蛋白4、R-脊椎蛋白-3、粘附G蛋白偶联受体E3、粘蛋白-13、内皮唾液酸蛋白、钙粘蛋白EGF LAG七通G型受体2、补体成分C1q受体、内皮细胞特异性分子1、信号肽、含有CUB和EGF-样结构域的蛋白2、 δ -样蛋白4、潜在的转化生长因子 β 结合蛋白3、 δ -样蛋白3、钙粘蛋白EGF LAG七通G型受体1、低密度脂蛋白受体相关蛋白1B、富含半胱氨酸的运动神经元1蛋白、腓骨蛋白-5、表皮生长因子-样蛋白7、粘附G

蛋白偶联受体E2、神经性基因座notch同源物蛋白3、锯齿状的蛋白-2及其它。

[0154] 因此,本文所述的IGFR-样受体的潜在配体包括上述蛋白的配体,比如IR、IGF1R、胰岛素、IGF1、IGF2、肝配蛋白-B1、肝配蛋白-B2、EGF、EGFR、TGFA/TGF- α 、双调蛋白、epigen/EPGN、BTC/ β -细胞素、外调蛋白/EREG、HBEGF/肝素结合EGF、GP30、ALB、MB、 κ 和 λ -轻链、TF、血红素、GC、SCGB1A1、APOA1、高密度脂蛋白、GIF-钴胺素复合物、LRP2、LGALS3、AGRIN、IL-1、IL-2、TNF、胶原I和IV、基底膜聚糖、层粘连蛋白、肝素、整合蛋白、纤连蛋白、蛋白C、EFNA5、EFNB1、EFNB2、EFNB3、锯齿状1、锯齿状2和 δ 1、神经调节蛋白、NTAK、CSPG5、TNFSF9/4-1BBL、Ac-LDL、AXL、TYRO3、MER、NRG1、NRG2、NRG3、NRG4、BTC、EREG、HBEGF、GR4、LGR5、LGR6、C1q、甘露糖结合凝集素(MBL2)、肺表面活性蛋白A(SPA)、TGFBR2,以及它们的片段和变体。

[0155] 包含甘露糖-6-磷酸受体结合结构域(InterPro Acc.No. IPR009011)的蛋白包括但不限于:阳离子非依赖性甘露糖-6-磷酸受体、葡糖苷酶2亚基 β 、阳离子依赖性甘露糖-6-磷酸受体、蛋白质OS-9、内质网凝集素1、和N-乙酰葡糖胺-1-磷酸转移酶亚基 γ 。

[0156] 因此,本文提供的IGFR-样受体的潜在配体包括上述蛋白的配体,比如IGF2、DPP4、磷酸甘露糖、TRPV4、IGF2、溶酶体酶、TGF β 、白血病抑制因子(LIF)、增殖蛋白、甲状腺球蛋白、肾素元、颗粒酶B、和视黄酸。

[0157] 本申请的发明人发现IGFR-样受体的基因敲低导致IGF1R和IR以及下游信号传导蛋白Akt-、mTOR-和AMPK的磷酸化增加。因此,假定IGFR-样受体可以抑制或减弱(dampen)IGF1R-和/或IR激活和/或下游信号传导。不受特定理论的束缚,认为IGFR-样受体可以例如起到“胰岛素清除剂”受体的作用,该受体从血液中消耗胰岛素并将其转移至其可被降解的核内体和溶酶体区室。还推测IGFR-样受体可能与胰岛素受体(InsR)有关,导致从细胞表面移除InsR。无论怎样,两种情况均可解释降低的InsR活化和InsR和/或IGF1R-介导的信号传导,包括在功能性IGFR-样受体存在下的InsR、Akt、mTOR和/或AMPK的磷酸化。因此,特别设想将胰岛素、InsR和/或胰岛素-IR复合物作为本文提供的IGFR-样受体的配体。

[0158] 拮抗剂和激动剂

[0159] 另外,提供了本文所述的IGFR-样受体的激动剂和拮抗剂。如本文所述和所附的实施例所证明,已经发现IGFR-样受体负调节(即抑制或减少)InsR-和/或IGF1R-介导的信号传导,和特别地(i)Akt磷酸化、(ii)AMPK磷酸化和(iii)mTOR磷酸化。

[0160] 术语“拮抗剂”是指抑制或减少激动剂介导的生物响应而非在与受体结合时自身引起生物响应的受体配体。拮抗剂对其受体具有亲和力但基本没有效力。该术语还包含与拮抗剂的受体的活性(正性)或变构性位点和/或通常不涉及受体功能的其他结合位点结合的拮抗剂。术语“拮抗剂”通常包括全部和部分拮抗剂,可逆的和不可逆的拮抗剂。优选地,根据本发明,所述拮抗剂特异性地结合IGFR-样受体。既然已经阐明了UPF0577蛋白KIAA1324的新功能,技术人员将能够容易地识别IGFR-样受体拮抗剂,如通过应用如本文所述的筛选测定。根据前述,设想IGFR-样受体拮抗剂消除受体干扰即抑制或减少InsR-和/或IGFR信号传导的能力,并且可以例如在逆转胰岛素抵抗方面特别有用。具体而言,设想IGFR-样受体拮抗剂能够增加InsR和/或IGFR-介导的信号传导并特别增加IGF1R、InsR、Akt、mTOR和/或AMPK磷酸化,这可以使用本领域已知的和在所附实例中描述的常规方法确定。

[0161] 如本文所使用的术语“激动剂”通常是指结合后激活受体以产生生物响应的受体

配体。相对于拮抗剂,激动剂对其受体具有亲和力和效力。术语“激动剂”通常包括全部和部分激动剂,可逆的和不可逆的激动剂。优选地,根据本发明,所述激动剂特异性地结合IGFR-样受体。根据前述内容,设想IGFR-样受体激动剂诱发或增加IGFR-样受体的生物响应,即减少和/或抑制InsR活化和下游信号传导。因此,设想IGFR-样激动剂能够降低InsR和/或IGF1R-介导的信号传导,并特别地降低InsR、IGF1R、Akt、mTOR和/或AMPK的磷酸化,这可以使用本领域已知的和在所附实例中描述的常规方法确定。

[0162] 本发明的“拮抗剂”或“激动剂”通常可以是任何分子(比如抗体、siRNA、核酸、适体、肽、蛋白或小分子有机化合物)或其变体或片段,所述分子或其变体或片段结合或特异性地结合本文所述的IGFR-样受体,且阻断或减少由IGFR-样受体介导的生物响应(即作为拮抗剂)或诱导或增加由IGFR-样受体介导的生物响应(即作为激动剂)。

[0163] 如采用如本文提供的筛选测定可以容易地发现IGFR-样受体的激动剂和拮抗剂。技术人员容易意识到可将包含如胰岛素-样生长因子结合结构域和/或甘露糖-6-磷酸受体结合结构域(已经在上文“配体”部分描述的示例性蛋白和配体)的蛋白质的配体作为用于制备能够结合IGFR-样受体并显示激动剂或拮抗剂作用的试剂的模板。如,在蛋白质或肽配体的情况下,可以采用基因工程的常规方法容易地制备其变体和片段。设想本发明的激动剂和拮抗剂特异性地结合本文所述的IGFR-样受体(即优选地不会对IGFR-样受体以外的靶标显示交叉反应性),这可以通过如在IGFR-样受体基因敲低宿主细胞中评估抗体结合容易地测定(参见所附实施例)。

[0164] 抗体

[0165] 本文提供的拮抗剂或激动剂可以是抗体。优选地,本文提供的抗体显示所需的生物活性,即特异性地结合本文所述的IGFR-样受体。具体而言,设想本发明的拮抗性抗体能够增加InsR和/或IGF1R-介导的信号传导,且特别地增加IGF1R、InsR、Akt、mTOR和/或AMPK的磷酸化,这可以使用本领域已知的和在所附实例中描述的常规方法确定。还设想本发明的拮抗性抗体结合表位(SEQ ID NOs:2-6)。因此,本发明还涉及一种抗体,该抗体(a)特异性地结合SEQ ID NOs:2-6中描绘的表位中的至少之一和(b)增加IGF1R、InsR、Akt、mTOR和/或AMPK的磷酸化。由此,“增加”表示在用于检测和/或定量所述增加的相应检测方法中,当与不存在抗体时相比,存在抗体时相应信号的增加。本发明进一步涉及一种抗体,该抗体(a)结合前述生长因子结合结构域和/或甘露糖-6-磷酸受体结合结构域之一(描绘于图1)和(b)增加IGF1R、InsR、Akt、mTOR和/或AMPK的磷酸化。由此,“增加”表示在用于检测和/或定量所述增加的相应检测方法中,当与不存在抗体时相比,存在抗体时相应信号的增加。引人注目地,IGFR-1含有与被抗体曲妥珠单抗(**Herceptin®**)靶向的HER2二聚化区显示极大相似性的胞外结构域。HER2是组成型激活的,其能够与其它以配体非依赖性方式起作用的HER家族成员二聚化,且通过曲妥珠单抗靶向HER2阻断了其活性并抑制癌症生长。此外,IGFR-1在其跨膜结构域中含有在EGFR家族成员中发现的GxxxG二聚化基序。这表明IGFR-1与EGFR和IR家族成员同源-和异源二聚化以调节细胞信号传导结果、代谢与有丝分裂。因此还设想靶向IGFR-样受体的本发明的抗体干扰受体同源-和异源二聚化和/或配体结合。

[0166] 提供这种抗体的方法是本领域技术人员熟知的(例如,WO/2014/124020),并在下文中举例说明。可以使用哺乳动物表达系统将IGFR-1胞外域以及全长受体纯化至高纯度,以产生具有天然构象的完全N-糖基化的适当折叠的受体。在合成膜中的受体重构不仅允许

脂质双分子层内受体的二聚化,而且还使受体在膜背景(context)中呈现作为抗原,并由此非常适合于产生本发明的抗体,特别是本发明的治疗性抗体。因此,IGFR-1脂蛋白体是细胞膜的合成模拟物,并因此理想地用于产生例如单克隆抗体。这些抗体仅定向针对受体的胞外结构域,并可能干扰受体同源-和异源二聚化和/或配体结合。因此,还设想本发明的抗体能够结合糖基化的IGFR-样受体,优选结合其糖基化的胞外域。

[0167] 如本领域所熟知,抗体是一种免疫球蛋白分子,该免疫球蛋白分子能够通过位于其可变区的至少一个表位识别位点特异性结合靶标(表位)。如本文所使用的术语“抗体”包含单克隆抗体和多克隆抗体以及它们的(天然存在的或合成的)片段或变体,包括融合蛋白,该融合蛋白包含具有所需特异性的抗原结合片段的抗体部分和包含具有所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的抗体的任何其它修饰构型。示例性实例包括dAb、纳米抗体(nanobody)、affibody、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链Fvs(scFv)、双抗体和包含连接至CH3结构域的scFv的微型抗体。应该理解,包含“抗原结合位点”的其它抗体框架或骨架可以与本发明一致地使用。因此,术语“抗体”还包括这些骨架。所提及的骨架包括,如基于非免疫球蛋白的抗体和可以移植抗体的CDR的骨架。这些骨架包括例如anticalin、avimer、affilin等。

[0168] 所述抗体可以是嵌合抗体(或其抗原结合变体或片段)。术语“嵌合抗体”是指这样的抗体以及此类抗体的片段,所述抗体中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一种抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源。

[0169] 抗体可以是人源化抗体(或其抗原结合变体或片段)。术语“人源化抗体”是指含有来自非人抗体的最小序列的抗体。通常,人源化抗体是人免疫球蛋白,其包含来自移植到人免疫球蛋白(“受体抗体”)上的非人物种(如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)的免疫球蛋白(“供体抗体”)的高可变区的残基。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可以包含既不存在于受体抗体也不存在于供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能。通常,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个,通常为两个可变结构域,其中全部或基本上全部的高可变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体任选还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),典型地包含至少一部分人免疫球蛋白的恒定区。

[0170] 抗体可以是人抗体。“人抗体”是具有对应于人产生的抗体的氨基酸序列的和/或已经使用制备人抗体的任何技术制备的一种抗体。人抗体的这种定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的多种技术,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter, *J. Mol Biol*, 227:381 (1991); Marks等人, *J. Mol Biol*, 222:581 (1991))产生人抗体。还可用于制备人单克隆抗体的是在Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985)和Boerner等人, *J. Immunol*, 147(1):86-95 (1991)中描述的方法。还参见van Dijk和van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol*, 5:368-374 (2001)。可以通过向转基因动物施用抗原制备人抗体,所述转基因动物已经被修饰以产生响应抗原攻击的此类抗体,但是其内源基因座已经失效,例如经免疫的xenomice(关于XENOMOUSE(TM)技术,参见例如US.6,075,181和6,150,584)。

关于通过人 B 细胞杂交瘤技术产生的人抗体，还参见例如 Li 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562 (2006)。

[0171] 化学修饰

[0172] 根据本发明所用的抗体或其抗原结合变体或片段可以被修饰。在本发明的上下文中可以想象的典型修饰包括，例如如下所述的化学修饰。

[0173] 一般而言，只要修饰不消除如本文其它地方所述的抗体或其抗原结合变体或片段特异性地结合 IGFR-样受体和作为 IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂的能力，可以想象所有类型的修饰。

[0174] 抗体或其抗原结合变体或片段的可能化学修饰包括氨基末端的酰化或乙酰化或羧基末端的酰胺化或酯化，或可选地，在两端均有。修饰还影响赖氨酸侧链上的氨基或苏氨酸的羟基。其它合适的修饰包括，如采用可变长度的多肽链延长氨基（如 XTEN 技术或 **PASylation®**）、N-糖基化、O-糖基化，和碳水化合物的化学缀合，诸如羟乙基淀粉（如 **HESylation®**）或聚唾液酸（如 **PolyXen®** 技术）。诸如烷基化（如甲基化、丙基化、丁基化）、芳基化和醚化的化学修饰是可能的，对此也有设想。

[0175] 如本文其他地方所述，在本发明的 IGFR-样受体中已经鉴定了几个结构域。原则上设想作为 IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂的抗体在优选的 IGFR-样受体的胞外结构域的任意处（如胰岛素-样生长因子结合结构域，甘露糖-6-磷酸受体结合结构域）或在所述胞外结构域之间结合。由此，通常还将已知抗体设想为拮抗剂或激动剂且可以在本文提供的筛选测定中容易地监测其拮抗性或激动性行为，所述已知抗体与包含一个或多个所述结构域的蛋白（上文“配体”部分已经列出了示例性蛋白）结合，特别是与所述蛋白的胰岛素-样生长因子结合结构域或甘露糖-6-磷酸受体结合结构域中的表位结合。

[0176] 此外，按照所附实施例所述可以制备针对 IGFR-样受体的抗体并在本文提供的筛选测定中测试它们的激动性或拮抗性活性。

[0177] 特别设想根据本发明提供作为拮抗剂或激动剂的抗体能够结合 IGFR-样受体表位，所述表位包含以下序列：

[0178] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2)；和/或

[0179] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3)；和/或

[0180] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4)；和/或

[0181] (iv) FQRRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5)；和/或

[0182] (v) CTFSRNTPTRTFN (SEQ ID NO.:6)。

[0183] 优选地，所述抗体特异性地结合本文所述的 IGFR-样受体，即未对非靶标分子（比如 InsR、IGF1R 和 IGF2R）显示交叉反应性。在所附实施例中已经证明了识别包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5 和 6 的表位的抗体的特异性结合。如，可以证明 IGFR-样受体基因敲低后，抗体结合消除，表明未发生非特异性结合。

[0184] 术语“表位”通常是指结合结构域（比如抗体或免疫球蛋白或抗体的衍生物或片段或免疫球蛋白的衍生物或片段）特异性结合的抗原上的位点。“表位”是抗原性的，因此术语表位在本文中有时也称为“抗原结构”或“抗原决定簇”。因此，结合结构域是一种“抗原相互作用位点”。所述结合/相互作用也被理解为限定“特异性识别”。术语“表位”涵盖线性表位

和构象表位。线性表位是包含在氨基酸一级序列中的连续表位,在单一序列中线性表位通常包括至少3或至少4,且更通常地至少5或至少6或至少7,例如,约8至约10个氨基酸。构象表位由通过蛋白质折叠而并列的非连续氨基酸形成。确定表位构象的方法包括但不限于X射线晶体学、二维核磁共振(2D-NMR)光谱和定向自旋标记和电子顺磁共振(EPR)光谱。

[0185] 本文还设想其它分子作为IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂。

[0186] 作为减少或抑制人KIAA1324基因(或其变体或直系同源物)表达的IGFR-样受体拮抗剂的siRNA和核酸是特别有用的。术语“siRNA”与“小干扰RNA”或“沉默RNA”互换使用。siRNA是双链“反义”RNA分子,其通常包括与靶核酸序列(比如人KIAA1324基因的编码序列)的互补序列具有至少95%序列同一性的至少20个连续核苷酸的序列,但也可以针对所述基因的调控序列,包括启动子序列以及转录终止和聚腺苷酸化信号。

[0187] 其它能够减少和/或抑制IGFR-样受体表达的核酸包括适体、**Spiegelmers®**、nc-RNA(包括反义-RNA、L-RNA Spiegelmer、沉默RNA、微小-RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、重复相关的小干扰RNA(rasiRNA)和与Piwi蛋白相互作用的分子或RNA(piRNA)。这种非编码核酸分子可以例如用于指导IGFR-样受体mRNA降解或破坏IGFR-样受体mRNA翻译。原则上可以在宿主细胞内直接合成各自的反应物,尤其是siRNA分子,或者可以将其引入宿主细胞中。

[0188] 通常可将肽和蛋白用作IGFR-受体拮抗剂或激动剂,取决于这些肽和蛋白是抑制(拮抗剂)还是诱发(激动剂)由IGFR-样受体信号传导介导的生物响应。本文中术语“多肽”和“蛋白”互换使用。设想蛋白和肽特异性地结合IGFR-样受体。如前所述,例如采用已知的包含胰岛素-样生长因子结合结构域和/或甘露糖-6-磷酸受体结合结构域的蛋白质(在上述“配体”部分已经列出了示例性蛋白)的配体,技术人员能够容易地发现能够特异性地结合IGFR-样受体的肽和蛋白质拮抗剂或激动剂。采用已知的基因工程方法可将所述配体用作模板用于制备其变体或片段。随后,采用如本文提供的筛选测定,可以测试所述蛋白和肽的激动性或拮抗性活性。小有机分子也能够作为IGFR-样受体拮抗剂或激动剂。设想小有机分子特异性地结合IGFR-样受体。本领域容易获得小有机分子的高通量筛选测定,并将该测定用于发现可显示激动性或拮抗性活性的本文提供的IGFR-样受体的配体。

[0189] 特异性结合

[0190] 如本文所述,优选的是结合剂,特别是本文提供的拮抗剂和激动剂(如抗体)与IGFR-样受体的特异性结合。在本文全部语法形式的术语“结合(至)”和“识别”可以互换使用。

[0191] 术语“特异性地结合”通常指结合剂,特别是拮抗剂或激动剂(比如抗体)以比其对非靶标分子更高的亲和力结合其预期靶标(即本文所述的IGFR-样受体)。非靶标分子包括IGF受体,特别是具有Uniprot Acc.No.P08069(2015年7月22日的输入版本185)的人IGF1R、具有Uniprot Acc.No.P11717(2015年7月22日的输入版本174)的人IGF2R、和具有Uniprot Acc.No.P06213(2015年7月22日的输入版本216)的人InsR;以及它们的功能性变体。优选地,所述拮抗剂或激动剂对靶标分子的亲和力可以是其对非靶标分子的亲和力的至少约5倍、优选地10倍、更优选地25倍、甚至更优选地50倍和最优地100倍,或更高。优选的抗体以至少约 10^7M^{-1} 、和优选地约 10^8M^{-1} 至约 10^9M^{-1} 、约 10^9M^{-1} 至约 10^{10}M^{-1} 、或约 10^{11}M^{-1} 至约 10^{12}M^{-1} 的亲和力结合。

[0192] 因此,优选地,术语“特异性地结合”表示拮抗剂或激动剂(比如抗体)仅与其预期靶标(即IGFR-样受体)结合。

[0193] 治疗

[0194] 设想所述IGFR-样受体拮抗剂和激动剂在糖尿病的治疗及诊断中特别有用。如本文所使用,“糖尿病”是指以胰岛素产生受损和葡萄糖耐量受损为特征的一大类病症,且其一般包括1型和2型糖尿病(也分别称为青少年期发病型和成年期发病型)、妊娠糖尿病、前驱糖尿病、胰岛素抵抗、代谢综合征和葡萄糖耐量受损。糖尿病是由胰岛素产生 β 细胞的缺陷或功能损伤,单独或与胰岛素抵抗结合引起的。

[0195] 术语“代谢综合症”包括腹型(中央)肥胖、血压升高、空腹血糖升高、高血清甘油三酯、低高密度脂蛋白(HDL)和/或高低密度脂蛋白(LDL)水平。此外,其与发展2型糖尿病和/心血管疾病(包括冠心病)的风险有关。

[0196] 术语“ β 细胞”、“beta细胞”和“胰岛细胞”在本文中互换使用,用于指位于郎格罕氏胰岛中的胰腺 β 细胞。它们的主要功能是储存和释放胰岛素。

[0197] 有缺陷的胰岛素分泌是所有形式的糖尿病的基础。尽管 β 细胞的破坏是造成1型糖尿病(T1D)的原因,但2型糖尿病(T2D)与 β 细胞团减少和分泌功能丧失均有关。新兴的研究结果表明,涉及成熟 β 细胞去分化为更像祖细胞样的状态的功能性缺陷可能是T2D分泌受损的重要驱动因素。

[0198] 考虑可将本发明的拮抗剂和激动剂有利地应用于阻止 β 细胞去分化和/或逆转 β 细胞功能丧失。因此设想将本文所述的拮抗剂和激动剂用作药物。特别地,所述拮抗剂和激动剂旨在用于预防性和/或治疗性治疗糖尿病的方法中。

[0199] 1型糖尿病也被称为胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)和青少年型糖尿病。本文中这些术语可互换使用。这种类型占糖尿病的5-10%,并认为其是由于细胞介导的胰腺 β 细胞的自身免疫破坏,从而导致很少或没有胰岛素分泌。本文提供的IGFR-样受体的拮抗剂和激动剂能够阻止或甚至逆转 β 细胞的去分化和/或功能丧失。因此,设想本发明为T1D的预防性或再生性治疗开辟了新的可能性。

[0200] 2型糖尿病也被称为成年期发病型糖尿病,且其占全部糖尿病的~90-95%。2型糖尿病(T2D)的主要特征是靶组织中的胰岛素抵抗和从胰腺 β 细胞中分泌的胰岛素相对不足。在本文中胰岛素抵抗用于表示以靶细胞对胰岛素响应失败而导致高血糖症为特征的病症。随后胰腺中的胰腺 β 细胞增加其产生的胰岛素,导致高胰岛素血症。不受具体理论的束缚,考虑本文所述的IGFR-样受体作为胰岛素或胰岛素受体的清除剂起作用。例如,IGFR-样受体可与胰岛素受体结合,导致其内化(胰岛素受体清除剂)。IGFR-样受体还可与胰岛素结合,导致其内化和潜在的溶酶体降解(胰岛素清除剂)。在如本文所述的拮抗剂的帮助下通过抑制这些IGFR-样受体功能,InsR-和/或IGF1R-介导的信号传导可以增加,由此恢复胰岛素敏感度。

[0201] 如在所附实施例中进一步显示的,本申请的发明人证明本文所述的IGFR-样受体负调节胰岛素下游信号传导。因此设想IGFR-样受体拮抗剂促进或重建(restore)InsR下游信号传导,而认为IGFR-样受体激动剂抑制或减弱InsR信号传导。

[0202] 因此,优选地,IGFR-样受体拮抗剂能够(i)增加InsR和/或IGF1R-介导的Akt磷酸化,(ii)增加InsR和/或IGF1R-介导的AMPK磷酸化,和/或(iii)mTOR磷酸化,由此有利地增

加胰岛素抗性细胞中的胰岛素敏感度。

[0203] 诊断

[0204] 本申请的发明人已惊奇的发现本文所述的IGFR-样受体的表达与胰腺β细胞的去分化有关。β细胞去分化是这样的术语,其用于描述β-细胞表型逆转回到其起源的多能祖细胞的改变或单独可逆的去分化状态。认为胰腺β细胞去分化导致包括胰岛素分泌在内的关键功能的丧失。将由于关键β细胞功能丧失导致的胰岛素分泌失调看作糖尿病(包括T1D和T2D)发病的基本部分。将高血糖症看作导致胰岛素分泌失调的胰腺β细胞去分化的主要原因;也称为葡萄糖毒性的过程。

[0205] 通过提交的本申请可知,没有用于疾病发作和进展的可靠生物标志物。本申请的发明人已经发现本文所述的IGFR-样受体不仅是用于糖尿病治疗的有潜力的且有力的靶标,还在非常早期伴随发病机制。因此,监测本文提供的IGFR-样受体的表达允许糖尿病的早期诊断且甚至能够在β细胞的功能丧失或严重受损之前(预防性)治疗。

[0206] 因此,本发明提供一种能够特异性地结合本文所述的IGFR-样受体的结合分子,其用作糖尿病或发展糖尿病的风险的诊断性标志物。优选地,所述IGFR-样受体包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列,然而,还设想了所述IGFR-样受体的变体。

[0207] 鉴于以上所述,本文还提供了用于检测受试者中胰岛细胞的去分化的体外诊断性测定(即诊断性方法),所述测定包括以下步骤:

[0208] i) 使自所述受试者获得的样品与特异性地结合可溶IGFR-样受体的诊断性结合剂接触;

[0209] ii) 检测所述诊断性结合剂的结合;

[0210] 其中所述诊断性结合剂的可检测结合指示受试者中胰岛细胞的去分化;并且其中所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。

[0211] 如本文其它处所述,认为胰腺β细胞的去分化指示糖尿病或发展糖尿病的风险。通常所述样品可以是任何样品,特别是血浆样品。

[0212] 一般而言,为了提供诊断性结合剂,技术人员可以遵循与在提供IGFR-样受体的拮抗剂和激动剂上下文中所示出的相同原理。类似地,设想本文提供的诊断性结合剂特异性地结合本文提供的IGFR-样受体。诊断性结合剂可显示拮抗性或激动性活性(由此如实现同时诊断和(预防的)治疗),或可完全不会对IGFR-样受体信号传导产生影响。当制备诊断性结合剂时,如本文其它处所述,技术人员可以例如采用配体和包含胰岛素-样生长因子结合结构域和/或甘露糖-6-磷酸受体结合结构域的蛋白,和采用它们的配体作为“模板”用于产生能够特异性地结合IGFR-样受体的诊断性结合剂。在本文“配体”部分已经描述了示例性蛋白和配体。在制备IGFR-样受体的拮抗剂和激动剂的上下文中描述了该方法,且该方法也完全适用于诊断性结合剂,只是这种结合剂无需必须显示激动性和/或拮抗性特性。

[0213] 在体外诊断性结合测定中使用的特别有用的结合剂包括单克隆抗体,如特异性识别IGFR-样受体表位的抗体,所述表位包含以下序列:

