

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4594623号
(P4594623)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C O 7 K	14/47 (2006.01)	C O 7 K	14/47
C O 7 K	7/06 (2006.01)	C O 7 K	7/06
C O 7 K	7/08 (2006.01)	C O 7 K	7/08

請求項の数 21 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-584089 (P2003-584089)
(86) (22) 出願日	平成15年4月10日(2003.4.10)
(65) 公表番号	特表2005-528894 (P2005-528894A)
(43) 公表日	平成17年9月29日(2005.9.29)
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/011159
(87) 国際公開番号	W02003/087134
(87) 国際公開日	平成15年10月23日(2003.10.23)
審査請求日	平成18年4月4日(2006.4.4)
(31) 優先権主張番号	60/372,640
(32) 優先日	平成14年4月12日(2002.4.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	596129215 シェーリング コーポレイション Schering Corporation アメリカ合衆国 ニュージャージー 07 033-0530, ケニルワース, ギャロ ッピング ヒル ロード 2000
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質共役レセプターリガンドおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

S P 9 1 5 5 レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法であって：
 (a) 標識した既知量の S P 9 1 5 5 レセプターリガンドの存在下で、該アゴニストまたはアンタゴニストの存在について試験するサンプルと、配列番号 2 または配列番号 2 0、あるいは、一つまたは数個のアミノ酸置換、欠失、または付加により配列番号 2 または配列番号 2 0 から誘導されるポリペプチドで表され、そして活性化された場合に細胞内カルシウム移動を誘導する機能を有する、S P 9 1 5 5 レセプターとを接触する工程であって、該リガンドは、ペプチドのカルボキシ末端に - アルギニン - フェニルアラニン - アミドモチーフを含む R F - アミドペプチドであり、該 - アルギニン - フェニルアラニン - アミドモチーフは、配列番号 4 または 1 3 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの R F G (^K / _R) モチーフにおけるタンパク質分解切断から得られる、工程；および
 (b) 該レセプターに特異的に結合した該リガンドの量を測定する工程、
 を包含し、該サンプルは、該レセプターへの該標識リガンドの結合の、該サンプルの非存在下で測定される結合と比較しての実質的な減少を測定することによりアンタゴニストまたはアゴニストを含むことが同定される、方法。

【請求項2】

前記標識リガンドが、配列番号 5 ~ 1 1 および 1 5 ~ 1 8 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項3】

10

20

前記レセプターが、配列番号2または配列番号20のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記レセプターの供給源が、該レセプターを含む哺乳動物細胞から単離された膜を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

SP9155レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法であって：
 (a) 既知量のSP9155レセプターリガンドの存在下で、該アゴニストまたはアンタゴニストの存在について試験するサンプルと、配列番号2または配列番号20、あるいは、一つまたは数個のアミノ酸置換、欠失、または付加により配列番号2または配列番号20から誘導されるポリペプチドで表され、そして活性化された場合に細胞内カルシウム移動を誘導する機能を有する、SP9155レセプターを発現する細胞とを接触する工程であって、該リガンドは、ペプチドのカルボキシ末端にアルギニン-フェニルアラニン-アミドモチーフを含むRF-アミドペプチドであり、該アルギニン-フェニルアラニン-アミドモチーフは、配列番号4または13に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのRFG(^K/_R)モチーフにおけるタンパク質分解切断から得られる、工程；および

(b) 該細胞によるカルシウム移動を測定する工程、
 を包含し、該サンプルは、該サンプルの非存在下で測定される移動と比較しての実質的なカルシウム移動の減少を測定することによりアンタゴニストを含むことが同定され、そして該サンプルの非存在下で測定される移動と比較しての実質的なカルシウム移動の増加を測定することによりアゴニストを含むことが同定される、方法。

【請求項6】

前記標識リガンドが、配列番号5～11および15～18から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記レセプターが、配列番号2または配列番号20のアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記カルシウム移動が、カルシウムとカルシウム指示薬を接触させ、次いで、該指示薬の蛍光を測定することにより測定される、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

前記カルシウム指示薬が、1-[2-アミノ-5-(2,7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキシ-9-キサントニル)フェノキシ]-2-(2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸、ペンタアセトキシメチルエステルである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

ポリペプチドを生成する方法であって、配列番号4または配列番号13由来の7以上の連続するアミノ酸を含むポリペプチドをコードする核酸を含む組み換えベクターを含む宿主細胞を、該核酸が発現される条件下で培養する工程を包含し、該ポリペプチドは、該ポリペプチドのカルボキシ末端に-アルギニン-フェニルアラニン-アミドモチーフを含み、該-アルギニン-フェニルアラニン-アミドモチーフは、配列番号4または13に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのRFG(^K/_R)モチーフにおけるタンパク質分解切断から得られる、方法。

【請求項11】

前記発現されたポリペプチドが、前記培養物から単離される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

請求項2に記載の方法であって、前記標識リガンドが、配列番号11で示されるアミノ酸配列を含み、前記SP9155レセプターは、配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

請求項 6 に記載の方法であって、前記標識リガンドが、配列番号 11 で示されるアミノ酸配列を含み、前記 SP9155 レセプターは、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 14】

配列番号 13 で示されるアミノ酸配列のうちの 11 以上の連続する残基を含む、単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、該ポリペプチドのカルボキシ末端に - アルギニン - フェニルアラニン - アミドモチーフを含み、該 - アルギニン - フェニルアラニン - アミドモチーフは、配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの RFG (^K / _R) モチーフにおけるタンパク質分解切断から得られる、単離されたポリペプチド。

10

【請求項 15】

配列番号 15 ~ 18 から選択されるアミノ酸配列を含むか、または配列番号 5 ~ 11 から選択されるメンバーで示されるアミノ酸配列からなる、単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、ペプチドのカルボキシ末端に - アルギニン - フェニルアラニン - アミドモチーフを含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 16】

免疫原性のキャリア分子に結合された、請求項 14 または 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号 5 で示されるアミノ酸配列からなる、請求項 15 に記載の単離されたポリペプチド。

20

【請求項 18】

配列番号 6 で示されるアミノ酸配列からなる、請求項 15 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 19】

配列番号 7 で示されるアミノ酸配列からなる、請求項 15 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 20】

配列番号 17 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の単離されたポリペプチド。

30

【請求項 21】

配列番号 18 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の単離されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、現在係属している、2002年4月12日に出願された合衆国仮出願第60/372,640号の利益を主張し、この仮出願は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【0002】

40

(発明の分野)

本発明は、Gタンパク質共役レセプターおよびこのレセプターに結合するリガンドの同定に関する。より詳細には、本発明は、このレセプターのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニングシステムにおいて、このレセプターを用いる方法に関する。本発明はまた、このレセプターの新規なペプチドリガンド、このペプチドリガンドをコードする核酸、ならびにこのペプチドリガンドを作製および用いる方法に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

Gタンパク質共役レセプター(GPCR)は、ホルモン、神経伝達物質、および局所メ

50

ディエイタを含む、それらの機能におけるように構造が変動する非常に多様なシグナル伝達分子（このリストは、タンパク質および小ペプチド、ならびにアミノ酸および脂肪酸誘導体を含む）に対する細胞応答を媒介する。

【0004】

それらに結合するシグナル伝達分子の化学的および機能的多様性にかかわらず、DNA配列決定研究からそのアミノ酸配列が知られているすべてのGタンパク質共役レセプターは、類似の構造を有し、そしてほぼ確実に進化的に関連している。それらは、脂質二重層を通過して7回往復する単一のポリペプチド鎖からなる。このレセプターファミリーのメンバーは、それらのアミノ酸配列のみならず、それらが、細胞外リガンドが存在する細胞の内部にメッセージを送信するGタンパク質とのそれらの機能的相関関係を保存している。

10

【0005】

Gタンパク質共役レセプターは、すべての細胞の表面膜上に存在する薬物標的の重要なクラスであり、そして、痛みコントロールおよび鎮痛、喘息、炎症、肥満、癌、心臓血管疾患、代謝疾患、ウイルス疾患、免疫調節疾患、胃腸管疾患および中枢神経系疾患を含む、広範な範囲の治療カテゴリーと関連している。ヒトゲノム中には、潜在的な治療有用性をもつ、1,000を超えるGPCRがあると推定されている。GPCRは、歴史的に価値ある薬物標的であるが、現在まで、既知のリガンドで良く特徴付けられたほんの約200のGPCRが存在するに過ぎず、そのうち、ほんの約半分が、市販薬物の現在の標的である。それに対するリガンドが同定されていない残りのGPCRは、代表的には、「オーファンGPCR」と称されている。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

特に重要なオーファンGPCRは、hRUP4レセプターであり、以後本明細書では、SP9155レセプターと称される。このSP9155はまた、vc-38_1、AXOR16およびGP103と称されている。このレセプターのアミノ酸配列は、例えば、PCT/US99/19351(WO00/11015)、PCT/US99/240625(WO00/22131)、PCT/US99/23687(WO00/31258)、PCT/US00/16869(WO00/78809)、PCT/JP00/05684(WO01/16316)およびPCT/JP00/09409(WO01/48189)を含むいくつかの国際出願において従前に開示されている。しかし、これらの刊行物は、SP9155レセプターの対するリガンドは開示していない。このSP9155レセプターは、orexinA、orexinBおよびNPFFレセプターに相同性のアミノ酸配列を有する。orexinA、orexinBレセプターは、肥満のような代謝疾患に關与することが示されている(Shiraishira(2000)、Physiol.Behav.71:251~61;Mondalら(1999)Neurosci.Lett.273:45~48およびDunら(2000)Regul.Pept.96:65~70)。NPFFレセプターは、痛みコントロールおよび鎮痛に關与することが示されている(Lakeら(1991)Neurosci.Lett.132:29~32;Kavaliersら(1992)Peptides13:603~607およびDongら(2001)Cell106:619~632)。従って、SP9155レセプターに対するリガンドの同定は、代謝障害および神経学的障害のために開発する治療において潜在的に有用であり得る。

30

40

【0007】

神経ペプチドは、哺乳動物を含む大部分の生物の神経系におけるシグナル伝達分子として用いられるGPCRリガンドの1つの治療的に重要なクラスである。例えば、RFアミド神経ペプチドは、心臓興奮(Greenbergら(1979)、Am.Zoologist19:163~167およびGroomeら(1994)Biol.Bull.186:309~318)、筋肉収縮のコントロール(Bowmanら(1996)Peptides17:381~387およびFrankhsら(1994)Parasit

50

ology 108:229~236)、無脊椎動物における神経調節(Brownleeら(1955)Parasitology 111:379~384およびCottrellら(1983)Nature 304:638~640)および脊椎動物における抗オピオイド効果(Kavaliereら(1985)Neuroendocrinology 40:533~535およびYangら(1985)Prog.Clin.Biol.Res.192:313~322)を含む多様な機能を有することが示されている。従って、RF-アミド類が結合するようなGPCRの同定はまた、潜在的な治療剤を開発することで有用であり得る。

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

本発明者らは、オーファンGPCR SP9155に対するリガンドを同定することによって先行するニーズを指向し、これは、このレセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングするための方法を可能にする。さらに、本発明者らはまた、SP9155に対する新規なペプチドリガンド、およびこのSP9155リガンドをコードするcDNAを同定した。

【0009】

本発明は、SP9155のアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法を提供し、(a)SP9155またはその機能的フラグメントを、既知量の標識されたSP9155リガンドの存在下、上記アゴニストまたはアンタゴニストの存在について試験されるべきサンプルと接触する工程；および(b)このレセプターに特異的に結合したリガンドの量を測定する工程を包含する。この方法では、サンプルは、サンプルの非存在下で測定され得る結合と比較して、このレセプターへの上記リガンドの実質的に減少した結合を測定することによって、アゴニストまたはアンタゴニストを含むと同定される。好ましくは、このリガンドは、配列番号4~11または13~18のいずれかのアミノ酸配列を含む。好ましくは、このポリペプチドは、カルボキシ末端でアミド化されている。好ましくは、このレセプターは、配列番号2または配列番号20のアミノ酸配列を含む。好ましくは、SP9155レセプターの供給源は、このレセプターを発現する哺乳動物細胞から単離された膜である。

