

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814366.8

C12N 15/12  
C07K 14/72 C07K 16/28  
C12Q 1/68 C12N 15/11  
C12N 5/10 C12N 1/19  
G01N 33/50 G01N 33/566  
A61K 48/00 A61K 31/70  
A61K 31/00 A01K 67/027  
[11] 公开号 CN 1379816A

[43] 公开日 2002 年 11 月 13 日

[22] 申请日 2000.9.15 [21] 申请号 00814366.8

[30] 优先权

[32] 1999.9.16 [33] EP [31] 99203014.8

[32] 1999.9.16 [33] NL [31] 1013062

[86] 国际申请 PCT/EP00/09116 2000.9.15

[87] 国际公布 WO01/19983 英 2001.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.16

[71] 申请人 索尔瓦药物有限公司

地址 荷兰韦斯普

[72] 发明人 W·德勒尔斯尼德尔 G·尼斯

N·德赫瓦尔特

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事  
务所

代理人 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 38 页 附图 1 页

[54] 发明名称 人 G-蛋白偶联受体

[57] 摘要

本发明涉及 IGS3 G-蛋白偶联受体家族和编码该 IGS3 蛋白质的多核苷酸。本发明也涉及对此类多核苷酸和多肽之作用的抑制或活化,涉及含有该多核苷酸的载体、含有该载体的宿主细胞以及非人转基因动物,其中 IGS3 基因为过度表达、错表达、表达不足或被抑制(敲除动物)。本发明进一步涉及筛选化合物的方法,其中所述化合物能作为该 G-蛋白偶联受体家族 IGS3 的激动剂或拮抗剂,以及 IGS3 多肽和多核苷酸以及 IGS3 受体家族的激动剂或拮抗剂在广泛的疾病治疗以及用于这些疾病诊断性检验中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种分离的多核苷酸,其包含选自如下的核苷酸序列:
  - a) 核苷酸序列, 其编码根据 SEQ ID NO: 2 的 IGS3 多肽;
  - b) 编码多肽的核苷酸序列, 其中所述多肽由 DNA 插入片段编码, 所述插入片段包含在保藏号 CBS 102196, 保藏于荷兰的真菌菌种保藏中心的保藏物中, 特别是对应于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列;
  - c) 核苷酸序列, 其全长至少有 80% (优选地至少 90%) 的序列与 (a) 或 (b) 的核苷酸序列相同;
  - d) 核苷酸序列, 其与 (a) 或 (b) 或 (c) 的核苷酸序列互补。
2. 权利要求 1 的多核苷酸, 其中所述的多核苷酸含有包含于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列, 而 SEQ ID NO: 1 编码 SEQ ID NO: 2 之 IGS3 多肽。
3. 权利要求 1 的多核苷酸, 其中所述的多核苷酸全长包含至少 80% 与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列相同的核苷酸序列。
4. 权利要求 3 的多核苷酸, 其为 SEQ ID NO: 1 的多核苷酸。
5. 权利要求 1-4 的多核苷酸, 其为 DNA 或 RNA。
6. 一种杂交探针, 其含有权利要求 1 的多核苷酸或其至少 5 个核苷酸, 优选 30-50 个核苷酸之间的片段,
7. DNA 或 RNA 分子, 其含有表达系统, 其中当所述表达系统位于合适的宿主细胞中时, 该表达系统可产生包含氨基酸序列的 IGS3 多肽, 其与 SEQ ID NO: 2 之多肽具有至少 80% 的同一性。
8. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 7 的表达系统。
9. 根据权利要求 8 的宿主细胞, 其为酵母细胞。
10. 根据权利要求 8 的宿主细胞, 其为动物细胞。
11. IGS3 受体的膜制备物, 其来自于根据权利要求 8-10 的细胞。
12. 一种产生 IGS3 多肽的方法, 其包括在足以产生该多肽的条件下培养权利要求 8 的宿主, 并从培养物中回收多肽。
13. 一种产生可产生 IGS3 多肽的细胞的方法, 包括用权利要求 7 的

表达系统转化或转染细胞，使得细胞在合适的培养条件下可产生 IGS3 多肽。

14. IGS3 多肽，其包含的氨基酸序列全长与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少 80% 相同。

15. 权利要求 14 的多肽，其包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

16. 一种抗体，其对权利要求 14 的 IGS3 多肽具有免疫特异性。

17. 一种治疗受试者的方法，其中受试者需要增强权利要求 14 之 IGS3 多肽受体的活性或表达，包括：

(a) 施与受试者治疗有效量的该受体之激动剂；和/或

(b) 向受试者提供分离的多核苷酸，其中包含全长至少 80% 与编码 SEQ ID NO: 2 之 IGS3 多肽的核苷酸序列相同的核苷酸序列；或包含与所述核苷酸序列互补的、呈可以体内影响所述受体活性产生的形式的核苷酸序列。

18. 一种治疗受试者的方法，其中受试者需要抑制权利要求 14 之 IGS3 多肽受体的活性或表达，包括：

(a) 施与受试者治疗有效量的该受体之拮抗剂；和/或

(b) 向受试者施用多核苷酸，所述多核苷酸抑制编码该受体之核苷酸序列的表达；和/或

(c) 施与受试者治疗有效量的多肽，该多肽与所述受体竞争其配体。

19. 一种诊断受试者疾病或疾病易感性的方法，所述疾病涉及受试者中权利要求 14 之 IGS3 多肽的表达或活性，包括：

(a) 于所述受试者的基因组中，确定编码所述 IGS3 多肽之核苷酸序列中存在突变与否；和/或

(b) 对来自所述受试者的样本，分析 IGS3 多肽是否表达或其表达的量。

20. 一种鉴定权利要求 14 的 IGS3 多肽之激动剂的方法，包括：

(a) 将试验化合物与产生 IGS3 多肽的细胞接触；并且

(b) 测定试验化合物是否影响通过 IGS3 多肽活化而产生的信号。

21. 一种通过权利要求 20 的方法而鉴定的激动剂。

22. 鉴定权利要求 14 的 IGS3 多肽之拮抗剂的方法, 包括:

(a) 将激动剂与产生 IGS3 多肽的细胞接触; 并且

(b) 在候选化合物存在时, 测定由所述激动剂产生的信号是否消失。

23. 一种通过权利要求 22 的方法而鉴定的拮抗剂。

24. 一种表达 IGS3 多肽的重组宿主细胞或其膜, 其通过权利要求 13 的方法而产生。

25. 一种建立遗传修饰的非人动物之方法, 其包括以下步骤:

a) 将多核苷酸的编码部分与调节序列相连接, 其中所述多核苷酸基本上由编码具有 SEQ ID NO: 2 之氨基酸序列的蛋白质或其生物活性片段的核苷酸序列组成, 其中所述调节序列可驱动高水平的基因表达或驱动该基因在正常情况下在所述动物中不表达该基因的一种细胞类型中表达,

b) 基因工程设计多核苷酸的编码部分, 并将所述的序列重新导入所述动物的基因组中, 以这种方式使内源基因之等位基因完全或部分失活, 其中所述多核苷酸基本上由编码具有 SEQ ID NO: 2 之氨基酸序列的蛋白质或其生物活性片段的核酸序列组成, 所述内源基因之等位基因编码具 SEQ ID NO: 2 之氨基酸序列的蛋白质或其生物活性片段。

# 说明书

---

## 人 G-蛋白偶联受体

### 描述

本发明涉及新的已鉴定的多核苷酸、由它们编码的多肽以及此类多核苷酸和多肽的用途，并涉及它们的产生。更明确地，本发明的多核苷酸和多肽涉及 G-蛋白偶联受体 (GPCR)，此后称之为 IGS3。本发明也涉及对此类多核苷酸和多肽之作用的抑制或活化，涉及含有该多核苷酸的载体、含有该载体的宿主细胞以及转基因动物，其中 IGS3 基因过度表达、错表达、表达不足和/或被抑制（敲除动物）。本发明进一步涉及筛选化合物的方法，其中所述化合物能作为该 G-蛋白偶联受体 IGS3 的激动剂或拮抗剂。

### 发明背景

已充分确定许多医学上重要的生物进程由参与信号转导途径的蛋白质介导，其中信号转导途径涉及 G-蛋白和/或第二信使；例如 cAMP(Lefkowitz, 自然(Nature),1991,351:353-354)。此处这些蛋白质指的是参与 G-蛋白途径的蛋白质。这些蛋白质的一些实例包括 GPC 受体（例如肾上腺素能因子和多巴胺的那些受体（Kobilka,B.K.等人,美国国家科学院院报( Proc. Natl. Acad. Sci. USA ), 1987, 84: 46-50; Kobilka,B.K.等人,科学 (Science), 1987, 238: 650-656; Bunzow,J.R.等人, 自然, 1988, 336: 783-787)）、G-蛋白自身、效应蛋白质（例如磷脂酶 C、腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶）以及调节 (actuator) 蛋白质（例如蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C (Simon,M.I.等人, 科学, 1991, 252: 802-8)）。

例如，在信号转导的一种形式中，激素与 GPCR 结合后，该受体与异三聚体的 G-蛋白相互作用，诱导 GDP 从鸟嘌呤核苷酸结合位点位离。在正常的鸟嘌呤核苷酸细胞浓度下，GTP 立即填充此位点。GTP 与 G-蛋白的  $\alpha$  亚基结合导致 G-蛋白从受体解离，并且 G-蛋白分解为  $\alpha$  和  $\beta$   $\gamma$

亚基。携带有 GTP 的形式然后结合至活化的腺苷酸环化酶。GTP 水解为 GDP，该过程由 G-蛋白自身催化( $\alpha$  亚基具有内在的 GTPase 活性)，使 G-蛋白回到其基础的非活化形式。 $\alpha$  亚基的 GTPase 活性实质上是控制打开/关掉开关的内部时钟。 $\alpha$  亚基的 GDP 结合形式对  $\beta\gamma$  具高亲和性，接下来  $\alpha$  GDP 与  $\beta\gamma$  重新结合，使该系统回到基础状态。这样，G-蛋白起到双重作用，即作为中间体将信号从受体传递至效应器（在这个实例中是腺苷酸环化酶），以及作为控制信号持续时间的时钟。

G-蛋白偶联受体的膜结合超家族已表征为具有七个推定的跨膜结构域。这些结构域被认为是代表跨膜  $\alpha$ -螺旋，其由胞外或胞质环连接。G-蛋白偶联受体包括广泛的生物学活性受体，例如激素、病毒、生长因子和神经受体。

G-蛋白偶联受体家族包括多巴胺受体，其结合用于治疗 CNS 紊乱的神经安定药物。该家族成员的其它实例包括(但不限于)降钙素、肾上腺素能、神经肽 Y、somatostatin、神经紧张素、神经激肽、辣椒素、VIP、CGRP、CRF、CCK、缓激肽、galanin、促胃动素、伤害感受素(nociceptin)、内皮素、cAMP、腺嘌呤核苷、毒蝇碱、乙酰胆碱、5-羟色胺、组胺、凝血酶、激肽、促卵泡激素、视蛋白、内皮分化基因-1、视紫红质、添味剂以及巨细胞病毒受体。

大部分 G-蛋白偶联受体的头两个胞外环中各具有单一保守的半胱氨酸残基，其可形成二硫键，该二硫键认为可稳定功能的蛋白质结构。将这 7 个跨膜区指定为 TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6 和 TM7。连接 TM5 和 TM6 的胞质环可能是 G-蛋白结合结构域的一个主要组成部分。

大部分 G-蛋白偶联受体包含潜在的磷酸化作用位点，其位于第三个胞质环内和/或羧基末端。对一些 G-蛋白偶联受体（如  $\beta$ -肾上腺素受体）而言，蛋白激酶 A 和/或特异的受体激酶的磷酸化作用可介导受体的脱敏。

近来发现某些 GPCR（像降钙素受体样受体）可与小的单次跨膜蛋白质相互作用，后者被称为受体活性修饰蛋白质(RAMP's)。GPCR 与某种 RAMP 的相互作用决定了哪个天然配体对 GPCR-RAMP 的组合具有适当的亲和性，并且可调节该复合体的功能信号传递活性 (McLathie, L.M.