[0214] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2); 和/或

[0215] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3); 和/或

[0216] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4); 和/或

[0217] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5); 和/或

[0218] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0219] 在本发明的方法中使用的诊断性结合剂可进一步包括附着在所述诊断性结合剂上的可检测标记。该可检测标记可以直接或经由不同长度的间隔物(spacer) (优选共价地) 附着在诊断性结合剂上以降低潜在的空间位阻。本领域已知各种标记蛋白的方法, 并且在实施本发明中可以使用这些方法。术语“标记”或“标记基团”是指任何可检测的标记。与诊断性结合剂一起使用的合适的标记包括但不限于: (i) 同位素标记, 其可以是放射性或重同位素, 比如放射性同位素或放射性核素(如³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁸⁹Zr、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I), (ii) 磁性标记(例如磁性颗粒), (iii) 氧化还原活性部分, (iv) 光学染料(包括但不限于生色团、磷光体和荧光团) 比如荧光标记(如FITC、罗丹明、镧系元素磷光体)、化学发光标记和既可以是“小分子”荧光团也可以是蛋白质样荧光团的荧光团、(v) 酶基团(如辣根过氧化物酶、β半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶), (vi) 生物素化基团, (vii) 通过二级报道基因识别的预定的多肽表位(如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签等等)。

[0220] “荧光标记”是指通过其内在荧光性质可被测定的任何分子。合适的荧光标记包括但不限于荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、赤藓红、香豆素、甲基香豆素、苾、孔雀石绿、苾、荧光黄、瀑布蓝J(Cascade BlueJ)、德州红(Texas Red)、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red640、Cy5、Cy5.5、LC Red 705、俄勒冈绿(Oregon green)、阿历克斯-氟(Alexa-Fluor) 染料(阿历克斯氟350、阿历克斯氟430、阿历克斯氟488、阿历克斯氟546、阿历克斯氟568、阿历克斯氟594、阿历克斯氟633、阿历克斯氟660、阿历克斯氟680)、瀑布蓝、瀑布黄和R-藻红素(R-phycoerythrin) (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR)、FITC、罗丹明、和德州红(Pierce, Rockford, IL)、Cy5、Cy5.5、Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA)。包括荧光团在内的合适光学染料描述于Richard P. Haugland的Molecular Probes Handbook中。示例性蛋白质样荧光标记还包括但不限于绿色荧光蛋白, 包括海肾(Renilla)、海笔(Ptilosarcus) 或水母(Aequorea) 物种的GFP、EGFP、蓝色荧光蛋白(BFP)、增强型黄色荧光蛋白(EYFP)、萤光素酶和β半乳糖苷酶。

[0221] 根据诊断结合剂的类型、其化学性质和预期的检测方法选择合适的标记在技术人员知识范围内。用在本发明的方法中的特别合适的诊断性结合剂是单克隆抗体, 优选地为特异性地识别本文所述的IGFR-样受体的单克隆抗体。

[0222] 有利地, 通过采用能够特异性地识别本文所述的IGFR-样受体的诊断性结合剂可显现胰腺β细胞的去分化。考虑所述β细胞的去分化指示糖尿病或发展糖尿病的风险, 并且在β细胞功能障碍之前。因此, 本发明第一次提供一种诊断性测定, 该测定允许在疾病发病的非常早的阶段诊断糖尿病(包括1型、2型、妊娠糖尿病、代谢综合征和前驱糖尿病), 从而为早期干扰导致β细胞功能障碍和胰岛素产生损失或损伤的破坏性机制开辟了新的可能性。

[0223] 已经发现人KIAA1324基因的基因产物在糖尿病中起作用, 本发明允许在KIAA1324基因中指定任何已知的SNP, 无论一个或多个SNP是否确实与发展糖尿病(特别是II型糖尿病) 或处于发展糖尿病(特别是II型糖尿病) 的风险的倾向有关。

[0224] 本发明还允许利用人KIAA1324基因(包括外显子、内含子、5'-和3'-非翻译区) 中已知的SNP来测定受试者是否可能具有发展糖尿病(特别是II型糖尿病) 或处于发展糖尿病

(特别是II型糖尿病)的风险的倾向。用于这种测定的优选SNP列于下表中。

染色体 1 上的 <i>KIAA1324</i> 基因:	
SNP 位置	
	109 660 032
	109 666 403
	109 672 215
	109 673 020
	109 678 443
	109 679 027
[0225]	109 680 501
	109 681 567
	109 683 485
	109 685 870
	109 686 206
	109 686 758
	109 687 741
	109 688 390
	109 688 810
	109 689 620
	109 692 058
[0226]	109 692 601
	109 697 510

[0227] 若与野生型人*KIAA1324*基因相比受试者在上述表中所列的位置处可具有另外的核苷酸,则所述受试者可具有发展糖尿病(特别是II型糖尿病)或处于发展糖尿病(特别是II型糖尿病)的风险的倾向,即在上表所列位置处的SNP可以指示发展糖尿病(特别是II型糖尿病)或处于发展糖尿病(特别是II型糖尿病)的风险的倾向。野生型人*KIAA1324*基因是2015年7月15日更新的NCBI基因ID 57535之一,其以基因库登录号NG_032763.1的核苷酸序列显示。

[0228] 上表中提到的位置取自*KIAA1324*(2016年8月27日更新)的基因ID 57535,注释版本108,汇编GRCh37.p13(GCF_000001405.25),染色体1,位置NC_000001.10(109656585..109749403)。

[0229] 患者

[0230] 如本文所使用的术语“患者”或“受试者”是指人或非人动物,通常是哺乳动物。特

别设想为哺乳动物,比如兔子、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、狗、猫、猪、牛、山羊、绵羊、马、猴子、猿或优选地人。因此,本文件中描述的方法、用途和化合物通常适用于人疾病和兽用疾病两者。

[0231] 治疗

[0232] 所有语法形式的术语“治疗”包括治疗性或预防性治疗。“治疗性或预防性治疗”包括旨在完全预防临床和/或病理学表现的预防性治疗,或者旨在改善或缓解疾病的临床和/或病理学表现的治疗性治疗。因此,术语“治疗”还包括糖尿病的改善或预防。

[0233] 在本发明的上下文中,术语“治疗效果”通常是指治疗的令人满意或有益的影响,如疾病表现的改善或缓解。本文采用术语疾病的“表现”来描述其可感知的表现,包括临床表现和病理学表现,所述临床表现在下文定义为体检时可检测到的和/或患者可感知的疾病指征(即症状),所述病理学表现是指疾病在细胞和分子水平上的表现。使用本领域常规方法可以评估采用IGFR-样拮抗剂和激动剂治疗的治疗效果,如测量患者血液样品中胰岛素水平和/或葡萄糖水平。另外地或可选地,还可以评估各患者的一般表现(如健康情况、幸福感),这也将帮助熟练的医务人员来评估是否已经产生治疗效果。技术人员知道许多其它适合观察本发明化合物的治疗效果的方法。

[0234] 剂量

[0235] 优选地,施用治疗有效量的本文所述的化合物。“治疗有效量”意指产生治疗效果的本文所述的化合物的量。IGFR-样受体拮抗剂或激动剂的确切剂量依赖于治疗的目的(如疾病的急性发作的缓解保持vs. 治疗),并且将由本领域的技术人员采用已知技术确定。针对施用途径、年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、施用时间、药物相互作用和病情严重程度进行调整可能是必须的,并且这种调整是本领域技术人员采用常规实验可以确定的。

[0236] 施用

[0237] 可采用多种途径用于施用本发明的化合物,包括但不限于经口、局部、经皮、皮下、静脉内、腹腔内、肌肉或眼内。然而,如果需要,本领域技术人员可很容易地选择任何其它途径。

[0238] 组合物

[0239] 设想以药物组合物的形式施用IGFR-样拮抗剂或激动剂。优选地,所述拮抗剂或激动剂以治疗有效量存在于药物组合物中。特别优选地,用于本文提供的药物组合物中的拮抗剂或激动剂是特异性地结合本文所述的IGFR-样受体的单克隆抗体。设想所述抗体特异性结合IGFR-样受体表位,所述表位包含以下序列:

[0240] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2); 和/或

[0241] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3); 和/或

[0242] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4); 和/或

[0243] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5); 和/或

[0244] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0245] 术语“药物组合物”特别指适合施用于人的组合物,即优选无菌的和/或含有药学可接受组分的组合物。然而,本文中还想设想了适合施用于非人动物的组合物。优选地,药物组合物包含IGFR-样拮抗剂或激动剂和一种或多种药用赋形剂。术语“赋形剂”包括填充剂、粘合剂、崩解剂、包衣、吸附剂、抗粘附剂、助流剂、防腐剂、抗氧化剂、调味剂、着色剂、甜味

剂、溶剂、共溶剂、缓冲剂、螯合剂、粘性赋予剂、表面活性剂、稀释剂、湿润剂、载体、稀释剂、防腐剂、乳化剂、稳定剂或张力调节剂。可将本发明的药物组合物制备成各种形式,如固态、液态、气态或冻干形式,特别可以是软膏剂、乳膏剂、透皮贴剂、凝胶剂、粉剂、片剂、溶液剂、气雾剂、颗粒剂、丸剂、混悬剂、乳剂、胶囊剂、糖浆剂、液体剂、酏剂、浸膏剂、酹剂或流浸膏提取物的形式,或者特别适于所需施用方法的形式。

[0246] 本发明的药物组合物可进一步包括一种或多种另外的试剂。优选地,所述试剂对本文所述疾病的治疗是治疗有效的并以治疗有效量存在于该组合物中。实例包括但不限于二甲双胍、磺酰脲类、氯茴苯酸类(meglitinide)、噻唑烷二酮类、DPP-4抑制剂、GLP-1受体激动剂、SGLT2抑制剂、胰岛素和胰岛素衍生物(赖谷胰岛素、赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素、地特胰岛素、低精蛋白胰岛素)以及它们的组合。

[0247] 鉴于上述,本发明因此还提供一种包含IGFR-样拮抗剂或激动剂的药物组合物。所述药物组合物特别地预期用于治疗性和/或预防性治疗糖尿病的方法中。

[0248] 试剂盒

[0249] 本文还提供一种试剂盒。该试剂盒可以是具有两个或更多个部分的试剂盒,其包含优选地治疗有效量和药学可接受的IGFR-样受体拮抗剂或激动剂。该试剂盒的组分可包含在容器或小瓶中。设想该试剂盒包含如本文其它处所述在治疗糖尿病中有用的另外的试剂。另外的试剂的实例包括但不限于二甲双胍、磺酰脲类、氯茴苯酸类(meglitinide)、噻唑烷二酮类、DPP-4抑制剂、GLP-1受体激动剂、SGLT2抑制剂、胰岛素和胰岛素衍生物(赖谷胰岛素、赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素、地特胰岛素、低精蛋白胰岛素)以及它们的组合。

[0250] 所述IGFR-样拮抗剂或激动剂和所述另外的试剂可以同时或顺序地施用于患者。

[0251] 筛选测定

[0252] 当在本文使用时,术语“筛选测定”与术语“筛选方法”等同使用。优选地,“在体外”实施这种测定或方法。然而也可以“在体内”实施所述测定或方法。

[0253] 采用本文提供的体外筛选测定可以识别IGFR-样受体的拮抗剂和激动剂,所述测定包括以下步骤:(a)提供表达所述IGFR-样受体的稳定细胞系;(b)使(a)的所述细胞系与候选拮抗剂或激动剂接触;和(c)测量IGFR-样受体下游信号传导事件,其中通过增加所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别拮抗剂,和通过减少所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别激动剂;其中所述IGFR-样受体包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列。

[0254] 优选的下游信号传导事件是InsR磷酸化、AMPK磷酸化、mTOR磷酸化、AKT磷酸化、ERK磷酸化和/或S6K磷酸化。

[0255] 可选地,在本文所述的筛选方法中,表达所述IGFR-样受体的细胞系(优选地与应用在本发明的筛选方法中相同的细胞系)未分别与候选拮抗剂或激动剂接触。这种细胞系作为对照。在这种对照细胞系中同样测量IGFR-样受体下游信号传导事件并将其与与候选拮抗剂或激动剂接触的细胞系中测量的IGFR-样受体下游信号传导事件比较。

[0256] 表达所述IGFR-样受体的细胞系的优选实例是Min6或PDX1+/NKX6.1+iPSC。

[0257] 如本文所述,认为IGFR-样受体下游信号传导事件导致了InsR-和/或IGF1R-介导的信号传导的负调节,且特别地抑制或减少(i) Akt磷酸化,(ii) AMPK磷酸化和/或(iii) mTOR磷酸化。由此,在本文提供的筛选测定中促进或增加(i) Akt磷酸化,(ii) AMPK磷酸化

和/或(iii)mTOR磷酸化的结合剂可以作为IGFR-样受体的拮抗剂。在本文提供的筛选测定中对(i)Akt磷酸化,(ii)AMPK磷酸化和/或(iii)mTOR磷酸化无作用或甚至使其减少的结合剂可以作为IGFR-样受体的激动剂。

[0258] 所述稳定细胞系可以是适合表达功能性IGFR-样受体的任何细胞系,其中特别地设想“功能性IGFR-样受体”负调节InsR-和或IGF1R-介导的信号传导,如通过(i)Akt磷酸化,(ii)AMPK磷酸化和/或(iii)mTOR磷酸化的降低或抑制可确定。

[0259] 本发明还涉及通过筛选方法可获得的拮抗剂或激动剂。

[0260] 本发明还考虑一种检测IGFR-样受体与IGFR-1、IGFR-2和/或InsR是否同源二聚化或异源二聚化的方法。所述方法包括检测标记的IGFR-样受体是否同源二聚化或异源二聚化。异源二聚体可包括IGFR-样受体和InsR、IGFR-1和/或IGF-R2。

[0261] 优选的标签是荧光蛋白,比如GFP或Venus,其是绿色荧光蛋白(GFP)的基因突变体,发射峰值为527nm。

[0262] 优选地通过将标签在框架中与所述IGFR-样受体融合来实现标记IGFR-样受体。这可以通过本领域已知的技术,如使用CRIPSR/Cas系统通过如基因组编辑,如由将编码标签的核苷酸序列基因敲入编码所述IGFR-样受体的核苷酸序列实现。

[0263] 本发明的特征还在于以下项目:

[0264] 1、一种分离的编码IGF受体(IGFR)-样受体的DNA序列,所述IGF受体(IGFR)-样受体能够与针对SEQ ID NO:1的IGFR-样受体的抗体反应,其中所述抗体特异性地结合至少一个包含以下序列的表位:

[0265] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或

[0266] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或

[0267] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或

[0268] (iv) FQRTTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或

[0269] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。

[0270] 2、一种分离的编码IGFR-样受体的DNA序列,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。

[0271] 3、一种载体,其包含前述项目中任一项所述的DNA序列。

[0272] 4、项目3的载体,其进一步包含位于编码所述IGFR-样受体的DNA序列的上游的基因调节元件。

[0273] 5、一种宿主细胞,其包含项目3或4的载体。

[0274] 6、一种能够特异性地结合IGFR-样受体的诊断性结合剂,所述IGFR-样受体包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列,所述诊断性结合剂用于诊断糖尿病或发展糖尿病的风险的方法中。

[0275] 7、一种IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列,所述拮抗剂或激动剂用作药物。

[0276] 8、一种IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列,所述拮抗剂或激动剂用于预防性和/或治疗性治疗糖尿病的方法中。

[0277] 9、项目7至8中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中所述拮抗剂特异性地结合所述IGFR-样受体。

- [0278] 10、项目7至9中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中所述拮抗剂或激动剂选自抗体、siRNA、核酸、适体、肽、蛋白或小分子有机化合物。
- [0279] 11、项目10的拮抗剂或激动剂,其中所述抗体包含抗体、抗体变体和抗体片段。
- [0280] 12、项目10或11的拮抗剂或激动剂,其中所述抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。
- [0281] 13、项目12的拮抗剂或激动剂,其中所述抗体是特异性地结合所述IGFR-样受体的表位的单克隆抗体,所述表位包含以下序列:
- [0282] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或
- [0283] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或
- [0284] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或
- [0285] (iv) FQRITTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或
- [0286] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。
- [0287] 14、前述项目中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中糖尿病包括1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病、前驱糖尿病、胰岛素抵抗、代谢综合征和葡萄糖耐量受损。
- [0288] 15、项目8至15中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中治疗阻止或逆转胰岛素抵抗。
- [0289] 16、项目8至16中任一项所述的拮抗剂或激动剂,其中治疗阻止或逆转胰岛细胞的去分化。
- [0290] 17、一种药物组合物,其包含含有对应于SEQ ID NO:1的序列的IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂,其中所述拮抗剂是特异性地结合所述IGFR-样受体的单克隆抗体。
- [0291] 18、项目17的药物组合物,其中所述抗体特异性地结合所述IGFR-样受体的表位,所述表位包含以下序列:
- [0292] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或
- [0293] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或
- [0294] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或
- [0295] (iv) FQRITTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或
- [0296] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。
- [0297] 19、一种单克隆抗体,其特异性地结合包含以下序列的IGFR-样受体表位:
- [0298] (i) TSKRTPDGFDSVPLKT (SEQ ID NO.:2);和/或
- [0299] (ii) CHQCDPKYSE (SEQ ID NO.:3);和/或
- [0300] (iii) MYKWAKPKICSEDLEG (SEQ ID NO.:4);和/或
- [0301] (iv) FQRITTFHEASRKYTN (SEQ ID No.:5);和/或
- [0302] (v) CTFSRNTPTRTFNY (SEQ ID NO.:6)。
- [0303] 20、一种IGFR-样受体的拮抗剂或激动剂的体外筛选测定,所述方法包括以下步骤:
- [0304] (a) 提供表达所述IGFR-样受体的稳定细胞系;
- [0305] (b) 使(i)的所述细胞系与候选拮抗剂或激动剂接触;和
- [0306] (c) 测量IGFR-样受体下游信号传导事件,其中通过抑制所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别拮抗剂,和通过促进所述IGFR-样受体下游信号传导事件识别激动剂;
- [0307] 其中所述IGFR-样受体包含对应于序列SEQ ID NO:1的序列。

[0308] 21、一种通过项目20的方法可获得的IGFR-样受体拮抗剂或激动剂,所述IGFR拮抗剂选自抗体、siRNA、核酸、适体、肽、蛋白或小分子有机化合物。

[0309] 22、一种用于检测受试者中胰岛细胞退化的体外诊断性测定,所述体外诊断性测定包括以下步骤:

[0310] i) 使自所述受试者获得的样品与特异性地结合IGFR-样受体的诊断性结合剂接触;

[0311] ii) 检测所述结合剂的结合;

[0312] 其中所述诊断性结合剂的可检测结合指示受试者中胰岛细胞的去分化;

[0313] 其中所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。

[0314] 23、项目22的体外诊断性测定,其中胰岛细胞的去分化指示糖尿病或发展糖尿病的风险。

[0315] 24、项目22或23中任一项所述的体外诊断性测定,其中所述样品是血浆样品。

[0316] 25、项目22至24中任一项所述的体外诊断性测定,其中所述诊断性结合剂是单克隆抗体。

[0317] 26、一种治疗糖尿病的方法,所述方法包括向受试者施用IGFR拮抗剂,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。

[0318] 27、IGFR-样受体拮抗剂或激动剂在治疗糖尿病的方法中的用途,所述IGFR-样受体包含对应于SEQ ID NO:1的序列。

[0319] 应当注意的是,如本文所用的单数形式“一个/一种”和“所述/该”包括复数指代,除非上下文另有清楚说明。因此,例如,提到的“试剂”包括一种或多种这样的不同试剂,而提到的“该方法”包括提到本领域普通技术人员已知的可以改进或替代本文所述方法的那些等同步骤和方法。

[0320] 除非另有说明,在一系列要素前面的术语“至少”应当理解是指系列中的每个要素。本领域技术人员将会意识到或者能够使用不超过常规试验确定,许多与本文描述的发明的具体实施方案的等同物。本发明旨在涵盖这类等同物。

[0321] 本文任意处的术语“和/或”包括“和”、“或”及“所述术语连接的要素的所有或任意其它组合”的含义。

[0322] 本文所用术语“大约”或“接近”表示在给出值或范围的20%内,优选在10%内,和更优选在5%内。然而,它也包括具体数字,例如“约20”包括20。

[0323] 术语“少于”或“大于”包括具体数字。例如,少于20意指少于或等于。类似地,多于或大于分别意指多于或等于,或大于或等于。

[0324] 贯穿本说明书和随后的权利要求,除非上下文另有要求,词语“包含(comprise)”及其变形(例如comprises和comprising)应当理解是指包括所述整数或步骤或者整数或步骤的组,但不排除任何其它的整数或步骤或者整数或步骤的组。本文使用的术语“包含”可以被术语“含有”或“包括”或有时在本文使用的术语“具有”替代。

[0325] 本文使用的“由.....组成”排除任何未在要求保护的要素中具体规定的元素、步骤或成分。本文使用的“基本由.....组成”并不排除不实质影响权利要求的基本和新颖性特征的材料或步骤。

[0326] 应当理解,本发明不限于本文所述的具体的方法学、方案、材料、试剂和物质等,并

且可发生变化。本文中所使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并未旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求限定。

[0327] 本说明书全文所引用的所有的出版物和专利(包括所有的专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指导书等),无论在前还是在后,均以其全文并入本文。本文无任何内容能被解释为承认由于在先发明,本发明不早于这样的公开内容。如果以参考引入的材料与本说明书矛盾或不一致,则本说明书将取代任何这样的材料。

[0328] 通过以下仅出于说明性目的的实施例可以更好的理解本发明及其优势。这些实施例并非意在以任何方式限制本发明的范围。

[0329] 实施例

[0330] 实施例1:材料和方法

[0331] IGFR-样受体基因敲除小鼠的产生

[0332] 根据德国动物福利立法以及实验室动物协会(GV-SOLAS)和实验动物科学协会联合会(FELASA)的公认准则,将所有小鼠安置在HMGU的中央设施中。在胚胎阶段处死小鼠无需监管部门授权。

[0333] 自EUCOMM细胞库(EuMMCR)获得(Helmholtz ZentrumMuenchen GmbH, Alleles produced for the EUCOMM and EUCOMMTools projects by the Helmholtz ZentrumMuenchen GmbH(HmgU).MGI Direct Data Submission.2010-2015)源自C57BL/6N亲本细胞系JM8.N4的靶向ES细胞克隆并将其注射入CD1胚泡以产生嵌合体。将得到的嵌合体与CD1或C57BL/6J小鼠交配,并通过PCR筛选后代以确认种系传递。携带靶向突变的杂合小鼠在CD1或C57BL/6J背景中互交产生纯合突变体小鼠。

[0334] 使用从对照和基因敲除小鼠的尾部提取的基因组DNA通过PCR确证了基因分型。用于PCR的引物如下:正向引物:5' TGGGTAGCCTTTCTGTATGG-3' (SEQ ID NO:8),和反向引物:5' GACATAGGGCAGATTTGTGG-3' (SEQ ID NO:9)。

[0335] 增殖分析

[0336] 为了评估突变型胚胎中的细胞增殖,向怀孕雌性皮下注射0.1mg EdU/克体重。两小时后,将动物处死,解剖来自E14.5、E16.5和E18.5胚胎的胰腺,并在pH 7.4的PBS中的4% PFA中于4℃下固定过夜。第二天,将器官经受包埋在组织冷冻培养基(Leica,Germany)中的7.5%、15%、30%的蔗糖梯度并储存于-80℃。使用Click-iT®EdU成像试剂盒(Life Technology)根据制造商的说明(包括针对胰岛素的抗体(1`250豚鼠ThermoScientific; PA1-26938))对20微米冷冻切片染色。使用具有20x物镜的Leica SP5共焦显微镜获取图像,并使用IMARIS软件(Bitplane,Switzerland)进行数据分析。

[0337] RT-qPCR

[0338] 对于基因表达分析,通过实时定量PCR,使用miRNeasy mini试剂盒(Qiagen,Germany)从基因敲除和对照胚胎的胰腺中分离mRNA。使用GoScript™逆转录系统(Promega)合成cDNA,随后用于采用TaqMan®低密度阵列的qPCR并在ViiA 7系统(Applied Biosystems)上运行。所使用的探针列于表1:

[0339] 表1

[0340]

<u>基因符号</u>	<u>探针</u>
Slc2a2	Mm00446229_m1
Slc30a8	Mm00555793_m1
Ucn3	Mm00453206_s1
Gjd3	Mm00731344_s1
Kcnj11	Mm00440050_s1
Abcc8	Mm00803450_m1
Smarca1	Mm00474150_m1
Mafa	Mm00845206_s1

[0341]

Mafb	Mm00627481_s1
Foxa2	Mm01976556_s1
18S	Hs99999901_s1
Nkx2-2	Mm00839794_m1
Nkx6-1	Mm00454962_m1
Pax6	Mm00443081_m1
Pdx1	Mm00435565_m1
Neurod1	Mm01946604_s1
Glp1r	Mm00445292_m1
Gcgr	Mm00433546_m1
Gipr	Mm01316344_m1
Prlr-	Mm00599957_m1
Insr	Mm01211875_m1
Insr	Mm00442243_m1
B9d1	Mm00840045_m1
Il6ra	Mm00439653_m1
Cntfr	Mm00516693_m1
Ffar1	Mm00809442_s1
Lgals3bp	Mm00478303_m1
Sstr3	Mm00436695_s1
1700009P17Rik	Mm00512620_m1
Pard6a	Mm01247370_g1
Atf2	Mm00833804_g1
Dvl3	Mm00432914_m1
Fzd3	Mm00445423_m1
Rhoa	Mm00834507_g1
Rock1	Mm00485745_m1
Rock2	Mm01270843_m1
Wnt5b	Mm01183986_m1
Gck	Mm00439129_m1
Pcsk1	Mm00479023_m1

[0342]	Pcsk2	Mm00500981_m1
	Ccnd1	Mm00432359_m1
	Ccnd2	Mm00438070_m1
	Cdk4	Mm00726334_s1
	Cdkn1a	Mm04205640_g1
	Cdkn1b	Mm00438168_m1
	Actb	Mm00607939_s1
	Rplp0	Mm00725448_s1

[0343] 针对雌激素诱导的基因121蛋白 (EIG) 的单克隆抗体的产生。

[0344] 合成来自人EIG蛋白的肽并偶联至OVA (Peps4LS, Heidelberg, Germany)。使用50 μ g 肽-OVA、5nmol CPG寡核苷酸 (Tib Molbiol, Berlin)、500 μ l (小鼠100 μ l) PBS和500 μ l (小鼠100 μ l) 弗氏 (Freund' s) 不完全佐剂的混合物皮下和腹膜内免疫Lou/c大鼠或C57BL/6小鼠。初次注射后6周给予无佐剂的加强。使用标准程序进行融合。在差异ELISA中,使用生物素化的EIG肽和不相关的生物素化的肽在抗生物素蛋白涂布的ELISA板上测试上清液。在蛋白质印迹法中进一步分析与EIG肽特异性反应的MAb。

[0345] 自德国柏林的Pineda **Antikörper** Service购买兔多克隆抗体。

[0346] 细胞培养

[0347] Min6是胰腺 β 细胞系,其在葡萄糖刺激后分泌胰岛素的能力已被充分表征。这个细胞系来自Susumu Seino实验室。

[0348] 在补充有10%胎牛血清 (FBS)、1%青霉素/链霉素和2-巯基乙醇的Gibco (41966-052) 的高葡萄糖Dulbecco改良Eagle培养基中维持Min6细胞。