【0010】

本発明はまた、SP9155レセプターまたはその機能的フラグメントのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法を提供し、(a)既知量のSP9155リガンドの存在下、このレセプターを発現する細胞を、上記アゴニストまたはアンタゴニストの存在について試験されるサンプルと接触する工程；および(b)この細胞によるカルシウム移動を測定する工程を包含する。この方法では、サンプルは、このサンプルの非存在下で測定され得るカルシウム移動と比較して、実質的に減少したカルシウム移動を測定することによってアンタゴニストを含むと同定され、そしてサンプルは、このサンプルの非存在下で測定され得るカルシウム移動と比較して、実質的に増加したカルシウム移動を測定することによってアゴニストを含むと同定される。好ましくは、細胞によるこのカルシウム移動は、カルシウムを、カルシウム指示薬、例えば、1-[2-アミノ-5-(2,7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキシ-9-キサンテニル)フェノキシ]-2-(2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸、ペンタアセトキシメチルエステル(Flour-3-AM)と接触すること、および次にこの指示薬の蛍光を測定することによって測定される。好ましくは、上記リガンドは、配列番号4~11または13~18のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドである。好ましくは、このポリペプチドは、カルボキシ末端でアミド化されている。好ましくは、SP9155レセプターは、配列番号2または配列番号20のアミノ酸配列を含む。

【0011】

本発明は、マウスおよびヒトの両方からのRFアミド前駆体を提供し、これは、配列番号3および4に、および配列番号12および13に、それぞれ提示されるアミノ酸配列お

10

20

30

40

50

よびヌクレオチド配列を含む。このヒトおよびマウス前駆体は、各々、いくつかのより小さな、好ましくは抗原性ペプチドである内部ペプチドを含み、これは、好ましくは、配列番号5～11および12～18のいずれかに提示されるアミノ酸配列を含む。このヒト前駆体は、脳、心臓および肝臓組織中で発現される。また提供されるのは、配列番号4（ヒト前駆体）および13（マウス前駆体）から選択されるアミノ酸配列の7つ以上の連続残基を含む、単離された抗原性のポリペプチドである。好適な実施形態では、このポリペプチドは標識されている。このポリペプチドは、非改変または改変（例えば、アミド化）カルボキシ末端を含み得る。本発明はまた、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体分子を含む。

【0012】

本発明はまた、前駆体ポリペプチド（配列番号4または配列番号13）をコードする単離された核酸を提供し、これは、好ましくは、配列番号3または配列番号12にそれぞれ提示されるヌクレオチド配列を含む。また提供されるのは、抗原性ポリペプチド、好ましくは、配列番号4（ヒト前駆体）および13（マウス前駆体）から選択されるアミノ酸配列の7つ以上の連続残基を含む抗原性ポリペプチドをコードする単離された核酸である。好ましくは、この核酸は、配列番号3または配列番号12に提示されるヌクレオチド配列からの21以上の連続するヌクレオチドを含む。

【0013】

本発明は、本発明の核酸を含む組換えベクター、およびこのベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。

【0014】

マウスSP9155レセプター（例えば、配列番号19および20）およびその任意の機能的フラグメントは、配列番号20に提示されるアミノ酸配列からの7つ以上の連続する残基を含むペプチド、およびこのペプチドをコードする核酸（例えば、配列番号19に提示されるヌクレオチド配列からの21以上の連続するヌクレオチドを含む核酸）とともに、本発明のさらなる部分である。

【0015】

本発明は、本発明のポリペプチドを作製する方法をさらに提供し、本発明のベクターを含む宿主細胞を、このベクター中に存在する核酸が発現される条件下で培養する工程を包含する。好ましくは、このポリペプチドはこの培養から単離される。

本発明はまた、配列番号4および13から選択されるアミノ酸配列の7つ以上の連続する残基を含む抗原性ペプチドを、このペプチドを認識する抗体分子と結合する方法を提供し、このペプチドを、この抗体分子と接触する工程を包含する。

【0016】

本発明はまた、SP9155レセプターによって媒介される被験体における医療状態を処置または予防する方法を提供し、この被験体に、本発明のポリペプチドを認識する抗体分子を、薬学的に受容可能なキャリアとともに含む組成物を、投与する工程を包含する。この方法は、痛みまたは肥満のような医療状態を処置するために用いられ得る。

【0017】

本発明のRFアミドペプチドは、とりわけ、ヒトSP9155レセプター（例えば、配列番号1および2；WO00/11015、WO00/22131、WO00/31256、WO00/78809、WO01/16316およびWO01/48189もまた参照のこと）またはマウスSP9155レセプター（例えば、配列番号19および20）のようなGタンパク質共役レセプター（GPCR）を結合およびその活性を調節するために有用であり得る。このヒトSP9155レセプターは、脳、心臓、腎臓および結腸組織中で発現される。本発明のRFアミドはまた、ヒトおよびマウス前駆体または任意のそのサブ配列を認識する抗体分子の生成のための抗原性ペプチドとして用いられ得る。

【発明を実施するための最良の形態】**【0018】**

（発明の詳細な説明）

10

20

30

40

50

(アッセイ)

本発明は、SP9155レセプターのそのリガンドへの結合によって媒介される、代謝障害(例えば、糖尿病)またはCNS状態(例えば、痛み)のような種々の医療状態の処置および管理において有用であり得る、SP9155レセプターまたはその機能的フラグメントのアゴニストおよびアンタゴニスト発見のためのアッセイを含む。

【0019】

詳細には、SP9155レセプターまたはその機能的フラグメント、および本発明のRF-アミドペプチドリガンドが、このようなスクリーニング方法において採用され得る。本質的に、これらの方法は、SP9155レセプター(例えば、配列番号2または配列番号20)またはその機能的フラグメントを、SP9155リガンド(例えば、配列番号4~11および13~18のいずれか、またはその任意のサブ配列)およびSP9155レセプターアゴニストまたはアンタゴニストの存在について試験されるサンプルと接触することを包含する。

10

【0020】

「サンプル」または「候補物質」は、例えば、SP9155レセプター(例えば、配列番号2または配列番号20)またはその機能的フラグメントとアゴナイズまたはアンタゴナイズする能力に対する試験またはアッセイで評価される組成物をいう。サンプルは、小分子、ペプチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、亜原子粒子および照射(例えば、ペプチド、ペプチド、照射、X線)および抗体分子を含み得る。

【0021】

アンタゴニストおよびアゴニストは、SP9155レセプター(例えば、配列番号2または配列番号20)またはその機能的フラグメントの、RFアミドペプチド(例えば、配列番号4~11および13~18のいずれか、またはその任意のサブ配列)のようなリガンドに結合する能力を調節し得るか、および/またはSP9155レセプターまたはその機能的フラグメントが細胞内シグナル(例えば、Gタンパク質結合、カルシウム移動)を生成する能力を調節し得る。

20

【0022】

スクリーニングシステムの2つの基礎的タイプ、標識リガンド結合アッセイおよび「機能的」アッセイが好ましい。結合アッセイにおける使用のための標識リガンドは、SP9155レセプターリガンド(例えば、配列番号4~11および13~18のいずれか、またはその任意のサブ配列)または公知のSP9155レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを、検出可能な標識(例えば、 ^{125}I または ^3H)で標識することによって得られ得る。代表的には、本発明のSP9155レセプター(例えば、配列番号2または配列番号20)の所定量を、増加する量の標識リガンド(例えば、 ^3H -p52)と接触し、そして洗浄によって非結合標識リガンドを除去した後、結合した標識リガンドの量を測定する。標識リガンドの量が増加するにつれ、最終的に、すべてのレセプター結合部位が占領または飽和される点に到達する。標識リガンドの特異的レセプター結合は、非標識リガンドの大過剰によってなくなる。

30

【0023】

好ましくは、標識リガンドのレセプターの非特異的結合が最小であるアッセイシステムが用いられる。非特異的結合は、代表的には標識リガンドの総結合の50%より少なく、好ましくは15%より少なく、そしてより好ましくは10%より少ない。

40

【0024】

用語「SP9155レセプターリガンド」は、本発明のRFアミド、例えば、表1(例えば、配列番号4~11または13~18のいずれか)に提示されるような、またはその任意のアナログを含む。この用語はまた、配列番号4から、または配列番号13からの7以上の連続するアミノ酸を含む任意のアミノ酸を含む(以下に論議される)。好ましくは、これらペプチドは、カルボキシ末端がアミド化されている。

【0025】

原則的に、本発明の結合アッセイは、本発明の可溶性レセプター(例えば、E.coli

50

i 発現系から標準的な方法による産生および再折り畳み後)を用いて実施され得、そして得られるレセプター-標識リガンド複合体は、例えば、このレセプターに対する抗体を用いて沈殿され得る。次いで、この沈殿は、洗浄され得、そして結合した標識リガンドの量が測定され得る。

【0026】

しかし、好ましくは、本発明のSP9155レセプターをコードする核酸は、適切な宿主細胞(例えば、HEK293またはCHO)中に形質転換またはトランスフェクトされ、それによって、このレセプターは、細胞の膜中に取り込まれるようになる。次いで、膜フラクションが細胞から単離され、そしてアッセイのためのレセプターの供給源として用いられ得る。好ましくは、標識リガンドの非トランスフェクト宿主細胞からの膜フラクションへの特異的結合は無視し得る。

10

【0027】

本発明の結合アッセイは、SP9155レセプターまたはその機能的フラグメントのアゴニストおよびアンタゴニストの両方を同定するために用いられ得る。なぜなら、一般に、両者は、標識リガンドのレセプターへの結合を調節するからである。

【0028】

基礎的な結合アッセイでは、SP9155レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法は、(a)SP9155レセプター(例えば、配列番号2、配列番号20またはその機能的フラグメント)を、既知量のSP9155レセプターリガンド(例えば、配列番号4~11および13~18のいずれか、またはその任意の部分配列)の存在下、サンプルと接触する工程;および(b)このレセプターに特異的に結合したリガンドの量を測定する工程を包含する。

20

【0029】

サンプルは、サンプルの非存在下で測定され得るレセプターへのリガンドの結合と比較して、実質的に減少したレセプターへのリガンドの結合を測定することによってアゴニストまたはアンタゴニストを含むと同定され得る。

【0030】

本発明の1つの実施形態では、先行する方法は、別のコントロール実験であるさらなる工程:(c)SP9155レセプターまたはその機能的フラグメントを、既知量の標識リガンドの存在下、SP9155レセプターアゴニストまたはアンタゴニストであることが知られる化合物と接触する工程;および(d)このレセプターに結合した標識リガンドの量を測定する工程を包含する。

30

【0031】

細胞または機能的アッセイもまた、サンプルがSP9155レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを含むか否かを決定するために用いられ得る。これらのアッセイでは、サンプルが、SP9155レセプター(例えば、配列番号2または配列番号20)によって媒介される細胞パラメータを調節する能力が評価され;このようなパラメータは、制限されないで、公開された方法を用いる、レセプターを経由して活性化される細胞内のセカンドメッセンジャー経路、細胞増殖速度における変化、ホルモンの分泌、カルシウムの移動などを含む。このような方法の例は、フォルスコリンで刺激される細胞内cAMP産生のレセプター媒介阻害に対するリガンドの影響(Parkerら、(1995)Mol. Brain Res. 34:179~189)、レセプター刺激されるCa²⁺移動および細胞分裂効果(Sethiら(1991)Cancer Res. 51:1674~1679)、およびイノシトールリン酸産生およびMAPキナーゼ誘導(Wangら(1998)Biochemistry 37:6711~17)の測定を包含する。好ましい実施形態では、SP9155レセプターを発現する細胞中のカルシウム移動が、例えば、Zhangら(2001)Journal of Biol. Chem. 276(11):8608~8615に記載されるような、蛍光定量イメージングプレートリーダー(FLIPLR)アッセイを用いて決定される。一般に、このFLIPLRアッセイは:(a)SP9155レセプター(例えば、配列番号2、配列番号20またはその機能的フラグメン

40

50

ト)を発現する細胞(例えば、HEK293細胞またはCHO細胞)を、既知量のSP9155レセプターリガンド(例えば、配列番号4~11および13~18のいずれか、またはその任意の部分配列)の存在下、サンプルと接触する工程;および(b)この細胞によるカルシウム移動を測定する工程を包含する。

【0032】

カルシウム移動は、細胞を、Fluor-3-Am(Molecular Probes; Eugene, OR; 1-[2-アミノ-5-(2,7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキシ-9-キサンテニル)フェノキシ]-2-(2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸、ペンタアセトキシメチルエステルのようなカルシウム指示薬に曝すことによって測定され得る。Ca²⁺の存在下、この指示薬は蛍光を発する。この蛍光は、例えば、蛍光定量イメージングプレートリーダーで細胞を分析することにより検出され得る。

10

【0033】

サンプルは、サンプルの非存在下で測定され得るカルシウム移動と比較して、実質的に減少したカルシウム移動を測定することによりアンタゴニストを含むとして同定され得、そしてサンプルは、サンプルの非存在下で測定され得るカルシウム移動と比較して、実質的に増加したカルシウム移動を測定することによりアゴニストを含むとして同定され得る。