等人, 自然(1988)393: 333-339)。

对一些受体, 人们认为 G-蛋白偶联受体的配体结合位点包含亲水口袋, 其由数种 G-蛋白偶联受体的跨膜结构域形成, 该口袋被 G-蛋白偶联受体的疏水残基包围。每个 G-蛋白偶联受体的跨膜螺旋之亲水位点推定面朝里, 并形成极性的配体结合位点。一些 G-蛋白偶联受体牵涉到 TM3, 因为其具有配体结合位点, 如 TM3 天冬氨酸残基。TM5 的丝氨酸、TM6 的天冬酰胺以及 TM6 或 TM7 的苯丙氨酸或酪氨酸也参与配体的结合。

G-蛋白偶联受体可通过异三聚体的 G-蛋白与多种胞内酶、离子通道和转运蛋白进行胞内偶联(见 Johnson 等人, 内分泌评论 (Endoc.Rev.), 1989, 10: 317-331)。不同的 G-蛋白  $\alpha$ -亚基优势性刺激特定的效应器, 以调节细胞内多种生物功能。已确定 G-蛋白偶联受体胞质残基的磷酸化作用是调节一些 G-蛋白偶联受体与 G-蛋白偶联的重要机制。已在哺乳动物宿主的许多地方发现了 G-蛋白偶联受体。

受体—主要是 GPCR 类—已导致了一多半目前公知的药物 (Drews, 自然生物技术 (Nature Biotechnology), 1996, 14: 1516)。这表明这些受体作为治疗靶位已有确定的、经证实的历史。本发明描述的新 IGS3 GPCR 无疑满足了本领域对鉴定和表征进一步的受体之需求, 其中所述进一步的受体为可在诊断、防止、改善或纠正机能障碍、紊乱或疾病(此后通称为“疾病”)中发挥作用之受体。疾病包括(但不限于)精神病学和 CNS 紊乱, 包括精神分裂症、阵发性焦虑 (EPA) 紊乱例如强迫观念与行为疾病 (OCD)、创伤后应激障碍 (PTSD)、恐怖症和极度焦虑、大部分的抑郁障碍、双极情感障碍、帕金森氏疾病、一般的焦虑障碍、孤独癖、谵语、多发性硬化症、阿尔茨海默疾病/痴呆以及其它神经变性疾病、严重的智力低下、运动障碍、亨廷顿舞蹈病、图雷特氏综合征、抽搐、震颤、张力障碍、痉挛、厌食症、贪食症、脑卒中、成瘾/依赖/渴望、睡眠障碍、癫痫、偏头痛、注意缺陷障碍(伴多动) (ADHD); 心血管疾病, 包括心力衰竭、心绞痛、心律失常、心肌梗塞、心脏肥大、低血压、高血压—例如原发性高血压、肾高血压或肺高血压、血栓形成、动脉硬化、脑血管痉挛、蛛网膜下出血、脑缺血、脑梗塞、外周血管病、雷诺氏病、肾脏疾病—例如肾功能衰竭; dyslipidemias; 肥胖症; 呕吐; 胃肠道紊乱, 包括肠道易激综合征 (IBS)、炎性肠病 (IBD)、胃食管

回流疾病（GERD）、能动性障碍、延迟的胃排空情况，如手术后或糖尿病性胃轻瘫和糖尿病，溃疡—例如胃溃疡；腹泻；其它疾病，包括骨质疏松症；炎症；感染，如细菌、真菌、原生动物以及病毒感染，尤其是 HIV-1 或 HIV-2 引起的感染；疼痛；肿瘤；化学治疗诱发的损伤；肿瘤侵袭；免疫紊乱；尿潴留；哮喘；变态反应；关节炎；良性前列腺肥大；内毒素休克；败血症；糖尿病并发症以及妇科疾病。

## 发明概述

本发明一方面涉及 IGS3 多肽、多核苷酸和重组材料，以及产生它们的方法。本发明另一方面涉及利用该 IGS3 多肽、多核苷酸和重组材料的方法。此类用途包括（但不限于）作为治疗靶点和用于上述疾病之一的治疗。

再者，本发明的另一方面涉及使用本发明提供的物质鉴定激动剂和拮抗剂的方法，以及用所鉴定的化合物治疗与 IGS3 失调相关的疾病。本发明的另一方面涉及检测疾病的诊断方法，其中疾病与不适当的 IGS3 活性或水平有关。本发明进一步的方面涉及基于动物的系统，其作为 IGS3 表达异常或活性不当而引起的紊乱模型。

## 附图简述

图 1. 不同 DNA 克隆相对位置的图式表示，分离这些不同的克隆用于产生共有的 IGS3 序列。HNT1370 代表“发现”基因组克隆。 $\lambda$ -IGS3.1A,B 等表示（基本上）分离的重叠序列毗连群，其获自  $\lambda$  克隆 IGS3.1DNA 之序列分析。已在本文中描述的 PCR 引物表示为 (IP#)。CONSENSUS 表示在合并所有获得的序列后得到的共有序列。用 IGS3DNA (SEQ ID NO: 1) 表示共有序列毗连群的部分，其通过对至少 3 个独立的克隆进行序列分析完全证实。存在于 IGS3DNA 中的 330 个氨基酸之长开放阅读框用星号表示 (“\*”)。ESTAF003828 的定位用 “==” 表示。

表 1: SEQ ID NO: 1 的 IGS3-DNA

```
5' -  
TTAATCTCTTCAAGCCTCTGATTTCTCTCCTGTAAAACAGGGGCGGTAATTACCACATA  
ACAGGCTGGTCATGAAAATCAGTGAACATGCAGCAGGTGCTCAAGTCTTGTTTTTGTTTC  
CAGGGGCACCAAGTGGAGGTTTTCTGAGCATGGATCCAACCACCCCGGCCTGGGGAACAGA  
AAGTACAACAGTGAATGGAAATGACCAAGCCCTTCTTCTGCTTTGTGGCAAGGAGACCCT  
GATCCCGGTCTTCCTGATCCTTTTCATTGCCCTGGTCGGGCTGGTAGGAAACGGGTTTGT  
GCTCTGGCTCCTGGGCTTCCGCATGCGCAGGAACGCCTTCTCTGTCTACGTCCTCAGCCT  
GGCCGGGGCCGACTTCTTCTCCTCTGCTTCCAGATTATAAATTGCCTGGTGTACCTCAG  
TAACTTCTTCTGTTCCATCTCCATCAATTTCCCTAGCTTCTTCACCACTGTGATGACCTG  
TGCCTACCTTGCAGGCCTGAGCATGCTGAGCACCGTCAGCACCGAGCGCTGCCTGTCCGT  
CCTGTGGCCCATCTGGTATCGCTGCCGCCGCCAGACACCTGTCAGCGGTCGTGTGTGT  
CCTGCTCTGGGCCCTGTCCCTACTGCTGAGCATCTTGAAGGGAAGTTCTGTGGCTTCTT  
ATTTAGTGATGGTGACTCTGGTTGGTGTGACACATTTGATTTTCATCACTGCAGCGTGGCT  
GATTTTTTTATTTCATGGTTCTCTGTGGGTCCAGTCTGGCCCTGCTGGTCAGGATCCTCTG  
TGGCTCCAGGGGTCTGCCACTGACCAGGCTGTACCTGACCATCCTGCTCACAGTGCTGGT  
GTTCTCCTCTGCGGCCTGCCCTTTGGCATTTCAGTGGTTCCTAATATTATGGATCTGGAA  
GGATTCTGATGTCTTATTTTGTATATTCATCCAGTTTCAGTTGTCTGTCTATCTTTAA  
CAGCAGTGCCAACCCCATCATTTACTTCTTCGTGGGCTCTTTTAGGAAGCAGTGGCGGCT  
GCAGCAGCCGATCCTCAAGCTGGCTCTCCAGAGGGCTCTGCAGGACATTGCTGAGGTGGA  
TCACAGTGAAGGATGCTTCCGTCAGGGCACCCCGGAGATGTCGAGAAGCAGTCTGGTGTA  
GAGATGGACAGCCTCTACTTCCATCAGATATATGTG - 3'
```

表 2: SEQ ID NO: 2 的 IGS3-蛋白质

```
MDPTTPAWGTESTTVNGNDQALLLLCGKETLIPVFLILFIALVGLVGNGFVLWLLGFRMR
RNAFSVYVLSLAGADFLFLCFQIINCLVYLSNFFCSISINFPSFFTTVMTCAYLGLSML
STVSTERCLSVLWPIWYRCRRPRHLSAVVCVLLWALSLLLSILEGKFCGFLFSDGDSGWC
QTFDFITAAWLIFLFMVLCGSSLALLVRILCGSRGLPLTRLYLTILLTVLVFLLCGLPFG
IQWFLILWIWKDSVDVLFCHIHPVSVVLSLSSANPIIYFFVGSFRKQWRLQQPILKLAL
QRALQDIAEVDHSEGCFRQGTPEMSRSSLV
```

### 发明详述

本发明的 IGS3 GPCR 与其它的人类 GPCR 之间在序列和基序上存在结构和化学相似性。因此暗示了 IGS3 在尤其是上面提及的疾病中起作用。

除非另外加以定义，此处所用的全部技术和科学术语与本发明所属领域中一般技术人员通常了解的意思相同。虽然类似或等同于此处所描述的任一方法和材料可用于本发明的实践或试验中，现在仍对优选的方法、设备和材料进行了描述。说明书中的所有出版物此处引用作为参考，尽管此处引用的每一个单独的出版物均专门地、单独地指出。

### 定义

提供以下定义，以利于对此处常用的某些术语的了解。

“IGS3” 特别是指包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽，或其变体。

“受体活性” 或 “受体的生物活性” 指该 IGS3 的代谢功能或生理功能，包含类似的活性或提高的活性或具有降低的、不希望的副作用的这些活性。也包括该 IGS3 的抗原活性和免疫原性活性。

“IGS3-基因” 指包含 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的多核苷酸，

或其变体，和/或它们的互补物。

此处所用的“抗体”包括多克隆和单克隆抗体、嵌合的、单链和人源化抗体，以及 Fab 片段，包括 Fab 或其它免疫球蛋白表达文库的产物。

“分离的”指“通过人工”从天然状态改变和/或从天然环境分离。这样，如果存在于自然界的“分离的”组合物或物质被“分离”，那么它已被改变或已被从其最初的环境移走，或两者都有。例如，天然存在于活的动物内的多核苷酸或多肽不是“分离”的，但从其天然状态的共存物质中分离的同一多核苷酸或多肽是“分离的”，正如此处所用的该术语。

“多核苷酸”通常指任一多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸，其可为未经修饰的 RNA 或 DNA 或经修饰的 RNA 或 DNA。“多核苷酸”包括（但不限于）单链和双链 DNA、单链区和双链区混合的 DNA、单链和双链 RNA，以及单链区和双链区混合的 RNA、包含 DNA 和 RNA 的杂交分子，其可为单链或更一般地，可为双链或单链区和双链区的杂合体。另外，“多核苷酸”也可包括三链区，其包含 RNA 或 DNA 或同时包含 RNA 和 DNA。术语多核苷酸也包括含有一个或多个修饰碱基的 DNA 或 RNA，以及因为稳定性或因为其它原因而对主链进行修饰了的 DNA 或 RNA。“修饰”碱基包括例如，三苯甲基化碱基和不寻常碱基（如次黄苷）。对 DNA 和 RNA 可进行多种修饰；这样，“多核苷酸”包含多核苷酸经化学修饰、酶修饰或代谢修饰后的形式，它们一般可在自然界中发现，以及病毒和细胞的 DNA 和 RNA 特征性的化学形式。“多核苷酸”也包括相对短的多核苷酸，通常称为寡核苷酸。