[0349] 自全球生物资源中心ATCC购买HEK293细胞。

[0350] IGFR-样受体基因敲低

[0351] 将Min6细胞以 5×10^4 个细胞/ cm^2 的细胞密度在高葡萄糖DMEM培养基中接种并培养。在第2天和第3天转染一次IGFR-样受体siRNA之后,在第4天将细胞以50-60%的细胞密度在冰上在RIPA缓冲液中裂解。根据Life Technologies的方案进行基于lipofectamin (Lipofectamine 2000, Life Technologies, #11668019) 的转染,并使用以下来自Dharmacon GE Healthcare的200pmol的siRNA:靶标加小鼠5330417C22Rik (229722) siRNA-SMARTpool L-048745-01-0020和对照siRNA靶标加非靶向siRNA#1 D-001810-01-20。

[0352] IGFR-样受体基因敲除

[0353] 靶向核心启动子和转录起始侧的Min6细胞中的CRISPR/Cas9介导的IGFR-1基因敲除策略(图23)。

[0354] IGFR-样受体基因敲入Venus融合物

[0355] 通过移除翻译终止序列并将Venus在框架中与IGFR-1开放阅读框融合,CRISPR/Cas9介导的Venus荧光报道基因的基因敲入融合(图23):将在框架中与Venus荧光报道基因融合的Cas9和引导RNA (gRNA) 共转染Min6细胞,该引导RNA (gRNA) 在IGFR-1转录起始侧的侧

翼。2天后,将荧光细胞进行流式分选,并将有限的稀释液铺在10cm的培养皿上。10-14天后,在96孔板上选取单一克隆并通过基因组PCR分析IGFR-1表达(染色和WB)和内部缺失。

[0356] 饥饿分析Min6

[0357] 将Min6细胞以 5×10^4 个细胞/ cm^2 的细胞密度在高葡萄糖DMEM培养基中接种并培养。在实施IGFR-样受体基因敲低后,将Min6细胞用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤6次,加入含有0.2%BSA的HBSS缓冲液达15分钟、30分钟、60分钟和120分钟以使细胞饥饿。随后,将细胞于冰上在RIPA缓冲液中裂解。

[0358] 蛋白质印记法(半干免疫印记)

[0359] 将细胞和组织在含有蛋白酶抑制剂(1:100, Sigma, P8340)和磷酸酶抑制剂(1:100, Sigma Aldrich, #2 P0044和#3 P5726)的混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% IGEPAL, 0.1% SDS, 0.1% 脱氧胆酸Na)中裂解并通过13000 r.p.m离心达10-30min使所述细胞或组织裂解物澄清。根据待检测的蛋白质大小,将蛋白质(10-20 μg) 在6.5-15% SDS-PAGE中解析并转移至PVDF膜。将一级抗体加入5%牛奶中的膜中,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜。通过化学发光检测(ECL, Millipore, WBKLS0500) 在Hyperfilms (GE healthcare, 28906837) 或Blaufilme CEA-RP (Ernst Christiansen GmbH, EC84A) 上观察蛋白条带。

[0360] 以下抗体以相应的稀释度使用:

[0361] IGFR-样受体SEQ ID No.2 (1:5000兔Pineda, 德国, 柏林), IGFR-样受体SEQ ID No.2 (1:100大鼠和小鼠), IGFR-样受体SEQ ID No.4和6 (1:10大鼠和小鼠), Akt (1:5000 Cell Signaling, 4691), P-Akt (1:5000 Cell Signaling, 4060), Erk (1:5000 Cell Signaling, 4695), P-Erk (1:5000 Cell Signaling, 4370), m-Tor (1:1000 Cell Signaling, 2972), P-mTor (1:1000 Cell Signaling, 5536), Ampk (1:1000 Cell Signaling, 2532), P-Ampk (1:2500 Cell Signaling, 2535), IRS-2 (1:1000 Cell Signaling, 4502), IRB (1:1000 Cell Signaling, 3025), S6rp (1:5000 Cell Signaling, 2217S), P-S6RP (1:5000 Cell Signaling, 2211S), P-IR/IGFR (1:1000, Millipore, 07-841), α -Tubulin (1:5000, Sigma, T7451), 小鼠衔接蛋白 β 克隆74 (1:5000, BD Bioscience 610382)。为了检测自噬相关蛋白,使用Cell Signaling的自噬抗体采样器试剂盒(#4445, 1:1000)。

[0362] 免疫荧光和成像

[0363] 对于免疫细胞化学,将Min6细胞以 5×10^4 个细胞/孔的细胞密度铺于Ibidi (德国慕尼黑) 8-孔室培养皿(经处理)中。接种后三天,将细胞用4%PFA直接固定10分钟,然后在透化溶液(1xPBS中的0.1M甘氨酸、0.2% Triton-X100)中温育10分钟。封闭(1xPBS中的10% 驴血清、1% BSA和5% FCS、0.5% Tween-20) 1小时后,使细胞在4 $^{\circ}\text{C}$ 下于包含一级抗体的封闭溶液中温育过夜:IGFR-样受体Seq ID No.2 (大鼠和小鼠1:10), GM130 (1:300, BD, 610822), IGF2R (1:100 ThermoScientific, PA3-850)。在室温下于封闭溶液中应用以下二级抗体达2小时:驴抗-兔IgG-555 (1:800, Invitrogen, A31572), 驴抗-小鼠IgG-488 (1:800, Invitrogen, A21202) 和驴抗-大鼠IgG 647 (1:400, Dianova, 712-605-150)。DAPI染色(50ng/ml)后,将样品用elvano1封固并在具有63x物镜的Leica激光扫描SP5共焦显微镜上获取图像。

[0364] 对于小鼠组织的免疫组织化学,将胰腺切片并于4℃下固定在4%PFA的PBS溶液中达2小时,在梯度系列的蔗糖溶液(7.5、15和30%蔗糖的PBS溶液)的每一溶液中冷冻保护至少2小时,最后将器官包埋在组织冷冻培养基(Leica 14020108926)中并储存于-80℃。20μm切片用于免疫染色。简言之,将切片在PBS中洗涤,在0.1%Triton X-100、0.1M甘氨酸的PBS溶液中透化15分钟,然后在封闭溶液(PBS中10%FCS、3%驴血清、0.1%BSA和0.1%Tween-20)中于室温下封闭1小时。将一级抗体在封闭溶液中稀释并在4℃下温育过夜。第二天,将切片在PBST(PBS中0.1%Tween-20)中以每次五分钟洗涤三次,于室温下在由封闭溶液稀释的第二抗体中温育3-5小时,用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)染色并封固于包埋培养基(ProLong Gold antifade embedding medium,Life Technologies)中。

[0365] 对于人胰岛的全封固染色,将胰岛在4%PFA的PBS溶液中于RT下固定15分钟,然后于4℃下用在封闭溶液中稀释的一级抗体中直接温育过夜,然后在PBST中洗涤三次,并随后如上于RT下用二级抗体温育3-5小时。

[0366] 对于人组织切片的染色,将来自人供体的快速冷冻的胰腺片包埋于组织冷冻培养基(Leica 14020108926)中并储存于-80℃。将10μm厚的切片在室温下于4%PFA的PBS溶液中固定20分钟,用PBS洗涤2次并在冰上透化5分钟。如上所述进行抗体染色程序。

[0367] 所采用的一级抗体是抗-IGFR-样受体兔SEQ ID No:2 1:100,抗-IGFR-样受体SEQ ID No:2和SEQ ID No.4大鼠1:10,IGFR-样受体SEQ ID No:2和SEQ ID No.6小鼠1:10,抗-胰岛素(兔1:250;Cell Signaling;3014),抗-胰岛素(豚鼠1:250;Thermo Scientific;PA1-26938),抗-E-钙粘蛋白(大鼠1:500;DECMA Kremmer;),抗-甘露糖6P受体(兔1:200;Thermo Scientific;PA3-850)和抗-尿皮质素3(兔1:300;Phoenix Pharmaceuticals;H-019-29)。所采用的二级抗体是抗-兔Alexa-555(1:800;Invitrogen;A31572),抗-兔Alexa-488(1:800;Invitrogen;A21206),抗-大鼠Alexa-488(1:800;life technologies,A-21208),抗-大鼠Alexa-647(1:800;Dianova,712-605-150)和抗-豚鼠Alexa647(1:800;Dianova;706-495-148),抗-小鼠Alexa-555(1:800;Invitrogen;A31570)。图片是在Leica DMI 6000显微镜上拍摄的。

[0368] 免疫沉淀分析

[0369] 对于免疫沉淀分析,使Min6细胞在含有0.2%BSA无脂肪酸的HBSS中饥饿15、30、60和120分钟,并在含有蛋白酶抑制剂混合物(1:100,Sigma,P8340)的免疫沉淀缓冲液(2%CHAPS,50mM HEPES pH7.5,200mM NaCl,2mM EDTA)中于冰上裂解20分钟。以14000rpm和4℃离心30分钟使裂解物澄清。在4℃下将约500μg全细胞裂解物用大鼠中产生并以1:10稀释的IGFR-样受体SEQ ID No 2抗体温育达1小时,然后于4℃下用蛋白G琼脂糖凝胶4Fast Flow(GE Healthcare)温育16小时。将沉淀物用免疫沉淀缓冲液洗涤5次,于95℃下在含有100mM DTT和5%2-巯基乙醇的2x SDS样品缓冲液(100mM Tris-HCL,4%SDS,20%甘油,0.2%溴酚蓝)中变性达5分钟,然后经受蛋白质印记分析。

[0370] 表面生物素化分析

[0371] 用PBS pH8.0中的2mMEZ-Link® Sulfo-NHS-LC-生物素(Thermo Scientific)在室温下温育Min6细胞10分钟,之后用100mM甘氨酸的PBS溶液终止生物素化反应。然后将细胞在冰冷的PBS中洗涤,并在含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液中裂解。在通过在14000rpm和4℃下离心30分钟澄清后,将上清液用NeutrAvidin珠子(ThermoScientific/

Pierce) 在4℃下温育过夜。第二天,在RIPA缓冲液中洗涤5次后,生物素标记的蛋白质通过在含有100mM DTT和5% 2-巯基乙醇的2×SDS样品缓冲液中煮沸从珠子中洗脱,然后进行蛋白质印迹分析。

[0372] 实施例2:在胰腺中接近IGF-1、IGF-2和胰岛素配体的IGFR-样受体的表达。

[0373] 简言之,获得E14.5小鼠胚胎并使用GenePaint™ (Tecan) 进行原位杂交 (ISH)。

[0374] E14.5小鼠胚胎的Gene paint原位杂交显示胰腺中IGFR-样受体mRNA的特异性表达(图2B)。IGF1和IGF2 mRNA在接近胰腺上皮的组织中表达(图2A、C),而胰岛素mRNA存在于胰腺的内分泌室中(图2D)。

[0375] 实施例3:IGFR-样受体基因敲除小鼠

[0376] 如实施例1所述产生IGFR-样受体基因敲除小鼠。

[0377] IGFR-样受体基因敲除小鼠在出生时表现出正常外观,但如通过其胃中缺乏牛奶所示不能进食(图3B,星号),它们昏睡并表现出呼吸窘迫。不同阶段的孟德尔比率表明三种基因型直到出生的正态分布,然而在出生后直至离乳期,存活的基因敲除小鼠的百分比显著降低。在离乳期发现只有少数幸存者,这可能因为补偿机制和/或在插入的盒周围剪接导致不完全基因敲除(图3C)。直方图描述在P0时基因敲除小鼠与野生型和杂合的同窝对照相比的正常体重(图3D)。

[0378] 实施例4:IGFR-样受体KO小鼠的胰腺中的生长、增殖和内分泌分化。

[0379] 简言之,产生IGFR-样受体基因敲除小鼠、解剖胰腺并进行采用针对胰岛素的抗体的免疫组织化学。使用EdU测定细胞增殖。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0380] 胰腺切片的共焦图像显示了如通过使用胰岛素抗体的免疫荧光标记的β-细胞所示(绿色)的在E16.5时的正常内分泌分化(在E14.5和E18.5时获得了类似的结果,未示出)。如通过引入EdU显示胰腺上皮的正常增殖(红色)。在E14.5、E16.5和E18.5时EdU阳性细胞相对于总细胞数的定量(由DAPI染色)显示基因敲除和野生型胰腺之间的增殖无显著性差异(计数来自一个胰腺/阶段的不同区域的至少三个切片,误差线代表平均值的标准误差)(图4)。

[0381] 实施例5:出生前IGFR-样受体KO小鼠中的胰腺基因表达。

[0382] 简言之,如前所述产生IGFR-样受体基因敲除小鼠。解剖出生前、出生后的KO小鼠和野生型对照的胰腺,分离mRNA并进行实时定量PCR。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0383] 实时qPCR显示,在E18.5时与野生型对照相比,选择的对基因敲除胰腺的内分泌β-细胞分化、成熟、增殖和功能重要的基因的相对mRNA表达的适度变化。在这个阶段,胚胎仍然依赖于母体营养(图5)。将肌动蛋白用作进行归一化的持家基因。如实时qPCR所示,当出生后立即与野生型对照相比,在基因敲除胰腺中选择的对内分泌β-细胞分化(Foxa2、Pdx1、Pax6、Neurod1、Nkx2-2、Nkx6-1)、成熟(MafA、MafB、Ucn3)、增殖(Ccnd1、Ccnd2、Cdk4、Cdkn1a、Cdkn1b)和功能(Slc2a2、Slc30a8、Gjd3、Kcnj11、Smarca1、Abcc8)重要的基因的相对mRNA表达显著改变(图6)。

[0384] 实施例7:在胰腺和Min6中IGFR-样受体介导的Akt和AMPK信号传导。

[0385] 简言之,产生IGFR-样受体基因敲除小鼠并解剖胰腺。如前所述培养并收获Min6细胞。通过用靶向IGFR-样受体mRNA的siRNA或作为对照的无意义siRNA转染来完成Min6细胞

中的IGFR-样受体的基因敲低。采用针对Akt和AMPK的磷酸化特异性抗体使细胞和组织经受蛋白质免疫印记。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0386] 整个胰腺组织裂解物的蛋白质印迹法显示采用磷酸化特异性抗体的Akt和AMPK磷酸化(图7A)。显著数量的突变型胚胎显示Akt(mt2,3,5,6)和AMPK磷酸化(mt1,2,3)增加(图7A)。类似地(图7B),在Min6细胞中IGFR-样受体的基因敲低导致Akt磷酸化增加。

[0387] 实施例8:IGFR-样受体的基因敲低对Min6细胞中胰岛素/IGF信号传导的影响。

[0388] 简言之,将Min6细胞培养并用靶向IGFR-样受体siRNA的siRNA转染,并使用针对IR/IGF1R的磷酸化特异性抗体以及针对下游信号传导分子AKT、mTOR、ERK和S6RP的磷酸化特异性抗体通过蛋白质印迹法进行研究。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0389] Min6细胞中IGFR-样受体的基因敲低导致正常生长条件下的IR/IGF1R磷酸化增加,并且似乎不依赖于饥饿条件。IR和IGF1R以及IRS-2(IR信号传导下游的衔接子分子)的总水平未改变,而在基因敲低样品中IGFR-样受体大大降低,证明了siRNA基因敲低的效率(图8A)。下游信号传导分子(比如AKT和mTOR,其是通常由于IR激活而被磷酸化的重要分子)的蛋白质印迹分析表明Min6细胞中的IGFR-样受体基因敲低导致Akt和mTOR的磷酸化增加,而ERK和S6PR的磷酸化未增加。如磷酸化-S6RP的时间依赖性降低所示,当与其时间匹配的对照相比时,饥饿条件似乎对IGFR-样受体基因敲低样品中的Akt、mTOR和ERK磷酸化没有影响(图8B)。

[0390] 实施例9:IGFR-样受体在胰腺的内分泌细胞、导管细胞和外分泌细胞中的定位。

[0391] 简言之,将E18.5胰腺解剖并进行采用针对IGFR-样受体、胰岛素和E-钙粘蛋白的抗体的免疫组织化学。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0392] 采用针对IGFR-样受体(绿色)、胰岛素抗体(红色)和E-钙粘蛋白(青色)的抗体染色的E18.5胰腺切片的共焦图像显示了IGFR-样受体在与胰岛素部分共定位的外分泌和内分泌区室内的免疫定位(图9)。细胞核用DAPI染色。

[0393] 实施例10:IGFR-样受体的亚细胞定位。

[0394] 简言之,将Min细胞如上所述培养并进行采用针对IGFR-样受体和GM130的抗体的免疫组织化学。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0395] 实施例11:IGFR-样受体的亚细胞定位

[0396] 简言之,如实施例1所述进行免疫荧光染色和成像。

[0397] 采用免疫荧光标记的针对IGFR-样受体和GM130(高尔基体标志物)的抗体染色的Min6细胞的免疫荧光图像显示,与IGF2R类似,IGFR-样受体在高尔基体复合物中部分定位(图10、图11)。

[0398] 可以观察到与正常生长条件相比,在饥饿2小时后集中在顺面高尔基体区域的IGFR-样受体的重新分布(图11)。

[0399] 实施例11:饥饿条件下IGFR-样受体与AP-2相互作用。

[0400] 简言之,将Min6细胞按照如前所述培养并进行免疫沉淀和采用针对IGFR-样受体和衔接蛋白 β (AP2复合物的亚基)的抗体的蛋白质印记法。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0401] 蛋白质印记分析显示,如通过采用针对IGFR-样受体和衔接蛋白 β 的抗体的免疫沉淀所证明的那样,饥饿条件下Min6细胞中衔接蛋白 β 亚基(AP2复合物的一部分)与IGFR-样

受体一起共免疫沉淀。在正常饥饿条件下几乎没有衔接蛋白 β 共沉淀(图13)。

[0402] 实施例12:营养缺乏时,是IGF3R而非InsR被转运至细胞。

[0403] 简言之,将Min6细胞按照如上所述培养并进行表面生物素化和采用针对IGFR-样受体和衔接蛋白 β 的抗体的蛋白质印记法(AP2复合物的亚基)。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0404] 表面生物素化然后是中性抗生物素蛋白pulldown和蛋白质印迹法证明在饥饿条件下IGFR-样受体的表面表达降低是时间依赖性降低,而Min6细胞中IR没有减少(图14)。

[0405] 实施例14:IGFR-样受体基因敲低对自噬相关蛋白的表达的作用。

[0406] 简言之,将Min6细胞按照如前所述培养并转染,并进行采用针对ATG16L1、ATG7、ATG3、苜蓿素-1、LC3A/B及ATG5(即自噬相关蛋白)的抗体的蛋白质印记法。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0407] 在基础条件下,IGFR-样受体基因敲低很可能不改变自噬相关蛋白的蛋白质表达。自噬相关分子的蛋白质印迹分析表明在正常生长条件下,Min6细胞中IGFR-样受体基因敲低时表达无明显变化(图15)。

[0408] 实施例15:在小鼠糖尿病胰岛和外分泌组织中IGFR-样受体的表达。

[0409] 简言之,将野生型和糖尿病小鼠的胰腺解剖并进行采用针对IGFR-样受体、胰岛素和E-钙粘蛋白的抗体的免疫组织化学。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0410] 野生型($<120\text{mg/dL}$ 葡萄糖)和糖尿病($>500\text{mg/dL}$ 葡萄糖)成人胰腺的LSM图像显示内分泌和外分泌区室的糖尿病胰腺中IGFR-样受体抗体的免疫反应性增加,其中所述成人胰腺采用针对IGFR-样受体(红色)、胰岛素(青色)和E-钙粘蛋白(绿色)(A)以及IGFR-样受体(红色)、胰高血糖素(青色)和尿皮质素3(绿色)(B)的抗体染色。通过糖尿病胰腺中染色的胰岛素和尿皮质素3降低证明糖尿病状态(图16)。

[0411] 实施例16:采用针对IGFR-样受体的胞外结构域的抗体检测胰岛细胞中的IGFR-样受体。

[0412] 简言之,按照如前所述培养HEK293细胞并获得人胰岛细胞。解剖来自野生型、杂合和突变型(IGFR-样受体基因敲除)小鼠的胰腺。采用识别SEQ ID NO:2、4和6的抗IGFR-样受体抗体对细胞和组织进行蛋白质印记法。

[0413] 蛋白质印记实验表明在胰岛细胞裂解物中特异性识别了 $\sim 130\text{kDa}$ 的蛋白条带,而通过针对SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的抗体在HEK细胞裂解物中不存在该蛋白条带。通过比较,在全部野生型和杂合的胰腺裂解物中,针对SEQ ID NO 2的抗体特异性识别了相同的条带,但是在突变型胚胎中未特异性识别相同的条带,以及在胰岛细胞中特异性识别了相同的条带,但是在HEK细胞中未特异性识别相同的条带(图17)。

[0414] 实施例17:IGFR-样受体在人郎格罕氏岛(islets of Langerhans)中的分布。

[0415] 简言之,获得人胰岛并进行采用针对IGFR-样受体、IGF2R和胰岛素的抗体的免疫组织化学。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0416] IGF-样受体在人郎格罕氏岛中的表达。郎格罕氏岛的共焦图像显示在高尔基体区室中典型的IGFR-样受体分布和与IGF2R及胰岛素的部分共定位,其中所述郎格罕氏岛来自人供体并采用针对IGFR-样受体(红色)、IGF2R(绿色)和胰岛素(青色)的抗体免疫荧光标记(图18)。

[0417] 实施例18:IGFR-样受体指示人中胰腺β细胞功能障碍。

[0418] 简言之,自健康和糖尿病供体获得人胰岛,并进行采用针对IGFR-样受体和胰岛素的抗体的免疫组织化学。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0419] 采用针对IGFR-样受体(红色)和胰岛素(绿色)的抗体染色的人胰腺切片的LSM图像。被DAPI(蓝色)染色的细胞核显示,与非糖尿病(4.6%HbA1c值)患者相比,糖尿病(6.9%HbA1c值)患者中胰岛素减少和IGFR-样受体表达增加(HbA1c用作糖尿病状态的指征,定义为血浆中糖化血红蛋白HbA1c的百分比;正常范围:<5.9%) (图22)。

[0420] 实施例19:在野生型和基因敲除Min6细胞中的IGFR-样受体亚细胞定位。采用针对IGFR-样受体和胰岛素的抗体染色的Min6细胞的免疫荧光图像。

[0421] 简言之,获得野生型Min6克隆和基因敲除Min6克隆并通过基因组PCR和蛋白质印记法对其检验,其中表明在基因敲除Min6克隆中IGFR-1蛋白完全缺失(图25A和B)。采用针对IGFR-样受体(红色)和胰岛素(绿色)的抗体对WT和KO进行免疫组织化学。采用DAPI(蓝色)使细胞核染色(图24)。免疫组织化学确证了基因组PCR和蛋白质印记法的结果。实施例1中提供了所用材料和方法的详细描述。

[0422] 实施例20:Min6(C22RIK)中IGFR-样受体的基因敲除对胰岛素/IGF信号传导的影响。

[0423] 简言之,通过如实施例1所述的CRISPR/Cas9-介导的基因敲除策略得到Min6基因敲除细胞,并通过采用针对IR/IGF1R的磷酸化特异性抗体以及针对下游信号传导分子Ampk、AKT和mTOR的磷酸化特异性抗体的蛋白质印记分析研究。

[0424] Min6细胞中IGFR-样受体基因敲除导致IR的磷酸化增加,并由此增加AMPK,但是未使Akt或mTor磷酸化增加(图26)。在生长条件下(10%FCS和高葡萄糖)培养Min6对照和基因敲除克隆。

[0425] 实施例21:IGFR-样Venus融合物基因敲入Min6细胞系。

[0426] 简言之,按照实施例1所述产生IGFR-1 Venus融合物基因敲入Min6细胞系,并进行采用针对IGFR-样受体和Venus荧光报告子的抗体的免疫组织化学。

[0427] IGFR-1 Venus融合物(抗-GFP检测Venus,绿色)与高尔基体和反面高尔基体区域中的内源性IGFR-1(抗-IGFR-1,红色)共定位。可以采用使用这种基因敲入Min6细胞系的高内涵筛选方法,鉴定通过跨膜结构域(TM)或生长因子受体富半胱氨酸结构域(CRD)(IPR009030)或反面高尔基体、高尔基体、溶酶体和质膜区室中的细胞内定位改变而抑制同源和异源二聚化的小分子化合物和生物制剂(图27)。

[0428] 实施例22:在自诱导多能干细胞(iPSC)分化的内分泌祖细胞中的IGFR-样受体定位。

[0429] 简言之,获得PDX1⁺/NKX6.1⁺内分泌祖细胞并进行采用针对PDX1、NKX6.1和IGFR-样受体的抗体的免疫组织化学。

[0430] 采用针对PDX1(浅蓝)、NKX6.1(红色)和IGFR-样受体(绿色)的抗体染色的内分泌祖细胞的共焦图像显示了IGFR-样受体与PDX1和NKX6.1免疫定位(图28)。用DAPI使细胞核染色(蓝色)。

[0431] 实施例23:可以在小鼠Min6胰岛瘤细胞和MCF7人乳腺癌细胞系中针对IGFR-1胞外域的肽B和D产生抗体。

[0432] 产生大鼠单克隆抗体EIG-B 18B2和EIG-B 10D9并将其用于针对IGFR-1胞外域的肽B的蛋白质印记,所述IGFR-1胞外域的肽B是指表位SEQ ID NO:4。针对IGFR-1胞外域的肽D产生小鼠单克隆抗体EIG-D 26D7,所述IGFR-1胞外域的肽D是指表位SEQ ID NO:6。

[0433] 这些抗体(EIG-B和EIG-D)显示特异性识别Min6(弱)和MCF7(强)细胞裂解物中的~130kDa的蛋白条带。

[0434] 实施例24:全基因组关联元研究中IGFR-样受体中的SNP与冠状动脉疾病、LDL胆固醇和2型糖尿病高度相关。

[0435] 编码染色体1上IGFR-1的人KIAA1324基因(图30)和IGFR-1 SNP与特定疾病(比如冠状动脉疾病、LDL胆固醇和2型糖尿病)的关系(图31)。这些研究是指具有50万测试人员的全基因组关联元研究。

序列表

<110> 德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与环境研究中心（有限公司）

<120> 新型 IGFR-样受体及其用途

<130> LC18310001P

<150> LU92818

<151> 2015-09-07

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1013

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met Ala Glu Pro Gly His Ser His His Leu Ser Ala Arg Val Arg Gly
1 5 10 15

[0001] Arg Thr Glu Arg Arg Ile Pro Arg Leu Trp Arg Leu Leu Leu Trp Ala
20 25 30

Gly Thr Ala Phe Gln Val Thr Gln Gly Thr Gly Pro Glu Leu His Ala
35 40 45

Cys Lys Glu Ser Glu Tyr His Tyr Glu Tyr Thr Ala Cys Asp Ser Thr
50 55 60

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

Ser Leu Pro Asp Pro Ile Lys Gly Thr Glu Cys Ser Phe Ser Cys Asn
85 90 95

Ala Gly Glu Phe Leu Asp Met Lys Asp Gln Ser Cys Lys Pro Cys Ala
100 105 110

Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Gly Thr Gly Ile Arg Phe Asp Glu Trp Asp
115 120 125