【0034】

(分子生物学)

本発明のポリペプチドおよび核酸のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、以下の表1に要約されるような配列表に見られる。

20

【0035】

【表1】

表1. 本発明のポリペプチドおよび核酸

ポリペプチドまたはポリヌクレオチド	配列の識別子
ヒトSP9155ヌクレオチド配列	配列番号1
ヒトSP9155アミノ酸配列	配列番号2
ヒトRFアミドペプチド前駆体	配列番号3

30

ヌクレオチド配列	
ヒトRFアミドペプチド前駆体アミノ酸配列	配列番号 4
ヒトP51アミノ酸配列 *(80-88) ‡(238-264)	配列番号 5
ヒトP242アミノ酸配列 *(73-88) ‡(217-264)	配列番号 6
ヒトP552アミノ酸配列 *(61-88) ‡(181-264)	配列番号 7
ヒトP52アミノ酸配列 *(127-133) ‡(379-399)	配列番号 8
ヒトP513アミノ酸配列 *(126-133) ‡(376-399)	配列番号 9
ヒトP517アミノ酸配列 *(125-133) ‡(373-399)	配列番号 10
ヒトP518アミノ酸配列 *(108-133) ‡(322-399)	配列番号 11
マウスRFアミドペプチド前駆体ヌクレオチド配列	配列番号 12
マウスRFアミドペプチド前駆体アミノ酸配列	配列番号 13
マウスP51アミノ酸配列 *(71-77) ‡(211-231)	配列番号 14
マウスP52アミノ酸配列 *(116-122) ‡(346-366)	配列番号 15
マウスP513アミノ酸配列 *(115-122) ‡(343-366)	配列番号 16
マウスP517アミノ酸配列 *(114-122) ‡(340-366)	配列番号 17
マウスP518アミノ酸配列 *(97-122) ‡(289-366)	配列番号 18
マウスSP9155ヌクレオチド配列	配列番号 19

マウスSP9155アミノ酸配列	配列番号 20
-----------------	---------

10

20

30

40

50

代表的には、前駆体は、例えば、インピボで、プロテアーゼ（例えば、フリンプロテアーゼまたはプロホルモンコンバターゼ）によって、認識部位で切断され、カルボキシ末端 Arg - Phe (RF) モチーフを含む RF アミドペプチドを生じる。このカルボキシ末端は、次いで、細胞内アミダーゼによってアミド化され、Arg - Phe - C(=O) - NH₂ (RF アミド) モチーフを生成する。配列番号 4 ~ 11 および 13 ~ 18 のいずれかのアミノ酸配列をもつペプチドは、遊離の非改変カルボキシ末端または、好ましくは、アミド化されたカルボキシ末端を含み得る。

【0036】

「*」によってマークされる配列番号 5 ~ 11 の行中の括弧内の数字は、それらペプチドが由来したヒト前駆体（配列番号 4）の部分を示す。同様に、「*」によってマークされる配列番号 14 ~ 18 の行中の括弧内の数字は、それらペプチドが由来したマウス前駆体（配列番号 13）の部分を示す。「‡」によってマークされる括弧の数字は、示されたペプチドをコードする対応ヒトまたはマウス前駆体遺伝子のヌクレオチドを示す。

【0037】

配列番号 3 および 12 に提示されるヌクレオチド配列は、デオキシリボヌクレオチドであるが、対応するリボヌクレオチド配列を含む核酸もまた、本発明の範囲内である。配列番号 3 および 12 のアンチセンス鎖またはその任意のサブ配列を含む核酸もまた、本発明の範囲内にある。

【0038】

いくつかのコード単一ヌクレオチド多形 (cSNP) が、ヒト SP9155 遺伝子中で同定されている。各 cSNP (すなわち、g154a - G52S; t181g - F61V; t206g - V69G; g208t - V70L; t447g - H149Q; g748t - G250C; t1031c - L344S; c1111t - R371W; g1162a - G388R および c1228t - L410F) は配列表に提示されている。さらに、いくつかの cSNP がヒト前駆体で同定されている。配列表に提示されている各 cSNP は、以下の表 2 に要約される。

【0039】

【表 2】

表 2. ヒト前駆体におけるコーディングの単一ヌクレオチド多型

cSNP (配列番号 3)	アミノ酸配列の変化 (配列番号 4)
76: g または c	26: Gln または Glu
103: g または a	35: Arg または Gly
139: c または t	47: Pro または Ser
203: t または a	68: His または Leu
239: a または g	80: Gly または Glu

本発明によれば、当該技術内の従来分子生物学、微生物学、および組換え DNA 技法が採用され得る。このような技法は、文献中に詳細に説明されている。例えば、Sambrook、Fritsch & Maniatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York (本明細書では、「Sambrookら、1989」); DNA Cloning: A Practical Approach、I 巻および II 巻 (D. N. Glover 編、1985); Oligonucleotide Syn

10

20

30

40

50

thesis (M. J. Gait 編、1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins 編 (1985)); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins 編 (1984)); Animal Cell Culture (R. I. Freshney 編 (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press、(1986)); B. Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel (編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、Inc. (1994) を参照のこと。

10

【0040】

本発明の目的には、用語「RFアミド」または「RFアミドペプチド」または「RFアミドポリペプチド」は、本発明の任意のペプチド（例えば、表1を参照のこと）、またはその任意の形態にあるアナログを含む。例えば、この用語は、アミド化カルボキシ末端をもつペプチドおよび非改変カルボキシ末端をもつペプチドを含む。

【0041】

用語「SP9155」または「SP9155レセプター」は、ヒトレセプター（例えば、配列番号1および2）およびマウスレセプター（例えば、配列番号19および20）を含む。

【0042】

用語「被験体」または「患者」は、任意の生物、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、イヌ、ネコ、ウシ、チンパンジー、ゴリラ）そして最も好ましくはヒトをいう。

20

【0043】

本発明は、本発明のRFアミドペプチドの組換えバージョンを含む。用語「組換え」は、天然には連続しておらず、そして互いに融合している2つ以上の核酸またはタンパク質を記載し得る。この用語はまた、人為的に改変されている（例えば、翻訳後改変または変異）核酸またはタンパク質に言及し得る。例えば、野生型コドン、同時に、核酸配列認識部位を導入または除去しながら、同じアミノ酸残基をコードする余分のコドンまたは保存的置換で置き換えられ得る。同様に、所望の機能をコードする核酸セグメントは、天然には一緒に見出されない所望に組み合わせをコードする単一の遺伝子実体を生成するために融合され得る。制限酵素認識部位は、しばしば、このような人工的操作の標的であるが、その他の部位特異的な標的、例えば、プロモーター、DNA複製部位、調節配列、制御配列、またはその他の有用な特徴が設計によって取り込まれ得る。以下に説明されるように、検出または精製のためのエピトープタグをコードする配列もまた取り込まれ得る。

30

【0044】

「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」は、DNAまたはRNAのような、核酸中の一連の2つ以上のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも呼ばれる）である。

【0045】

本発明は、表1に提示されるポリヌクレオチド（例えば、配列番号3または12）のいずれかの核酸フラグメントを含む。核酸「フラグメント」は、例えば、配列番号3および12のいずれかからの、少なくとも約12、15、18または21（例えば、22、23または24）、一般に少なくとも約25（例えば、26、27、28、29、30、31、32、33または34）、好ましくは少なくとも約35（例えば、36、37、38、39、40、41、42、43または44）、より好ましくは少なくとも約45（例えば、46、47、48、49、50、51、52、53または54）、そして最も好ましくは少なくとも約55またはそれ以上の連続するヌクレオチド（例えば、56、57、58、59、60、100、200、300、400、500、1000または1200）を含む。

40

50

【0046】

短い核酸配列（例えば、約10ヌクレオチドと約100ヌクレオチドとの間）はまた、「オリゴヌクレオチド」と称され得る。オリゴヌクレオチドは、PCR増幅のためのプライマーとして用いられ得る。本明細書で用いられる、DNAの「増幅」は、DNA配列の混合物内の特定のDNA配列の濃度を増加するためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の使用を意味し得る。PCRの説明には、Saikiら（1988）Science 239:487を参照のこと。オリゴヌクレオチドおよび核酸フラグメントは、例えば、³²P-ヌクレオチド、³H-ヌクレオチド、¹⁴C-ヌクレオチド、³⁵S-ヌクレオチド、またはビオチンのような標識が共有結合されたヌクレオチドの取り込みによって標識され得る。1つの実施形態では、標識オリゴヌクレオチドは、核酸の存在を検出するためのプローブとして用いられ得る。別の実施形態では、オリゴヌクレオチド（1つまたはその両方とも標識され得る）は、PCRプライマーとして、遺伝子の完全長またはフラグメントをクローニングするためであるか、または核酸の存在を検出するためのいずれかで用いられ得る。一般に、オリゴヌクレオチドは、合成によって、好ましくは核酸合成機上で調製される。

10

【0047】

「タンパク質配列」、「ペプチド配列」または「ポリペプチド配列」または「アミノ酸配列」は、タンパク質、ペプチドまたはポリペプチド中の一連の2つ以上のアミノ酸を意味し得る。

【0048】

「タンパク質」、「ペプチド」または「ポリペプチド」は、アミノ酸の連続するストリングを含む。本発明の好適なペプチドは、表1に提示されるもの、およびその改変体（例えば、カルボキシ末端アミデート化改変体）およびそのフラグメントを含む。このようなフラグメントは、配列番号4および13のいずれかからの、好ましくは少なくとも約4、5、6または7（例えば、8、9、10または11）、好ましくは少なくとも約12（例えば、13、14、15、16、17、18または19）、より好ましくは少なくとも約20（例えば、21、22、23、24、25、26、27、28または29）、そして最も好ましくは少なくとも約30（例えば、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90、100、124または136）またはそれ以上の連続するアミノ酸残基を含む。以下に論議されるように、このようなペプチドは、RFアミドペプチド前駆体ペプチド（例えば、配列番号4および13）またはその任意のフラグメントを認識する抗体分子を生成するための抗原として有用であり得る。

20

30

【0049】

本発明のポリペプチドは、インタクトなペプチドのタンパク質分解切断によるか、化学的合成によるか、または組換えDNA技術の適用により生成され得、そしてタンパク質分解切断部位によって輪郭を描かれるポリペプチドに制限されない。これらペプチドは、単独であるか、それらをより免疫原性にするためにキャリア分子に架橋もしくは結合されるかいずれかで、抗体およびそのフラグメントの産生を惹起するための抗原として有用である。これら抗体は、例えば、免疫アフィニティー精製のためのイムノアッセイなどで用いられ得る。

40

【0050】

用語「単離された核酸」または「単離されたポリペプチド」は、細胞中または組換えDNA発現系中で通常見出されるその他の成分から部分的または完全に分離されている、RNAまたはDNA分子または混合ポリマーのような核酸、またはポリペプチドをそれぞれ言及し得る。これらの成分は、制限されないで、細胞膜、細胞壁、リボソーム、ポリメラーゼ、血清成分、および隣接ゲノム配列を含む。従って、この用語は、その天然に存在する環境から取り除かれている核酸を含み得、そして組換えまたはクローン化DNA単離物、および化学的に合成されたアナログもしくは外来系によって生物学的に合成されたアナログを含み得る。

【0051】

50

単離された核酸またはポリペプチドは、好ましくは、本質的に分子の均一な組成物であるが、ある程度の不均一性を含み得る。

【0052】

用語「実質的に純粋」は、起源生物または組換えDNA発現系に由来するその他の汚染するタンパク質、核酸、およびその他の生物学的成分がないRFアミドペプチド、核酸またはその他の物質をいい得る。純度は、標準的方法によってアッセイされ得、そして代表的には、少なくとも約50%を超え、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%（例えば、約100%）純度を超える。純度評価は、質量ベースまたは分子ベースでなされ得る。

【0053】

本発明はさらに、表1に提示されるタンパク質および核酸に同一性または類似性を保有するアミノ酸または核酸配列をそれぞれ有するタンパク質および核酸を包含する。配列「同一性」は、比較されている2つの配列のヌクレオチドまたはアミノ酸間の正確な一致をいう。配列「類似性」または「相同性」は、比較されている2つのポリペプチドのアミノ酸間の正確な一致に加え、非同一の生化学的に関連するアミノ酸間の一致の両方をいう。生化学的に関連するアミノ酸は、類似の性質を共有し、そして相互交換可能である。相互交換可能であり得る類似の性質をもつアミノ酸は、当該分野で周知である。例えば、相互交換可能であり得る極性/親水性アミノ酸は、アスパラギン、グルタミン、セリン、システイン、スレオニン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含み；相互交換可能であり得る非極性/疎水性アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含み；相互交換可能であり得る酸性アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含み、そして相互交換可能であり得る塩基性アミノ酸は、ヒスチジン、リジンおよびアルギニンを含む。