“多肽”指任一肽或蛋白质，其包含通过肽键或修饰的肽键而互相连接起来的两个或多个氨基酸（即肽等配物）。“多肽”指短链以及较长的链，其中前者通常称为肽、寡肽或寡聚体，后者通常称为蛋白质和/或其组合物。多肽可包含除了 20 种基因编码氨基酸之外的其它氨基酸。“多肽”包含经修饰的氨基酸序列，所述修饰或被天然方法修饰（如翻译后加工），或被本领域公知的化学修饰技术修饰。此类修饰在基础课本和较详细的专著中，以及在大量的研究文献中有充分的描述。修饰可发生

在多肽的任一位置，包括肽主链、氨基酸侧链以及氨基或羧基末端。应意识到在特定多肽的一些位点，同一类型的修饰可以同样或不同程度出现。同样，特定多肽也可含有许多类型的修饰。多肽可因遍在蛋白化作用而分支，并且它们可为带或不带分支的环状。环状的、分支的以及分支环状的多肽可来自翻译后天然加工或可通过合成法产生。修饰包括乙酰化作用、酰化作用、ADP-核糖基化作用、酰胺化作用、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂类或脂类衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接；交联、环化作用、二硫键形成、去甲基化作用、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰基化、 $\gamma$ -羧化作用、糖基化作用、GPI 锚的形成、羟基化作用、碘化作用、甲基化作用、肉豆蔻酰化作用、氧化作用、蛋白水解加工、磷酸化作用、异戊二烯化作用、外消旋作用、硒化作用、硫酸化作用、转移 RNA 介导的向蛋白质添加氨基酸(如精氨酸酰化作用和遍在蛋白化作用)。见例如，蛋白质-结构和分子特性，第二版 (PROTEIN-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed.) T.E.Creighton, W.H.Freeman and Company, 纽约, 1993 以及，蛋白质的翻译后共价修饰 (POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS), B.C.Johnson, Ed., 学术出版社, 纽约, 1983 一书中的 Wold, F., 翻译后的蛋白质修饰：展望和前景 (Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects), 1-12 页; Seifter 等人, “蛋白质修饰和非蛋白质辅因子的分析” (“Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”), 酶学方法 (Meth.Enzymol.) (1990)182:626-646 和 Rattan 等人, “蛋白质合成：翻译后修饰和老化” (“Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and aging”), 纽约科学会纪事 (Ann.NY Acad.Sci.) (1992) 663: 48-62.

此处所用的术语“变体”是指多核苷酸或多肽，其分别不同于参考的多核苷酸或多肽，但保留了基本的特性，如基本的生物特性、结构特性、调节特性或生化特性。多核苷酸的一般变体之核苷酸序列不同于另一个，

参考核苷酸。变体核苷酸序列的变化可改变或不改变多肽的氨基酸序列，其中所述的多肽由参考多核苷酸编码。核苷酸的变化可导致参考序列所编码的多肽中氨基酸的替换、添加、删除、融合和截短，对此将在下面讨论。多肽的一般变体之氨基酸序列不同于另一个，参考多肽。通常，差异是有限的，以使参考多肽之序列与变体总体上非常相似，并且在许多区域是相同的。变体和参考多肽氨基酸序列上的差异可以是一个或多个氨基酸以任一组合的替换、添加和删除。替换或插入的氨基酸残基可由遗传密码编码，也可不由遗传密码编码。多核苷酸或多肽的变体可以自然产生（如等位基因变体），或者它可以是非自然产生的变体。多核苷酸和多肽之非自然产生的变体可通过诱变技术或直接合成而产生。

“同一性”是对核苷酸序列或氨基酸序列之同一性的量度。通常将序列排列起来，以获得最大限度的匹配。“同一性”本身具有本领域认知的意义并且可用公开的技术计算。见例如：（计算分子生物学（**COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY**）,Lesk,A.M.,ed.,牛津大学出版社，纽约，1988；生物计算机学：资讯学和基因组计划（**BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS**），Smith,D.W.,ed.,学术出版社，纽约，1993；序列数据的计算机分析，第一部分（**COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA,PART I**）,Griffin,A.M.,和 Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,新泽西，1994；分子生物学中的序列分析（**SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY**），von Heinje,G.,学术出版社，1987；以及序列分析导引（**SEQUENCE ANALYSIS PRIMER**）,Gribskov,M. 和 Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,纽约，1991）。虽然存在许多可用于测量两个多核苷酸或多肽间同一性的方法，该术语“同一性”为技术人员周知（Carillo,H.,和 Lipton,D.,工业与应用数学会应用数学杂志（**SIAM J.Applied Math.**）(1988)48:1073）。测定两个序列间的同一性或相似性的常用方法包括（但不限于）公开于超大计算机指南（**Guide to Huge Computers**），Martin J.Bishop,ed.,学术出版社，圣地亚哥，1994 和 Carillo,H.,和 Lipton,D.,工业与应用数学会应用数学杂志 (1988)48:1073

中的方法。测定同一性或相似性的方法已按规则编在计算机程序中。优选的、用于测定两个序列间的同一性或相似性的计算机程序方法包括(但不限于) GCG 程序包 (Devereux,J.,等人, 核酸研究 (Nucleic Acids Research) (1984)12(1): 387)、BLASTP、BLASTN、FASTA( Atschul,S.F. 等人, 分子生物学杂志 (J.Molec.Biol.) (1990)215:403)。单词“同源性”可替代单词“同一性”。

通过一种多核苷酸进行说明, 其所具有的核苷酸序列例如与 SEQ ID NO:1 的参考核苷酸序列至少具 95%的“同一性”是指: 在 SEQ ID NO:1 的参考核苷酸序列之每 100 个核苷酸中, 该多核苷酸的核苷酸序列除了含有多达 5 个核苷酸的不同外, 该多核苷酸之核苷酸序列与参考序列相同。换句话说, 为了获得核苷酸序列与参考核苷酸序列至少 95%相同的多核苷酸, 参考序列中多达 5%的核苷酸可被删除或被另一核苷酸替代; 或可将一些核苷酸插入参考序列中, 其中插入的核苷酸可多达参考序列之总核苷酸的 5%; 或在一些核苷酸中, 存在删除、插入和替换的组合, 其中所述核苷酸多达参考序列之总核苷酸的 5%。参考序列的这些突变可发生在参考核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置, 或在这些末端位置之间的任意地方, 它们或单独散在于参考序列的核苷酸中, 或以一个或多个邻近的组存在于参考序列中。

类似地, 一种多肽, 其所具有的氨基酸序列例如与 SEQ ID NO:2 的参考氨基酸序列至少具 95%的“同一性”是指: 在 SEQ ID NO:2 的参考氨基酸序列之每 100 个氨基酸中, 该多肽之氨基酸序列除了含有多达 5 个氨基酸的变化外, 该多肽之氨基酸序列与参考序列相同。换句话说, 为了获得氨基酸序列与参考氨基酸序列至少 95%相同的多肽, 参考序列中多达 5%的氨基酸残基可被删除或被另一氨基酸替代; 或可将一些氨基酸插入参考序列中, 其中插入的氨基酸多达参考序列之总氨基酸残基的 5%。参考序列的这些突变可发生在参考氨基酸序列的氨基或羧基末端位置, 或在这些末端位置之间的任意地方, 它们或单独散在于参考序列的残基中, 或以一个或多个邻近的组存在于参考序列中。

## 本发明的多肽

本发明一方面涉及 IGS3 多肽（包括 IGS3 蛋白质）。IGS3 多肽包括 SEQ ID NO:2 的多肽和具有由 DNA 插入片段编码的氨基酸序列之多肽，其中 DNA 插入片段包含在保藏号 CBS 102196，于 1999 年 9 月 15 日保藏在荷兰的真菌菌种保藏中心；还包括包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的多肽和包含具有由 DNA 插入片段编码的氨基酸序列之多肽，其中 DNA 插入片段包含在保藏号 CBS 102196，保藏于荷兰的真菌菌种保藏中心；以及包含与 SEQ ID NO:2 和/或具有由 DNA 插入片段编码的氨基酸序列之多肽至少 80% 同一性的氨基酸序列的多肽，其中 DNA 插入片段包含在保藏号 CBS 102196，保藏于荷兰的真菌菌种保藏中心，并且较优选地至少 90%、更优选地至少 95% 的同一性。进一步地，那些至少 97%、特别是至少 99% 的同一性的多肽是高度优选的。IGS3 多肽中也包括具有与包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的多肽或与具有由 DNA 插入片段编码的氨基酸序列之多肽至少 80% 同一性的氨基酸的多肽，其中 DNA 插入片段包含在保藏号 CBS 102196，保藏于荷兰的真菌菌种保藏中心，并且较优选地至少与 SEQ ID NO:2 90% 同一性、更优选地至少 95%。进一步地，那些至少 97%、特别是至少 99% 同一性的多肽是高度优选的。优选地，IGS3 多肽显示该受体的至少一种生物活性。

在另一个本发明的实施方案中，IGS3 多肽可为“成熟”蛋白质形式或为较大蛋白质（如融合蛋白质）的一部分。含有额外的氨基酸序列通常是有利的，其中所述之额外的氨基酸序列包括分泌或前导序列、前序列、利于纯化的序列（如多个组氨酸残基），有助于检测的序列（诸如抗原性肽标签（血细胞凝集素(HA)）），或者在重组生成中用于稳定的额外序列。

IGS3 多肽片段也包括在本发明中。片段是具有氨基酸序列的多肽，其具有与上述 IGS3 多肽之氨基酸序列的一部分（非全部）相同的氨基酸序列。与 IGS3 多肽一样，片段可以“独立存在”或包含在较大的多肽中，片段在其中形成一部分或一个区域，最优选地是作为单一的连续区域。本发明之多肽片段的代表性实例包括例如，氨基酸数从约 1-20、21-40、

41-60、61-80、81-100 以及 101 至 IGS3 多肽末端的片段。文中“约”包括在特指范围的任一末端或两端多出或少了数个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个氨基酸。

优选的片段包括例如，具有 IGS3 多肽之氨基酸序列的截短多肽，其中不包括对包括氨基末端的连续残基序列的删除，或对包括羧基末端的连续残基序列的删除，或对两个连续残基序列的删除，其中一个包含氨基末端，一个包含羧基末端。通过结构或功能属性表征的片段也是优选的，例如含有  $\alpha$ -螺旋和  $\alpha$ -螺旋形成区、 $\beta$ -片层和  $\beta$ -片层形成区、转角和转角形成区、卷曲和卷曲形成区、亲水区、疏水区、 $\alpha$  两亲区、 $\beta$  两亲区、可变形区、表面形成区、底物结合区和高抗原系数区的片段。其它优选的片段为生物活性片段。生物活性片段是那些介导受体活性的片段，包括那些具相似活性或具升高的活性，或具降低的、不希望的活性之片段。也包括那些对动物，尤其对人是抗原或免疫原的片段。

这样，本发明的多肽包括具有氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列至少 80% 同一性的多肽和/或具有由 DNA 插入片段编码的氨基酸序列之多肽，其中 DNA 插入片段包含在保藏号 CBS 102196，保藏于荷兰的真菌菌种保藏中心，或其片段，其中所述片段与对应片段有至少 80% 同一性。优选地，所有这些多肽片段保留了受体的生物活性，包括抗原活性。所定义的序列和片段的变体也构成了本发明的一部分。优选的变体是那些通过保守氨基酸替换而不同于参考序列的变体—即用另一个类似特征的残基替换的变体。一般此类替换为 Ala、Val、Leu 和 Ile 之间；Ser 和 Thr 之间；酸性残基 Asp 和 Glu 之间；Asn 和 Gln 之间；以及碱性残基 Lys 和 Arg 之间；或芳香族残基 Phe 或 Tyr 之间。特别优选的变体是其中有数个、5-10 个、1-5 个或 1-2 个氨基酸被以任一组合替换、删除或添加。