Glu Leu Pro His Gly Phe Ala Ser Leu Ser Ala Asn Met Glu Leu Asp
130 135 140

Asp Ser Ala Ala Glu Ser Thr Gly Asn Cys Thr Ser Ser Lys Trp Val
 145 150 155 160

Pro Arg Gly Asp Tyr Ile Ala Ser Asn Thr Asp Glu Cys Thr Ala Thr
 165 170 175

Leu Met Tyr Ala Val Asn Leu Lys Gln Ser Gly Thr Val Asn Phe Glu
 180 185 190

Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ser Ser Ile Ile Phe Glu Phe Phe Val Gln Asn
 195 200 205

Asp Gln Cys Gln Pro Asn Ala Asp Asp Ser Arg Trp Met Lys Thr Thr
 210 215 220

Glu Lys Gly Trp Glu Phe His Ser Val Glu Leu Asn Arg Gly Asn Asn
 225 230 235 240

Val Leu Tyr Trp Arg Thr Thr Ala Phe Ser Val Trp Thr Lys Val Pro
 245 250 255

[0002] Lys Pro Val Leu Val Arg Asn Ile Ala Ile Thr Gly Val Ala Tyr Thr
 260 265 270

Ser Glu Cys Phe Pro Cys Lys Pro Gly Thr Tyr Ala Asp Lys Gln Gly
 275 280 285

Ser Ser Phe Cys Lys Leu Cys Pro Ala Asn Ser Tyr Ser Asn Lys Gly
 290 295 300

Glu Thr Ser Cys His Gln Cys Asp Pro Asp Lys Tyr Ser Glu Lys Gly
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Cys Asn Val Arg Pro Ala Cys Thr Asp Lys Asp Tyr Phe
 325 330 335

Tyr Thr His Thr Ala Cys Asp Ala Asn Gly Glu Thr Gln Leu Met Tyr
 340 345 350

Lys Trp Ala Lys Pro Lys Ile Cys Ser Glu Asp Leu Glu Gly Ala Val
 355 360 365

Lys Leu Pro Ala Ser Gly Val Lys Thr His Cys Pro Pro Cys Asn Pro

Tyr Tyr Ile Asp Arg Asp Ser Gly Thr Cys His Ser Cys Pro Thr Asn
 610 615 620

Thr Ile Leu Lys Ala His Gln Pro Tyr Gly Val Gln Ala Cys Val Pro
 625 630 635 640

Cys Gly Pro Gly Thr Lys Asn Asn Lys Ile His Ser Leu Cys Tyr Asn
 645 650 655

Asp Cys Thr Phe Ser Arg Asn Thr Pro Thr Arg Thr Phe Asn Tyr Asn
 660 665 670

Phe Ser Ala Leu Ala Asn Thr Val Thr Leu Ala Gly Gly Pro Ser Phe
 675 680 685

Thr Ser Lys Gly Leu Lys Tyr Phe His His Phe Thr Leu Ser Leu Cys
 690 695 700

Gly Asn Gln Gly Arg Lys Met Ser Val Cys Thr Asp Asn Val Thr Asp
 705 710 715 720

[0004] Leu Arg Ile Pro Glu Gly Glu Ser Gly Phe Ser Lys Ser Ile Thr Ala
 725 730 735

Tyr Val Cys Gln Ala Val Ile Ile Pro Pro Glu Val Thr Gly Tyr Lys
 740 745 750

Ala Gly Val Ser Ser Gln Pro Val Ser Leu Ala Asp Arg Leu Ile Gly
 755 760 765

Val Thr Thr Asp Met Thr Leu Asp Gly Ile Thr Ser Pro Ala Glu Leu
 770 775 780

Phe His Leu Glu Ser Leu Gly Ile Pro Asp Val Ile Phe Phe Tyr Arg
 785 790 795 800

Ser Asn Asp Val Thr Gln Ser Cys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Thr Ile
 805 810 815

Arg Val Arg Cys Ser Pro Gln Lys Thr Val Pro Gly Ser Leu Leu Leu
 820 825 830

Pro Gly Thr Cys Ser Asp Gly Thr Cys Asp Gly Cys Asn Phe His Phe

	835	840	845
	Leu Trp Glu Ser Ala Ala Ala Cys Pro Leu Cys Ser Val Ala Asp Tyr 850	855	860
	His Ala Ile Val Ser Ser Cys Val Ala Gly Ile Gln Lys Thr Thr Tyr 865	870	875 880
	Val Trp Arg Glu Pro Lys Leu Cys Ser Gly Gly Ile Ser Leu Pro Glu 885	890	895
	Gln Arg Val Thr Ile Cys Lys Thr Ile Asp Phe Trp Leu Lys Val Gly 900	905	910
	Ile Ser Ala Gly Thr Cys Thr Ala Ile Leu Leu Thr Val Leu Thr Cys 915	920	925
	Tyr Phe Trp Lys Lys Asn Gln Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Ser Lys Leu 930	935	940
[0005]	Val Met Asn Ala Thr Leu Lys Asp Cys Asp Leu Pro Ala Ala Asp Ser 945	950	955 960
	Cys Ala Ile Met Glu Gly Glu Asp Val Glu Asp Asp Leu Ile Phe Thr 965	970	975
	Ser Lys Lys Ser Leu Phe Gly Lys Ile Lys Ser Phe Thr Ser Lys Arg 980	985	990
	Thr Pro Asp Gly Phe Asp Ser Val Pro Leu Lys Thr Ser Ser Gly Gly 995	1000	1005
	Leu Asp Met Asp Leu 1010		
	<210> 2		
	<211> 16		
	<212> PRT		
	<213> 人		
	<400> 2		
	Thr Ser Lys Arg Thr Pro Asp Gly Phe Asp Ser Val Pro Leu Lys Thr 1	5	10 15

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 3

Cys His Gln Cys Asp Pro Asp Lys Tyr Ser Glu
 1 5 10

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Met Tyr Lys Trp Ala Lys Pro Lys Ile Cys Ser Glu Asp Leu Glu Gly
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5

[0006]

Phe Gln Arg Thr Thr Phe His Glu Ala Ser Arg Lys Tyr Thr Asn
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

Cys Thr Phe Ser Arg Asn Thr Pro Thr Arg Thr Phe Asn Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 3042
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 7

atggctgagc ctgggcacag ccaccatctc tccgccagag tcaggggaag aactgagagg 60
 cgcatacccc ggctgtggcg gctgctgctc tgggctggga ccgccttcca ggtgaccag 120
 ggaacgggac cggagcttca tgcctgcaaa gagtctgagt accactatga gtacacggcg 180
 tgtgacagca cgggttccag gtggagggtc gccgtgccgc atacccggg cctgtgcacc 240

	agcctgcctg acccctcaa gggcaccgag tgctccttct cctgcaacgc cggggagttt	300
	ciggatatga aggaccagtc atgtaagcca tgcgctgagg gccgctactc cctcggcaca	360
	ggcattcggg ttgatgagtg ggatgagctg ccccatggct ttgccagcct ctcagccaac	420
	atggagctgg atgacagtgc tgctgagtcc accgggaact gtacttcgtc caagtgggtt	480
	ccccggggcg actacatcgc ctccaacacg gacgaatgca cagccacact gatgtacgcc	540
	gtcaacctga agcaatctgg caccgttaac ttcgaatact actatccaga ctccagcatc	600
	atctttgagt ttttcgttca gaatgaccag tgccagccca atgcagatga ctccaggtgg	660
	atgaagacca cagagaaagg atgggaattc cacagtgtgg agctaaatcg aggcaataat	720
	gtcctctatt ggagaaccac agccttctca gtatggacca aagtacccaa gcctgtgctg	780
	gtgagaaaca ttgccataac aggggtggcc tacacttcag aatgcttccc ctgcaaacct	840
	ggcacgtatg cagacaagca gggctcctct ttctgcaaac tttgccagc caactcttat	900
	tcaaataaag gagaaacttc ttgccaccag tgtgaccctg acaaatactc agagaaagga	960
	tcttcttct gtaacgtgcg ccagcttgc acagacaaag attatttcta cacacacag	1020
	gcctgcgatg ccaacggaga gacacaactc atgtacaaat gggccaagcc gaaaatctgt	1080
[0007]	agcgaggacc ttgagggggc agtgaagctg cctgcctctg gtgtgaagac ccactgcca	1140
	ccctgcaacc caggcttctt caaaaccaac aacagcacct gccagccctg cccatatggt	1200
	tcctactcca atggctcaga ctgtaccgc tgccctgcag ggactgaacc tgctgtggga	1260
	tttgaataca aatggtggaa cacgctgccc acaaacatgg aaacgaccgt tctcagtggg	1320
	atcaacttcg agtacaaggg catgacagc tgggaggtgg ctggtgatca catttacaca	1380
	gctgctggag cctcagacaa tgacttcatg attctcactc tggttgtgcc aggatttaga	1440
	cctccgcagt cgggtgatggc agacacagag aataaagagg tggccagaat cacatttgc	1500
	tttgagacc tctgttctgt gaactgtgag ctctacttca tgggtgggtgt gaattctagg	1560
	accaacactc ctgtggagac gtggaaaggt tccaaaggca aacagtccta tacctacatc	1620
	attgaggaga aactaccac gagcttacc tgggccttcc agaggaccac ttttcatgag	1680
	gcaagcagga agtacaccaa tgacgttgcc aagatctact ccatcaatgt caccaatgtt	1740
	atgaatggtg tggcctccta ctgccgtccc tgtgccctag aagcctctga tgtggctcc	1800
	tcctgcacct cttgtcctgc tggttactat attgaccgag attcaggaac ctgccactcc	1860
	tgccccacta acacaattct gaaagcccac cagccttatg gtgtccaggc ctgtgtgccc	1920
	tgtggtccag ggaccaagaa caacaagatc cactctctgt gctacaacga ttgcacette	1980

	tcacgcaaca ctccgaccag gactttcaac tacaacttct ccgctttggc aaacactgtc	2040
	actcttgctg gagggccaag cttcacttcc aaagggtga aatacttcca tcactttacc	2100
	ctcagtctct gtggaaacca gggtaggaaa atgtctgtgt gcaccgacaa tgtcactgac	2160
	ctccggattc ctgagggtga gtcagggttc tccaaatcta tcacagccta cgtctgccag	2220
	gcagtcatca tcccccaaga ggtgacagge tacaaggccg gggtttctc acagcctgtc	2280
	agccttgctg atcgacttat tggggtgaca acagatatga ctctggatgg aatcacctcc	2340
	ccagctgaac tttccacct ggagtccttg ggaataccgg acgtgatctt cttttatagg	2400
	tccaatgatg tgaccagtc ctgcagttct gggagatcaa ccaccatccg cgtcaggtgc	2460
	agtccacaga aaactgtccc tggagtttg ctgctgccag gaacgtgctc ggatgggacc	2520
	tgtgatggct gcaacttcca ctctctgtgg gagagcgcg ctgcttgccc gctctgtca	2580
	gtggctgact accatgctat cgtcagcagc tgtgtggctg ggatccagaa gactacttac	2640
	gtgtggcgag aaccaagct atgctctggt ggcatttctc tgcctgagca gagagtcacc	2700
	atctgcaaaa ccatagattt ctggctgaaa gtgggcatct ctgcaggcac ctgtactgcc	2760
	atctgctca cgtcttgac ctgctacttt tggaaaaaga atcaaaaact agagtacaag	2820
[0008]	tactccaagc tggatgaa tgctactctc aaggactgtg acctgccagc agctgacagc	2880
	tgcccatca tggaaaggca ggatgtagag gacgacctca tctttaccag caagaagta	2940
	ctctttggga agatcaaate attacctcc aagaggactc ctgatggatt tgactcagtg	3000
	ccgctgaaga catcctcagg aggcctagac atggacctgt ga	3042

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 8

tgggtagcct ttctgtatgg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 反向引物

<400> 9
 gacatagggc agatttgtgg 20

<210> 10
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10
 Thr Met Asp Lys Lys Asn Gln Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Ser Lys Leu
 1 5 10 15
 Val Met Asn Ala Thr Leu Lys Asp Cys Asp Leu Pro Ala Ala Asp Ser
 20 25 30
 Cys Ala Ile Met Glu Gly Glu Asp Val Glu Asp Asp Leu Ile Phe Thr
 35 40 45
 Ser Lys Lys Ser Leu Phe Gly Lys Ile Lys Ser Phe Thr Ser Lys Arg
 50 55 60
 Thr Pro Asp Gly Phe Asp Ser Val Pro Leu Lys Thr Ser Ser Gly Gly
 65 70 75 80
 [0009]

Leu Asp Met Asp Leu
 85

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 基序

<220>
 <221> X
 <222> (2)..(3)
 <223> X 可以选自任何氨基酸

<220>
 <221> X
 <222> (4)..(4)
 <223> X 可以选自 F、I、L、M 或 V

<400> 11
 Tyr Xaa Xaa Xaa
 1

<210> 12
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列

<400> 12

Lys Lys Asn Gln Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Ser Lys Leu Val Met Thr
 1 5 10 15

[0010]

Thr Asn Ser Lys Glu Cys Glu Leu Pro Ala Ala Asp Ser Cys Ala Ile
 20 25 30

Met Glu Gly Glu Asp Asn Glu Glu Glu Val Val Tyr Ser Asn Lys Gln
 35 40 45

Ser Leu Leu Gly Lys Leu Lys Ser Leu Ala Thr Lys Glu Lys Glu Asp
 50 55 60

His Phe Glu Ser Val Gln Leu Lys Thr Ser
 65 70

SEQ ID No. 1 (IGFR-样受体)				
10	20	30	40	50
MAEPGSHHLL	SARVRGRTER	RIPRLWRLLL	WAGTAFQVTQ	GTGPELHACK
60	70	80	90	100
ESEYHYEYTA	CDSTGSRWRV	AVPHTPGLCT	SLPDPIKGTE	CSFSCNAGEF
110	120	130	140	150
LDMKDQSCKP	CAEGRYSLGT	GIRFDEWDEL	PHGFASLSAN	MELDDSAAES
160	170	180	190	200
TGNCTSSKWV	PRGDYIASNT	DECTATLMYA	VNLKQSGTVN	FEYYYPDSSI
210	220	230	240	250
IFEFFVQNDQ	CQPNADDSRW	MKTTEKGWEF	HSVELNRGNN	VLWRTTAFS
260	270	280	290	300
VWTKVPKPVL	VRNIAITGVA	YTSECFCKP	GTYADKQGSS	FCKLCPANSY
310	320	330	340	350
SNKGETSCHQ	CDPKYSEKG	SSSCNVRPAC	TDKDYFYTHT	ACDANGETQL
360	370	380	390	400
MYKWAPKIC	SEDLEGAVKL	PASGVKTHCP	PCNPGFFKTN	NSTCQPCPYG
410	420	430	440	450
SYSNGSDCTR	CPAGTEPAVG	FEYKWWNTLP	TNMETTVLSG	INFYKGMTG
460	470	480	490	500
WEVAGDHIYT	AAGASDNDFM	ILTLVVPGFR	PPQSVMADE	NKEVARITFV
510	520	530	540	550
FETLCSVNCE	LYFMVGVNSR	TNTPVETWKG	SKGKQSYTYI	IEENTTTSTF
560	570	580	590	600
WAFQRTTFHE	ASRKYTNDVA	KIYSINVTNV	MNGVASYCRP	CALEASDVGS
610	620	630	640	650
SCTSCPAGYY	IDRDSGTCHS	CPTNTILKAH	QPYGVQACVP	CGPGTKNNKI
660	670	680	690	700
HSLCYNDCTF	SRNTPTRTFN	YNFSALANTV	TLAGGPSFTS	KGLKYFHHFT
710	720	730	740	750
LSLCGNQGRK	MSVCTDNVTD	LRIPEGESGF	SKSITAYVCQ	AVIIPPEVTG
760	770	780	790	800
YKAGVSSQPV	SLADRLIGVT	TDMTLDGITS	PAELFHLESL	GIPDVIFFYR
810	820	830	840	850
SNDVTQSCSS	GRSTTIRVRC	SPQKTVPGSL	LLPGTCSDGT	CDGCNFHFLW
860	870	880	890	900
ESAAACPLCS	VADYHAIVSS	CVAGIQKTTY	VWREPKLCSG	GISLPEQRVT
910	920	930	940	950
ICKTIDFWLK	VGISAGTCTA	ILLTVLTCYF	WKKNQKLEYK	YSKLVMNATL
960	970	980	990	1000
KDCDLPAADS	CAIMEGEDVE	DDLIFTSKKS	LFGKIKSFTS	KRTPDGFDSV
1010				
PLKTSSGGLD	MDL			

图1

预测的结构域:

273-413- 生长因子结合结构域

579-659- 生长因子结合结构域

655-857- 甘露糖-6-磷酸受体结合结构域

908-930- 跨膜结构域

932-1013- 细胞质结构域

加下划线的粗体字符代表如下列出的对其产生抗体的序列

SEQ ID NO. 2: TSKRTPDGFDSVPLKT (与小鼠 100%同一的细胞质尾部中的表位)

SEQ ID No. 3: CHQCDPDKYSE

SEQ ID No. 4: MYKWAKPKICSEDLEG

SEQ ID No. 5: FQRTTFHEASRKYTN

SEQ ID No. 6: CTFSRNTPTRTFNY

图1(续)