【0054】

配列「同一性」および「類似性」は、公知の方法によって容易に算出され得、制限されないで、(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第I部, Griffin, A.M. および Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991; および Carillo, Hら (1988), SIAM J. Applied Math., 48:1073に記載のようなものを含む。同一性を算出する好ましい方法は、試験される配列間の最大的一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公衆に利用可能なコンピュタープログラムに体系化されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュタープログラム方法は、制限されないで、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J.ら, (1984) Nucleic Acid Research 12(1):387)、BestFit、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschul, S.F.ら, (1990) J. Mol. Biol. 215:403~410)を含む。BLASTXプログラムは、NCBIおよびその他の供給源から公に入手可能である (BLAST Manual, Altschul, S.ら, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S.ら, (1990) J. Mol. Biol. 215:403~410)。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた同一性を決定するために用いられ

10

20

30

40

50

得る。

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータ以下を含む：

1) アルゴリズム：Needlemanら、(1970)、J. Mol. Biol. 48 : 443 ~ 453

比較マトリックス：Hentikoffら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 ~ 10919からのBLOSSUM62

ギャップペナルティ：12

ギャップ長さペナルティ：4

これらのパラメータを用いる有用なプログラムは、「ギャップ」プログラムとして、Madison、WIに位置するGenetics Computer Groupから、公に入手可能である。前記のパラメータは、ペプチド比較のためのデフォルトパラメータである（エンドギャップについてペナルティなし）。

ギャッププログラムを用いる、ポリヌクレオチド比較のための好ましいパラメータは以下を含む：

1) アルゴリズム：Needlemanら、(1970)、J. Mol. Biol. 48 : 443 ~ 453

比較マトリックス：マッチ = +10、ミスマッチ = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長さペナルティ：3

本発明は、表1に記載されるポリペプチド（例えば、配列番号4 ~ 11および13 ~ 18）をコードする核酸（例えば、配列番号3および12）およびそれにハイブリダイズする核酸を含む。好ましくは、これら核酸は、低ストリンジェンシー条件下、より好ましくは中程度のストリンジェンシー条件で、そして最も好ましくは高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。核酸分子は、核酸分子の一本鎖形態が温度および溶液イオン強度の適切な条件下でその他の核酸分子にアニールし得るとき、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAのような別の核酸分子に「ハイブリダイズ可能」である（Sambrookら、前述を参照のこと）。温度およびイオン強度の条件は、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。代表的には、低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、55、5 × SSC、0.1% SDS、0.25% ミルク、およびホルムアルデヒドなし；または30%ホルムアミド、5 × SSC、0.5% SDSであり得る。代表的な、中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションが、5 × または6 × SSCで40%ホルムアミド中で実施されるのを除き、低ストリンジェンシー条件に類似している。高ストリンジェンシー条件は、ハイブリダイゼーションが、5 × または6 × SSCで50%ホルムアミド中で実施され得、そして、必要に応じて、より高い温度（例えば、57、59、60、62、63、65 または68）で実施され得るのを除き、低ストリンジェンシー条件に類似している。代表的には、SSCは0.15M NaClおよび0.015Mクエン酸ナトリウムである。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに依存して、塩基間のミスマッチが可能であるが、2つの核酸が相補的配列を含むことを必要とする。ハイブリダイズする核酸の適切なストリンジェンシーは、当該技術分野で周知の変数である、核酸の長さ、および相補性の程度に依存する。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が大きい程、核酸がハイブリダイズし得るストリンジェンシーは高くなる。代表的な、選択的ハイブリダイゼーション条件は、少なくとも約30のヌクレオチドのストレッチに亘り少なくとも約55%、好ましくは少なくとも約25ヌクレオチドに亘り少なくとも約65%、より好ましくは約20ヌクレオチドまたはそれ以上に亘り約75% ~ 約95%またはそれ以上の同一性が存在するとき起こる。長さが100ヌクレオチドより長いハイブリッドには、融点温度を算出するための等式が誘導されている（Sambrookら、前述、9.50 ~ 9.51を参照のこと）。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドでのハイブリダイゼーションには、ミスマッチの位置がより重要になり、そしてこのオリゴヌクレオチドの長さが、その特異性を決定する（Sambrookら、

10

20

30

40

50

前述、11.7~11.8を参照のこと)。

【0055】

2つのポリペプチドをコードする2つの核酸が実質的に同一であるというさらなる指標は、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であることである。代表的には、例えば、2つのペプチドが、主に、保存的置換によって異なる場合、ポリペプチドは、第2のポリペプチドに実質的に同一であると見なされる。

【0056】

本発明にまた含まれるのは、表1の参照ヌクレオチドおよびアミノ酸配列に、少なくとも約70%同一、好ましくは少なくとも約80%同一、より好ましくは少なくとも約90%同一、そして最も好ましくは少なくとも約95%同一(例えば、95%、96%、97%、98%、99%、100%)であるヌクレオチド配列を含む核酸、およびアミノ酸配列を含むポリペプチドである。表1の参照アミノ酸配列(例えば、配列番号4~11および13~18)に、少なくとも約70%類似または同一、好ましくは少なくとも約80%類似または同一、より好ましくは少なくとも約90%類似または同一、そして最も好ましくは少なくとも約95%類似または同一である(例えば、95%、96%、97%、98%、99%、100%)アミノ酸配列を含むポリペプチドもまた、本発明に含まれる。さらに、本発明は、表1に提示されるアミノ酸配列(例えば、配列番号4~11および13~18)に、少なくとも約70%類似または同一、好ましくは少なくとも約80%類似または同一、より好ましくは少なくとも約90%類似または同一、そして最も好ましくは少なくとも約95%類似または同一である(例えば、95%、96%、97%、98%、99%、100%)アミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0057】

いくつかの物理的改変体は、本発明のRFアミドペプチドのアミノ酸配列と実質的なアミノ酸配列相同性を有している。本発明では、アミノ酸配列相同性、または配列同一性は、残基一致を最適化することにより、そして必要であれば、必要に応じてギャップを導入することにより決定され得る。相同性アミノ酸配列は、各個々の配列における、代表的には、天然の対立遺伝子、多形および種間変動を含むことが意図される。代表的な相同性タンパク質またはペプチドは、RFアミドペプチドのアミノ酸配列と、約25~100%の相同性(ギャップが導入され得る場合)から、約50~100%の相同性(保存的置換が含まれる場合)を有する。観察された相同性は、代表的には、少なくとも約35%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約75%、そして最も好ましくは少なくとも約80%またはそれ以上である。Needleham、(1970)ら、J. Mol. Biol. 48:443~453; Sankoffら、Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison, 1983, Addison-Wesley, Reading, MA; および Intelligent Genetics, Mountain View, CA, および University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WIを参照のこと。

【0058】

RFアミドペプチドおよびそのフラグメントをコードする核酸は、標準的な方法によって調製され得る。例えば、DNAは、例えば、Matteucciら(1981)(J. Am. Chem. Soc. 103:3185)のホルホルアミダイト固相支持体法、Yooらの方法(1989)(J. Biol. Chem. 764:17078)、またはその他の周知の方法を用いて化学的に合成され得る。これは、以下に記載のように合成オリゴヌクレオチドのペアを含む一連のオリゴヌクレオチドカセットを連続的に連結することによりなされ得る。

【0059】

当然、遺伝子コードの縮重に起因して、多くの異なるヌクレオチド配列が、本発明のR

10

20

30

40

50

Fアミドペプチドをコードし得る。そのコドンは、原核系または真核系における最適な発現について選択され得る。このような縮重改変体もまた、当然、本発明により包含される。さらに、本発明のRFアミドペプチドをコードする核酸は、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、ヌクレオチド挿入、およびヌクレオチドストレッチの反転により容易に改変され得る。このような変更は、野生型ペプチドと共通の免疫原性活性または抗原活性を有する抗原をコードする新規のDNA配列を生じ得る。これらの改変された配列は、野生型または変異ペプチドを生成するため、あるいは、組み換えDNA系における発現を増強するために使用され得る。

【0060】

本発明の核酸は、転写（例えば、プロモーター；上述）、翻訳（例えば、Kozak配列（Kozak（1991）*J. Biol. Chem.* 255:19867-19870 またはKozak（1991）*J. Cell. Biol.* 115:887-903）、および/またはDNA複製（例えば、複製起点（例えば、ori））を制御するDNAセグメントに作動可能に連結され得る。

10

【0061】

核酸は、その配列が、コードする配列からRNA（好ましくは、mRNA）（次いで、RNAスプライシングを受け得（イントロンを含む場合）、そして必要に応じて、コード配列によりコードされるタンパク質に変換される）への、RNAポリメラーゼ媒介転写を指示する場合、転写および/または翻訳制御配列「の制御下にある」、「と機能的に関連している」、「と作動可能に連結されている」、または「と作動可能に関連している」。

20

【0062】

用語「発現する」および「発現」は、遺伝子、RNA、またはDNA配列の情報を具現化する（例えば、対応する遺伝子の転写および翻訳に關与する細胞機能を活性化させることによってタンパク質を生成する）ことを意味し得る。あるいは、遺伝子は、インビトロで発現され得；その遺伝子を含むDNAは、組み換えRNAポリメラーゼにより転写され得、そして、必要に応じて、例えば、ウサギ網状赤血球溶解物（Promega Corporation; Madison, WI）により翻訳される。DNA配列は、細胞中もしくは細胞により発現されるかまたはインビトロで発現され、「発現産物」（例えば、RNA（例えば、mRNA）またはタンパク質）を形成する。発現産物自体もまた、「発現される」と言及され得る。

30

【0063】

本発明の核酸を挿入し得るベクターとしては、微生物プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組み込み型DNAフラグメント、および宿主のゲノムへの核酸の導入を容易にし得る他のビヒクルが挙げられ得る。プラスミドは、最も一般的に使用される形態のベクターであるが、類似の機能を発揮し、当該分野で公知であるかまたは公知となる全ての他の形態のベクターが、本明細書中での使用に適している。例えば、Pouwelsら、*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985 および *Supplements*, Elsevier, N.Y. および Rodriguezら（編）、*Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, 1988, Butterworth, Boston, MAを参照のこと。

40

【0064】

RFアミドペプチドをコードするDNAまたはSP9155レセプターもしくはその機能的フラグメントコードするDNAの、ベクターへの挿入は、DNAおよびベクターの両方の末端が、適合する制限部位を含む場合、容易に達成される。そうでない場合、DNAおよび/またはベクターの両方の末端を、制限エンドヌクレアーゼ切断により生成される一本鎖DNAオーバーハングを消化して平滑末端にすることによって改変するか、または適切なDNAポリメラーゼ（例えば、Klenow）で一本鎖末端を充填することにより同じ結果を達成する必要がある。あるいは、所望の部位は、例えば、その末端にヌクレオチド配列（リンカー）をライゲートすることにより生成され得る。このようなリンカ

50

ーは、所望の制限部位を定義する特定のオリゴヌクレオチドを含み得る。制限部位はまた、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用することによって作成され得る。例えば、S a i k i ら, Science 239:487(1988)を参照のこと。切断されたベクターおよびDNAフラグメントはまた、ホモポリマーテーリングにより必要とされる場合、改変され得る。

【0065】

本発明において使用される組み換え発現ベクターは、代表的に、RFアミドペプチドもしくはSP9155またはそれらの機能的フラグメントをコードする核酸を含む自律複製DNAまたはRNA構築物であり、通常、適合する宿主細胞における核酸の発現を調節し得る適切な遺伝子制御エレメントに作動可能に連結される。遺伝子制御エレメントとして
10
は、原核生物プロモーター系または真核生物プロモーター発現制御系が挙げられ得、代表的には、転写プロモーター、および転写の開始を制御する選択的プロモーター、mRNA発現のレベルを上昇させる転写エンハンサー、適切なりボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳を終結させる配列が挙げられる。遺伝子発現を制御するのに使用され得るプロモーターとしては、トリプトファン (trp) プロモーター系 (G o e d d e l ら, (1980) Nucleic Acids Res. 8:4057)、P
Lプロモーター系 (S h i m a t a k e ら, (1981) Nature 292:128)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (米国特許第5,385,839号および同第5,168,062号) SV40初期プロモーター領域 (B e n o i s t ら, (1981) Nature 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端
20
反復に含まれるプロモーター (Y a m a m o t o ら, Cell (1980) 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (W a n g e r ら, (1981) P
r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 78:1441-1445)、メタロプロテイン遺伝子の調節配列 (B r i n s t e r ら, (1982) Nature 296:39-42)、
-ラクタマーゼプロモーター (V i l l a - K o m a r o f f ら, (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731)、またはtacプロモーター (D e B o e r ら, (1983) Proc. Natl. A
c a d . S c i . U S A 80:21-25)が挙げられるがこれらに限定されない(「U
s e f u l p r o t e i n s f r o m r e c o m b i n a n t b a c t e r i a
」, S i c e n t i f i c A m e r i c a n (1980) 242:74-94もまた参
30
照のこと); 酵母または他の真菌由来のプロモーターエレメント(例えば、Gal4プロモーター、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、またはアルカリホスファターゼプロモーター)もまた、本発明の核酸に作動可能に連結され得る。発現ベクターはまた、宿主細胞から独立してベクターの複製を可能にする複製機起点を含み得る。