本发明的 IGS3 多肽可以任一合适的方式制备。此类多肽包括分离的天然存在多肽、重组产生的多肽、合成产生的多肽或通过这些方法的结合产生的多肽。制备此类多肽的方法为本领域公知。

## 本发明的多核苷酸

本发明进一步的方面涉及 IGS3 多核苷酸。IGS3 多核苷酸包括编码 IGS3 多肽和片段的分离的多核苷酸，以及与其密切相关的多核苷酸。更明确地，本发明的 IGS3 多核苷酸包括这样的多核苷酸，其包含的核苷酸序列包含于 SEQ ID NO:1 中，例如可编码 SEQ ID NO:2 的 IGS3 多肽之多核苷酸，具有 SEQ ID NO:1 特定序列的多核苷酸，以及基本上对应于 DNA 插入片段的多核苷酸，其中 DNA 插入片段包含在保藏号 CBS 102196，保藏于荷兰的真菌菌种保藏中心。

IGS3 多核苷酸还包括如下多核苷酸：包含其全长至少与 SEQ ID NO:2 的编码 IGS3 之多核苷酸序列 80% 同一性的核苷酸序列之多核苷酸，包含其全长序列与 SEQ ID NO:1 至少 80% 同一性的核苷酸序列之多核苷酸，以及基本上相应于包含在保藏于荷兰真菌菌种保藏中心的保藏物 (CBS 102196) 中的 DNA 插入片段的多核苷酸。

在这点上，具至少 90% 同一性的多核苷酸是特别优选的，并且那些具至少 95% 同一性的多核苷酸是尤其优选的。而且，具至少 97% 同一性的多核苷酸是高度优选的，并且那些具至少 98-99% 同一性的多核苷酸是最高度优选的，具至少 99% 同一性的多核苷酸是最优选的。也包括在 IGS3 多核苷酸条目下的核苷酸序列是这样的，其中所述核苷酸序列为可在一定条件下可与 SEQ ID NO:1 或 DNA 插入片段中所含有的核苷酸序列具足够的同一性可与之杂交的一段核苷酸序列，其中 DNA 插入片段包含在保藏号 CBS 102196，保藏于荷兰的真菌菌种保藏中心，所述条件可用于扩增或用作探针或标记。本发明也提供与此类 IGS3 多核苷酸互补的多核苷酸。

本发明的 IGS3 与 G-蛋白偶联受体家族的其它蛋白质具有结构相关性，这一点可通过公共数据库中 BLAST 研究结果显示。表 2 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 的主要部分 (氨基酸残基 2-306) 与人 mas 癌基因编码的蛋白质 (专利申请 WO8707472 之序列 1) 具有约 35% 的同一性 (应用 BLAST, Altschul S.F. 等人, [1997], 核酸研究 25: 3389-3402), 并且序列与公开于专利申请 WO9616081 的 G-蛋白偶联受体 (GENESEQ 96P

- R97222) 具有 37% 的同一性。表 1 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 的主要部分分别与上述两个受体 (GENESEQ 87N-70685 和 96N-T28807) 具有 52% 和 54% 的相同性。与残基 104-1144 中的人 Somatostatin-3 受体有 48% 同一性 (WO9313130; 93N-Q45657)。IGS3 蛋白质序列的亲水性分析 (Kyte, J. et al., J. Mol. Biol. (1982), 157:105-132; Klein P. et al., Biochim. Biophys. Acta (1985) 815: 468-476) 表明存在 7 个跨膜结构域。这样, 可以预计本发明的 IGS3 多肽和多核苷酸尤其是具有与它们同源的多肽和多核苷酸类似的生物功能/特性, 并且它们的应用对任一本领域技术人员是显而易见的。

本发明的多核苷酸可从自然资源中获得, 如基因组 DNA。特别地, 可设计简并 PCR 引物, 其编码特定 GPCR 基因亚家族内的保守区。用简并引物对基因组 DNA 或 cDNA 的 PCR 扩增反应会导致该目标基因家族一些成员的扩增 (包括已知的和新的) (当所使用的是基因组模板时, 简并引物必须位于同一外显子内)。(Libert 等人, 科学, 1989, 244: 569-572)。本发明的多核苷酸也可用公知的和商业上可得到的技术合成。

编码 SEQ ID NO:2 之 IGS3 多肽的核苷酸序列可与包含在 SEQ ID NO:1 中的多肽编码序列相同 (核苷酸数 149 至 1138), 或者它可以是一个不同的核苷酸序列, 因为基因密码子的冗余性 (简并性), 其与 SEQ ID NO:1 中含有的多肽编码序列相比, 也可显示变化, 但仍编码 SEQ ID NO:2 之多肽。

当本发明的多核苷酸用作产生 IGS3 多肽的重组体时, 该多核苷酸可自身包含成熟多肽或其片段的编码序列; 也可符合阅读地包含成熟多肽或其片段的编码序列与其它编码序列, 例如那些编码前导序列或分泌序列、前蛋白、原蛋白或前原蛋白质序列、或其它融合肽部分。例如, 可编码促进融合多肽纯化的标记序列。本发明此方面的某些优选的实施方案中, 标记序列是 6 个组氨酸肽或 HA 标签, 其中 pQE 载体 (Qiagen, Inc.) 可提供 6 个组氨酸肽, 并且 Gentz 等人, 美国国家科学院报 (1989) 86: 821-824 进行了描述。多核苷酸也可包含 5' 和 3' 非编码序列, 例如转录、非翻译区、剪切和多聚腺苷化信号、核糖体结合位以及稳定 mRNA 的序

列。

进一步优选的实施方案为编码 IGS3 变体的多核苷酸，其中 IGS3 变体包含 SEQ ID NO:2 的 IGS3 多肽之氨基酸序列，其中的几个、5-10 个、1-5 个或 1-2 个氨基酸残基以任一组合被替换、删除或添加。

可用本领域普遍公知的方法基因工程设计本发明的多核苷酸，以便为一些目的而改变 IGS3 编码序列，其包括（但不限于）克隆、加工和/或基因产物之表达的改变。通过随机片段化的 DNA 改组和基因片段的 PCR 重新组装以及合成寡核苷酸可用来基因工程化核苷酸序列。例如寡核苷酸介导的定点诱变可用于导入突变，以产生氨基酸替换、产生新的限制性位点、改变修饰作用（例如糖基化作用或磷酸化作用）模式、改变密码子偏好、产生剪接变体等。

本发明进一步涉及可与上述序列杂交的多核苷酸。在这方面，本发明特别涉及到在严紧条件下可与上述多核苷酸杂交的多核苷酸。此处所用术语“严紧条件”是指：只要序列间存在至少 80%，优选至少 90%，较优选地至少 95%，更优选地至少 97%，特别优选地至少 99% 的同一性，则会发生杂交。

本发明的多核苷酸可用作 cDNA 和基因组 DNA 的杂交探针，以分离编码 IGS3 的全长 cDNA 和基因组克隆，以及分离与 IGS3 基因具有高序列相似性的其它基因（包括编码来自非人物种的同种物或直系同源进化物的基因）的 cDNA 和基因组克隆，其中所述多核苷酸与 SEQ ID NO:1 中含有的核苷酸序列或其片段相同或十分相同。本领域技术人员周知此类杂交技术。一般地，这些核苷酸序列与参考的核苷酸序列 80%，优选地 90%，更优选地 95% 相同。探针通常包含至少 5 个核苷酸，并且优选地至少 8 个核苷酸，优选至少 10 个核苷酸，更优选地至少 12 个核苷酸，特别是至少 15 个核苷酸。此类探针最优选的为具有至少 30 个核苷酸，以及具有至少 50 个核苷酸。特别优选的探针在 30 至 50 个核苷酸的范围之间。

为了获得编码 IGS3 多肽之多核苷酸，其包括来自非人物种的同种物或直系同源进化物，一个实施方案包含以下步骤：在严紧的杂交条件下，

用具有 SEQ ID NO:1 或其片段的标记探针筛选合适的文库，并分离含有该核苷酸序列的全长 cDNA 和基因组克隆。此类杂交技术为本领域技术人员周知。严谨杂交条件为如上所定义的或经改变的条件，于溶液中 42℃ 过夜温育，然后在约 65℃ 下，用 0.1 ×SSC 洗膜，其中所述杂交溶液含有：50% 甲酰胺、5 ×SSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5 ×Denhardt's 溶液、10% 硫酸葡聚糖以及 20 微克/ml 变性的切断鲑精 DNA。

本发明的多核苷酸和多肽可用作研究试剂和材料，以发现对动物和人类疾病的治疗和诊断方法。

#### 载体、宿主细胞、表达

本发明也涉及载体，其包含本发明的一种多核苷酸或多种多核苷酸，还涉及用本发明的载体经基因工程改造的宿主细胞，并涉及用重组技术产生本发明的多肽。通过本发明的 DNA 构建体得到的 RNA，可用无细胞翻译系统产生此类蛋白质。

为了产生重组体，可通过基因工程改造宿主细胞，使之具有本发明之多核苷酸的表达系统或其部分。许多标准的实验室手册中描述的方法可实现多核苷酸导入宿主细胞，例如 Davis 等人，分子生物学基础方法 (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY) (1986) 和 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第二版 (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.)，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约(1989)中描述的例如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、transfection、微注射、阳离子脂质体介导的转染、电穿孔、转导、scrape loading、粒子轰击导入或注射。

合适宿主的代表性实例包括细菌细胞，例如链球菌属 (Streptococci)、葡萄球菌属 (Staphylococci)、大肠杆菌 (E.coli)、链霉菌属 (Streptomyces) 和枯草芽胞杆菌 (Bacillus subtilis) 细胞；真菌细胞，例如酵母细胞和曲霉属 (Aspergillus) 细胞；昆虫细胞例如果蝇属 S2 (Drosophila S2) 和灰翅夜蛾属 Sf9 (Spodoptera Sf9) 细胞；动物细胞例如 CHO、COS、Hela、

C127、3T3、BHK、HEK293 和鲍斯黑素瘤细胞 (Bowes melanoma cells); 以及植物细胞。

可使用许多表达系统。此类系统尤其包括衍生于染色体的、游离体的以及病毒的系统, 例如, 衍生于细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母游离体、插入成分、酵母染色体成分、病毒 (如杆状病毒 (baculoviruses)、乳多空病毒 (papova viruses) 如 SV40、痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒 (fowl pox viruses)、假狂犬病病毒 (pseudorabies viruses) 和逆转病毒 (retroviruses)) 的质粒, 以及衍生于其组合的质粒, 如那些衍生于质粒和噬菌体遗传成分的质粒, 如粘粒和噬菌粒。表达系统可包含控制区, 其调节并引起表达。通常可使用任一系统或载体, 其适于在宿主内维持、增殖或表达多核苷酸以产生多肽。可用许多公知的和常规技术之一将合适的核苷酸序列插入表达系统, 例如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册(出处同前)。

可将合适的分泌信号加入目标多肽, 使被翻译蛋白质分泌入内质网腔、壁膜间隙或分泌至胞外环境。这些信号对多肽而言可以是内源的或者它们可是异源信号。

如果 IGS3 多肽的表达用于筛选测定, 通常优选在细胞表面产生多肽。在这种情况下, 可于使用筛选分析前收获细胞。在 IGS3 多肽的亲和性或功能活性由受体活性修饰蛋白质 (RAMP) 修饰时, 尽可能地在细胞表面共表达相关的 RAMP 是优选的并且通常是需要的。在这种情况下, 同样需要在筛选分析前收获表达 IGS3 多肽和相关 RAMP 的细胞。如果 IGS3 多肽分泌至培养基中, 可回收培养基, 以回收和纯化多肽; 如果产生在胞内, 在回收多肽前必须首先裂解细胞。如果在细胞内产生, 在回收肽之前必须先将细胞裂解。表达 IGS3 多肽的膜可利用本领域技术人员已知的方法回收。一般地, 这种方法包括收集表达 IGS3 多肽的细胞, 利用诸如 (但不限于) pottering 的方法将细胞匀浆化。通过洗涤悬浮液一次或数次回收膜。