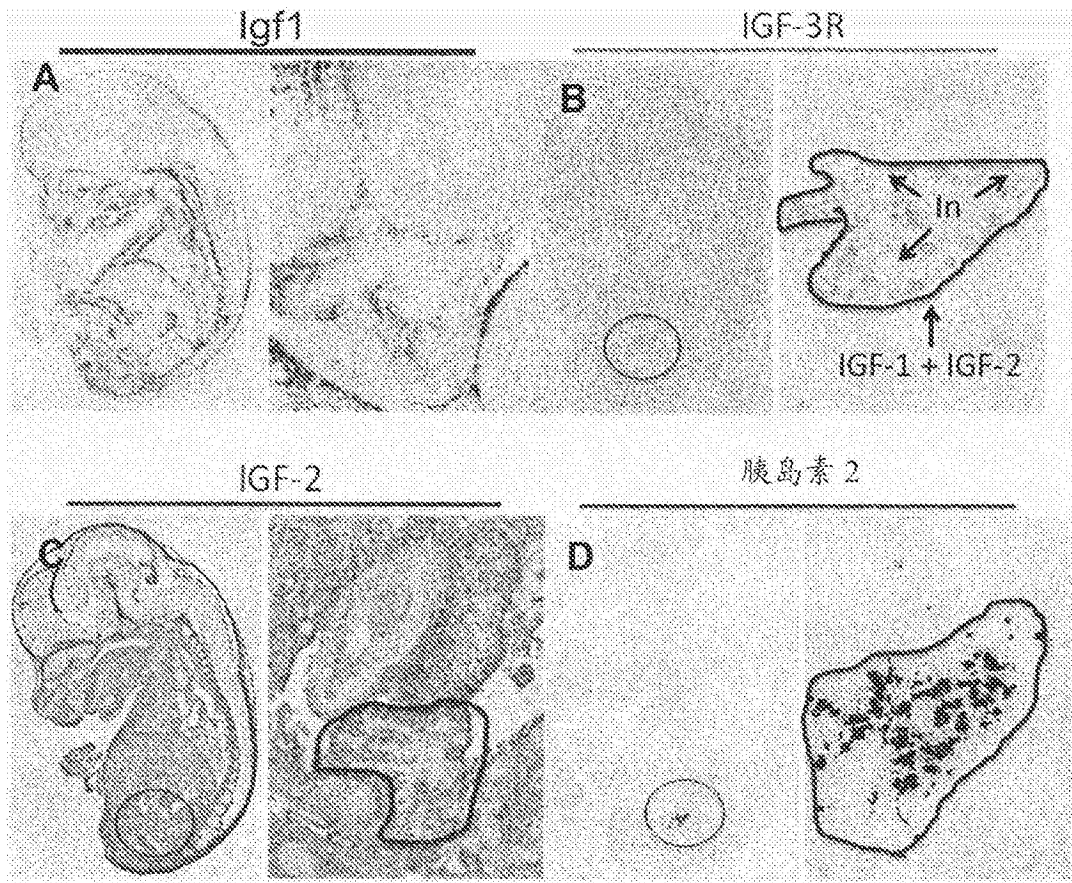


图2

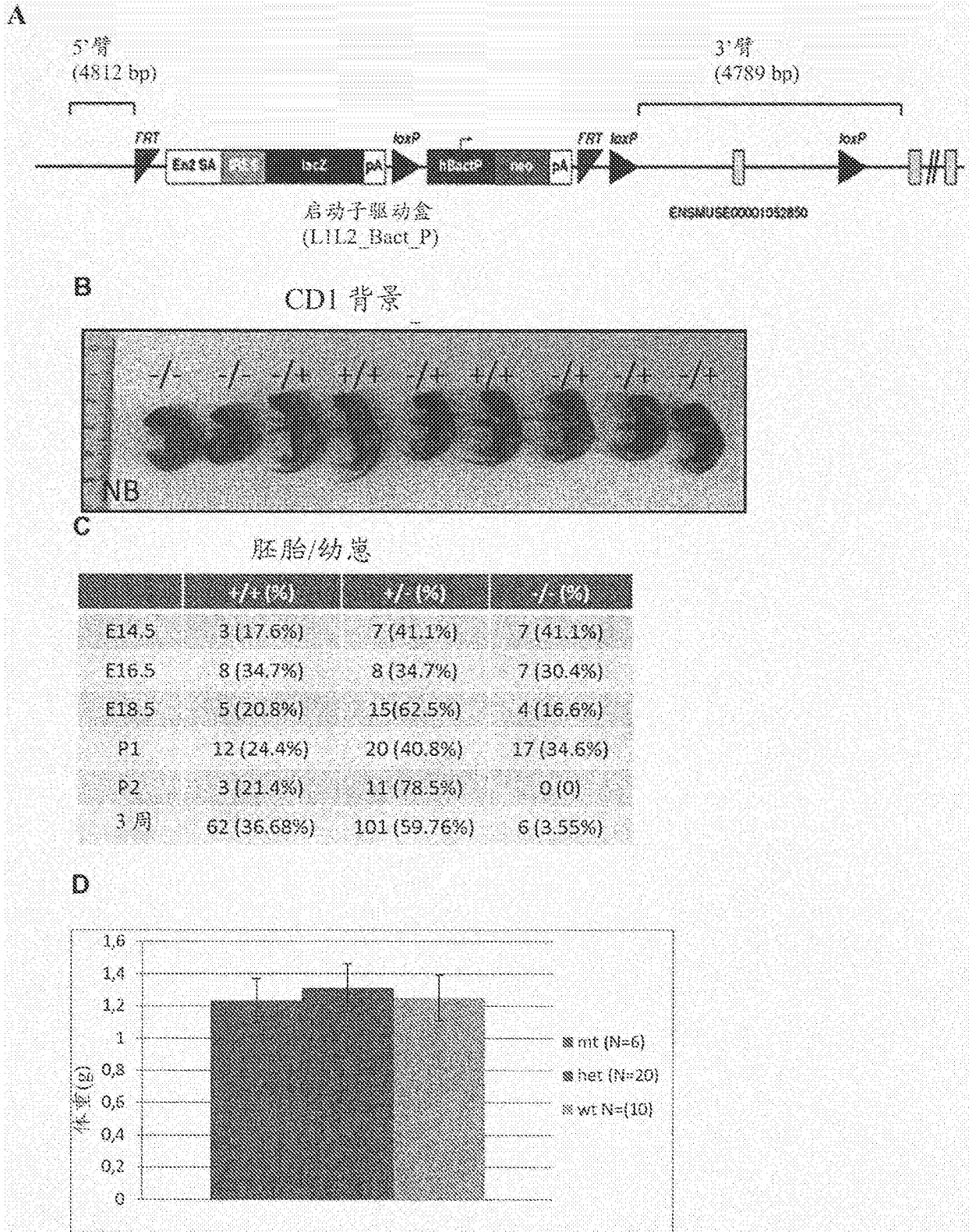


图3

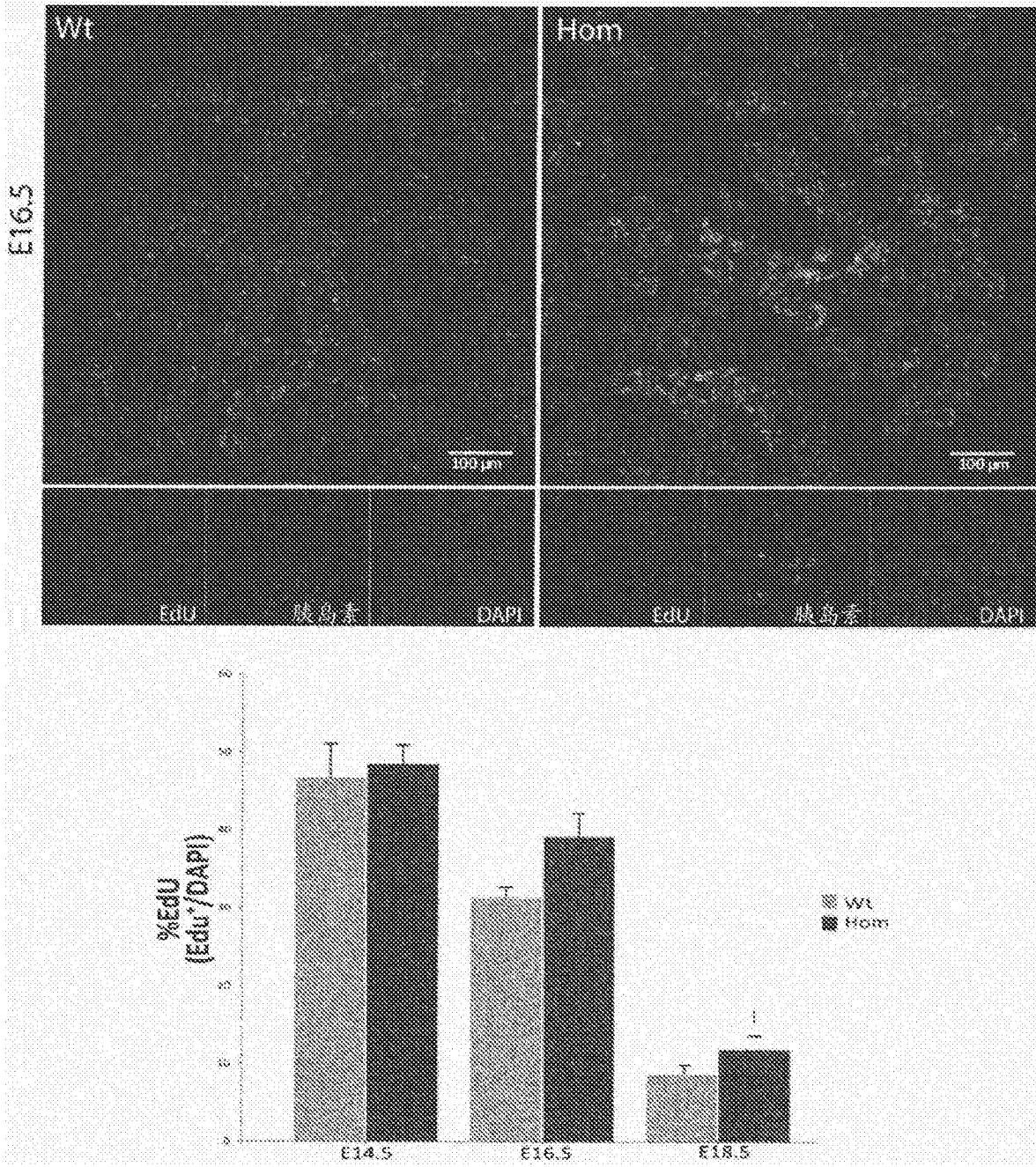


图4

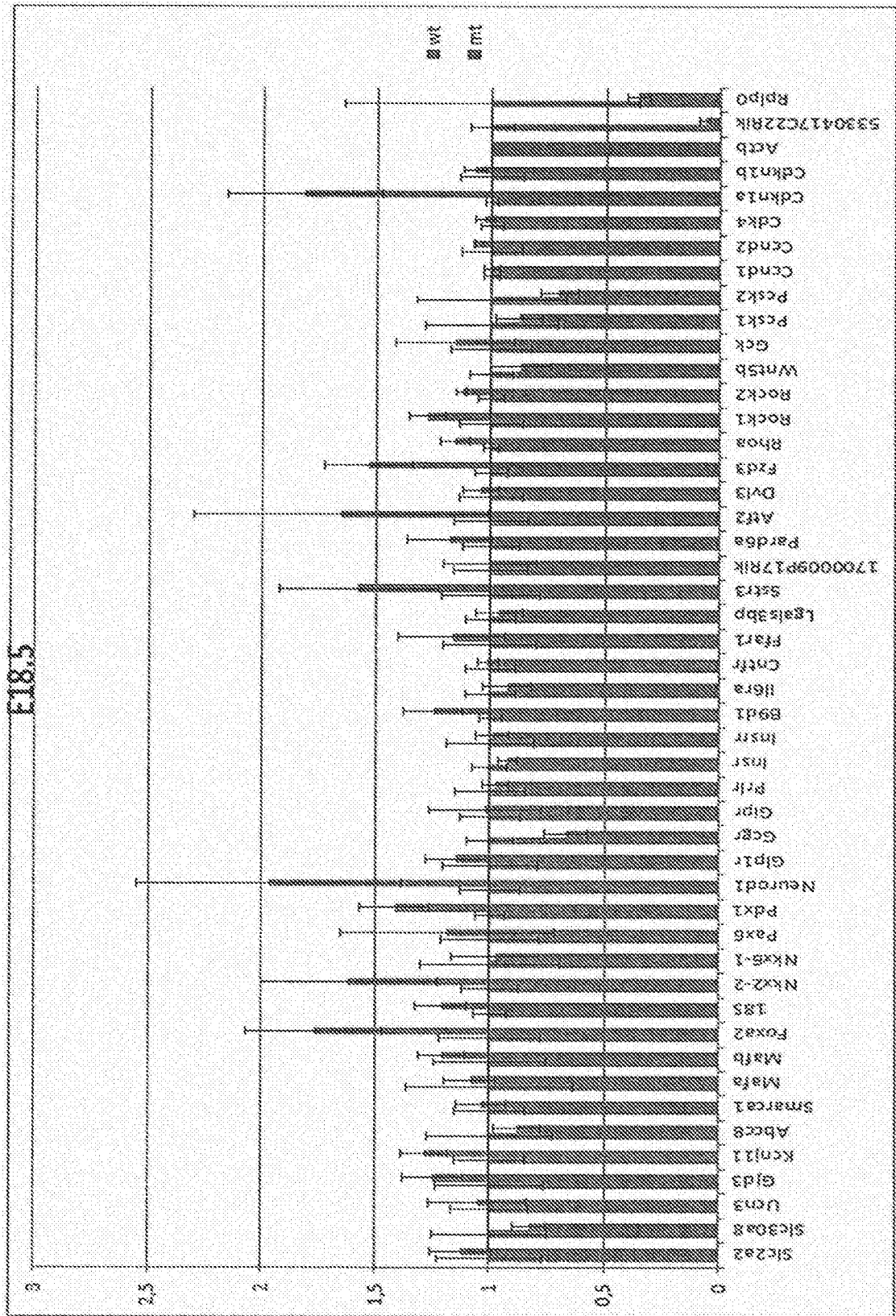


图5

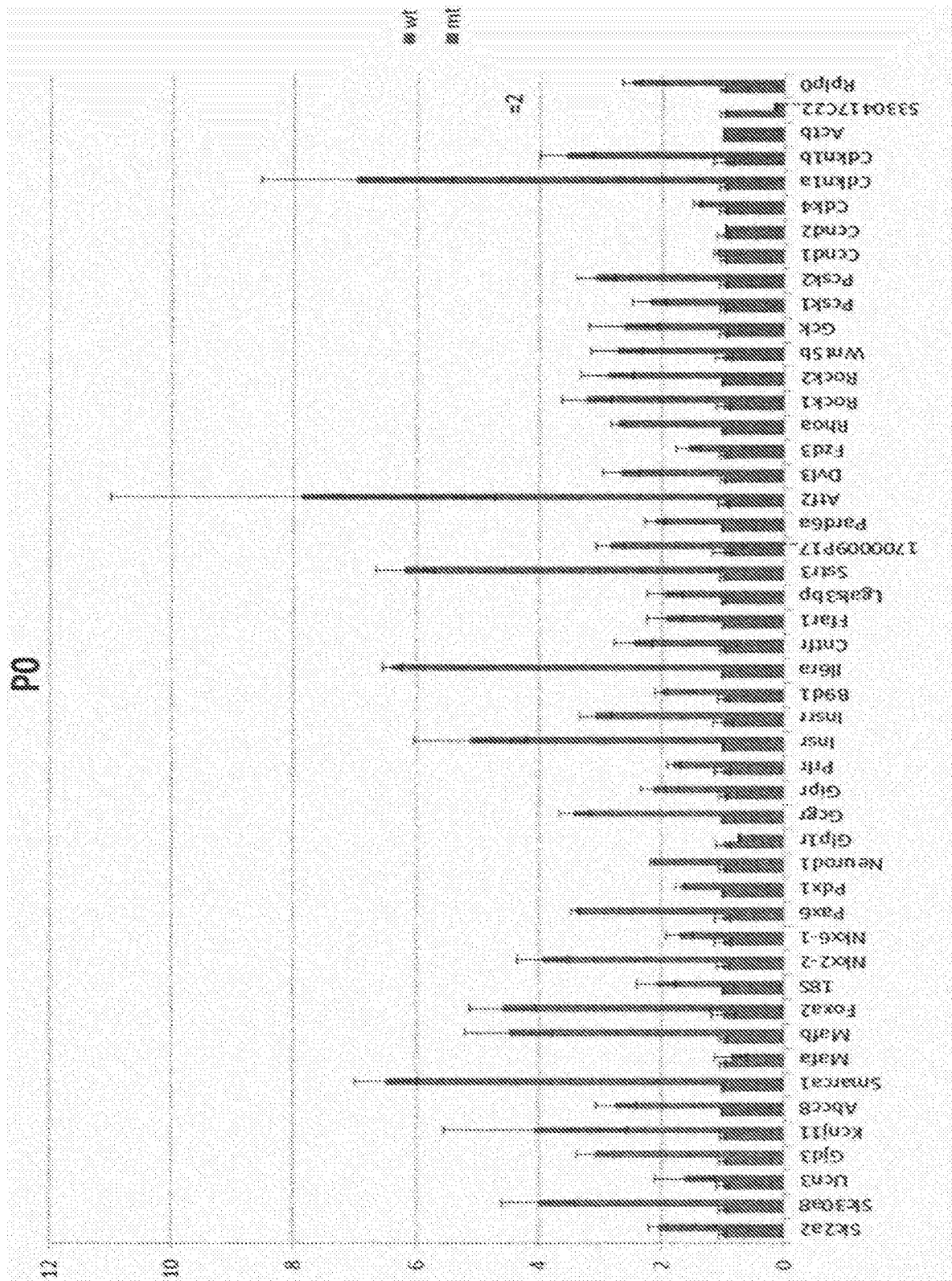
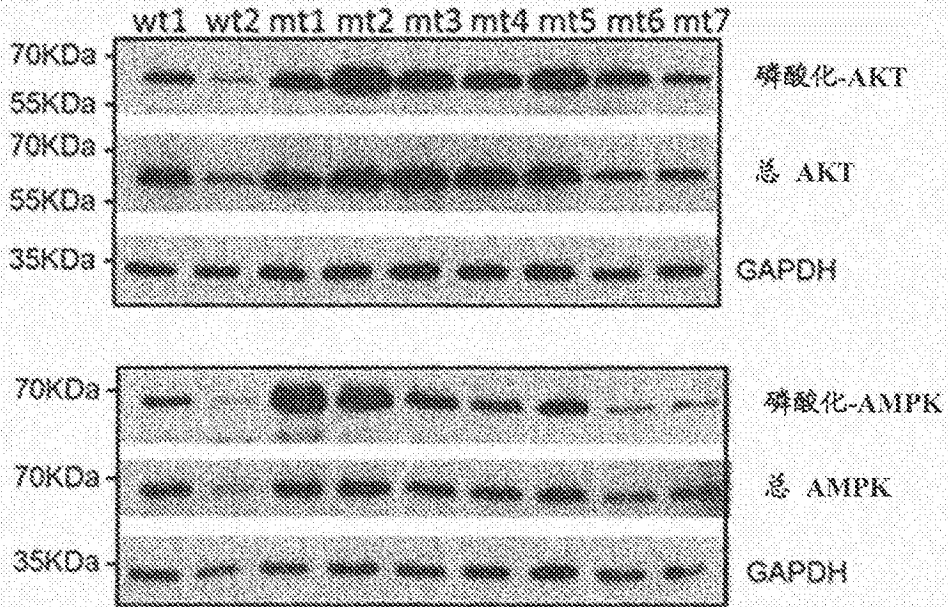


图6

A

E18.5 C-切片胰腺裂解物



B

Min6 中 IGF3R 基因敲低

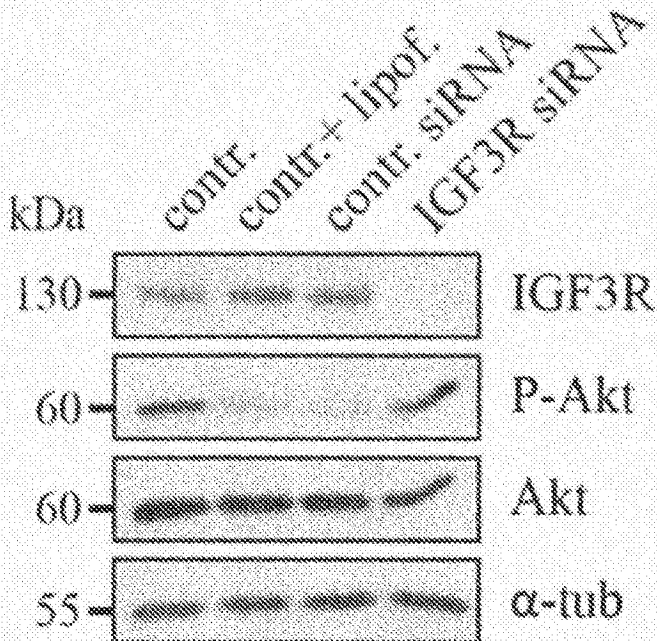


图7

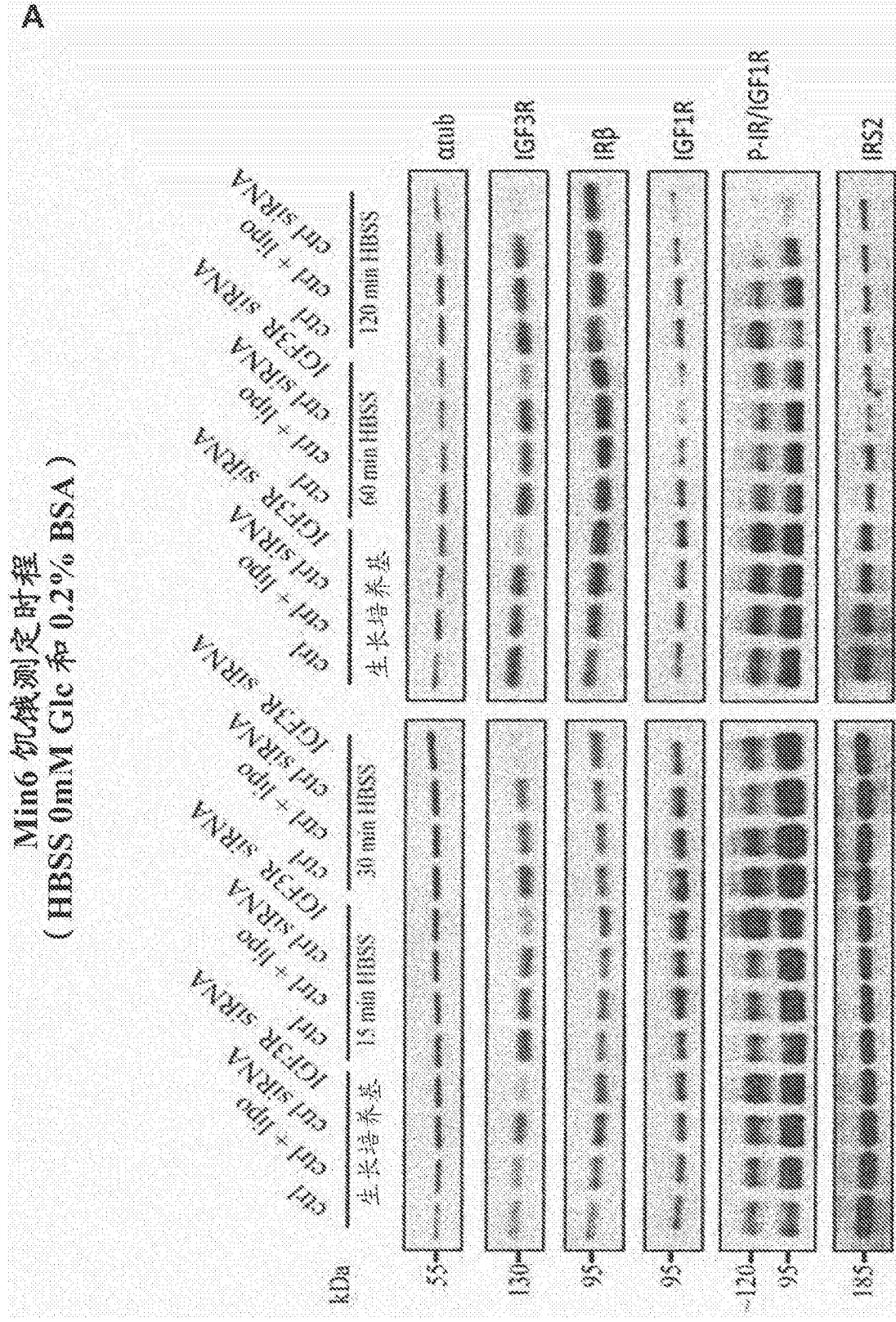


图8

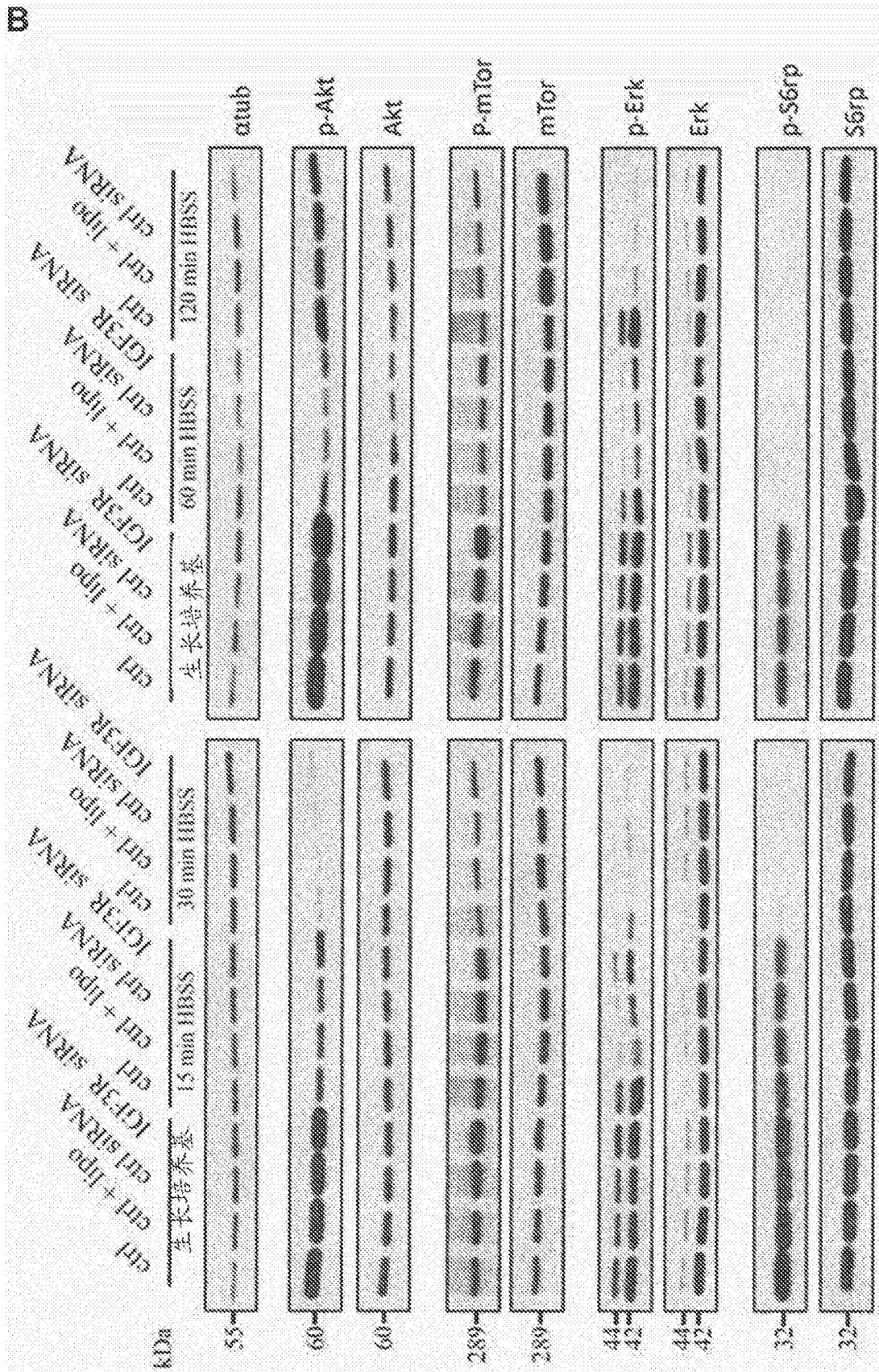


图8(续)