【0066】

用語「宿主細胞」は、細胞による物質の精製(例えば、細胞による、遺伝子、DNAまたはRNA分子、ベクター、タンパク質、または酵素の発現または複製により)のために、任意の方法で選択、修飾、トランスフェクト、形質転換、増殖、または使用もしくは操
40
作される任意の生物の任意の細胞を意味し得る。好ましい宿主細胞としては、細菌細胞(例えば、E. coli(例えば、BL21(DE3)、DH5、またはHB101))および真核生物細胞(例えば、HEK293細胞またはCHO細胞)が挙げられる。

【0067】

用語「形質転換」は、細胞への核酸(例えば、配列番号3もしくは12、それらのフラグメント、または配列番号4~11および13~18もしくはその任意のフラグメントをコードする核酸)の導入をいう。導入遺伝子または配列は、「クローン」と呼ばれ得る。導入DNAまたはRNAを受け取る宿主細胞は、「形質転換」されており、そして「形質
転換体」または「クローン」である。宿主細胞に導入されるDNAまたはRNAは、任意の供給源由来であり、その宿主細胞と同じ属もしくは種の細胞、または異なる属もしくは
50
種の細胞が挙げられる。

【0068】

本発明のRFアミドペプチドをコードする核酸の発現は、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかにおいて、従来法により実施され得る。原核生物系においてはE. coli 宿主細胞が最も頻繁に用いられるが、多くの他の細菌（例えば、Pseudomonas および Bacillus の種々の株）が当該分野で公知であり、同様に使用される。RFアミドペプチドもしくはSP9155レセプターまたはそれらの機能的フラグメントをコードする核酸を発現するために適した宿主細胞としては、原核生物および高等真核生物が挙げられる。原核生物は、グラム陰性生物およびグラム陽性生物（例えば、E. coli および B. subtilis）の両方を含む。高等真核生物としては、動物細胞（例えば、非哺乳動物起源（例えば、昆虫細胞および鳥類細胞）および哺乳動物起源（例えば、ヒト、霊長類、および齧歯類）の両方）から構築された組織培養細胞株を含む。

10

【0069】

原核生物宿主-ベクター系としては、多くの異なる種に対する広範な種々のベクターが挙げられる。DNA増幅のための代表的なベクターは、pBR322または多くのその誘導体（例えば、pUC18または19）である。RFアミドペプチドを発現するのに使用され得るベクターとしては、lacプロモーター（pUCシリーズ）；trpプロモーター（pBR322-trp）；Ippプロモーター（pINシリーズ）；pPまたはpRプロモーター（pOTS）；またはハイブリッドプロモーター（例えば、ptac（pDR540）を含むベクターが挙げられるがこれらに限定されない。Brosiusら、「Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and Ipp-derived Promoters」, Rodriguez and Denhardt (編), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Butterworth, Boston, pp. 205-236を参照のこと。本発明のペプチドは、米国特許第4,952,496号、同第5,693,489号、および同第5,869,320号ならびにDavanloo, P.ら,(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2035-2039; Studier, F.W.ら,(1986) J. Mol. Biol. 189:113-130; Rosenberg, A.H.ら,(1987) Gene 56:125-136; および Dunn, J.J.ら,(1988) Gene 68:259に開示されるようなE. coli/T7発現系において高レベルで発現され得る。

20

30

【0070】

高等真核生物組織培養細胞もまた、本発明のRFアミドペプチドの組み換え生成について使用され得る。任意の高等真核生物組織培養細胞（昆虫バキュロウイルス発現系を含む）が使用されるが、哺乳動物細胞が好ましい。このような細胞の形質転換またはトランスフェクションおよび増殖は慣用的な手順となっている。有用な細胞株の例としては、ヒト胚性腎臓（HEK293）細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、ラット胎仔腎臓（BRK）細胞株、昆虫細胞株、鳥類細胞株、およびサル（COS）細胞株が挙げられる。このような細胞株のための発現ベクターは、通常、複製起点、プロモーター、翻訳開始部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および/または転写終結部位を含む。これらのベクターはまた、選択遺伝子または増幅遺伝子を含む。適切な発現ベクターは、例えば、アデノウイルス、SV40、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、またはサイトメガロウイルスのような供給源由来のプロモーターを含むプラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスであり得る。適切な発現ベクターの代表例としては、pCR（登録商標）3.1、pCDNA1、pCD（Okayamaら,(1985) Mol. Cell Biol. 5:1136）、pMC1neo Poly-A（Thomasら,(1987) Cell 51:503）、pREP8、pSVSPORT、およびそれらの誘導体、ならびにバキュロウイルスベクター（例えば、pAC373またはpAC610）が挙げられる。

40

【0071】

50

本発明はまた、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドならびに第2のポリペプチドおよびポリヌクレオチド部分（「タグ」と呼ばれ得る）を含む融合物を含む。本発明の融合物は、表1に示されるポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはそれらの部分配列もしくはフラグメントのいずれかを含み得る。本発明の融合ポリペプチドは、従来法により（例えば、上記のような発現ベクターへの本発明のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントの挿入により）構築され得る。本発明の融合物は、精製または検出を容易にするタグを含み得る。このようなタグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、ヘキサヒスチジン（His₆）タグ、マルトース結合タンパク質（MBP）タグ、ヘマグルチニン（HA）タグ、細胞結合タンパク質（CBP）タグ、およびmycタグが挙げられる。検出可能な標識またはタグ（例えば、³²P、³⁵S、¹⁴C、³H、^{99m}Tc、¹¹¹In、⁶⁸Ga、¹⁸F、¹²⁵I、¹³¹I、^{113m}In、⁷⁶Br、⁶⁷Ga、^{99m}Tc、¹²³I、¹¹¹In、および⁶⁸Ga）もまた、本発明のポリペプチドを標識するのに使用され得る。このような融合物を構築および使用方法は、従来法であり、当該分野で周知である。

10

【0072】

ポリペプチド中に生じる改変（例えば、翻訳後修飾）は、しばしば、それがどのように生成されるかによる。宿主においてクローニング遺伝子を発現することにより作成されるポリペプチドについては、例えば、その改変の性質および程度は、大部分は、宿主細胞の翻訳後修飾能力およびポリペプチドアミノ酸配列中に存在する改変シグナルにより決定される。例えば、周知のように、グリコシル化は、しばしば、細菌宿主（例えば、E. coli）においては生じない。従って、グリコシル化が望まれる場合、ポリペプチドは、宿主（一般的には、真核生物細胞）において発現され得る。昆虫細胞は、哺乳動物細胞と同様に、しばしば、翻訳後修飾を有し得る。この理由から、昆虫細胞発現系は、ネイティブのグリコシル化パターンを有する哺乳動物タンパク質を効果的に発現するために開発される。あるいは、脱グリコシル化酵素が、真核生物発現系において生成される間に付着した炭水化物を除去するのに使用され得る。

20

【0073】

また、他の改変としては、ポリペプチドのカルボキシ末端へのアミドまたは脂肪エステルの付加が挙げられ得る。本発明はまた、非天然アミノ酸残基またはリン酸化アミノ酸残基（例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホスレオニン残基）のような改変を含むRFアミドペプチドのアナログを含む。他の潜在的な改変としては、スルホン酸化、ピオチニル化、または他の部分（特に、リン酸基と類する分子形状を有する部分）の付加が挙げられる。

30

【0074】

本発明のペプチドはまた、環化され得る。詳細には、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端残基または本発明のペプチドの2つの中間残基が融合されて環化ペプチドが生成され得る。好ましくは、環化は、そのペプチドのカルボキシ末端がフリーになるように環化され得る。ペプチドはまた、アミノ末端がフリーになるように環化され得る。ペプチドを環化する方法は従来法であり、当該分野で周知である；例えば、Gurrathら、(1992) Eur. J. Biochem 210: 911-921を参照のこと。

40

【0075】

本発明のRFアミドペプチドは、被験体内でのそのペプチドの半減期を増加させるポリマーに結合され得る。好ましいポリマーとしては、ポリエチレングリコール（PEG）（例えば、2kDa、5kDa、10kDa、12kDa、20kDa、30kDa、または40kDaの分子量を有するPEG）、デキストラン、およびモノメトキシポリエチレングリコール（mPEG）が挙げられる。

【0076】

所定のポリペプチドにおいて、同じタイプの改変が、いくつかの部位において同じ程度でまたは異なる程度で存在し得ることが理解される。また、所定のポリペプチドは、多くのタイプの改変を含み得る。

50

【0077】

本発明のRFアミドペプチドのアナログは、化学合成により、または部位特異的変異誘発(Gillmanら、(1979)Gene 8:81; Robertsら、(1987)Nature, 328:731またはInnis(編)、1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York, NY)もしくはポリメラーゼ連鎖反応法PCR; Saikiら、(1988)Nature 239:487(Daughertyら(1991)(Nucleic Acids Res. 19:2471)により例示される)により調製され、そのペプチドをコードする核酸が改変される。

【0078】

なお他のアナログは、反応性側鎖を通じた架橋タンパク質におけるそれらの有用性のために、当該分野で公知の薬剤の使用によって調製される。架橋剤との好ましい誘導体化部位は、遊離アミノ基またはカルボキシル基、炭水化物基、およびシステイン残基である。

【0079】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、全てのこのような改変(特に、宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現することにより合成されるポリペプチドに存在する改変)を含む。

【0080】

(タンパク質の精製)

代表的に、本発明のペプチドは、培養物中(例えば、培養ブロスのような液体培養物)で増殖される宿主細胞中でポリペプチドをコードする核酸を発現させることにより生成され得る。例えば、核酸は、宿主細胞中に存在するベクター(例えば、プラスミド)の一部であり得る。発現後、本発明のペプチドは、培養細胞から単離され得る。本発明のペプチドは、標準的な方法(塩またはアルコール沈殿、アフィニティクロマトグラフィー(例えば、上記のような精製タグペプチドと合わせて使用される)、調製ディスクゲル電気泳動、等電点電気泳動、高圧クロマトグラフィー(HPLC)、逆相HPLC、ゲル濾過、カチオンおよびアニオン交換ならびに分画クロマトグラフィー、ならびに逆流分布を含むがこれらに限定されない)によって精製され得る。このような精製方法は当該分野で周知であり、例えば、「Guide to Protein Purification」, Methods in Enzymology, Vol. 182, M. Deutscher編、1990, Academic Press, New York, NYに開示されている。

【0081】

精製工程の後に、以下に記載されるようなレセプター結合活性についてのアッセイが実施され得る。特に、RFアミドペプチドが細胞供給源または組織供給源から単離される場合、アッセイ系に、1つ以上のタンパク質分解酵素インヒビター(例えば、フッ化フェニルメタンシルホニル(PMSF)、ペファブロックSC、ペプスタチン、ロイペプチン、キモスタチン、およびEDTA)を含むことが好ましい。

【0082】

(抗体分子)

本発明のRFアミドペプチドの抗原性(すなわち、免疫原性)フラグメントは、本発明の範囲内である(SP9155またはその機能的フラグメントに結合するものもしないもの)。抗原性ペプチドは、RFアミドペプチド前駆体またはその任意のフラグメントを認識する抗体分子を調製するのに有用であり得る。

【0083】

必ずしもそうとは限らないが、RFアミドペプチドが、免疫学的に適合する宿主における抗体産生を誘導する抗原として使用される場合、小さい抗原性のフラグメントは、好ましくは最初に、架橋もしくは濃縮することによって、または免疫原性キャリア分子(すなわち、宿主動物において独立して免疫応答を誘発する特性を有する高分子(例えば、ジフテリア毒素またはテタヌス))と連結することによって、より大きな免疫原性を与えられ

10

20

30

40

50

る。小さいポリペプチドフラグメントは時々、ハプテン（抗体に特異的に結合し得るが、抗体産生を誘発し得ない分子（すなわち、それらは免疫原性ではない））として作用するため、キャリア分子への架橋または結合は、必要となり得る。このようなフラグメントの、免疫原性キャリア分子への結合は、「キャリア効果」として一般的に知られている効果を通して、それらにより大きな免疫原性を与える。