可采用公知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化 IGS3 多肽, 其中包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维

素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。最优选地，使用高效液相色谱法纯化。可使用周知技术进行蛋白质的重折叠，使在分离和/或纯化过程中变性的多肽再生为活性构象。

## 诊断测定

本发明也涉及 IGS3 多核苷酸用作诊断试剂的用途。对与功能紊乱相关的 IGS3 基因之突变形式的检测可提供一种诊断工具，其可添加至或定义一种疾病或疾病易感性，所述疾病源于 IGS3 的低表达、过表达或表达改变。同样在这种情况下，需要相关的受体活性修饰蛋白质的共表达，以得到所希望质量的诊断测定。可通过一系列技术于 DNA 水平检测携带 IGS3 基因突变的个体。

用于诊断的核酸可来自受试者的细胞。例如来自血液、尿、唾液、活组织检查或尸体解剖材料。基因组 DNA 可直接用于检测或在分析前通过 PCR 或其它扩增技术对其进行酶扩增。RNA 或 cDNA 也可以类似方式使用。可通过与正常基因型比较扩增产物的大小而检测删除和插入。将扩增的 DNA 与标记的 IGS3 核苷酸序列杂交可鉴定点突变。通过 RNase 消化或通过变性温度的不同可将完全匹配的序列与错配的双链区别开来。通过 DNA 片段在有或没有变性剂的凝胶中电泳迁移率的改变，或通过直接的 DNA 测序也可检测 DNA 序列的差异。见例如 Myers 等人，科学 (1985) 230: 1242。也可通过核酸酶保护测定来揭示特定位点处序列的改变，其中所述核酸酶保护测定例如 RNase 和 S1 保护或化学切割方法。见 Cotton 等人，美国国家科学院院报 (1985) 85: 4397-4401。在另一个实施方案中，可通过构建寡核苷酸引物阵列来进行例如基因突变的有效扫描，其中所述引物包含 IGS3 核苷酸序列或其片段。阵列技术方法是周知的，并且具普遍适用性，可用于解决分子遗传学中的许多问题，包括基因表达、遗传连锁和遗传变异性。(见例如：M.Chee 等人，科学，274 卷，610-613 页 (1996))。

诊断测定提供了对尤其是上述疾病易感性的诊断或测定方法，方法是通过所述方法检测 IGS3 基因中的突变。

此外，尤其是上述疾病可通过包括测定样本的方法来诊断，其中样本来自于 IGS3 多肽或 IGS3 mRNA 水平异常下降或升高的受试者。

可使用任一本领域公知的、用于在 RNA 水平定量多核苷酸的方法测定表达的下降或升高，例如 PCR、RT-PCR、RNase 保护、Northern 印迹以及其它杂交方法。用于测定来自宿主样本中蛋白质水平（如 IGS3）的测定技术为本领域技术人员公知。此类测定方法包括放射免疫测定、竞争结合测定、Western 印迹分析和 ELISA 测定。

本发明另一方面涉及诊断试剂盒，用于诊断尤其是上述疾病或对上述疾病之一的易感性诊断。

试剂盒可包含：

(a)IGS3 多核苷酸，优选地 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列或其片段；和/或

(b)与(a)互补的核苷酸序列；和/或

(c)IGS3 多肽，优选地 SEQ ID NO:2 的多肽或其片段；和/或

(d)针对 IGS3 多肽的抗体，优选地针对 SEQ ID NO:2 的多肽的抗体；和/或

(e)RAMP 多肽，其为 IGS3 多肽的相关生物特性或抗原特性所需。

应当理解在任一此类试剂盒中，(a)、(b)、(c)、(d)和(e)可包括其基本成分。

## 染色体测定

本发明的核苷酸序列对染色体鉴定也是有价值的。该序列特异地靶向并且能与个体的人染色体上之特定位置杂交。根据本发明对染色体相关序列的作图是将那些序列与基因相关疾病联系起来的第一步重要步骤。一旦某个序列被作图至精确的染色体位置，则可使该序列在染色体上的物理位置与遗传图谱数据相联系。此类数据可在，例如 V.McKusick,人类孟德尔遗传 (Mendelian Inheritance in Man) (通过与约翰霍普金斯大学 Welch 医学图书馆联机可获得)中找到。然后通过连锁分析 (物理毗连基因的共同继承) 鉴定作图至同一染色体区的基因和疾病的关系。

也可测定受影响的和未受影响的个体 cDNA 或基因组序列的差异。如果在一些或全部受影响的个体观察到了某个突变，而未在任一正常个体观察到该突变，则这个突变可能是引起疾病的因子。

## 抗体

本发明的多核苷酸或其片段或其类似物，或表达它们（如果需要的话，与相关的 RAMP 一起表达）的细胞也可作为免疫原，以产生对 IGS3 多肽免疫特异性的抗体。术语“免疫特异性的”指抗体对本发明之多肽的亲合性与它们对现有技术中其它相关多肽的亲合性相比较，抗体对前者具有明显较大的亲合性。

可使用常规方法，通过将多肽或具有表位的片段、类似物或细胞施与动物，优选的非人，以获得产生针对 IGS3 多肽的抗体。对于单克隆抗体的制备而言，可使用任一提供通过连续的细胞系培养而产生抗体的技术。实例包括杂交瘤技术（Kohler,G.和 Milstein,C., 自然（1975）256: 495-497）、三瘤（trioma）技术、人 B 细胞杂交瘤技术（Kozbor 等人, 今日免疫学（Immunology Today）(1983)4:72）和 EBV-杂交瘤技术（Cole 等人, 单克隆抗体与肿瘤治疗（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY），77-96 页，Alan R.Liss.Inc.,1985）。

上述抗体可用于分离或鉴定表达多肽的克隆，或通过亲和层析法纯化多肽。

此类抗 IGS3 多肽抗体、或抗 IGS3 多肽-RAMP 复合物抗体也可用于治疗尤其是上述疾病。

## 动物

本发明的另一方面涉及基于非人动物的系统，其用作因 IGS3 反常表达或活性异常而致的紊乱模型。基于非人动物的模型系统也可用于进一步表征 IGS3 基因的活性。此系统可用作为鉴定化合物而设计的筛选策略之一部分，其中所述化合物能治疗基于 IGS3 的紊乱，尤其是上述疾病。

以这种方式，基于动物的模型可用于鉴定药物化合物、疗法以及干预

法，它们可有效治疗反常 IGS3 表达或活性异常而致的紊乱。此外，此类动物模型可用于确定受试动物的 LD<sub>50</sub> 和 ED<sub>50</sub>。这些数据可用于确定潜在的 IGS3 紊乱治疗的体内有效性。

基于 IGS3 紊乱的基于动物的模型系统可包括非重组动物和重组基因工程的转基因动物，其中所述紊乱是基于反常的 IGS3 表达或活性异常。

IGS3 紊乱的动物的模型包括例如遗传模型。显示基于 IGS3 紊乱样症状的动物模型可通过使用例如，将如上所述的那些 IGS3 序列与本领域技术人员周知的产生转基因动物的技术相结合，进行基因工程设计。例如，可将 IGS3 序列导入目标动物的基因组，并使之过表达和/或错表达，或者，如果存在内源的 IGS3 序列时，它们可被过表达、错表达或另外地它们可被破坏，以使 IGS3 基因的表达不足或失活。

为了过表达或错表达 IGS3 基因序列，可将 IGS3 基因序列的编码部分与调节序列连接，后者能驱动高水平的基因表达，或在通常不表达该基因的目标动物类型的细胞类型中表达该基因。此类调节区将为本领域技术人员周知，且无需过度实验即可利用。

对于内源的 IGS3 基因序列的低表达，可分离并基因工程设计这样的序列，使其重新导入目标动物的基因组后，可失活或“敲除”内源 IGS3 基因的等位基因。优选地，基因工程的 IGS3 基因序列通过基因打靶导入，使内源的 IGS3 序列在基因工程的 IGS3 基因序列整合入动物基因组后被破坏。

可用来产生 IGS3 相关紊乱之动物模型的任一类动物包括，但不限于，小鼠、大鼠、兔子、松鼠、豚鼠、猪、小猪、山羊以及非人灵长类的动物，例如狒狒、猴子和黑猩猩。

可用本领域公知的任一技术将 IGS3 转基因导入动物，以产生转基因动物的起始系。此类技术包括，但不限于，原核显微注射 (Hoppe,P.C. 和 Wagner,T.E.,1989, 美国专利号 4,873,191)；逆病毒介导的胚系基因转移 (van der Putten 等人, 美国国家科学院院报 82: 6148-6152, 1985)；胚胎干细胞的基因打靶 (Thompson 等人, 细胞 (Cell) 56: 313-321, 1989, )；胚胎的电穿孔 (Lo, 分子细胞生物学 (Mol.Cell.Biol.) 3: 1803-1814, 1983)；

以及精子介导的基因转移 (Lavitano 等人, 细胞 57:717-723,1989) 等。此类技术的综述见 Gordon, 转基因动物, 国际细胞学评论 (Intl.Rev.Cytol.) 115:171-229,1989。

本发明提供所有细胞内均携带 IGS3 转基因的转基因动物, 以及一些细胞 (而非所有细胞) 内携带该转基因的动物, 即镶嵌动物。(见例如, Jakobovits 描述的技术, 当前生物学 (Curr.Biol.) 4:761-763, 1994)。转基因可作为单一转基因整合或作为串联体整合, 例如头-头串联或头-尾串联。通过例如下述 Lasko 等人的方法 (Lasko,M.等人, 美国国家科学院院报 89: 6232-6236, 1992), 该转基因可被选择性导入特定的细胞类型并活化。

此类细胞类型特异性活化所需调节序列依赖于特定的目标细胞类型, 并且这一点对本领域技术人员是显然的。

当希望 IGS3 转基因被整合于内源 IGS3 基因的染色体位点时, 优选基因打靶。简而言之, 当欲应用此技术时, 设计用作整合目的之载体, 其中所述载体含有与目标内源 IGS3 基因同源的一些核苷酸序列 (例如小鼠 IGS3 基因的核苷酸序列), 通过与染色体序列的同源重组, 导入并破坏内源 IGS3 基因或 IGS3 基因的等位基因的核苷酸序列之功能。通过例如下述 Gu 等人 (Gu,H.等人, 科学 265: 103-106, 1994) 的方法, 该转基因也可被选择性导入特定的细胞类型, 这样仅在该细胞类型中失活目标内源基因。此类细胞类型特异性失活所需调节序列依赖于特定的目标细胞类型, 并且对本领域技术人员是显然的。

一旦产生了转基因动物, 可用标准技术测定重组 IGS3 基因和蛋白质的表达。最初的筛选可通过 Southern 印迹分析或 PCR 技术来分析动物组织, 以测定是否转基因的整合已发生。也可使用如下技术评估转基因动物组织中 IGS3 转基因的 mRNA 表达水平, 其中技术包括, 但不限于, 对来自动物组织样品的 Northern 印迹分析、原位杂交分析及 RT-PCR。表达目标基因的组织样品也可使用抗体免疫细胞化学评估, 其中抗体对目标基因的转基因目标产物是特异的。然后对以易于检测到的水平表达 IGS3 基因 mRNA 或 IGS3 转基因肽 (用直接抗目标基因产物表位的抗体