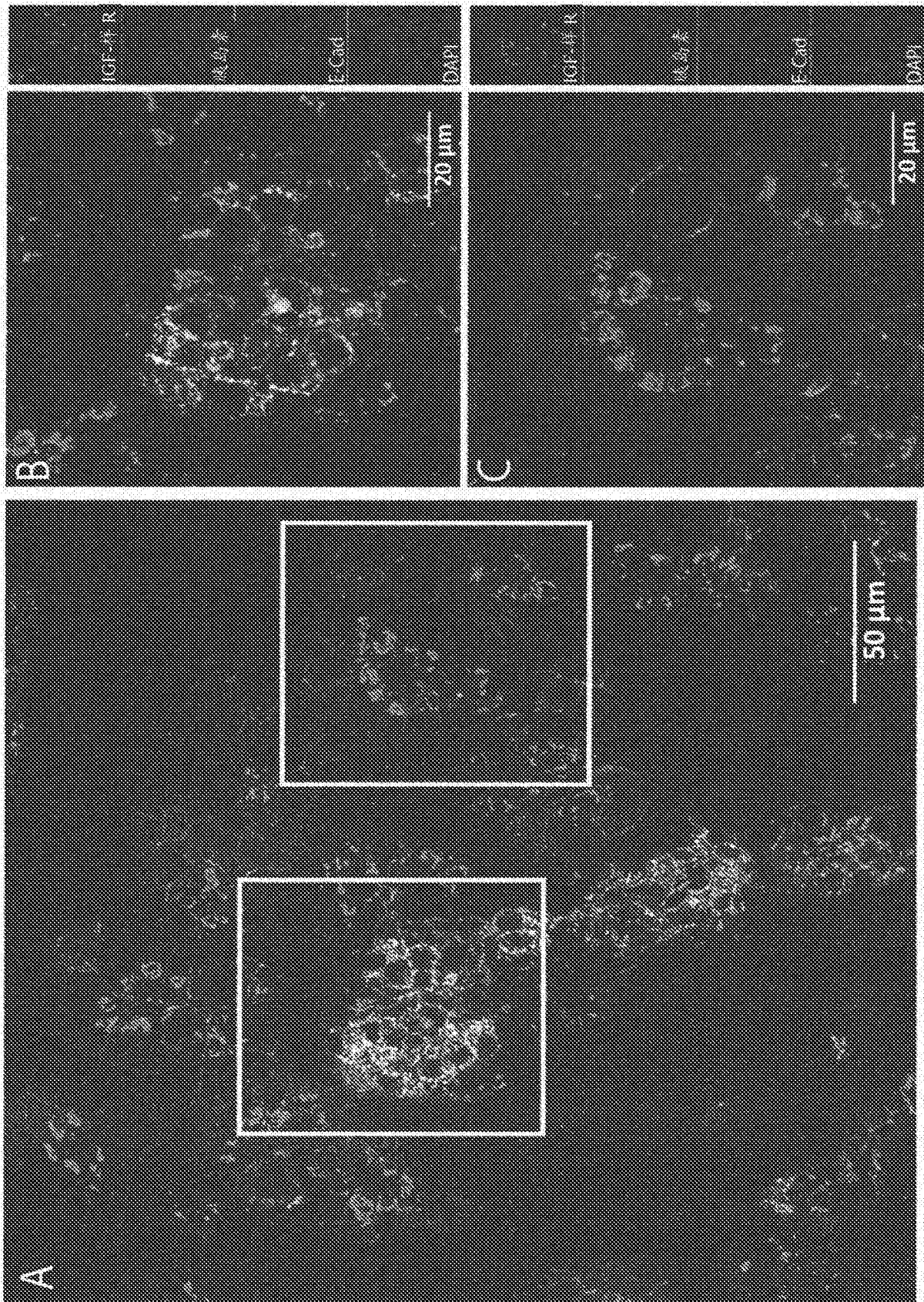


图9

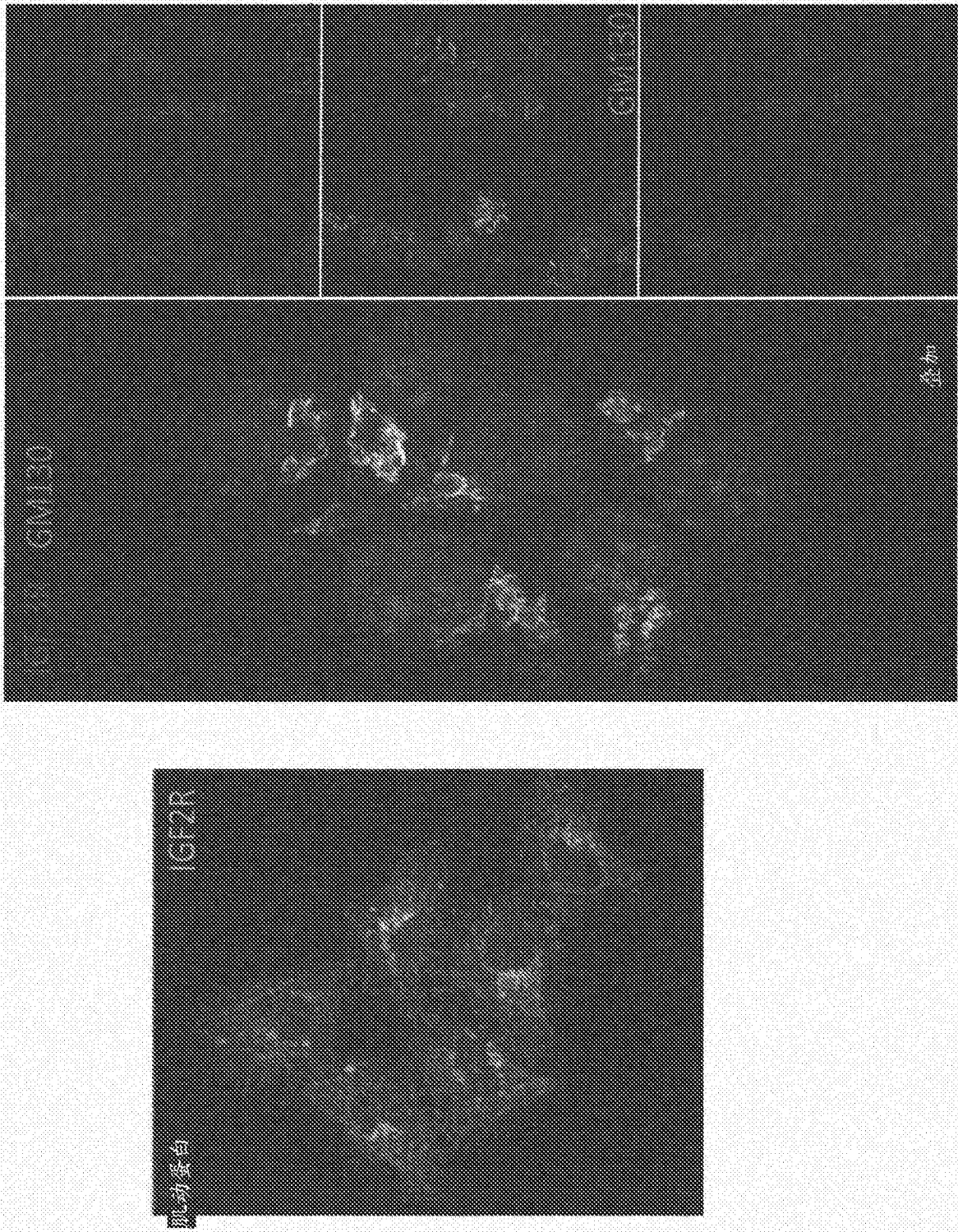


图10

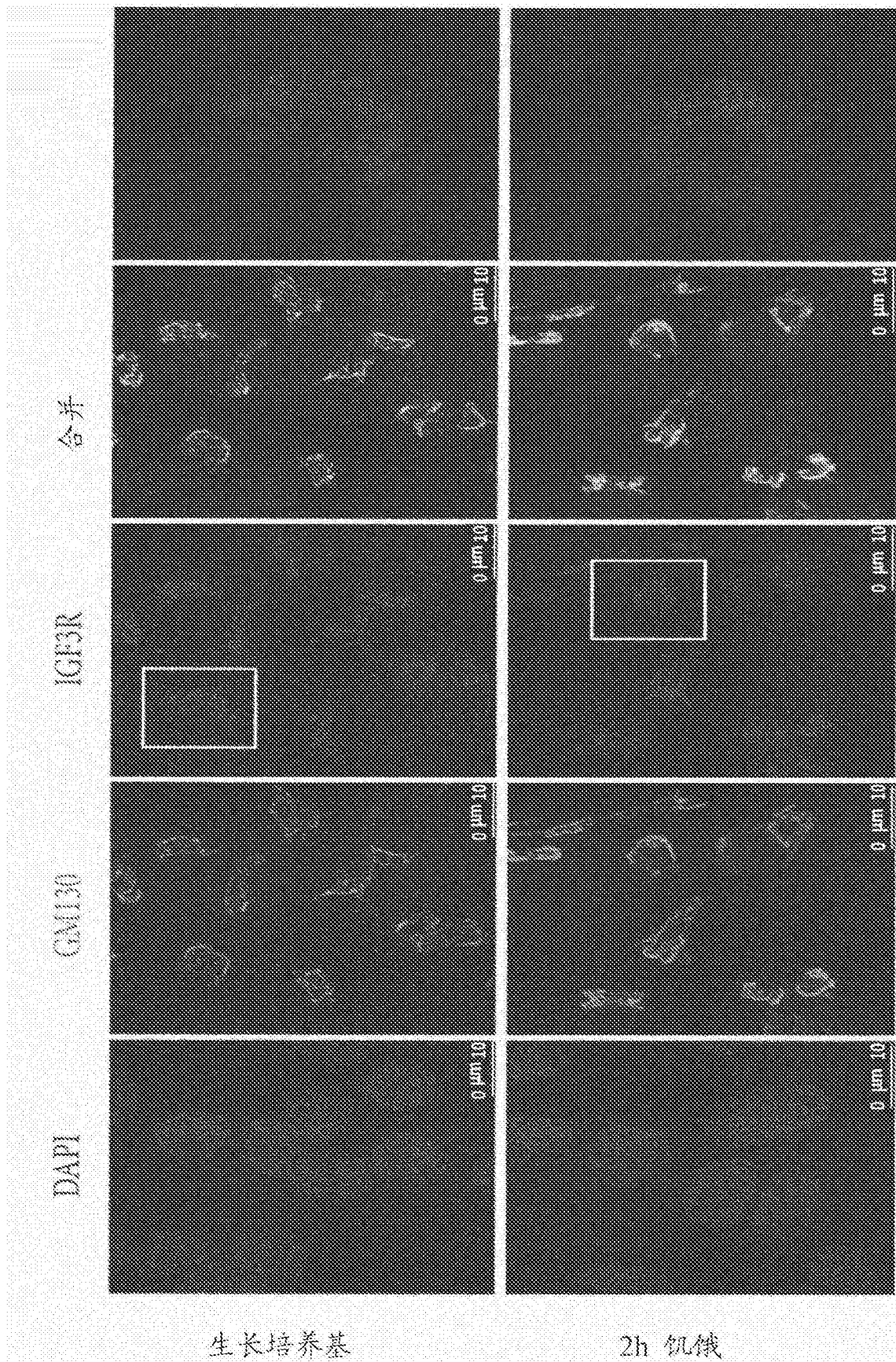


图11

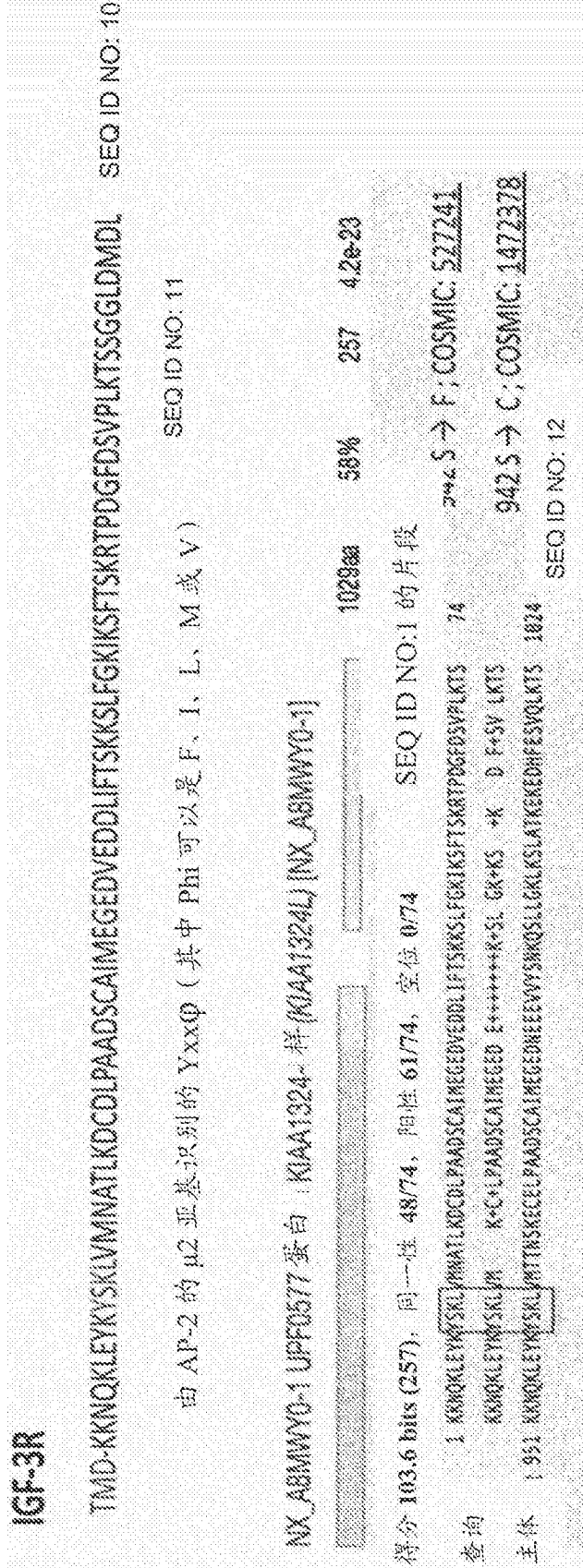


图12

饥饿条件下与 AP-2 相互作用

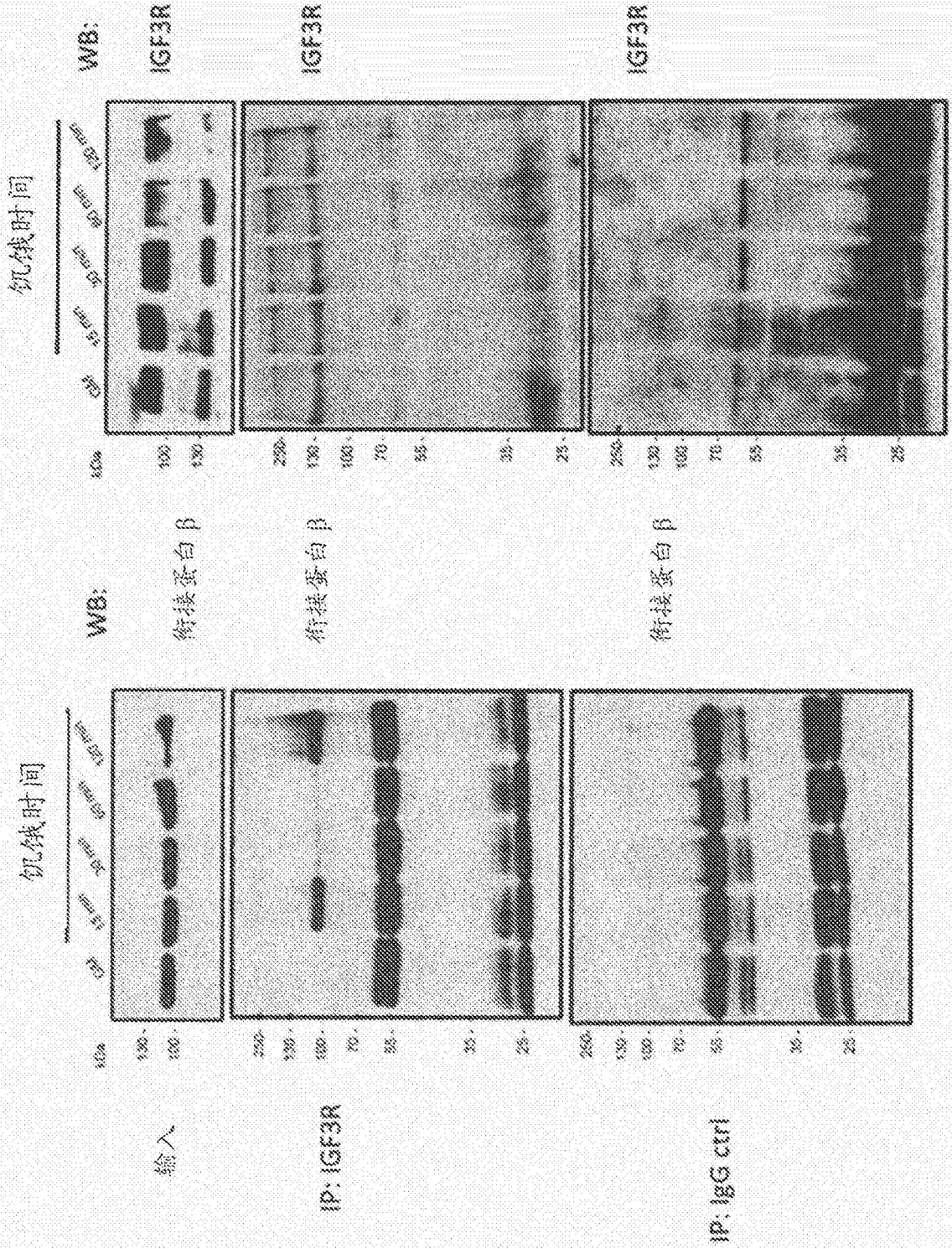


图13

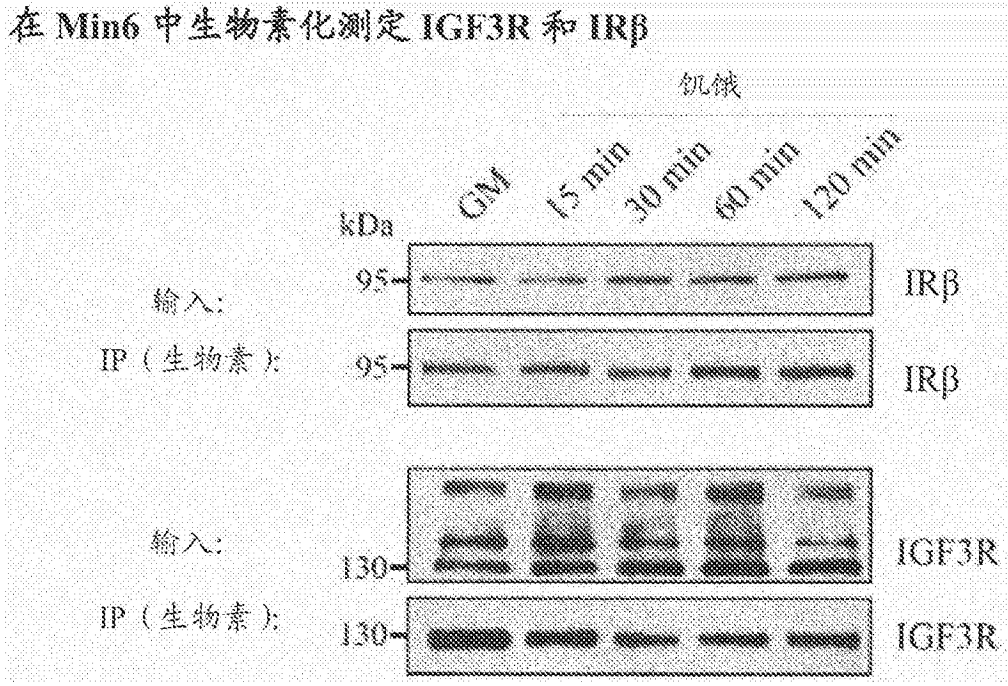


图14

Min6 细胞中 IGF3R 基因敲低

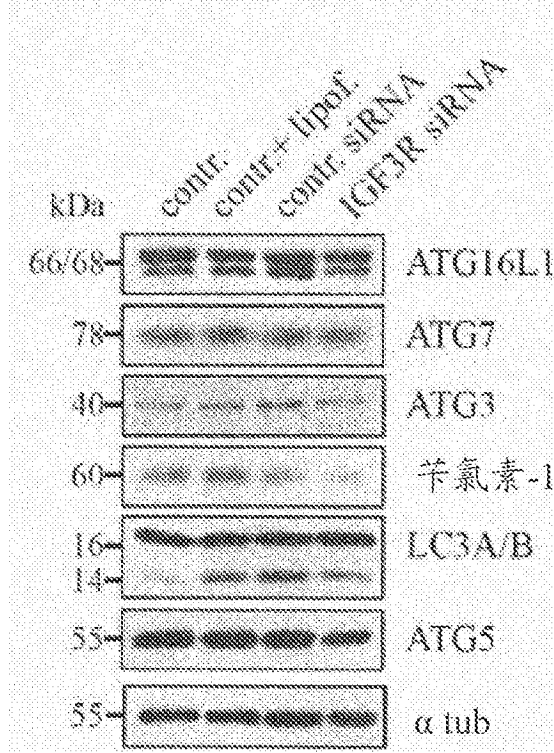


图15

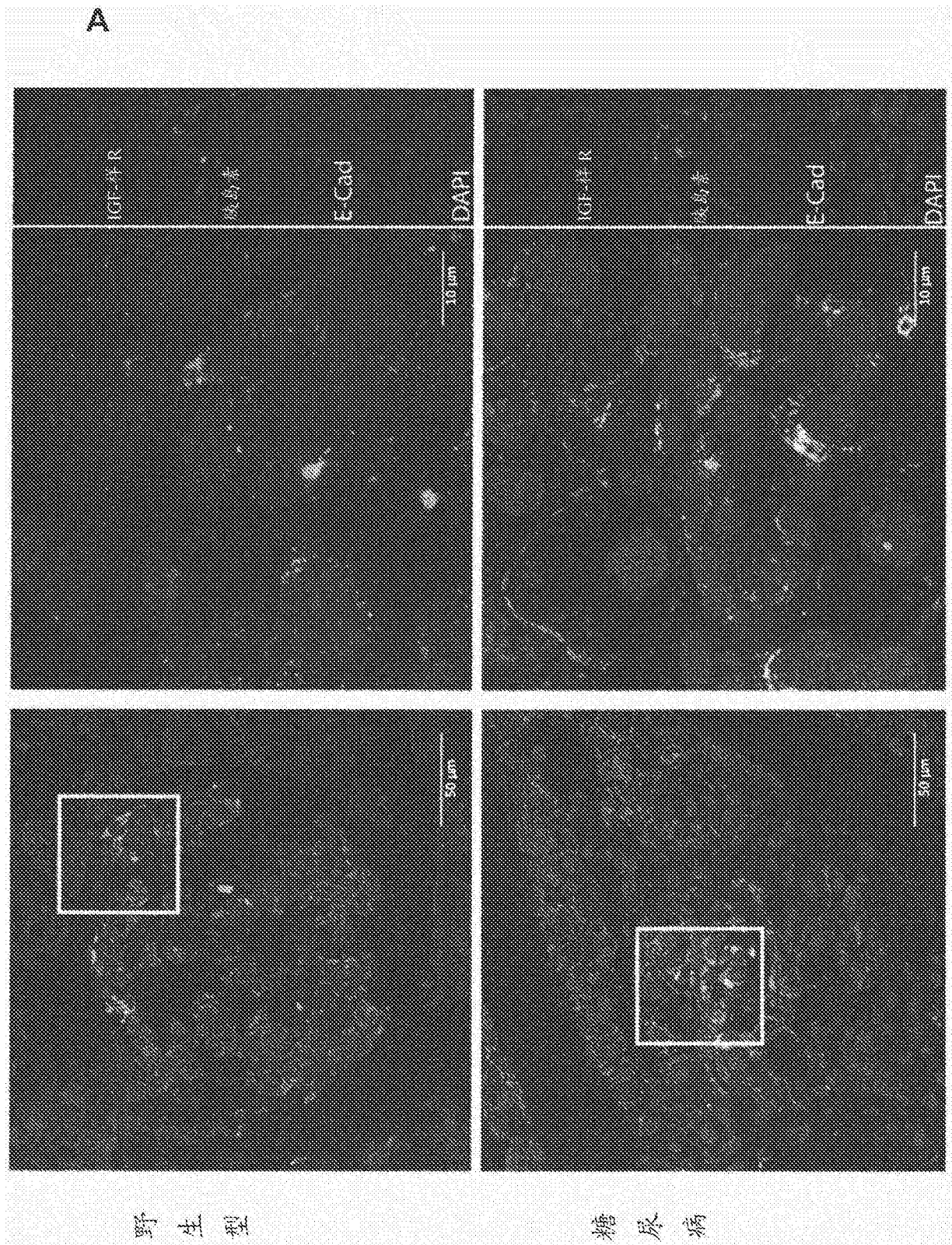


图16

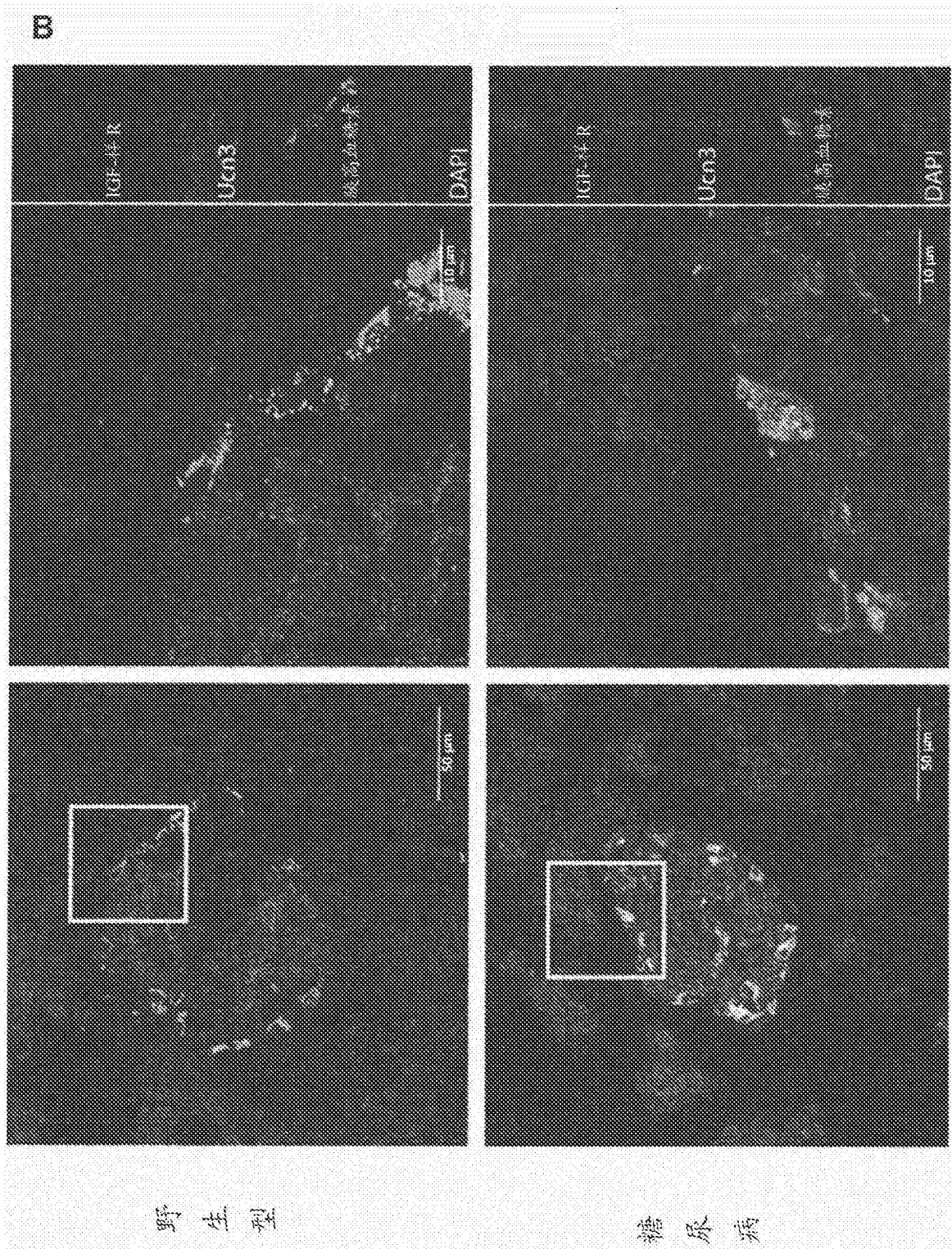


图16 (续)

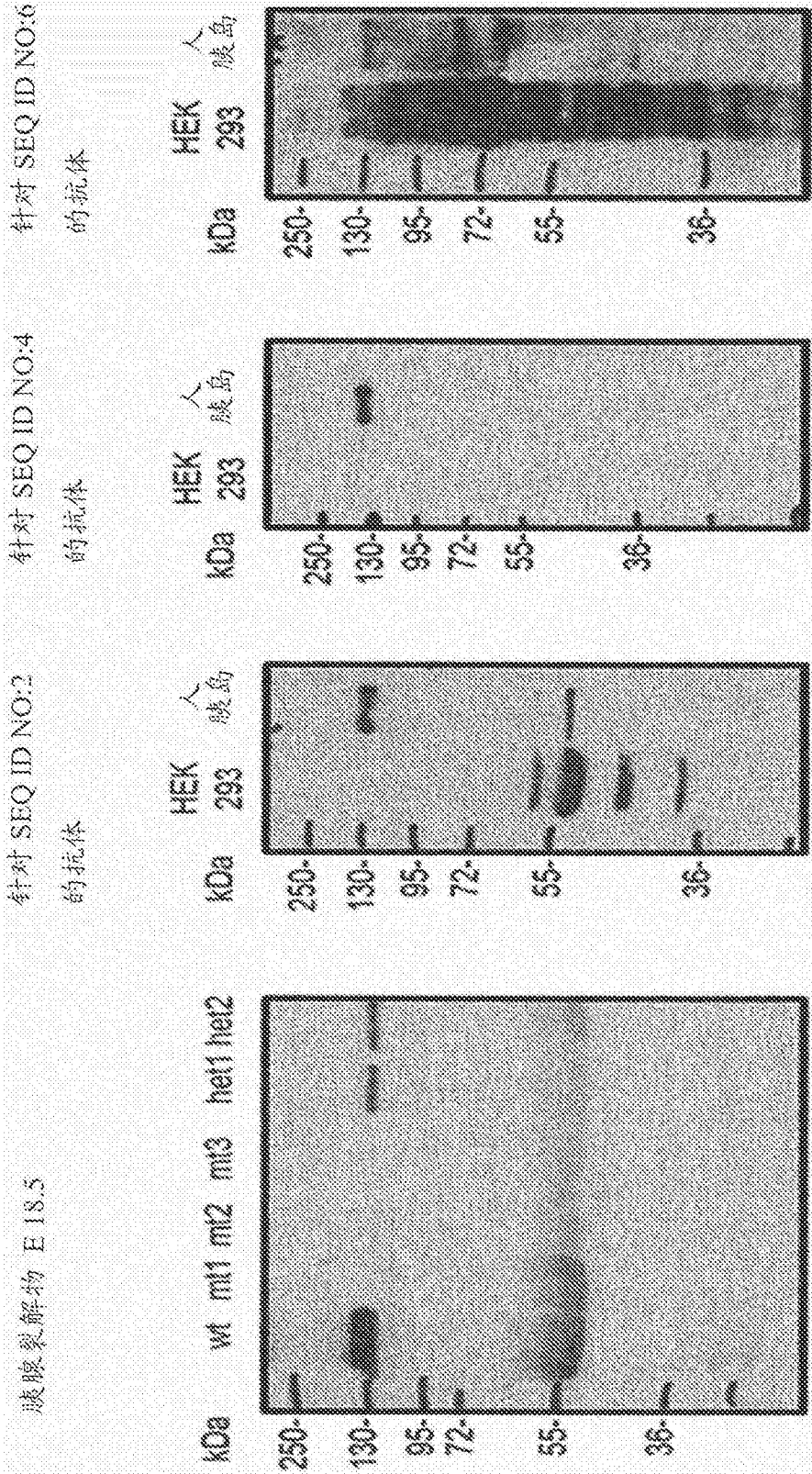


图17

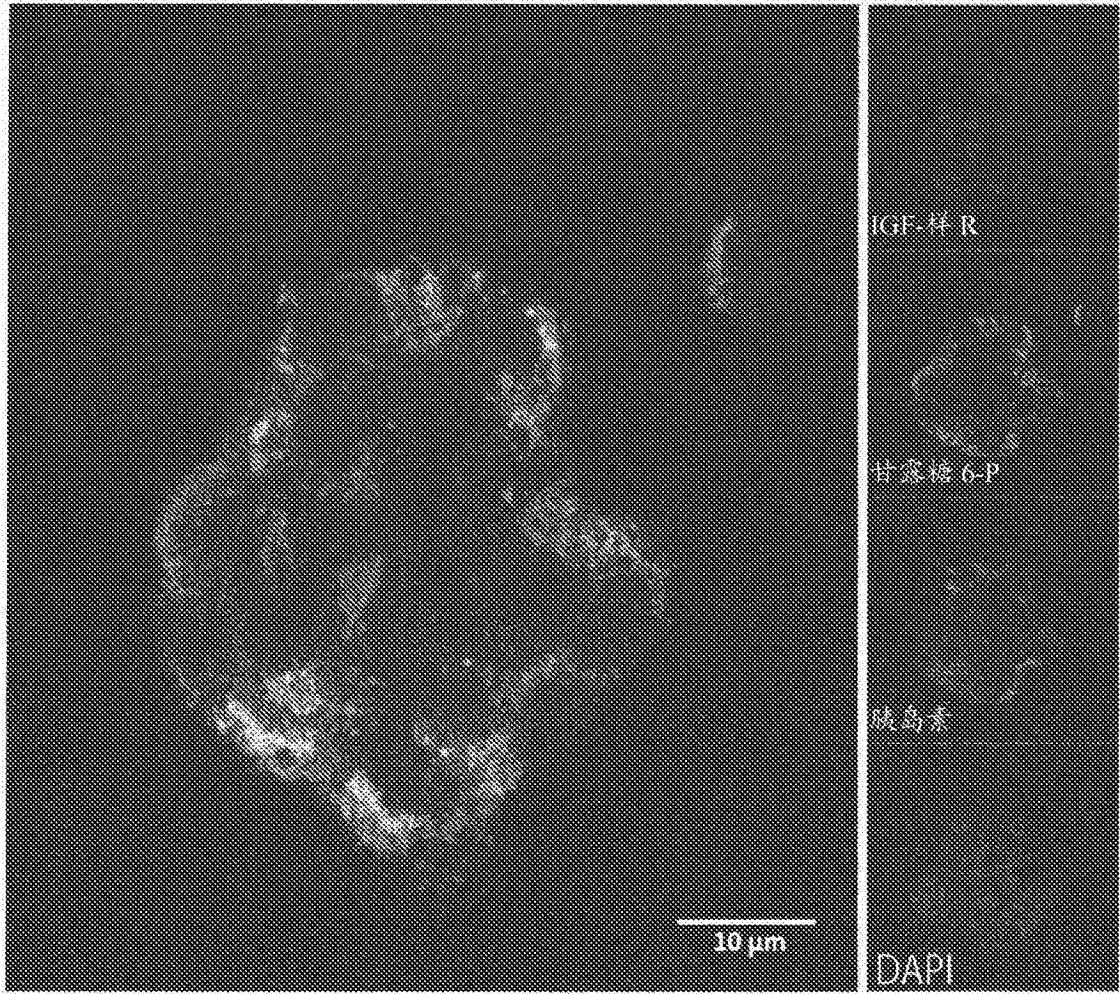


图18

A

识别符	基因上的位置	长度	编码	
			Iso 1 ENST00000389939	Iso 3 ENST00000529753
ENSE00002163328	323 - 658	336	Met 1 - Glu 51	
ENSE00002142416	477 - 658	182		Met 1 - Glu 51
ENSE00003470284	48216 - 48336	121	Ser 52 - Ser 92	Ser 52 - Ser 92
ENSE00003686523	50821 - 51013	193	Ser 92 - Ser 156	Ser 92 - Ser 156
ENSE00003539220	58188 - 58335	148	Ser 156 - Phe 205	Ser 156 - Phe 205
ENSE00003644627	58810 - 58890	81	Val 206 - Ser 232	Val 206 - Ser 232
ENSE00001665257	59796 - 59879	84		Val 233 - Leu 260
ENSE00003585024	59796 - 59901	106	Val 233 - Gly 268	
ENSE00003687030	60010 - 60159	150	Gly 268 - Glu 318	
ENSE00003491577	71367 - 71455	89	Glu 318 - Glu 347	
ENSE00003581990	74499 - 74676	178	Thr 348 - Asp 407	Thr 261 - Asp 320
ENSE00003585444	75388 - 75516	129	Asp 407 - Gly 450	Asp 320 - Gly 363
ENSE00003567810	75914 - 76004	91	Gly 450 - Arg 480	Gly 363 - Arg 393
ENSE00003505690	77688 - 77793	106	Arg 480 - Val 515	Arg 393 - Val 428
ENSE00003605994	78048 - 78185	138	Gly 516 - Ala 561	Gly 429 - Ala 474
ENSE00003603237	78933 - 79196	264	Ser 562 - Lys 649	Ser 475 - Lys 562
ENSE00003468515	80743 - 80916	174	Ile 656 - Gln 707	Ile 563 - Gln 620
ENSE00003538222	83796 - 83976	181	Gly 708 - Gly 768	Gly 621 - Gly 681
ENSE00003469577	84301 - 84397	97	Gly 768 - Arg 800	Gly 681 - Arg 713
ENSE00003558615	84885 - 84986	102	Arg 800 - Gly 834	Arg 713 - Gly 747
ENSE00003628838	86176 - 86302	127	Gly 834 - Gln 878	Gly 747 - Gln 789
ENSE00003467882	86381 - 86559	179	Lys 877 - Lys 936	Lys 790 - Lys 849
ENSE00003650058	87057 - 87222	166	Lys 936 - Lys 991	Lys 849 - Lys 904
ENSE00002151239	89266 - 89427	162		Arg 905 - Leu 926
ENSE00001451285	89266 - 89551	286	Arg 992 - Leu 1013	