【0084】

キャリア分子としては、例えば、タンパク質および天然または合成ポリマー化合物（例えば、ポリペプチド、多糖、リポ多糖など）が挙げられる。タンパク質キャリア分子は特に好ましくは、キーホールリンペットヘモシアニンおよび哺乳動物血清タンパク質（例えば、ヒトもしくはウシガンマグロブリン、ヒト、ウシ、もしくはウサギ血清アルブミン、またはそのようなタンパク質のメチル化物もしくは他の誘導体が挙げられる）。他のタンパク質キャリアは、当業者に明らかである。好ましくは、タンパク質キャリアは、そのフラグメントに対する抗体が誘発される宿主動物に対して外来性である。

10

【0085】

キャリア分子に対する共有結合カップリングは、当該分野で周知の方法を用いて達成され得；その正確な選択は、使用されるキャリア分子の性質により決定される。免疫原性キャリア分子がタンパク質である場合、本発明のフラグメントは、例えば、水溶性カルボジイミド（例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミドまたはグルタルアルデヒド）を用いて連結され得る。

【0086】

これらのカップリング剤もまた、別個のキャリア分子を使用せずにフラグメントをそれらに架橋するために使用され得る。このような凝集素への架橋もまた、免疫原性を増加させ得る。免疫原性はまた、単独でまたはカップリングもしくは凝集と組み合わせて、公知のアジュバントの使用により増加され得る。

20

【0087】

動物のワクチン接種のためのアジュバントとしては、アジュバント65（ピーナツ油、モノオレイン酸マンニド、およびモノステアリン酸アルミニウムを含む）；フロイント完全または不完全アジュバント；ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、およびミョウバン）；界面活性剤（例えば、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、シロレシチン、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、N, N - ジオクタデシル - N', N' - ビス(2 - ヒドロキシメチル)プロパンジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロール、およびブルロニックポリオール）；ポリアニオン（例えば、ピラン、硫酸デキストラン、ポリIC、ポリアクリル酸、およびカルボボール）；ペプチド（例えば、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、およびタフトシン）；油エマルジョンが挙げられるがこれらに限定されない。ポリペプチドはまた、リポソームまたは他のマイクロキャリアへの組み込み後に投与され得る。

30

【0088】

アジュバントに関する情報および免疫アッセイの種々の局面は、例えば、P. Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, 第3版, 1987, Elsevier, New Yorkによるシリーズに開示されている。ポリクローナル抗血清を調製するための方法を網羅する他の有用な参考文献としては、*Microbiology*, 1969, Hoeber Medical Division, Harper and Row; Landsteiner, *Specificity of Serological Reactions*, 1962, Dover Publications, New York、およびWilliamsら、*Methods in Immunology and Immunochimistry*, Vol. 1, 1967, Academic Press, New Yorkが挙げられる。

40

【0089】

本発明の抗RFアミドペプチド「抗体分子」としては、抗RFアミドペプチド抗体（例

50

えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二特異的抗体、および抗イデオタイプ抗体)およびそのフラグメント(好ましくは、抗原結合フラグメントまたは機能的フラグメント)(例えば、Fab抗体フラグメント、F(ab)₂抗体フラグメント、Fv抗体フラグメント(例えば、V_HまたはV_L)、単鎖Fv抗体フラグメント、およびdsFv抗体フラグメント)が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、本発明の抗体分子は、完全ヒト抗体、マウス抗体、ウサギ抗体、ニワトリ抗体、ヒト/マウスキメラ抗体、またはヒト化抗体であり得る。

【0090】

本発明の抗RFアミドペプチド抗体分子は、好ましくは、本発明のヒトまたはマウスRFアミドペプチドを認識する；しかし、本発明は、異なる種、好ましくは哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、またはイヌ)由来のRFアミドペプチドを認識する抗体分子を含む。本発明はまた、本発明のRFアミドペプチドおよび1つ以上の抗体分子を含む複合体を含む。このような複合体は、単に、その同族ペプチドと抗体分子を接触させることにより生成され得る。

10

【0091】

種々の方法が、本発明の抗体分子を生成するのに使用され得る。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、米国特許第5,625,126号；同第5,877,397号；同第6,255,458号；同第6,023,010号、および同第5,874,299号において開示されるのと類似の方法により生成される。モノクローナル、完全ヒト抗RFアミドペプチド抗体を生成するハイブリドーマ細胞は次いで、当該分野で一般に公知の方法により生成され得る。これらの方法としては、Kohlerら(1975)(Nature 256:495-497)によって最初に開発されたハイブリドーマ技術、トリオーマ技術(Heringら,(1988)Biomed.Biochim.Acta.47:211-216およびHagiwarara,(1993)Hum.Antibod.Hybridomas 4:15)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら(1983)Immunology Today 4:72およびCoteら(1983)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:2026-2030)、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96,1985)が挙げられるがこれらに限定されない。ここでも、ハイブリドーマ細胞が抗RFアミドペプチド抗体を発現しているか否かを決定するために、ELISAが使用され得る。

20

30

【0092】

本発明の抗RFアミドペプチド抗体分子はまた、組み換え生成され得る(例えば、上記のようなE.coli/T7発現系)。この実施形態において、本発明の抗体分子(例えば、V_HまたはV_L)をコードする核酸は、ペットベース(pet-based)プラスミドに挿入され得、そしてE.coli/T7系において発現され得る。当該分野で公知の組み換え抗体を作成するためのいくつかの方法が存在する。抗体の組み換え生成方法の1つの例は、米国特許第4,816,567号に開示されている。

【0093】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同質の抗体の集団から得られる抗体を含む(すなわち、その集団を含む個々の抗体は、微量で存在し得る潜在的な天然に存在する変異体を除いて、同一である)。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に指向する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養によって合成され得、本質的に他の免疫グロブリンに汚染されていないという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な集団の抗体である抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の精製を必要とするよう解釈されない。上述のように、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975)Nature 256:495によって記載されるハイブリドーマ方法により作成され得る。

40

【0094】

50

用語「ポリクローナル抗体」は、1つ以上の他の、非同一の抗体の存在下で生成された抗体を含む。一般的には、ポリクローナル抗体は、非同一の抗体を生成するいくつかの他のBリンパ球の存在下でBリンパ球から生成される。通常、ポリクローナル抗体は、免疫した動物から直接得られる。

【0095】

「二特異的抗体」は、異なる抗原に結合する2種の異なる抗原結合領域を含む。二得的抗体、およびその抗体を作成および使用する方法は、従来法であり、当該分野で周知である。

【0096】

抗イディオタイプ抗体または抗イディオタイプは、別の抗体分子の抗原結合領域または可変領域（イディオタイプと呼ばれる）に対する抗体である。Jerneら（Jerne, N. K., (1974) Ann. Immunol. (Paris) 125c: 373およびJerne, N. K., (1982) EMBO 1: 234）により開示されるように、所定の抗原（例えば、RFアミドペプチド）についてのパラトープ（抗原結合部位）を発現する抗体分子による免疫は、一群の抗抗体を生成し、その内のいくつかは、抗原と、パラトープに対する相補的構造を共有する。抗イディオタイプ抗体の部分集団による免疫は、最初の抗原に対して反応性の抗体の部分集団または免疫細胞サブセットを生成する。

【0097】

用語「完全ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリン配列のみを含む抗体をいう。同様に、「マウス抗体」は、マウス免疫グロブリン配列のみを含む抗体をいい、「ニワトリ抗体」は、ニワトリ免疫グロブリン配列のみを含む抗体をいう。

【0098】

「ヒト/マウスキメラ抗体」は、ヒト定常領域に融合されたマウス可変領域（ V_H および V_L ）を含む抗体をいう。

【0099】

「ヒト化」抗RFアミドペプチド抗体もまた、本発明の範囲内である。非ヒト（例えば、マウスまたはニワトリ）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ免疫グロブリンである。大部分については、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、マウス、ニワトリ、ラット、またはウサギ）の相補性決定領域由来の残基で置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例においては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基はまた、対応する非ヒト残基で置換されている。

【0100】

「単鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは、抗体の V_H および V_L ドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的には、sFvポリペプチドはさらに、 V_H ドメインと V_L ドメインとの間にポリペプチドリンカーを含み、sFvが、抗原結合について所望の構造を形成するのを可能にする。単鎖抗体の生成について記載される技術（米国特許第5,476,786号；同第5,132,405号；同第4,946,778号）は、抗RFアミドペプチド特異的単鎖抗体を生成するのに適合され得る。sFvの総説については、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore編, Springer-Verlag, N. Y., pp 269-315 (1994)を参照のこと。

【0101】

「ジスルフィド安定化Fvフラグメント」および「dsFv」は、ジスルフィド架橋により連結された可変重鎖（ V_H ）および/または可変軽鎖（ V_L ）を有する分子を含む。

【0102】

本発明の範囲内の抗体フラグメントはまた、例えば、ペプシンによるIgGの酵素的切

10

20

30

40

50

断によって生成され得る $F(a b)_2$ フラグメントを含む。 $F a b$ フラグメントは、例えば、ジチオトレイトールまたはメルカプトエチルアミンによる $F(a b)_2$ の還元により生成され得る。 $F a b$ フラグメントは、ジスルフィド架橋により $V_H - C_{H1}$ 鎖に結合された $V_L - C_L$ 鎖である。 $F(a b)_2$ フラグメントは、2つのジスルフィド架橋により結合された2つの $F a b$ フラグメントである。 $F(a b)_2$ 分子の $F a b$ 部分は、 $F c$ 領域の部分を含み、その間にジスルフィド架橋が位置する。

【0103】

$F v$ フラグメントは、 V_L または V_H 領域である。

【0104】

それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り当てられ得る。少なくとも5つのクラスの免疫グロブリン： $I g A$ 、 $I g D$ 、 $I g E$ 、 $I g G$ 、および $I g M$ 、が存在し、これらのうちのいくつかはさらに、サブクラス（イソタイプ）（例えば、 $I g G - 1$ 、 $I g G - 2$ 、 $I g G - 3$ 、および $I g G - 4$ ； $I g A - 1$ および $I g A - 2$ に分類され得る。

10

【0105】

本発明の抗 $R F$ アミドペプチド抗体分子はまた、キメラ部分に連結され得る。その化学的部分は、とりわけ、ポリマー、放射性核種、または細胞障害性因子であり得る。好ましくは、化学的部分は、被験体の体内での抗体分子の半減期を増加させるポリマーである。適切なポリマーとしては、ポリエチレングリコール（ $P E G$ ）（例えば、分子量 $2 k D a$ 、 $5 k D a$ 、 $10 k D a$ 、 $12 k D a$ 、 $20 k D a$ 、 $30 k D a$ 、または $40 k D a$ を有する $P E G$ ）、デキストラン、およびモノメトキシポリエチレングリコール（ $m P E G$ ）が挙げられるがこれらに限定されない。米国特許第 $6,133,426$ 号（本明細書に参考として援用される）に記載されている、ペグ化抗 $I L 8$ 抗体を生成するための方法は、本発明の $P E G$ 化 $R F$ アミドペプチド抗体の生成に適用され得る。 $L e e$ ら、（ 1999 ）（ $B i o c o n j . C h e m . 10 : 973 - 981$ ）は、 $P E G$ 結合単鎖抗体を開示する。 $W e n$ ら、（ 2001 ）（ $B i o c o n j . C h e m . 12 : 545 - 553$ ）は、放射性金属キレート剤（ジエチレントリアミンペンタ酢酸（ $D T P A$ ））に結合された $P E G$ と抗体を結合する方法を開示する。

20

【0106】

本発明の抗体分子はまた、放射性同位元素標識（例えば、 $^{99} T c$ 、 $^{90} Y$ 、 $^{111} I n$ 、 $^{32} P$ 、 $^{14} C$ 、 $^{125} I$ 、 $^3 H$ 、 $^{131} I$ 、 $^{11} C$ 、 $^{15} O$ 、 $^{13} N$ 、 $^{18} F$ 、 $^{35} S$ 、 $^{51} C r$ 、 $^{57} T o$ 、 $^{226} R a$ 、 $^{60} C o$ 、 $^{59} F e$ 、 $^{57} S e$ 、 $^{152} E u$ 、 $^{67} C u$ 、 $^{217} C i$ 、 $^{211} A t$ 、 $^{212} P b$ 、 $^{47} S c$ 、 $^{109} P d$ 、 $^{234} T h$ 、および $^{40} K$ ）および非放射性同位元素標識（例えば、 $^{157} G d$ 、 $^{55} M n$ 、 $^{52} T r$ 、 $^{56} F e$ ）と結合され得る。