通过免疫细胞化学检测)的 IGS3 转基因动物进行进一步的评估,以鉴定显示特征性基于 IGS3 紊乱症状的那些动物。

一旦产生 IGS3 转基因的起始动物(即那些在目标细胞或组织中表达 IGS3 蛋白质的动物,并且优选地,显示基于 IGS3 紊乱症状的那些动物),可对它们进行繁殖、近交繁殖、杂交繁殖或杂交育种,以产生特定动物群体。此类繁殖策略的实例包括,但不限于:将具有多于一个整合位点的起始动物杂交繁殖,以建立分离品系;将分离品系近交繁殖,以产生复合的 IGS3 转基因学,因为每个 IGS3 转基因的加合表达作用,其可高水平表达目标 IGS3 转基因;杂合子的转基因动物杂交,以在特定整合位点产生纯合动物,目的在于提高表达并无需通过 DNA 分析来筛选动物;将分离的纯合子品系杂交,以产生复合的杂合子或纯合子品系;繁殖具有不同近交繁殖遗传背景的动物,以检验改变等位基因对 IGS3 转基因的表达及对产生 IGS3 样症状的影响。一种方法是将 IGS3 转基因的起始动物与野生型品系杂交,以产生显示如上所述的那些 IGS3 相关的紊乱样症状之 F1 代。然后将 F1 代近交,以开发一种纯合子品系,如果发现纯合子的目标基因转基因动物可存活。

## 疫苗

本发明的另一方面涉及诱导哺乳动物免疫反应的方法,其包括施与(例如通过接种)哺乳动物 IGS3 多肽或其片段,如果需要的话,与 RAMP 多肽一同施与,足以产生抗体和/或 T 细胞免疫反应,以保护所述的动物免于尤其是上述疾病之一。

本发明的另一个方面涉及诱导哺乳动物免疫反应的方法,其包括通过载体递送 IGS3 多肽,其中载体可于体内表达 IGS3 多核苷酸,以诱导免疫反应,保护所述的动物免于疾病。

本发明进一步的方面涉及免疫/疫苗制剂(组合物),其导入哺乳动物宿主后,可在哺乳动物内诱导对 IGS3 多肽的免疫反应,其中组合物包含 IGS3 多肽或 IGS3 基因。此类免疫/疫苗制剂(组合物)可为治疗性免疫/疫苗制剂或预防性免疫/疫苗制剂。疫苗制剂可进一步包含合适的载体。

因为 IGS3 多肽在胃中可被降解，故优选地肠胃外施用（包括皮下注射、肌肉注射、静脉内注射、真皮内注射等）。适于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性无菌注射溶液，其可包含抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和可使制剂与受者的血液等渗的溶质；以及水性和非水性无菌悬液，其可包含悬浮因子或增稠因子。制剂可以单位剂量或多剂量存在于容器中，例如密封安瓿和小玻璃瓶，并且可在冷冻干燥条件下储存，在使用前只需加入无菌液体载体。疫苗制剂也可包含佐剂系统，以促进制剂的免疫原性，例如本领域公知的水包油系统和其它系统。剂量依赖于疫苗的比活性，并且很容易通过常规实验测定。

### 筛选测定

本发明的 IGS3 多肽可用作化合物的筛选方法，其中化合物与该受体结合，并且活化（激动剂）或抑制（拮抗剂）本发明之受体多肽的活化。这样，本发明的多肽也可用于评估在例如，细胞、无细胞制备物、化学文库以及天然产物混合物中，小分子底物与配体的结合。这些底物和配体可以是天然的底物和配体，或者是结构或功能的模拟物。

IGS3 多肽负责生物功能，包括病理学方面。据此希望找到化合物和药物，其一方面刺激 IGS3，并且另一方面其可抑制 IGS3 的功能。通常，激动剂用于对尤其是上述疾病情况的治疗和预防目的。

拮抗剂可用于对尤其是上述疾病情况的一系列治疗和预防目的。

通常，此筛选步骤包括产生合适的细胞，其在表面表达本发明的受体多肽，并且如果必要的话，与 RAMP 在其表面共表达。此类细胞包括来自哺乳动物、酵母、果蝇属或大肠杆菌的细胞。然后，将表达该受体的细胞（或含有表达受体的细胞膜）与试验化合物接触，以观察结合，或功能反应的刺激或抑制。

一种筛选技术包括在系统中使用表达本发明的受体之细胞（例如，转染的 CHO 细胞），其中系统可测量胞外 pH、胞内 pH 或受体活化引起的胞内钙变化。在此技术中，化合物与表达本发明的受体多肽的细胞接触，然后测定第二信使反应，例如信号转导、pH 改变或钙水平的改变，

以确定潜在的化合物是否活化或抑制了该受体。

另一种方法涉及受体抑制剂的筛选，它通过测定受体介导的信号调节而进行，例如 cAMP 累积和/或腺苷酸环化酶活性。此方法包括用本发明的受体转染真核细胞，以在细胞表面表达该受体。然后当存在潜在的拮抗剂时，将细胞暴露于本发明的受体之激动剂。如果潜在的拮抗剂与受体结合，这样会抑制受体的结合，调节激动剂介导的信号。

另一种检测本发明的受体之激动剂或拮抗剂的方法是在美国专利号 5,482,835 中描述的基于酵母的技术。

测定可只需测试候选化合物的结合，其中与带有受体之细胞的粘附可通过与候选化合物直接或间接结合的标记而检测，或者测定中涉及到与标记的竞争物竞争。进一步地，使用适于对表面携带受体之细胞的检测系统，这些测定可测试候选化合物是否通过活化受体导致信号产生。通常在公知的激动剂存在时，测定活化作用的抑制剂，并且在候选化合物存在时，观察激动剂对活化作用的影响。

进一步地，测定可只需包含以下步骤：将候选化合物与含有 IGS3 多肽的溶液混合以形成混合物，测定混合物中 IGS3 活性，并将混合物的 IGS3 活性与标准比较。

IGS3 cDNA、蛋白质以及该蛋白质的抗体也可用于构型测定，用于检测添加的化合物对细胞内 IGS3 mRNA 和蛋白质产生的影响。例如通过本领域公知的标准方法，用单克隆和多克隆抗体构建 ELISA，以测定 IGS3 蛋白质的分泌水平或细胞相关水平，并且它可用于从经适当操作的细胞或组织中发现这样的药剂，其可抑制或增强 IGS3 的产生（也分别称为拮抗剂和激动剂）。进行筛选测定的标准方法为本领域周知。

潜在的 IGS3 拮抗剂的实例包括抗体或，在有些时候，为寡核苷酸或与 IGS3 的配体密切相关的蛋白质，例如配体的片段或小分子，其与受体结合但不引起反应，导致受体活性被抑制。

这样在另一方面，本发明涉及筛选试剂盒，其用于鉴定 IGS3 多肽的激动剂、拮抗剂、配体、受体、底物、酶等；或者用于鉴定降低或增强 IGS3 多肽产生的化合物，其包括：

- (a) IGS3 多肽, 优选地 SEQ ID NO:2 的多肽;
- (b) 表达 IGS3 多肽的重组细胞, 优选地表达 SEQ ID NO:2 的重组细胞;
- (c) 表达 IGS3 多肽的细胞膜, 优选地表达 SEQ ID NO:2 的细胞膜; 或
- (d) 针对 IGS3 多肽的抗体, 优选地 SEQ ID NO:2 的抗体。

应当理解在任一此类试剂盒中, (a)、(b)、(c)或(d)可包括其基本成分。

## 预防和治疗方法

本发明提供了治疗与 IGS3 活性过量或不足有关的反常情况的方法。

如果 IGS3 活性过度, 可采用一些方法。一种方法包括将如上所述的抑制剂化合物(拮抗剂)与药学可接受的载体一起以有效量施与受试者, 通过阻断配体与 IGS3 的结合, 或通过抑制与 RAMP 多肽或第二信号的相互作用, 从而抑制活化作用, 由此缓解反常情况。

在另一种方法中, 可施用 IGS3 多肽的可溶形式, 其仍可与内源的 IGS3 竞争地结合配体。此类竞争物的一般实施方案包括 IGS3 多肽片段。

还有另一种方法, 编码内源 IGS3 的基因之表达可用表达-阻断技术抑制。公知的此类技术涉及反义序列的使用, 该反义序列或在内部产生, 或单独施用。见例如, O'Connor, 神经化学杂志 (J Neurochem) (1991) 56: 560 寡脱氧核苷酸作为基因表达的反义抑制剂 (Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression), CRC Press, Boca Raton, 美国佛罗里达 (1988)。另外, 可提供能与基因形成三股螺旋的寡核苷酸。见例如, Lee 等人, 核酸研究 (1979) 6: 3073; Cooney 等人, 科学 (1988) 241: 456; Derven 等人, 科学, (1991) 251: 1360。这些寡聚物本身是可施用的, 或者可在体内表达相关的寡聚物。合成的反义或三链寡核苷酸可含有经修饰的碱基或经修饰的主链。后者的实例包括甲基磷酸酯、硫代磷酸酯或肽核酸主链。在反义或三链寡核苷酸中掺入此类主链, 以保护不受核酸酶的降解, 并且为本领域周知。合成的具有这些或其它经修饰主链的反义或三链分子也形成了本发明的一部分。

此外, 可使用对 IGS3 mRNA 序列特异的核酶阻止 IGS3 多肽的表达。

核酶是具有酶活性的 RNA，其可为天然的或合成的（见例如 Usman,N. 等人，结构生物学最新观点（Curr.Opin.Struct.Biol.）(1996)6(4),527-33）。合成的核酶可设计为在所选位点特异地切割 IGS3 mRNA，由此阻止 IGS3 mRNA 翻译为功能多肽。可用天然的核糖磷酸主链和天然碱基合成核酶，正如通常在 RNA 分子中所见。另外，可用非天然的主链合成核酶，以提供免受核酸酶降解的保护，例如 2'-O-甲基 RNA，并且可含有经修饰的碱基。

为治疗与 IGS3 和其活性低表达相关的反常情况，也可采用一些方法。一种方法包括将活化 IGS3 的化合物（即上述的激动剂）与药学可接受的载体组合以治疗有效量施与受试者，以因此减轻反常情况。另外，可使用基因治疗，以实现受试者体内的相关细胞产生内源 IGS3。例如，如上所讨论的，本发明的多核苷酸可被基因工程设计，以便在复制缺陷的逆病毒载体中表达。然后可分离该逆病毒表达构建体并将其导入包装细胞，其中包装细胞用含有编码本发明多肽的 RNA 的逆病毒质粒载体转导，使得包装细胞现在可产生含有目标基因的感染性病毒粒子。这些生产者细胞可施与受试者用于体内构建细胞，并在体内表达多肽。基因治疗的综述见人分子遗传学（Human Molecular Genetics）一书中第 20 章，基因治疗和其它基于分子遗传的治疗方法（Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches）（并且此处引用作为参考），Strachan T. 和 Read A.P., BIOS Scientific Publishers Ltd(1996)。

上述任一治疗方法可用于任一需要此类治疗的受试者，包括例如，哺乳动物如狗、猫、牛、马、兔、猴以及最优选地，人。

### 制剂及施用

肽，例如 IGS3 多肽的可溶形式，以及激动剂和拮抗剂肽或小分子，可与合适的药物载体组合而形成制剂。此类制剂包括治疗有效量的多肽或化合物，以及药学可接受的载体或赋形剂。制剂应该为适于施用的模式，并且在本领域的技术范围内。本发明进一步涉及药学包装和试剂盒，

它们含有用一种或多种本发明的上述组合物之成分填充的一个或多个容器。

本发明的多肽和其它化合物可单独使用，或与其它化合物，如治疗化合物结合。

对药物组合物进行系统施用的优选形式包括注射，一般通过静脉内注射。也可用其它注射途径，例如皮下注射、肌内注射或腹腔内注射。用于系统施用的其它途径包括使用渗透剂（如胆汁盐或夫西地酸或其它去污剂）经粘膜和经皮肤施用。此外，如果存在合适的肠制剂或胶囊制剂，也可口服施用。

所需的剂量范围依赖于对肽或化合物的选择、施用途径、制剂的性质、受试者情况的性质和主治开业医生的决定。合适的剂量范围为 0.1-100 $\mu$ g/kg 受试者。但鉴于许多化合物是可得到的，以及不同的施用途径具有不同的有效性，可以预计所需剂量存在大的差异。例如，可以预计口服施用与静脉内注射比较，前者需要较高的剂量。这些剂量水平间的差异可用标准的日常经验调整优化，这一点为本领域周知。