图19

B

同种型 iso 1 1013 aa, 质量: 111382 Da, pI 6.13

查看 FASTA BLAST 序列 BLAST 选择

```

1 MAEPGNHSHL SARVRCRTER RIRPLWRLLL WAGTAFQVTO GTGPELNACK
51 ESEYHNEYTA CDSTGSRWRV AVPHTPGLCT SLFDPIKQTE CSFSCNAGEF
101 LDMKQDSCKP CAEGRYSLGT GIRFDEWDEL PHGFASLSAN MELDSSAAES
151 TGNCYSSKQV PRGDYIASNT DECTATLMYA VNLKQSGTVN FEYYYYPDSSI
201 IFEPVQNDQ CQPNADDSRW MKTTEKQWEP HVELNRCNN VLYWRITAFS
251 VWTKPKPVL VRNIAITGVA YTSECFPCPKP GTYADKQSS FCKLCPANSY
301 SNKGETSCHQ CDPDKYSEKG SSSCNVRFAC TDKDYFYTHF ACDANGETQL
351 MYKWKPKIC SEDLEGAVKL PASQVETHCP PCNPGEFKTH NSTCPCPYG
401 SYNSGSDCTR CPAGTEPAVG FEYKWNWTLT TNMETTVLSG INFEYKGMTG
451 WEVAGDHIYT AAGASDNDPM ILTLVVPGFR PPQSVHADTE NKEVARITPV
501 FETLQSVNCE LYFMVGVNSR TNPVETWKG SRGKQSYTYI IEENTTTSTF
551 WAFQSTTFHE ASRKYTNDVA KIYSINVTNV HNGVASYCRP CALEASDVGS
601 SCTSPAGYY IDRDSGTCHS CPANTILKAR QFYGVQACVP CGPQTKNNKI
651 HSLCNDCTF SRNTPTRTPN YMSALANTV TLAGGPSFTS KGLKYPHHFT
701 ESLCNDGGRK HNVCTONVTS LRVEGSGF SKSITAYVCO AVIIPPEVTG
751 YKAGVSSQPV SLADRLIGVT TDHTLDGITS PAELFHLESL GIPDVIFFYR
801 SNDVQSCSS GRSTTIRVRC SPKTVPGSL LLPGTCSDGT CDGCNPHFLW
851 ESAA CPLCS VADYHAIVSS CVGIQKTTY VWREPCLCSG GISLPEQRVT
901 ICKTDFWLK VGISAGTCTA ILTVLTCYF WKKKQKLEYK YSKLVNNATL
951 KDCDPAADS CAINEGEDVE DDLIFTSKKS LFGKIKSFTS KRTPDGFDV
1001 PLKTSGGQLD MDL

```

↑
A=0.2600/1302
(L → P) rs1052878; T=0.1096/549
(H → Y) rs74920406; T=0.0112/56

胰岛素受体(289-625); EGF 受体(246-679); 甘露糖- & 磷酸结构域(656-857);
TM (911-931); 细胞质 (932-1013)

图19(续)

基因总结

(示出经典转录物的覆盖率; ENST00000369939)

平均覆盖率 64.34

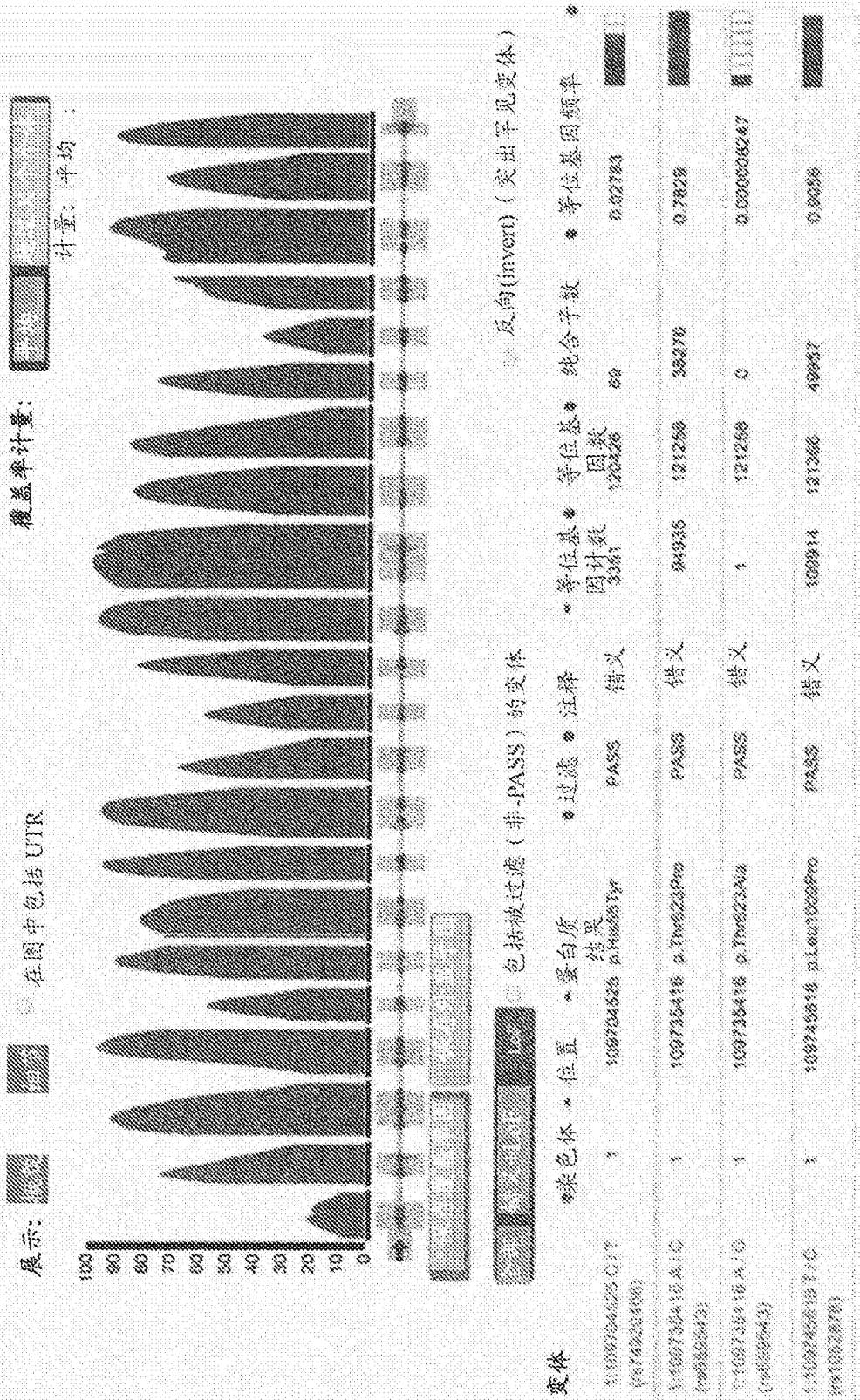


图19 (续)

表. KIAA1324 标记的 SNP 与胰岛素敏感性的关联 (N_{OGTT}=2,223; N_{clamp}=502)

基因型	N OGTT	胰岛素, 禁食的 (mmol/L)	HOMA-IR (10 ⁻⁶ mol ² U ⁻² L ⁻²)	ISI, OGTT (10 ⁻⁴ L ² mol ⁻¹ min ⁻¹)	N Clamp	ISI, Clamp (10 ⁻⁴ L ² kg ⁻¹ min ⁻¹)
Rs74820406	2,038	81.6 ± 72.2	3.21 ± 3.07	13.7 ± 9.0	460	0.088 ± 0.052
CT	182	75.8 ± 59.2	2.97 ± 2.48	12.7 ± 8.1	42	0.082 ± 0.059
TT	3	72.3 ± 16.3	2.75 ± 0.77	11.8 ± 6.0	.	.
P _{关联}	.	0.7	0.7	0.5	.	0.5
P _{性别交互}	.	0.4	0.5	0.5	.	.
Rs659543	1,267	80.5 ± 70.8	3.17 ± 2.97	13.7 ± 9.7	286	0.087 ± 0.052
GT	828	81.9 ± 73.1	3.22 ± 3.17	13.7 ± 9.9	184	0.086 ± 0.055
TT	128	80.2 ± 61.8	3.12 ± 2.53	12.3 ± 7.5	22	0.073 ± 0.037
P _{关联}	.	0.0292	0.0384	0.06	.	0.6
P _{性别交互}	.	0.5	0.6	0.8	.	.
Rs1052678	1,793	80.6 ± 69.6	3.17 ± 2.95	13.7 ± 9.6	402	0.088 ± 0.052
CT	408	83.0 ± 78.0	3.27 ± 3.36	13.6 ± 9.9	96	0.084 ± 0.053
TT	22	83.0 ± 65.3	3.20 ± 2.53	13.3 ± 8.7	4	0.104 ± 0.065
P _{关联}	.	0.8	0.9	0.9	.	0.9
P _{性别交互}	.	0.1	0.2	0.2	.	.

以未调整的原始数据示出代谢数据 (平均 ± SD)。通过采用性别、年龄和 BMI 作为相关变量的多元线性回归分析 (标准最小二乘法) 测试 SNP 基因型与胰岛素敏感性之间的关联。对于 SNP-性别交互分析, 通过采用年龄和 BMI 作为相关变量的多元线性回归分析测试对胰岛素敏感性的交叉作用。P_{关联}—SNP 与胰岛素敏感性之间的关联的 p 值 (加性遗传模型); P_{性别交互}—SNP 与性别之间对胰岛素敏感性的交互作用的 p 值。采用粗体标记称关联 (p < 0.05)。采用粗体和下划线标记显著性关联 (对 3 个 SNP 经 Bonferroni 校正后 p < 0.0170)。BMI—体重指数; HOMA-IR—胰岛素抗性的稳态模型评估; ISI—胰岛素敏感性指数; OGTT—口服葡萄糖耐量试验; SNP—单核苷酸多态性

图 20

表. KIAA1324 标记的 SNP 与脂肪因子和炎症特征的关联 (N_{Leukos}/CRP=2,198; N_{脂因子}=470; N_{脂因子}=1,304)

B

基因型	N Leukos/CRP	白细胞 (μL)	CRP (mg/dL)	N 脂因子	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	N 脂因子	瘦素 (ng/mL)	脂联素 (μg/mL)
Rs74920406	2,020	6,650 ± 1,942	0.397 ± 0.547	431	0.871 ± 0.817	2.91 ± 5.58	1,193	28.8 ± 33.3	14.4 ± 7.5
	175	6,474 ± 1,754	0.375 ± 0.466	38	0.804 ± 0.614	1.66 ± 1.78	110	33.9 ± 33.5	14.8 ± 7.3
TT	3	7,287 ± 2,454	0.715 ± 0.548	1	2.550	1.87	1	44.6	8.0
P _{交互}	-	0.6	0.7	-	0.5	0.07	-	0.0158	0.4
P _{遗传}	-	0.6	0.08	-	-	-	-	0.5	0.9
Rs658643	1,250	6,673 ± 1,936	0.407 ± 0.561	274	0.866 ± 0.821	2.96 ± 5.69	742	29.2 ± 32.7	14.5 ± 7.6
	821	6,562 ± 1,902	0.381 ± 0.523	167	0.786 ± 0.676	2.73 ± 5.28	485	29.3 ± 34.6	14.4 ± 7.4
TT	127	6,772 ± 2,012	0.374 ± 0.442	29	1.195 ± 1.190	2.02 ± 2.15	77	28.7 ± 31.7	14.4 ± 6.7
P _{交互}	-	0.6 (0.1, 0.06)	0.8	-	0.7	0.4	-	0.8 (0.2, 0.0293)	0.6
P _{遗传}	-	0.0181	0.4	-	-	-	-	0.0438	0.9
Rs1052878	1,767	6,626 ± 1,932	0.397 ± 0.553	377	0.860 ± 0.771	2.81 ± 5.52	1,045	28.6 ± 32.9	14.4 ± 7.5
	409	6,660 ± 1,903	0.390 ± 0.496	89	0.909 ± 0.934	2.82 ± 4.93	243	31.3 ± 35.1	14.4 ± 7.4
TT	22	7,111 ± 2,091	0.360 ± 0.377	4	0.943 ± 1.363	2.69 ± 2.85	16	34.4 ± 38.1	15.7 ± 7.9
P _{交互}	-	0.8	0.9	-	0.9	0.6	-	0.6	0.8
P _{遗传}	-	0.5	0.1	-	-	-	-	1.0	0.5

以未调整的原始数据示出数据 (平均 ± SD)。通过采用性别、年龄和 BMI 作为相关变量的多元线性回归分析 (标准最小二乘法) 测试 SNP 基因型与脂肪因子/炎症参数之间的关联。对于 SNP-性别交互分析, 通过采用年龄和 BMI 作为相关变量的多元线性回归分析测试脂肪因子/炎症参数的交互作用。P_{交互}-SNP 与脂肪因子/炎症参数之间的关联的 p 值 (加速遗传模型); P_{遗传}-SNP 与性别对脂肪因子/炎症参数之间的交互作用的 p 值。采用粗体标称关联 (p < 0.05)。采用粗体和下划线标称显著性关联 (对 3 个 SNP 经 Bonferroni 校正后 p < 0.0170)。BMI—体重指数; CPR—C 反应蛋白; IL—白细胞介素; MCP—单核细胞趋化蛋白; SNP—单核苷酸多态性; TNF—肿瘤坏死因子

图20 (续)

表. KIAA1324 标记的 SNP 与胰岛素原转化的关联 (N_{OGTT}=2,036)

	基因型	N OGTT	胰岛素原/胰岛素 餐食的	胰岛素原/胰岛素 X _{0min}	AUC _{0-30min} 胰岛素
Rs74920406	CC	1,861	0.100 ± 0.139	0.026 ± 0.028	0.041 ± 0.035
	CT	172	0.087 ± 0.098	0.021 ± 0.016	0.035 ± 0.026
	TT	3	0.097 ± 0.023	0.014 ± 0.011	0.021 ± 0.013
P 值	-	-	0.2	0.012	0.042
P 值交互	-	-	0.6	0.7	0.7
P _{DMI} 交互	-	-	0.8	0.5	0.5
P _{IS} 交互	-	-	0.9	0.5	0.4
P 值交互	-	-	0.3	0.3	0.2
Rs659243	GG	1,159	0.097 ± 0.133	0.026 ± 0.025	0.041 ± 0.035
	GT	758	0.101 ± 0.143	0.026 ± 0.031	0.039 ± 0.034
	TT	119	0.101 ± 0.112	0.026 ± 0.017	0.043 ± 0.033
P 值	-	-	0.3	0.5	0.6
P 值交互	-	-	0.2	0.4	0.2
P _{DMI} 交互	-	-	0.4	0.5	0.4
P _{IS} 交互	-	-	0.7	0.4	0.9
P 值交互	-	-	0.7	0.4	0.9
Rs1052878	CC	1,840	0.098 ± 0.136	0.025 ± 0.025	0.040 ± 0.034
	CT	375	0.100 ± 0.138	0.028 ± 0.034	0.043 ± 0.036
	TT	21	0.101 ± 0.089	0.022 ± 0.016	0.037 ± 0.027
P 值	-	-	0.4 (P=0.7, I=0.0262)	0.3	0.1 (P=0.9, I=0.0103)
P 值交互	-	-	0.000	0.06	0.063
P _{DMI} 交互	-	-	0.8	0.3	0.3
P _{IS} 交互	-	-	0.4	0.4	0.5
P 值交互	-	-	0.7	0.2	0.4

图 20 (续)