30

【0107】

本発明の抗体はまた、蛍光標識または化学発光標識（フルオロフォア（例えば、希土類キレート）、フルオロセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、イソチオシアネート、フィコエリシン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、 o -フタルアルデヒド、フルオレスカミン、 $^{152} E u$ 、ダンシルウンベリフェロン、ルシフェリン、ルミナル標識、イソルミナル標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジニウム塩標識、オキサレートエステル標識、エクオリン標識、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ピオチン/アビジン、スピン標識、および安定なフリーラジカルが挙げられる）と結合され得る。

40

【0108】

抗体分子はまた、例えば、ジフテリア毒素、 $P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a$ エンドトキシン A 鎖、リシン A 鎖、アルピン A 鎖、モデクシン A 鎖、 α -サルシン、 $A l e u r i t e s f o r d i i$ タンパク質および化合物（例えば、脂肪酸）、ジアンチタンパク質、 $P h y t o i a c c a a m e r i c a n a$ タンパク質 $P A P I$ 、 $P A P I I$ 、および $P A P - S$ 、 $m o m o r d i c a c h a r a n t i a$ インヒビター、

50

キュルシン、クロチン、saponaria officinalis インヒビター、ミトゲリン、レスチリクトシン、フェノマイシン、およびエノマイシンのような細胞障害性因子と結合され得る。

【0109】

本発明の抗体分子を種々の部分に結合するための当該分野で公知の任意の方法が用いられ得、これらとしては、Hunterら、(1962) Nature 144:945; Davidら、(1974) Biochemistry 13:1014; Painら、(1981) J. Immunol. Meth. 40:219; および Nygren, J., (1982) Histochem. and Cytochem. 30:407により記載される方法が挙げられる。

10

【0110】

抗体を結合体化するための方法は従来法であり、当該分野で周知である。

【0111】

(薬学的組成物)

本発明のRFアミドペプチドおよび抗体分子は、被験体に、好ましくは薬学的組成物中で、好ましくは治療目的で投与され得る。好ましくは、薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリアを含む。RFアミドペプチドおよび抗体分子は、SP9155レセプターの活性を刺激またはブロックし、それによって、このレセプターにより引き起こされるかまたは媒介される任意の医学的状態を処置するために、治療的に(例えば、薬学的組成物中で)使用され得る。本発明のRFアミドペプチドの、SP9155レセプターへの結合をブロックすることにより、このペプチドが有するレセプターに対する効果がブロックされ得る。上記のように、SP9155レセプターは、代謝障害(例えば、肥満)および機構(例えば、疼痛および鎮痛)に関連する。

20

【0112】

薬学的に受容可能なキャリアは従来のであり、当該分野で周知である。例としては、生理学的に適合する水性および非水性キャリア、安定化剤、抗酸化剤、溶媒、分散媒体、コーティング、抗微生物剤、緩衝剤、血清タンパク質、等張剤、および吸収遅延剤などが挙げられる。好ましくは、キャリアは、被験体の体内への注射に適している。一般的には、このような薬物の非経口投与に有用な組成物が周知である: 例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 17th Ed. (Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990)。

30

【0113】

本発明の薬学的組成物中で用いられ得る適切な水性および非水性キャリアの例としては、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適切な混合物、植物油(例えば、オリーブ油)、ならびに注射可能な有機エステル(例えば、オレイン酸エチル)が挙げられる。適切な流動性は、例えば、コーティング材料(例えば、レシチン)の使用により、分散物の場合は、適切な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持され得る。

【0114】

本発明の薬学的組成物は、第2の薬学的組成物または物質と組み合わせて投与され得る。好ましい実施形態において、第2の組成物は、抗肥満薬または鎮痛剤である。組み合わせ治療が使用される場合、両方の組成物は、同時送達のために単一の組成物に処方されるか、または2つ以上の組成物に別々に処方され得る(例えば、キット)。

40

【0115】

抗肥満薬は、シブトラミン、フェンテルミン、またはオルリスタントを含み得る。

【0116】

鎮痛剤は、アスピリン、アセトミノフェン、コデイン、モルヒネ、アポノルフィン、ノルモルヒネ、エトルフィン、ブプレノルフィン、ヒドロコドン、ラセモルファン、レボルファノール、ブトルファンド、メタドン、デメロール、イブプロフェン、またはオキシコドンが挙げられ得る。

50

【0117】

本発明の薬学的組成物はまた、本明細書中に記載されるアッセイを用いて同定される他のタイプの物質（有機低分子および阻害性リガンドアナログ）を含み得る。

【0118】

この処方物は、都合良くは、単一の投薬形態で存在し、そして薬学分野で周知の任意の方法により調製され得る。例えば、Gilmanら（編）（1990）、The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; および Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出, Easton, Penn.; Avisら（編）（1993）Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, New York; Liebermanら（編）（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, New York; および Liebermanら（編）（1990）、Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, New Yorkを参照のこと。

10

【0119】

治療適用に関係する投薬レジメンは、治療物質の作用を変更し得る種々の要因（例えば、患者の状態、体重、性別、および食事、任意の感染の重篤度、投与時間、ならびに他の臨床的要因）を考慮して、医師により決定され得る。

【0120】

しばしば、処置投薬は、安全性および有効性を最適化するため、低レベルから上げられる。投薬量は、小さい分子サイズおよび投与後に半減期（クリアランス時間）が減少する可能性を考慮して調節され得る。

20

【0121】

本発明の組成物の「有効量」は、SP9155レセプターまたはその機能的フラグメントにより引き起こされるかまたは媒介される医学的状态を特徴付ける周知のパラメータの1つ以上を改善する。

【0122】

このような物質の治療的投与の代表的なプロトコルは、当該分野で周知である。本発明の薬学的組成物は、例えば、非経口経路（例えば、静脈注射、筋肉注射、皮下注射、腫瘍注射、または吸入により）または非非経口経路（例えば、経口投与、肺投与、または局所投与）により投与され得る。

30

【0123】

組成物は、当該分野で公知の医学的デバイスにより投与され得る。例えば、好ましい実施形態において、本発明の薬学的組成物は、皮下針による注射により投与され得る。

【0124】

本発明の薬学的組成物はまた、無針皮下注射デバイス（例えば、米国特許第5,399,163号；同第5,383,851号；同第5,312,335号；同第5,064,413号；同第4,941,880号；同第4,790,824号；または同第4,596,556号に開示されるデバイス）により投与され得る。

40

【0125】

本発明において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例としては、制御された速度で医薬を分散するための移植可能な微小吸入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号；正確な吸入速度で医薬を送達するための医薬吸入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号；連続的な薬物送達のための可変流の移植可能な吸入装置を開示する米国特許第4,447,224号；複数のチャンバ区画を有する浸透圧薬物送達系を開示する米国特許第4,439,196号が挙げられる。

【0126】

（アンチセンス分子）

本発明はまた、核酸の発現を防止するための、本発明のRFアミドペプチド（好ましく

50

は、配列番号 4 ~ 11 または 13 ~ 18 のいずれかにより定義されるアミノ酸配列またはその部分配列を有する) をコードする核酸(例えば、ゲノム核酸または mRNA) に特異的にハイブリダイズし得るアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。

【0127】

本発明はさらに、(a) その翻訳を防止するための、細胞膜を通過し、細胞中で本発明の RF アミドペプチドをコードする mRNA と特異的に結合する、SP9155 レセプターの活性を調節するのに有効な量のオリゴヌクレオチド、および (b) 細胞膜を通過し得る薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。一つの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、mRNA を不活性化する物質(例えば、リボザイム) に連結される。

10

【実施例】

【0128】

(実施例)

以下の実施例は、本発明の例示のみを意図し、いかなる方法によっても本発明の範囲を限定するよう解釈されるべきではない。

【0129】

(略語)

GenScan: 遺伝子予測アルゴリズム (Burge *et al.*, (1997) *J. Mol. Biol.* 268 (1): 78-94)。

【0130】

ヒトウイルス転写データベース (VTS): GenScan を稼働させることで、公的なデータベースにおいて利用可能なヒトゲノム DNA から遺伝子またはエキソンを予測した。VTS の DNA 版およびタンパク質版の両方を作成した。

20

【0131】

(実施例 1: ヒト RF アミドペプチド前駆体タンパク質の同定)

RF アミドペプチドは、周知の神経ペプチドファミリーのメンバーであり、カルボキシ末端「RF_G(^K/_R)」モチーフを有するプロペプチドから得られる。一般的に、「G(^K/_R)」は、プロテイナーゼ消化およびアミド化シグナルである。タンパク質消化およびアミド化は、プロペプチドが RF アミドカルボキシ末端を有する成熟ペプチドにプロセッシングされる場合に起こる工程である。

30

【0132】

ほとんどの RF アミドペプチド前駆体は、1 つ以上の RF_G(^K/_R) モチーフを有するので、VTS タンパク質データベースを、1 つ以上の RF_GR モチーフを有するペプチドについて検索した。本発明者らは、VTS 164407 が、2 つの RF_G(^K/_R) モチーフを有するエキソンを含むことが見出されたことを同定した。さらなる分析により、このエキソンが始めに開始コドンを含み、そして最後に終止コドンを含むことが明らかになった。PSORT (タンパク質細胞内局在化予測のためのフリーソフトウェア; Nakai *et al.*, (1999) *Trends Biochem. Sci.* 24 (1): 34-36) を用いたエキソンの分析により、このエキソンが、リーダーペプチドを有し、膜貫通ドメインを有さないことが予測された。このことは、そのエキソンが分泌タンパク質をコードすることを示唆していた。このエキソンが、「RF アミドペプチド前駆体」と称され得る。

40

【0133】

一般的に、RF アミドペプチド前駆体もまた、分泌され得るので、この遺伝子をコードする cDNA を単離した。ゲノムエキソンと cDNA クローンとの間に 1 つのヌクレオチド差があることを同定した。この差は、多型を表し得る。そのヌクレオチド配列、および対応する推定アミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 3 および 4 に示す。

【0134】

(実施例 2: ヒト RF アミドペプチド前駆体遺伝子のマウスホモログの同定)

ヒト RF アミドペプチド前駆体遺伝子のマウスホモログを、公的な発現配列タグ (ES

50

T) データベースをBLASTにより検索して同定した(クエリーとしてヒトRFアミドペプチド前駆体遺伝子を用いた)。この検索において、マウスEST BF167714を、ヒトRFアミドペプチド前駆体に対して相同であると同定した。さらに、公的なマウスゲノムDNAデータベースを、クエリーとしてヒトRFアミドペプチド前駆体遺伝子を用いて検索した。第2検索においても、マウスホモログを同定し、これは、配列アラインメントによって、第1検索において同定したマウスホモログと同一であることを決定した。全長RFアミドペプチド前駆体遺伝子を、同定したクローンから推定した。

【0135】

推定マウスRFアミドペプチド前駆体DNA配列に基づき、マウスRFアミドペプチド前駆体のcDNAをクローニングした。そのヌクレオチド配列および対応する推定アミノ酸配列を、それぞれ、配列番号12および13において示す。

10

【0136】

(実施例3: ヒトおよびマウスのRFアミドペプチド前駆体遺伝子の両方から得られた可能性のある機能的ペプチド)

本発明者らは、 $RF G (K / R)$ がカルボキシ末端にあるとの仮定に基づき、以下の可能性のある機能的RFアミドペプチドを推定した。

【0137】

ヒトRFアミドペプチド前駆体から得たペプチドは、以下の通りである:

Human P51: EHAGCRFRF - アミド(配列番号5)

Human P242: GLQTSGREHAGCRFRF - アミド(配列番号6)

Human P552: ASQPQALLVIARGLQTSGREHAGCRFRF - アミド(配列番号7)

Human P52: GGF SFRF - アミド(配列番号8)

Human P513: KGGFSFRF - アミド(配列番号9)

Human P517: KKGFSFRF - アミド(配列番号10)

Human P518: TSGPLGNLA EELNGYSRKKGGFSFRF - アミド(配列番号11)。

20

【0138】

マウスRFアミドペプチド前駆体から得たペプチドは、以下の通りである:

マウスP51: EHTGFR L - アミド(配列番号14)

マウスP52: GGF SFRF - アミド(配列番号15)

マウスP513: KGGFSFRF - アミド(配列番号16)

マウスP517: RKGGFSFRF - アミド(配列番号17)

マウスP518: ASGPLGTLAEELSSYSRRKGGFSFRF - アミド(配列番号18)。

30

【0139】

(実施例4: アッセイ)

(a. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定)