用于治疗的多肽也可在受试者体内内源地产生，在治疗形式上通常称为如上所述的“基因治疗”。这样例如，来自受试者的细胞可用多核苷酸（如 DNA 或 RNA）基因工程改造，以离体编码多肽，以及例如，通过逆病毒质粒载体的使用。然后将细胞导入受试者。

下列实施例只用于进一步较详细地说明本发明，因此这些实施例无论如何不用于限制本发明的范围。

## 实施例 1. 编码新的 G 蛋白偶联受体之 cDNA 克隆

实施例 1a. 基因组片段的同源 PCR 克隆，其中基因组片段编码新的 G 蛋白偶联受体（GPCR）。

基于 PCR 的同源克隆策略用于分离部分基因组 DNA 序列，其中所述基因组 DNA 序列编码新的 G 蛋白偶联受体（GPCR）。分别在神经紧张素受体基因家族（Vita N. et al. (1993) *Febs Lett.* 317:139-142; Vita N. et al., (1998) *Eur. J. Pharmacol.* 360:265-272）跨膜结构域 2（TM2）的保守

区内以及跨膜结构域3与胞内环n<sup>o</sup>2(TM3/12)交界处设计下列正向(F20)和反向(R42, R43)简并PCR引物:

F20 (I1/TM2):

5'-CTGCACTACCACGTGCTC(A或T)(G或C)(A,C,G或T)(C或T)T(A,C,G或T)GC-3'  
(SEQ ID NO: 3)

R42 (TM3/I2):

5'-GGGTGGCAGATGGCCA(A或G)(A或G)(C或T)A(A,C,G或T)C(G或T)(C或T)TC(C或  
肌苷)(C,G或T)  
(SEQ ID NO: 4)

R43 (TM3/I2):

5'-GTGGCAGATGGCCAGGCAGCG(A或G)TC(A,C,G或T)(A或G)C(A或G)CT(A,G或T)-3'  
(SEQ ID NO: 5)

为了抑制已知神经紧张素受体家族成员的扩增, 这样选择引物 R42 和 R43 的 3' 末端 (ultimate) 核苷酸位置, 使得其既不与人 NTR1 cDNA (R42) 互补, 也不与 NTR1 和 NTR2 的 cDNA (R43) 相应位置互补。

于 60 $\mu$ l 体积中进行最初的 PCR 反应, 其中含有 100ng 人基因组 DNA (Clontech)、6 $\mu$ l Gene Amp<sup>TM</sup> 10 $\times$ PCR 缓冲液 II (100mM Tris-HCl pH8.3; 500mM KCl, Perkin Elmer)、3.6 $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>、0.36 $\mu$ l dNTP(每种 dNTP 25mM)、1.5 单位 AmpliTaq<sup>TM</sup> 聚合酶 (Perkin Elmer)、每条简并的正向 (F20) 和反向引物 (R42) 各 30pmole。反应管于 95 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 然后进行 35 个循环的变性 (95 $^{\circ}$ C, 1 分钟)、退火 (55 $^{\circ}$ C, 2 分钟) 和延伸 (72 $^{\circ}$ C, 3 分钟)。最后于 72 $^{\circ}$ C 加热反应管 10 分钟。

对于半巢式 PCR 反应, 使用初步 PCR 反应的 1/50 稀释液 1 $\mu$ l 作为模板, 分别使用简并性正向和反向引物 F20 和 R43。在如初步 PCR 反应相同的条件下进行半巢式 PCR 反应。

用琼脂糖凝胶对半巢式 PCR 反应产物的大小进行分离, 并用溴化乙锭染色。用 Qiaex-II<sup>TM</sup> 纯化试剂盒 (Qiagen Inc.) 鉴别并纯化凝胶上  $\pm$  220bp 的片段, 并按照供应商 (pGEM-T 试剂盒 Promega) 推荐步骤连接至 pGEM-T 质粒。这样产生的重组质粒用于转化感受态大肠杆菌 SURE<sup>TM</sup>2 细菌 (Stratagene)。将转化的细胞铺于含氨苄青霉素

(100µg/ml) 的 LB 琼脂平板。利用 Qiagen-tip20 miniprep 试剂盒 (Qiagen) 从单菌落微型培养物中纯化质粒 DNA。利用插入的侧翼 (insert-flanking), 用 ABI Prism BigDye™ 终止末端循环测序反应试剂盒 (PE-ABI) 进行 DNA 测序反应。通过 EtOH/NaOAc 沉淀来纯化循环测序反应产物并上样于 ABI 373 自动测序仪。

针对公共结构域序列数据库 (Blastn; Altschul S.F. et al., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402) 的计算机辅助的 HNT1370 克隆之插入序列的同源性检索显示, 其编码 (部分) 的 GPCR 家族的新成员。尽管 HNT1370 已经从 ±220bp 片段中克隆, 作为克隆 artefact 的结果, 插入序列的大小仅为 130bp。我们称此新 GPCR 序列为 IGS3。

表 3: 所用的寡引物总览

SEQ ID NO: 3	F20: 5'-CTGCACTACCACGTGCTC(A 或 T)(G 或 C)(A,C,G 或 T)(C 或 T)T(A,C,G 或 T)GC -3'
SEQ ID NO: 4	R42: 5'-GGGTGGCAGATGGCCA(A 或 G)(A 或 G)(C 或 T)A(A,C,G 或 T)C(G 或 T)(C 或 T)TC(C 或 肌苷)(C,G 或 T)
SEQ ID NO: 5	R43: 5'-GTGGCAGATGGCCAGGCAGCG(A 或 G)TC(A,C,G 或 T)(A 或 G)C(A 或 G)CT(A,G 或 T) -3'
SEQ ID NO: 6	IP11969: 5'GGGGCCGACTTCCTCCTCCTGCTTCC-3'
SEQ ID NO: 7	IP12008: 5'-GCAAGGTAGGCACAGGTCATCACAGTGG-3'
SEQ ID NO: 8	IP12936: 5'-ATAAGCTTCTCCCTGGCCCTTAATAAATGAC-3'
SEQ ID NO: 9	IP12937: 5'-AGGAATTCAGACAGACAGGGGCAAAGTTG-3'

### 实施例 1b. 含有完整 IGS3 编码序列的 cDNA 片段之克隆

通过人基因组文库的杂交筛选获得 IGS3 的完整编码序列。用 IGS3 特异性探针杂交筛选构建于 λEMBL3 SP6/T7 噬菌体载体中的人基因组 DNA 文库 (Clontech # HL1067)。探针来自 130bp 的 PCR 片段, 其从 HNT 1355 质粒 (含有与 HNT1370 相同的插入片段) 利用 IGS3 特异性引物 IP 11969 (SEQ ID NO: 6) 和 IP 12008 (SEQ ID NO: 7) 扩增。

(图 1) 利用 Qiaex-II™ 纯化试剂盒 (Qiagen) 从凝胶中纯化 130bp 的片段, 利用 Prime-It II 试剂盒 (Stratagene) 按照厂商的指示, 通过 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 随机引发的掺入到比活性大于 10<sup>9</sup>cpm/ $\mu$ g 进行标记。根据 Clontech 的  $\lambda$ 文库使用指南 (PT1010-1), 用 130bp 探针筛选了大约 550, 000 噬斑。对三个阳性噬斑 ( $\lambda$ -IGS3.1,  $\lambda$ -IGS3.3,  $\lambda$ -IGS3.5) 进行噬斑纯化, 从如 Maniatis et al. (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition (1989), CSH Laboratory Press) 所述的小规模液体培养物中制备。

利用 IGS 3 特异性引物的重组噬菌体 DNA 序列分析显示, 所有 3 个  $\lambda$  克隆的插入片段含有编码新的推定的 330 个氨基酸的 (无内含子的) GPCR (假定的翻译起始之前为一个符合读框的终止密码子)。PCR 扩增后将 IGS3 编码序列亚克隆入质粒载体。采用 Expand™ 高保真 PCR 系统 (Boehringer) 由 IP12936 (SEQ ID NO: 8) 和 IP12937 (SEQ ID NO: 9) 寡核苷酸引物对分离的  $\lambda$ -IGS3.1、 $\lambda$ -IGS3.3 和  $\lambda$ -IGS3.5 噬菌体 DNA (500ng) 进行 PCR。反应管于 95℃ 加热 2 分钟, 然后进行 35 个循环的变性 (95℃, 30 秒)、退火 (58℃, 30 秒) 和延伸 (72℃, 1 分钟)。最后有一个于 72℃ 的延长步骤 (10 分钟)。从凝胶中纯化  $\pm$ 1200bp 的 PCR 产物, 连接入 pGEM-T 载体。重组 DNA 用于转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ F' 菌株。由此产生细菌克隆 HB4971, HB4972 (均从  $\lambda$ -IGS3.1 亚克隆), HB4973, HB4974 (均从  $\lambda$ -IGS3.3 亚克隆) 以及 HB4975, HB4976 (均从  $\lambda$ -IGS3.5 亚克隆)。所有质粒克隆的插入片段均完全测序。所有序列数据的汇合产生了一个共有序列, 其证实了存在有一个 330 个氨基酸的长的开放阅读框, 其编码一种推定的新 GPCR 受体 (IGS3) (图 1)。IGS3 的共有 cDNA 和蛋白质序列在此分别表示为 IGS3DNA (SEQ ID NO: 1) 和 IGS3PROT (SEQ ID NO: 2)。利用 IGS3DNA 序列的 DNA 数据库之同源检索显示, 有一个 EST 序列 (登录号 AF003828) 其与 IGS3DNA 在 3' 末端部分重叠 (图 1)。

带有质粒 HNT4971 (包含 IGS3DNA 序列) 的细菌菌株在含有 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂上重新铺板后再次克隆, 并保藏于

**Innogenetics N.V. 菌株目录(ICCG4319)以及“真菌菌种保藏中心(CBS)”**  
**(Barrn, 荷兰) (保藏号 102196)。质粒 DNA 从再克隆分离株中制备,**  
**重新测定插入片的序列, 发现与 IGS3DNA 序列相同。**

序列表

<110> SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V.

<120> 人G-蛋白偶联受体

<130> SPW 99.07

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1176

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (149)..(1138)

<400> 1

```

ttaatctctt caagcctctg atttcctctc ctgtaaaaca ggggcggtaa ttaccacata 60
acaggctggt catgaaaatc agtgaacatg cagcaggtgc tcaagtcttg tttttgtttc 120
caggggcacc agtggagggt ttctgagc atg gat cca acc acc ccg gcc tgg      172
                Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp
                1                5
gga aca gaa agt aca aca gtg aat gga aat gac caa gcc ctt ctt ctg      220
Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu
    10                15                20
ctt tgt ggc aag gag acc ctg atc ccg gtc ttc ctg atc ctt ttc att      268
Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile
    25                30                35                40
gcc ctg gtc ggg ctg gta gga aac ggg ttt gtg ctc tgg ctc ctg ggc      316
Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly
                45                50                55
ttc cgc atg cgc agg aac gcc ttc tct gtc tac gtc ctc agc ctg gcc      364
Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala
                60                65                70
ggg gcc gac ttc ctc ttc ctc tgc ttc cag att ata aat tgc ctg gtg      412
Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val
    75                80                85