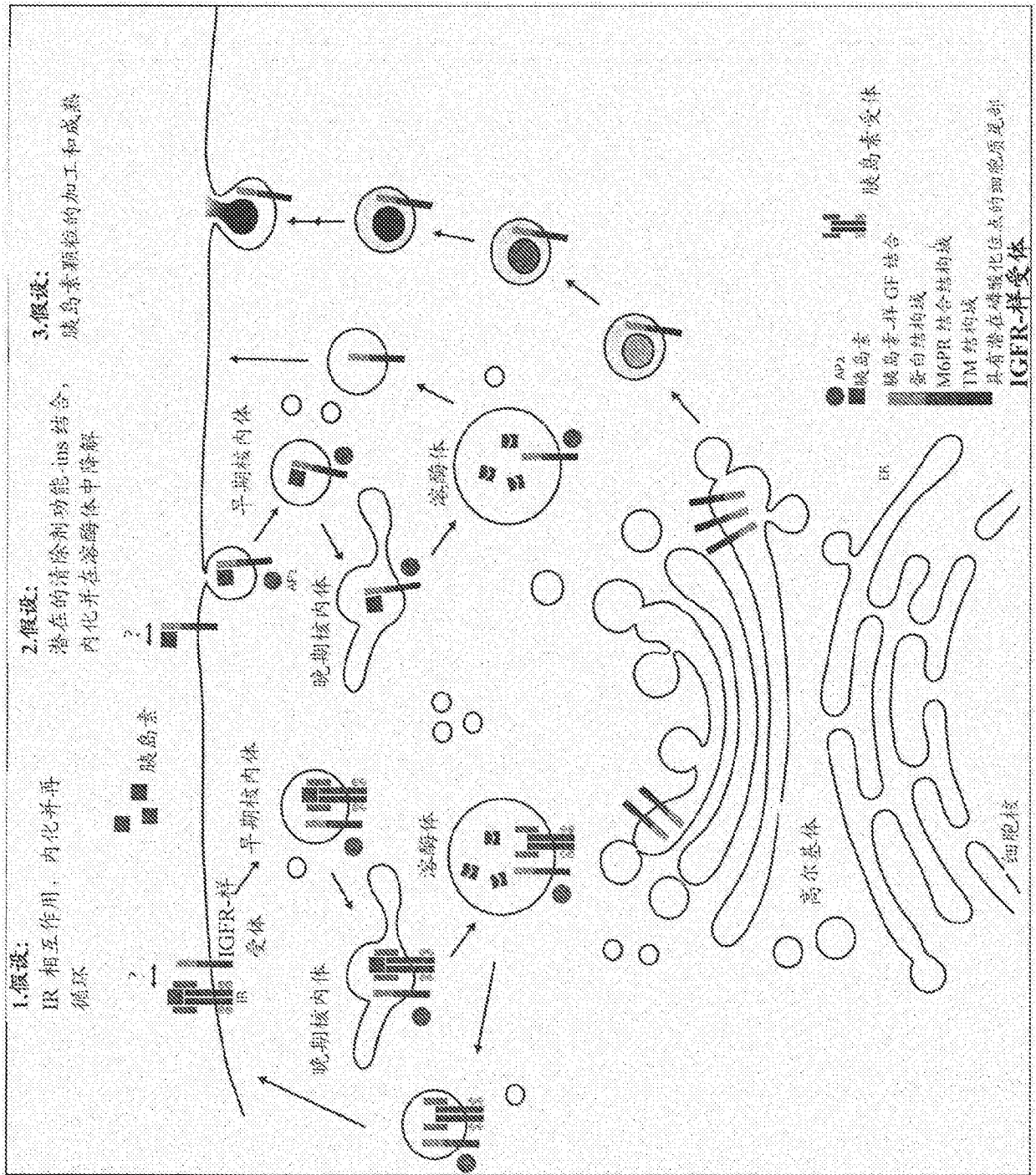


图21

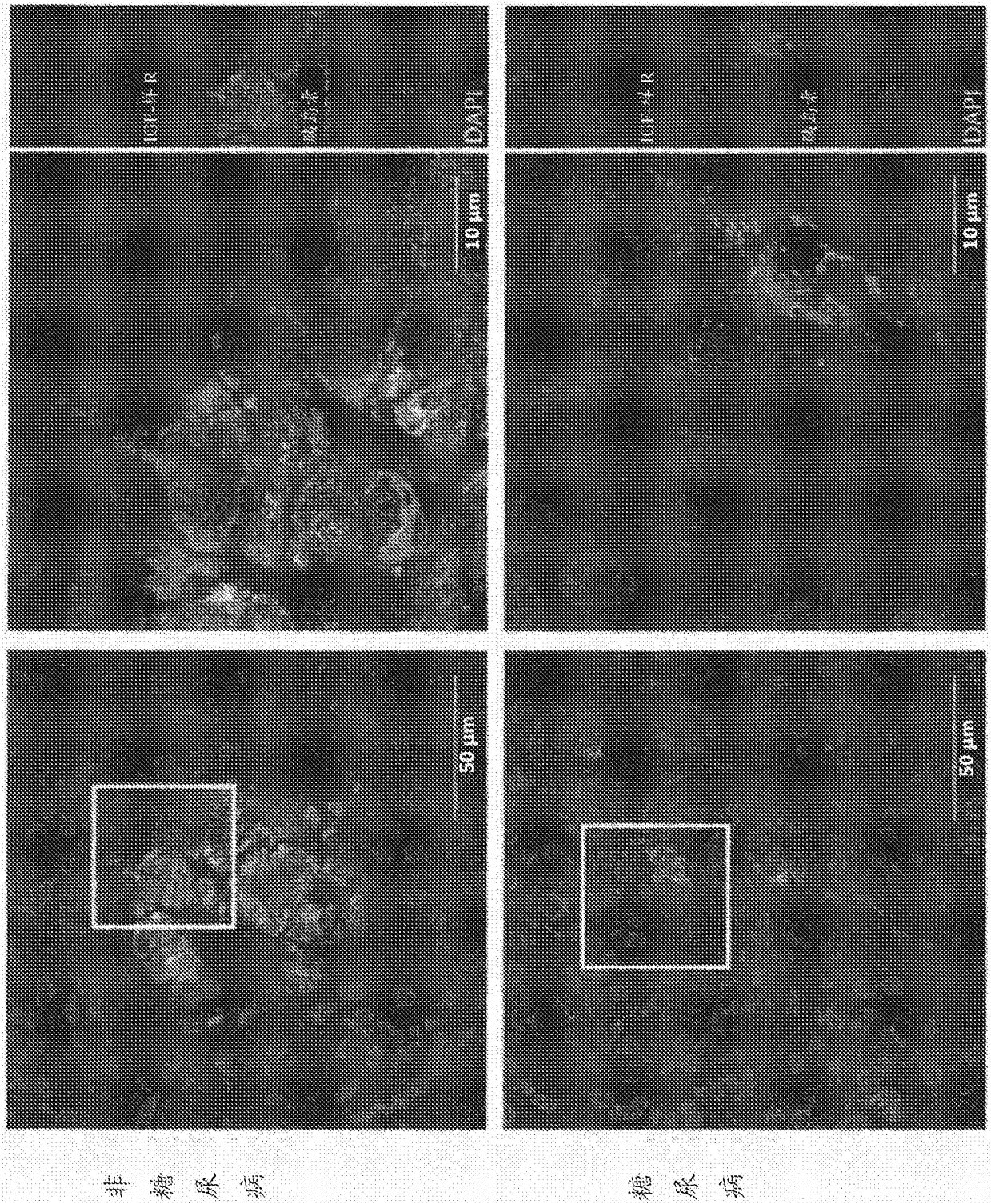


图22

产生IGFR-1基因敲除和基因敲入 Venus 融合物的策略

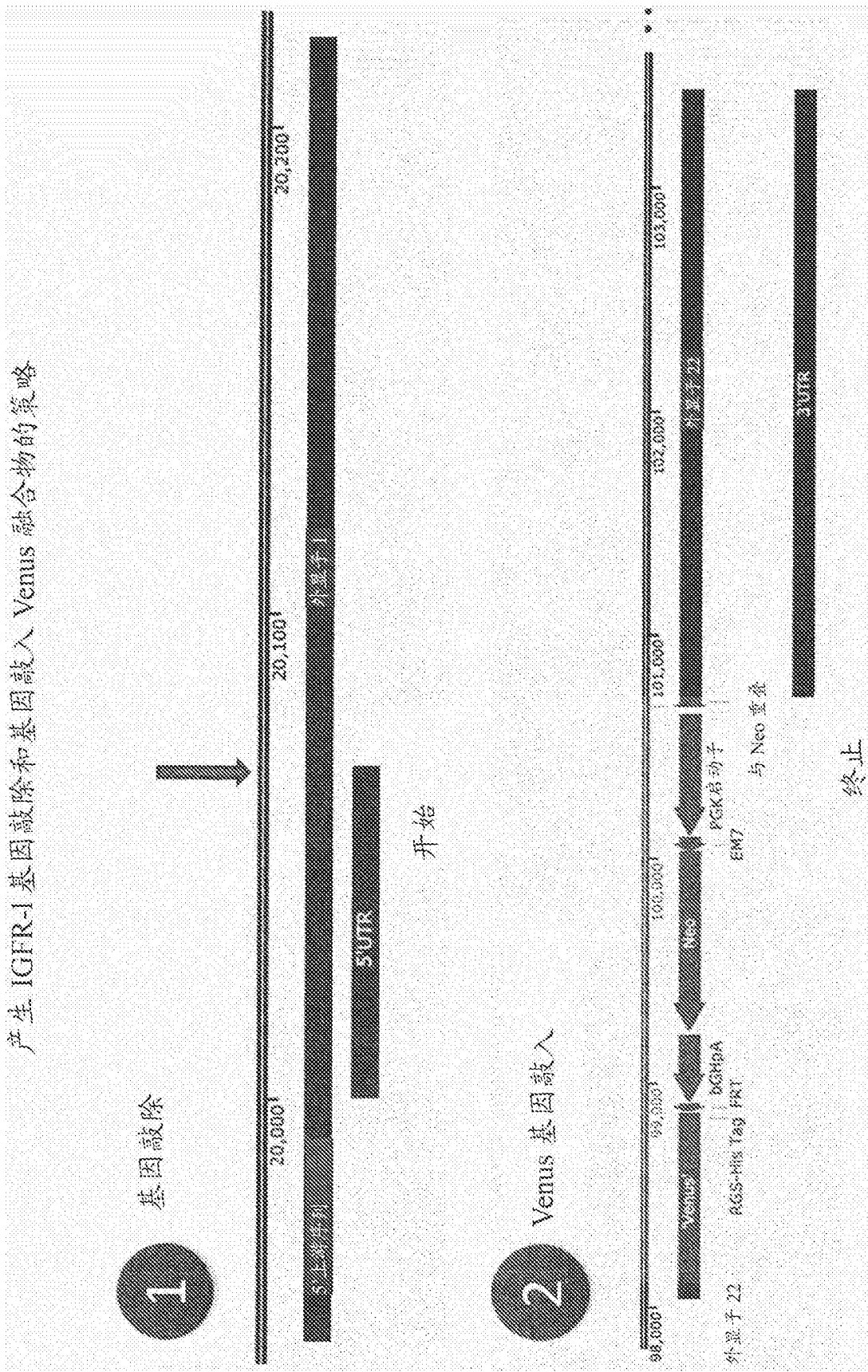


图23

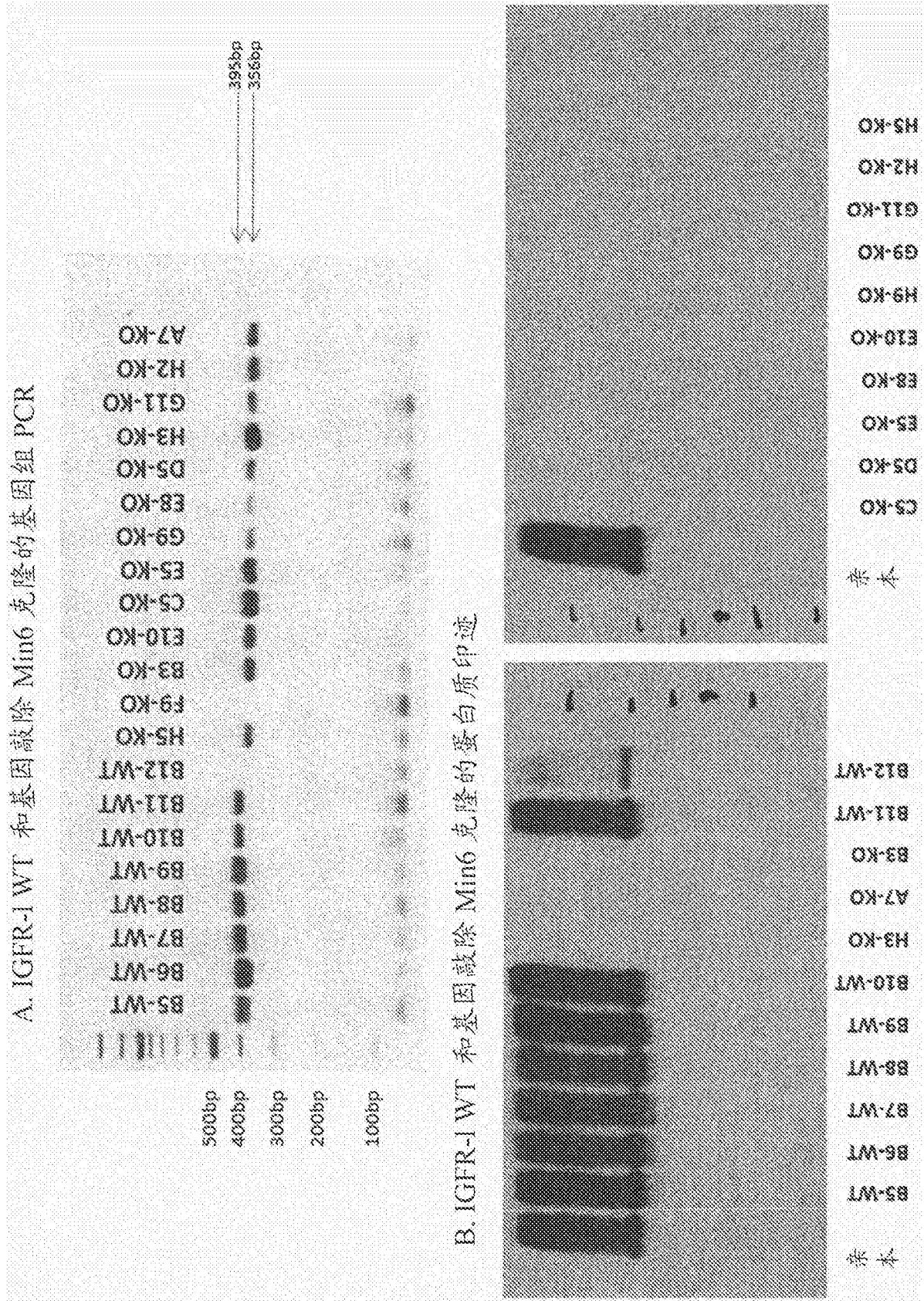


图25

在生长培养基中 Min6 IGFR-1 (C22Rik) 基因敲除显示 AMPK 和胰岛素受体活化增加

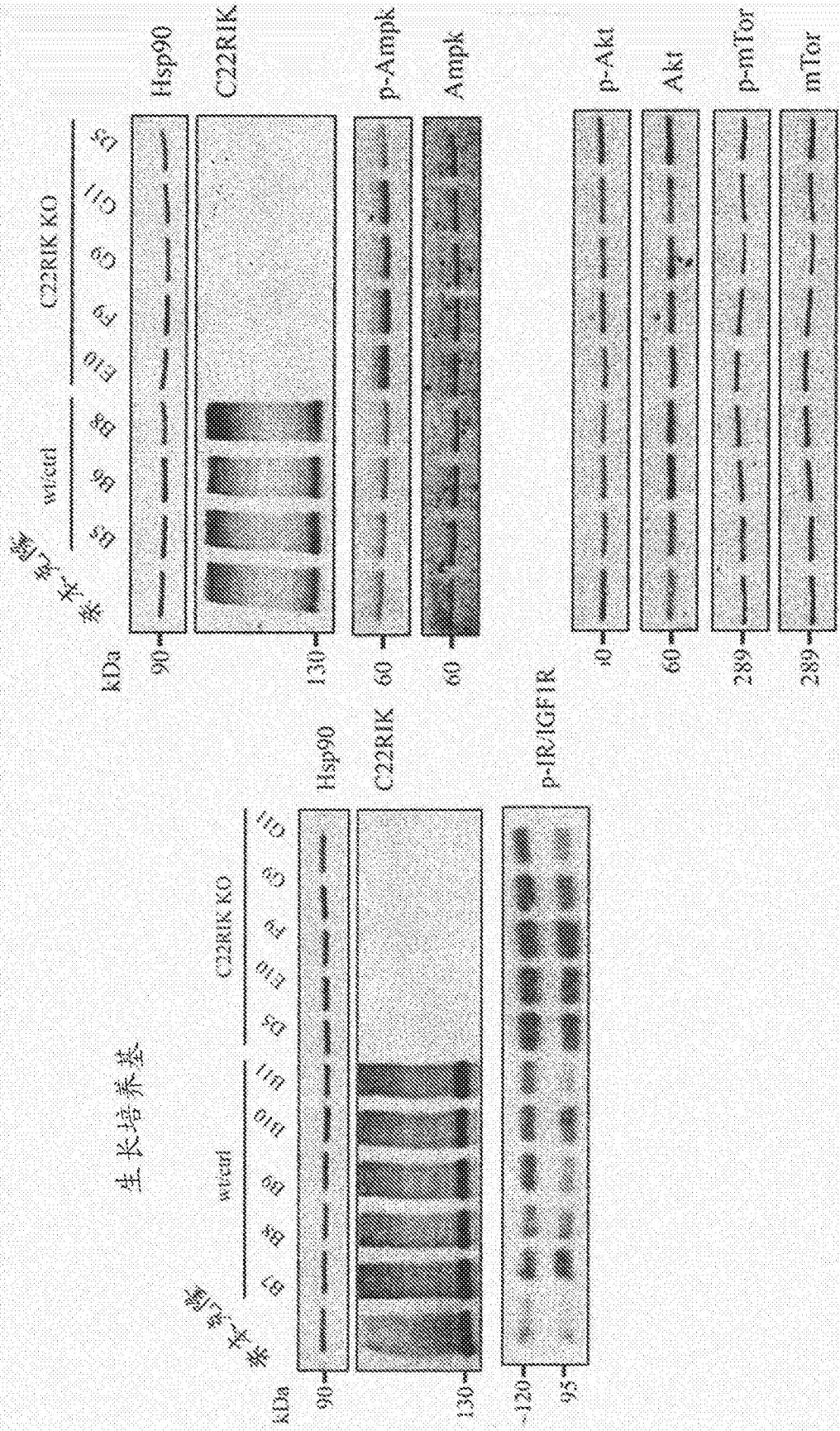


图26

IGFR-I-Venus 融合物基因敲入 Min6 细胞系

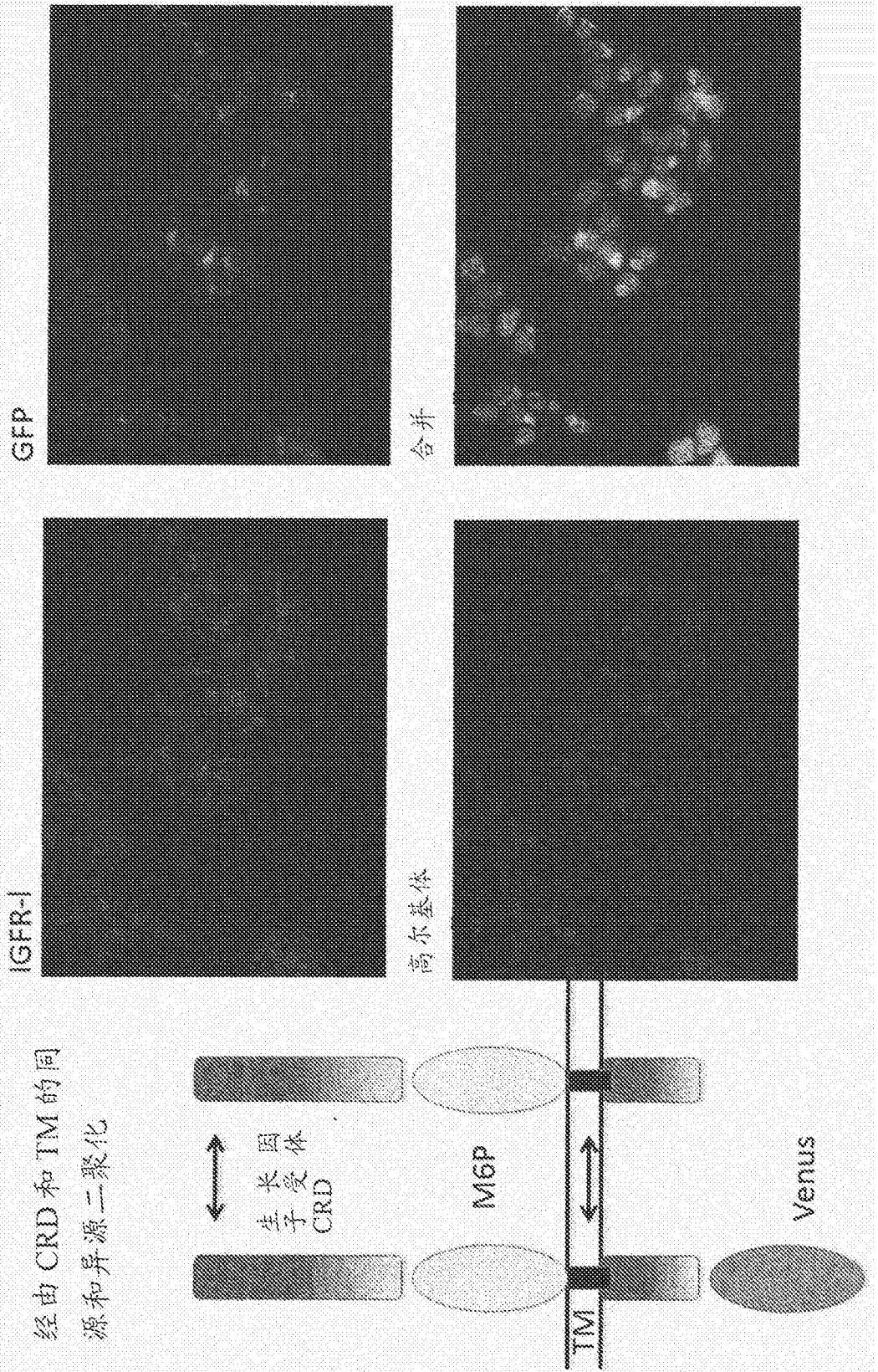


图27

在自诱导的多能干细胞(iPSC)分化的PDX1⁺ / NKX6.1⁺内分泌祖细胞中IGFR-1强烈上调。

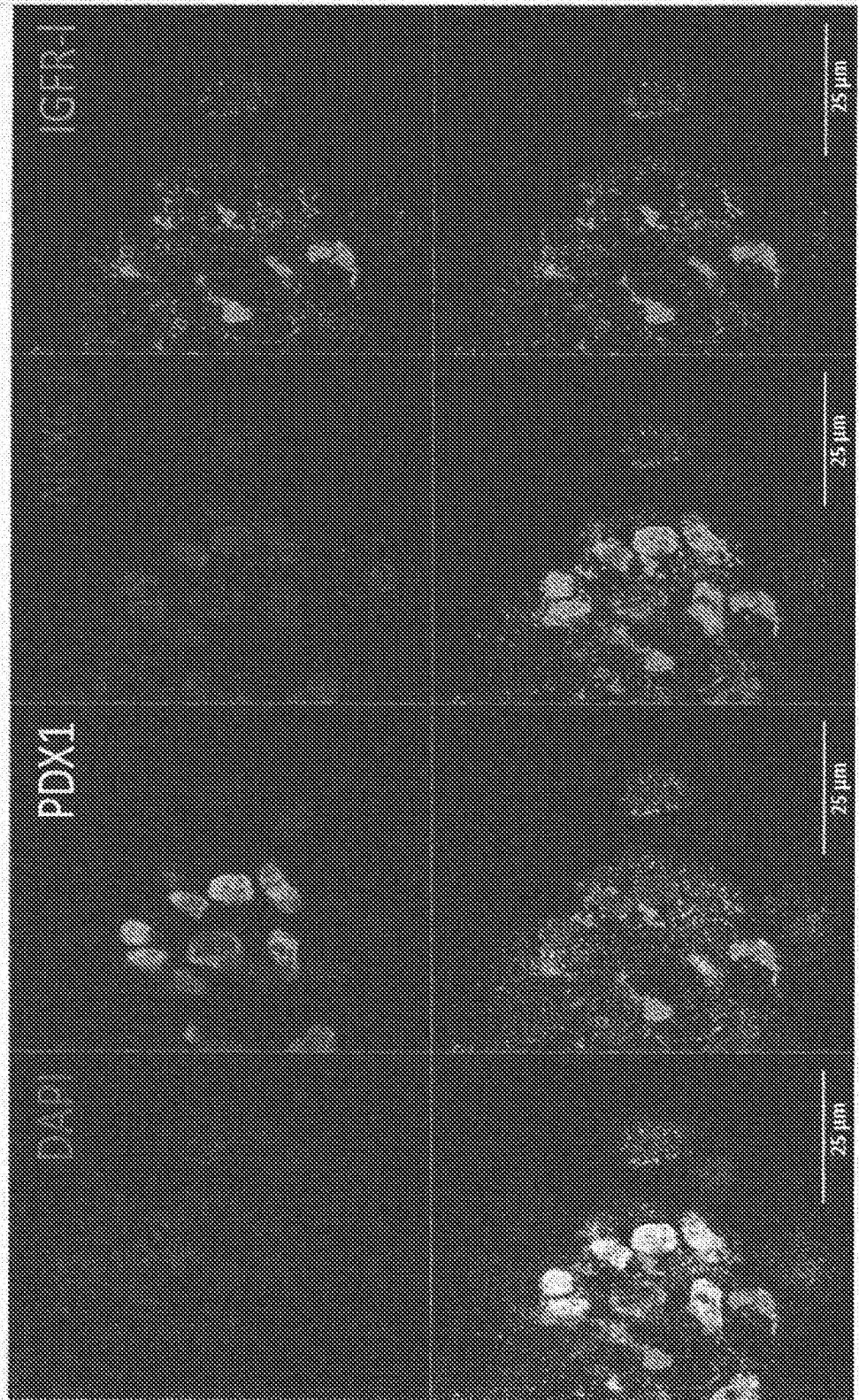
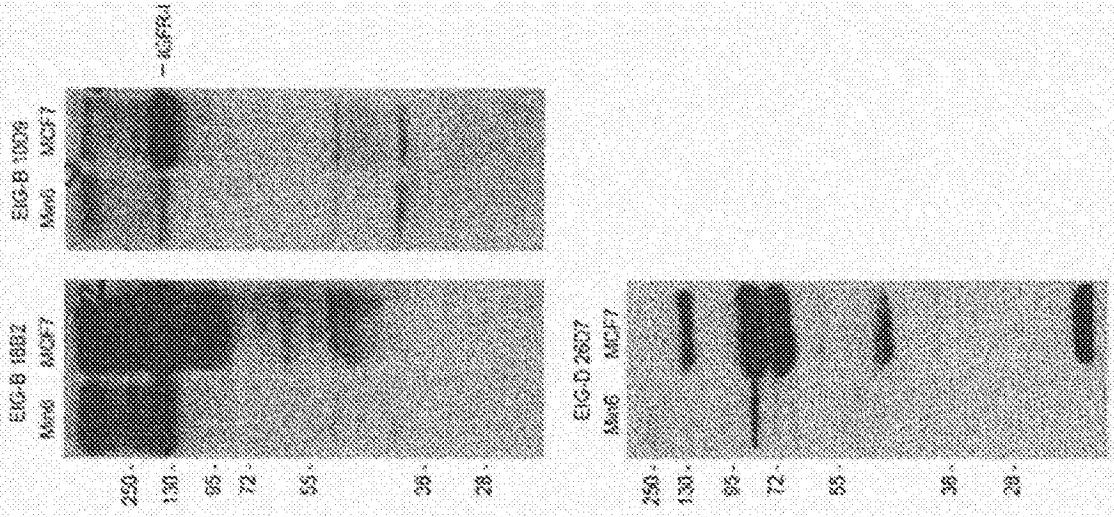


图28

用于蛋白质印迹的针对IGF1R胞外域的肽B和肽D的大鼠和小鼠抗体



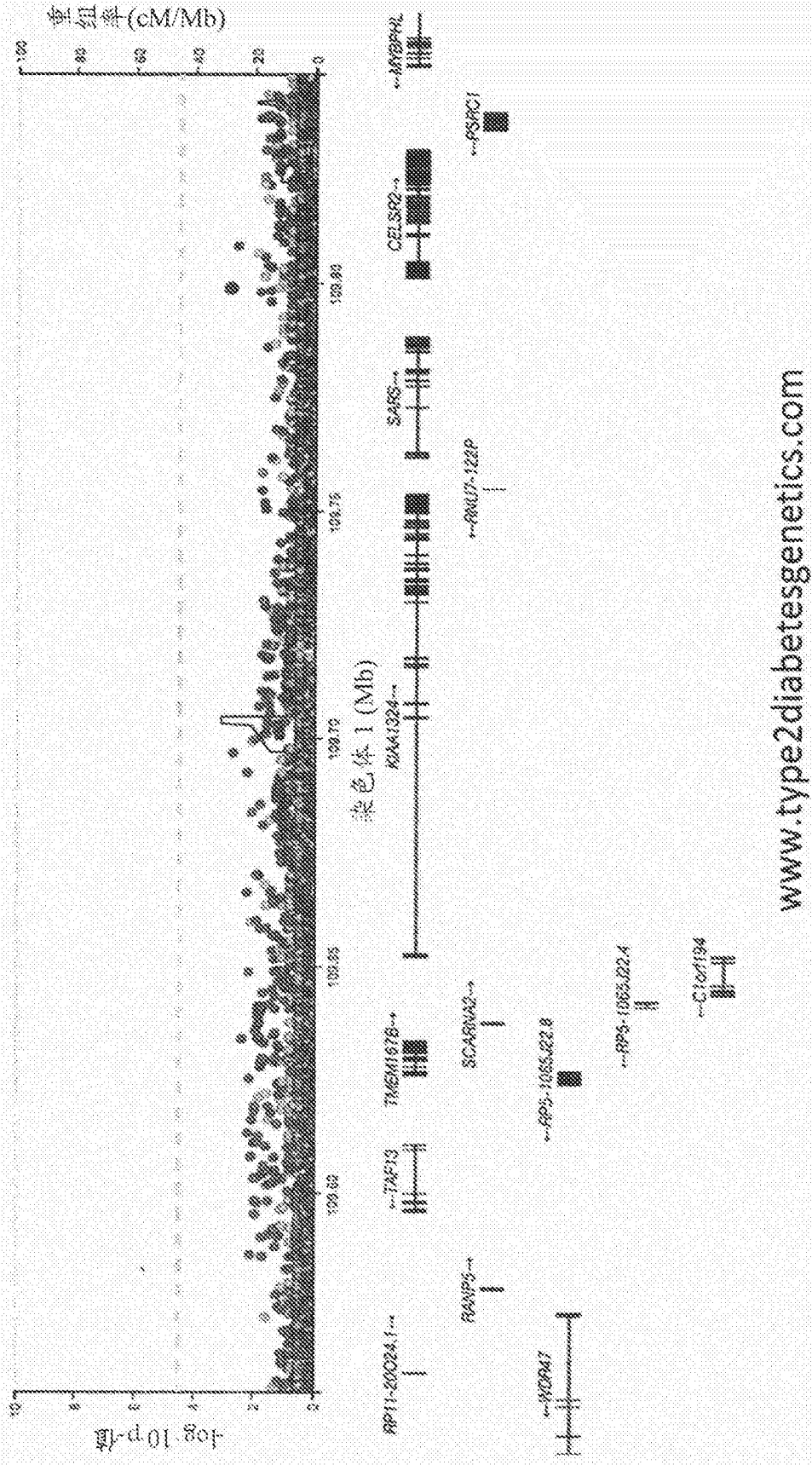
EIG-B 克隆是大鼠

EIG-D 克隆是小鼠

图29

GWAS 元研究中 IGFR-1 SNP 与冠状动脉疾病、LDL 胆固醇和 2 型糖尿病高度相关。

2 型糖尿病



www.type2diabetesgenetics.com

图30

GWAS 元研究中 IGF1R1 SNP 与冠状动脉疾病、LDL 胆固醇和 2 型糖尿病高度相关。

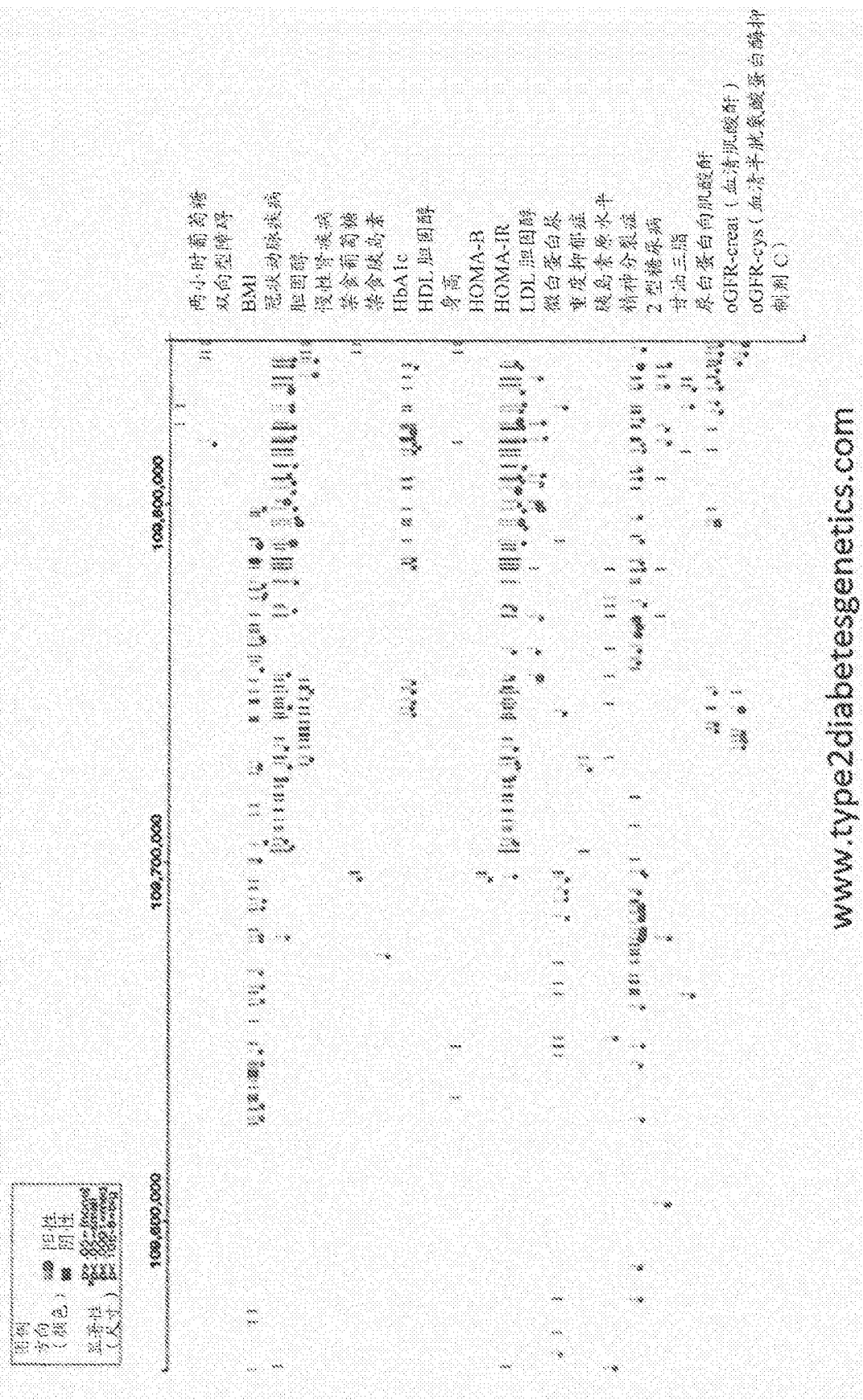


图31