```

tac	ctc	agt	aac	ttc	ttc	tgt	tcc	atc	tcc	atc	aat	ttc	cct	agc	ttc	460
Tyr	Leu	Ser	Asn	Phe	Phe	Cys	Ser	Ile	Ser	Ile	Asn	Phe	Pro	Ser	Phe	
	90					95					100					
ttc	acc	act	gtg	atg	acc	tgt	gcc	tac	ctt	gca	ggc	ctg	agc	atg	ctg	508
Phe	Thr	Thr	Val	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Met	Leu	
105					110					115					120	
agc	acc	gtc	agc	acc	gag	cgc	tgc	ctg	tcc	gtc	ctg	tgg	ccc	atc	tgg	556
Ser	Thr	Val	Ser	Thr	Glu	Arg	Cys	Leu	Ser	Val	Leu	Trp	Pro	Ile	Trp	
				125					130					135		
tat	cgc	tgc	cgc	cgc	ccc	aga	cac	ctg	tca	gcg	gtc	gtg	tgt	gtc	ctg	604
Tyr	Arg	Cys	Arg	Arg	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Ala	Val	Val	Cys	Val	Leu	
			140					145					150			
ctc	tgg	gcc	ctg	tcc	cta	ctg	ctg	agc	atc	ttg	gaa	ggg	aag	ttc	tgt	652
Leu	Trp	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Leu	Glu	Gly	Lys	Phe	Cys	
		155					160					165				
ggc	ttc	tta	ttt	agt	gat	ggg	gac	tct	ggg	tgg	tgt	cag	aca	ttt	gat	700
Gly	Phe	Leu	Phe	Ser	Asp	Gly	Asp	Ser	Gly	Trp	Cys	Gln	Thr	Phe	Asp	
	170					175					180					
ttc	atc	act	gca	gcg	tgg	ctg	att	ttt	tta	ttc	atg	gtt	ctc	tgt	ggg	748
Phe	Ile	Thr	Ala	Ala	Trp	Leu	Ile	Phe	Leu	Phe	Met	Val	Leu	Cys	Gly	
185					190					195					200	
tcc	agt	ctg	gcc	ctg	ctg	gtc	agg	atc	ctc	tgt	ggc	tcc	agg	ggg	ctg	796
Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Leu	Cys	Gly	Ser	Arg	Gly	Leu	
				205					210					215		
cca	ctg	acc	agg	ctg	tac	ctg	acc	atc	ctg	ctc	aca	gtg	ctg	gtg	ttc	844
Pro	Leu	Thr	Arg	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Phe	
			220					225					230			
ctc	ctc	tgc	ggc	ctg	ccc	ttt	ggc	att	cag	tgg	ttc	cta	ata	tta	tgg	892
Leu	Leu	Cys	Gly	Leu	Pro	Phe	Gly	Ile	Gln	Trp	Phe	Leu	Ile	Leu	Trp	
		235				240						245				
atc	tgg	aag	gat	tct	gat	gtc	tta	ttt	tgt	cat	att	cat	cca	ggt	tca	940
Ile	Trp	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Cys	His	Ile	His	Pro	Val	Ser	
	250					255					260					
gtt	gtc	ctg	tca	tct	ctt	aac	agc	agt	gcc	aac	ccc	atc	att	tac	ttc	988
Val	Val	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Ser	Ser	Ala	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Phe	
265					270					275					280	
ttc	gtg	ggc	tct	ttt	agg	aag	cag	tgg	cgg	ctg	cag	cag	ccg	atc	ctc	1036
Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	Lys	Gln	Trp	Arg	Leu	Gln	Gln	Pro	Ile	Leu	
				285					290					295		
aag	ctg	gct	ctc	cag	agg	gct	ctg	cag	gac	att	gct	gag	gtg	gat	cac	1084
Lys	Leu	Ala	Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln	Asp	Ile	Ala	Glu	Val	Asp	His	
			300					305					310			

agt gaa gga tgc ttc cgt cag ggc acc ccg gag atg tcg aga agc agt 1132  
 Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser  
           315                                  320                                  325

ctg gtg tagagatgga cagcctctac ttccatcaga tatatgtg 1176  
 Leu Val  
       330

<210> 2  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 2  
 Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn  
   1                                  5                                  10                                  15

Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile  
                                   20                                  25                                  30

Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn  
                                   35                                  40                                  45

Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe  
   50                                  55                                  60

Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys  
   65                                  70                                  75                                  80

Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val Tyr Leu Ser Asn Phe Phe Cys Ser  
                                   85                                  90                                  95

Ile Ser Ile Asn Phe Pro Ser Phe Phe Thr Thr Val Met Thr Cys Ala  
                                   100                                  105                                  110

Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Met Leu Ser Thr Val Ser Thr Glu Arg Cys  
                                   115                                  120                                  125

Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Arg His  
   130                                  135                                  140

Leu Ser Ala Val Val Cys Val Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu  
   145                                  150                                  155                                  160

Ser Ile Leu Glu Gly Lys Phe Cys Gly Phe Leu Phe Ser Asp Gly Asp  
                                   165                                  170                                  175

Ser Gly Trp Cys Gln Thr Phe Asp Phe Ile Thr Ala Ala Trp Leu Ile  
 180 185 190  
 Phe Leu Phe Met Val Leu Cys Gly Ser Ser Leu Ala Leu Leu Val Arg  
 195 200 205  
 Ile Leu Cys Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Leu Thr  
 210 215 220  
 Ile Leu Leu Thr Val Leu Val Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Gln Trp Phe Leu Ile Leu Trp Ile Trp Lys Asp Ser Asp Val Leu  
 245 250 255  
 Phe Cys His Ile His Pro Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Asn Ser  
 260 265 270  
 Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Lys Gln  
 275 280 285  
 Trp Arg Leu Gln Gln Pro Ile Leu Lys Leu Ala Leu Gln Arg Ala Leu  
 290 295 300  
 Gln Asp Ile Ala Glu Val Asp His Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser Leu Val  
 325 330

<210> 3  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 简并性引物

<220>  
 <221> 变化  
 <222> (21)  
 <223> A, C, G或T

<220>  
 <221> 变化  
 <222> (24)  
 <223> A, C, G或T

<400> 3  
 ctgcactacc acgtgctcws nytngc

26

<210> 4  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 简并性引物

<220>  
<221> 变化  
<222> (21)  
<223> A, C, G或T

<220>  
<221> 变化  
<222> (27)  
<223> C或 肌昔

<400> 4  
gggtggcaga tggccarrya nckytcnb

28

<210> 5  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 简并性引物

<220>  
<221> 变化  
<222> (25)  
<223> A, C, G或T

<400> 5  
gtggcagatg gccaggcagc grtcnrcret d

31

<210> 6  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 6  
ggggccgact tcctcttct ctgcttcc

28

<210> 7  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列的描述: 引物  
  
<400> 7  
gcaaggtagg cacaggtcat cacagtgg 28

<210> 8  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列的描述: 引物  
  
<400> 8  
ataagcttct ccctggcct taataaatga c 31

<210> 9  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列的描述: 引物  
  
<400> 9  
aggaattcag acagacaggg gcaaagttg 29

# 说明书附图

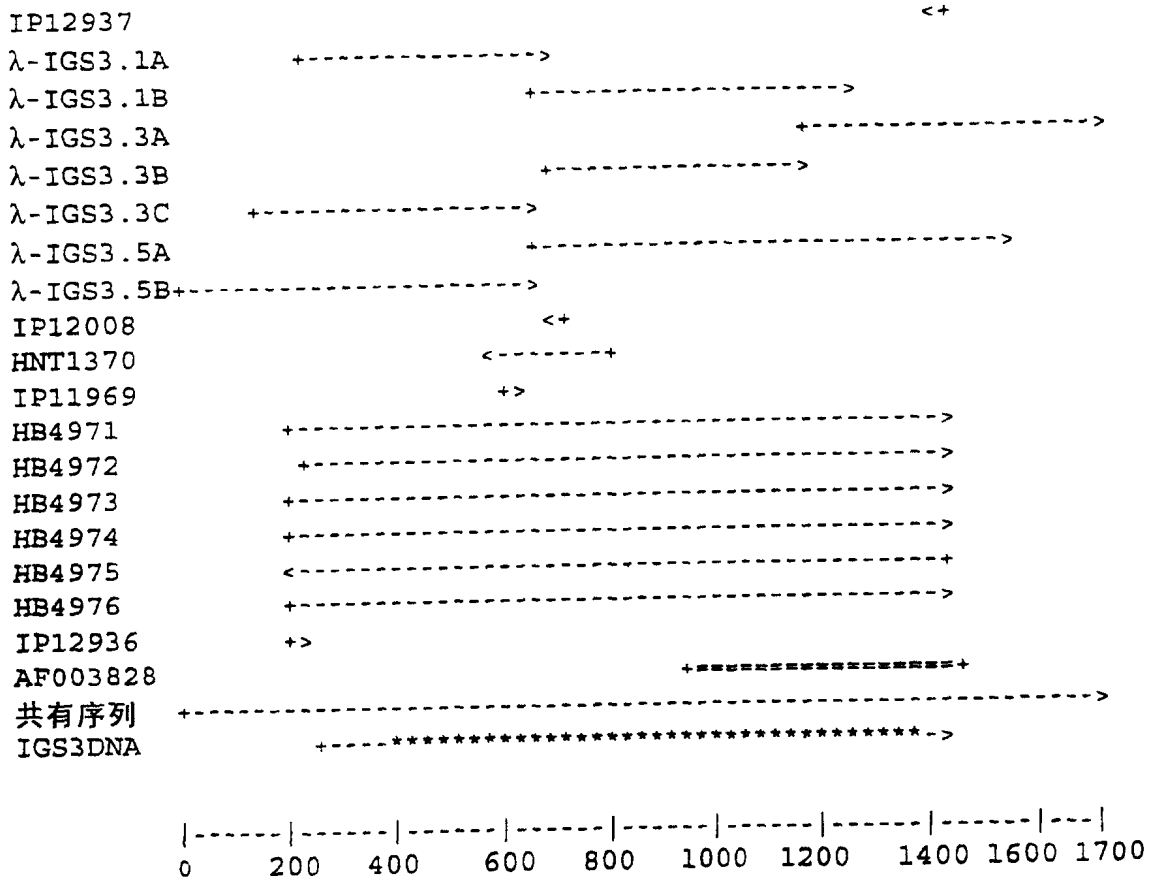


图1

专利名称(译)	人G - 蛋白偶联受体		
公开(公告)号	<a href="#">CN1379816A</a>	公开(公告)日	2002-11-13
申请号	CN00814366.8	申请日	2000-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	索尔瓦药物有限公司		
申请(专利权)人(译)	索尔瓦药物有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	索尔瓦药物有限公司		
[标]发明人	W德勒尔斯尼德尔 G尼斯 N德赫瓦尔特		
发明人	W·德勒尔斯尼德尔 G·尼斯 N·德赫瓦尔特		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/00 A61K31/70 A61K31/7088 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P13/12 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/19 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P1/00 A61P3/10 A61P13/12 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/723		
优先权	1999203014 1999-09-16 EP 1013062 1999-09-16 NL		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及IGS3 G - 蛋白偶联受体家族和编码该IGS3蛋白质的多核苷酸。本发明也涉及对此类多核苷酸和多肽之作用的抑制或活化,涉及含有该多核苷酸的载体、含有该载体的宿主细胞以及非人转基因动物,其中IGS3基因为过度表达、错表达、表达不足或被抑制(敲除动物)。本发明进一步涉及筛选化合物的方法,其中所述化合物能作为该G - 蛋白偶联受体家族IGS3的激动剂或拮抗剂,以及IGS3多肽和多核苷酸以及IGS3受体家族的激动剂或拮抗剂在广泛的疾病治疗以及用于这些疾病诊断性检验中的用途。

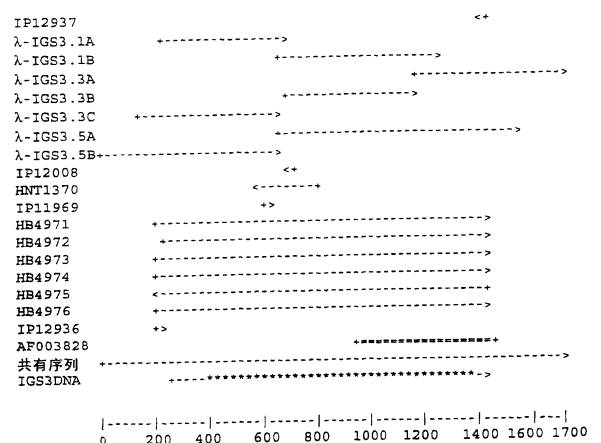


图1