以下の実験において、蛍光イメージングプレートリーダー(FLI PR)アッセイを用いて、ヒトP518、P517、P52、P513、およびP51がヒトSP9155レセプターに対するリガンドであることを決定した。以下に議論されるように、サンプルがこのレセプターに対するアゴニストであるかアンタゴニストであるかを決定することについて、このアッセイを適合させ得る。

40

【0140】

HEK293細胞(10% FCSを含むDMEM中で、80~90%コンフルエンスまで増殖させた)を、Superfectトランスフェクション試薬を用いて、SP9155レセプターcDNAを含む発現ベクターまたはSP9155レセプターcDNAを欠く発現ベクターでトランスフェクトした。次の日に、細胞を培養プレート上でトリプシン処理し、 Ca^{2+} / Mg^{2+} を欠くPBSで洗浄した。次いで、この細胞を、100 μ lの培地あたり35,000細胞の密度で、96ウェルプレート(ポリ-D-リジンでプレ

50

コーティングしておいた) (Becton Dickinson) に播種した。トランスフェクションから3日後、細胞から培地を除去し、4 μ M の Fluor-3、AM (Molecular Probes)、20 mM HEPES、pH 7.4、0.1% (w/v) BSA、および 250 mM プロベネシドを含む 100 μ l のハックス平衡塩溶液を添加し、その後 37、5% CO₂ 下で1時間インキュベートした。次いで、この細胞を、150 μ l の洗浄緩衝液 (ハックス BSS、40 mM HEPES、pH 7.4、および 250 mM プロベネシド含有) で三回洗浄した。最後の洗浄の後に、100 μ l の洗浄緩衝液を追加し、そして各々のペプチドを含む 40 μ l の洗浄緩衝液を添加した後に Ca²⁺ フラックスを測定した。FLIPR 機器 (Molecular Device) を、Ca²⁺ フラックスの測定に使用した。

10

【0141】

これらのアッセイにおいて得られたデータを、以下の表3に示す。

【0142】

【表3】

表3. ペプチドの能力

リガンド ¹	EC ₅₀ (nM) ²
ヒトP518 (配列番号11)	7.0 ± 3.0
ヒトP517 (配列番号10)	235 ± 6
ヒトP52 (配列番号8)	245 ± 58
ヒトP513 (配列番号19)	258 ± 20
ヒトP51 (配列番号5)	1560 ± 170

20

¹ 試験した各ペプチドはカルボキシ末端がアミド化されていた。

² 値は、平均 ± 標準偏差で表す; n = 5。

【0143】

FLIPR アッセイはまた、アゴニストまたはアンタゴニスト活性についてサンプルをスクリーニングするのにも使用され得る。これらのアッセイにおいて、試験細胞を、ペプチドリガンド (または任意の他の SP9155 レセプターリガンド) およびサンプルと同時に接触させ得る。ネガティブコントロール実験は、試験細胞をリガンドおよびブランク (例えば、水、またはアゴニストまたはアンタゴニストでないことが既知の任意の他の物質) を接触させることを含み得る。ポジティブコントロール実験は、試験細胞と、リガンドおよび SP9155 レセプター/リガンド結合をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることが既知の物質を接触させることを含み得る。

30

【0144】

サンプルは、サンプルを含まないで実施された同一の実験の程度と比較して、リガンド/レセプター結合により引き起こされる Ca²⁺ 移動の程度を減少させる (すなわち、FLIPR シグナルを減少させる) 能力に対するアンタゴニストを含むことが同定され得る。逆に、サンプルは、サンプルを含まないで実施された同一の実験の程度と比較して、リガンド/レセプター結合により引き起こされる Ca²⁺ 移動の程度を増加させる能力に対するアゴニスト (すなわち、FLIPR シグナルを増加させる) を含むことが同定され得る。

40

(b. 放射リガンド結合アッセイ)

この実施例において、放射リガンド結合アッセイを用いて、ヒトP518がヒトSP9155 についてのリガンドであることを決定する。以下で議論されるように、サンプルがこのレセプターに対するアゴニストであるかアンタゴニストであるかを決定することについて、このアッセイを適合させ得る。

【0145】

培養細胞中で発現された場合に、³H 標識 P518 に結合する SP9155 レセプター

50

の能力を試験するため、放射リガンド結合アッセイを実施する。SP9155のORFを、発現ベクターpCR3.1中にクローニングする(pCR3.1-SP9155)。COS-7細胞を、pCR3.1-SP9155またはpCR3.1のみでトランスフェクトする。トランスフェクションの2日後、通常の成長培地DMEM/10% FCSを、Opti-MEMまたはDMEM-Opti-MEM/5% FCSのいずれかで置き換える。細胞を1日以上増殖し、次いで、結合アッセイにおいて使用するため膜を調製する。非標識P518(1 μ M)を、非特異的結合を決定するため使用する。トランスフェクションから合計3日後、トランスフェクション細胞から膜を調製し、³H-P518への特異的結合を観察する。

【0146】

飽和結合について、24 μ gの膜を含有する150 μ lの結合アッセイ緩衝液(30mM HEPES、pH7.4、10mM CaCl₂、10mM MgCl₂、0.05%無脂肪酸BSA(w/v)、氷上で維持する)を、2%(v/v)DMSO冷P518(1 μ M)を含有する結合アッセイ緩衝液50 μ lと混合する。³H-P518/エタノールを漸増濃度でアッセイに添加する。室温で1時間、50 μ lの結合アッセイ緩衝液でプレソッキングしたマルチスクリーンFBフィルター(Millipore)を使用して結合アッセイを濾過し、そしてフィルターを、100 μ l 50mM Tris-HCl、pH7.5(氷冷)で二度洗浄する。50 μ lのシンチレーション液をフィルターに添加し、そして結合した放射リガンドを検出するため計数する。

【0147】

放射リガンド競合アッセイについて、適切な膜を含有する160 μ lの結合アッセイ緩衝液を、6%DMSO(v/v)および異なる濃度の候補競合化合物を含有する結合アッセイ緩衝液20 μ lと混合する。6%(v/v)DMSOおよび1 μ lの³H-P518/エタノール(NEN、50nM)を含有する最終20 μ lの結合アッセイ緩衝液を添加し、結合反応を開始する。放射リガンドの最終濃度は、0.25nMである。インキュベーション条件は、上記飽和アッセイについて使用したのと同じである。サンプルは、サンプルなしで同じ実験を行った場合と比較して、レセプターに対するリガンドの結合が減少する場合、アゴニストまたはアンタゴニストを含有すると同定され得る。

【0148】

ネガティブコントロール実験は、リガンドおよびブランク(例えば、水またはアゴニストまたはアンタゴニストでないことが既知の任意の他の物質)と膜を接触させることを含み得る。ポジティブコントロール実験は、リガンドおよびSP9155レセプター/リガンド結合をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることが既知の物質と試験細胞を接触させることを含み得る。

【0149】

本発明は、本明細書中に記載される特定の実施形態により範囲が限定されるべきでない。実際、本明細書中に記載されるものに加えて、本発明の種々の変更が、前述の説明および添付図面から当業者に明らかである。このような変更は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【0150】

特許、特許出願、刊行物、製品説明書、およびプロトコルが、本明細書を通して引用されており、それらの開示は、全ての目的のために、その全体が、参考として援用される。

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

<110> Schering-Plough Corporation

<120> G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR LIGANDS AND METHODS

<130> CN01530

<140> To be assigned

<141> Herewith

10

<150> 60/372,640

<151> April 12, 2002

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20

<211> 1296

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> 1..1296

30

<223>

<220>

<221> VARIANT

<222> 154

<223> a

<220>

<221> VARIANT

<222> 181
<223> g
<220>
<221> VARIANT
<222> 206
<223> g
<220>
<221> VARIANT 10
<222> 208
<223> t
<220>
<221> VARIANT
<222> 447
<223> g
<220>
<221> VARIANT 20
<222> 748
<223> t
<220>
<221> VARIANT
<222> 1031
<223> c
<220>
<221> VARIANT 30
<222> 1111
<223> t
<220>
<221> VARIANT
<222> 1162
<223> a
<220> 40

<221> VARIANT

<222> 1228

<223> t

<400> 1

atg cag gcg ctt aac att acc ccg gag cag ttc tct cgg ctg ctg cgg	48
Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Pro Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Arg	
1 5 10 15	
gac cac aac ctg acg cgg gag cag ttc atc gct ctg tac cgg ctg cga	96
Asp His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile Ala Leu Tyr Arg Leu Arg	
20 25 30	10
ccg ctc gtc tac acc cca gag ctg ccg gga cgc gcc aag ctg gcc ctc	144
Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Gly Arg Ala Lys Leu Ala Leu	
35 40 45	
gtg ctc acc ggc gtg ctc atc ttc gcc ctg gcg ctc ttt ggc aat gct	192
Val Leu Thr Gly Val Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ala	
50 55 60	
ctg gtg ttc tac gtg gtg acc cgc agc aag gcc atg cgc acc gtc acc	240
Leu Val Phe Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr	
65 70 75 80	
aac atc ttt atc tgc tcc ttg gcg ctc agt gac ctg ctc atc acc ttc	288
Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Thr Phe	
85 90 95	20
ttc tgc att ccc gtc acc atg ctc cag aac att tcc gac aac tgg ctg	336
Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Asn Trp Leu	
100 105 110	
ggg ggt gct ttc att tgc aag atg gtg cca ttt gtc cag tct acc gct	384
Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala	
115 120 125	
ggt gtg aca gaa atc ctc act atg acc tgc att gct gtg gaa agg cac	432
Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His	
130 135 140	
cag gga ctt gtg cat cct ttt aaa atg aag tgg caa tac acc aac cga	480
Gln Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Asn Arg	
145 150 155 160	30
agg gct ttc aca atg cta ggt gtg gtc tgg ctg gtg gca gtc atc gta	528
Arg Ala Phe Thr Met Leu Gly Val Val Trp Leu Val Ala Val Ile Val	
165 170 175	
gga tca ccc atg tgg cac gtg caa caa ctt gag atc aaa tat gac ttc	576
Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Gln Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe	
180 185 190	
cta tat gaa aag gaa cac atc tgc tgc tta gaa gag tgg acc agc cct	624
Leu Tyr Glu Lys Glu His Ile Cys Cys Leu Glu Glu Trp Thr Ser Pro	
195 200 205	

gtg cac cag aag atc tac acc acc ttc atc ctt gtc atc ctc ttc ctc	672
Val His Gln Lys Ile Tyr Thr Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu	
210 215 220	
ctg cct ctt atg gtg atg ctt att ctg tac agt aaa att ggt tat gaa	720
Leu Pro Leu Met Val Met Leu Ile Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu	
225 230 235 240	
ctt tgg ata aag aaa aga gtt ggg gat ggt tca gtg ctt cga act att	768
Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Gly Ser Val Leu Arg Thr Ile	
245 250 255	
cat gga aaa gaa atg tcc aaa ata gcc agg aag aag aaa cga gct gtc	816
His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val	
260 265 270	
att atg atg gtg aca gtg gtg gct ctc ttt gct gtg tgc tgg gca cca	864
Ile Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Val Cys Trp Ala Pro	
275 280 285	
ttc cat gtt gtc cat atg atg att gaa tac agt aat ttt gaa aag gaa	912
Phe His Val Val His Met Met Ile Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu	
290 295 300	
tat gat gat gtc aca atc aag atg att ttt gct atc gtg caa att att	960
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Ile Phe Ala Ile Val Gln Ile Ile	
305 310 315 320	
gga ttt tcc aac tcc atc tgt aat ccc att gtc tat gca ttt atg aat	1008
Gly Phe Ser Asn Ser Ile Cys Asn Pro Ile Val Tyr Ala Phe Met Asn	
325 330 335	
gaa aac ttc aaa aaa aat gtt ttg tct gca gtt tgt tat tgc ata gta	1056
Glu Asn Phe Lys Lys Asn Val Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val	
340 345 350	
aat aaa acc ttc tct cca gca caa agg cat gga aat tca gga att aca	1104
Asn Lys Thr Phe Ser Pro Ala Gln Arg His Gly Asn Ser Gly Ile Thr	
355 360 365	
atg atg cgg aag aaa gca aag ttt tcc ctc aga gag aat cca gtg gag	1152
Met Met Arg Lys Lys Ala Lys Phe Ser Leu Arg Glu Asn Pro Val Glu	
370 375 380	
gaa acc aaa gga gaa gca ttc agt gat ggc aac att gaa gtc aaa ttg	1200
Glu Thr Lys Gly Glu Ala Phe Ser Asp Gly Asn Ile Glu Val Lys Leu	
385 390 395 400	
tgt gaa cag aca gag gag aag aaa aag ctc aaa cga cat ctt gct ctc	1248
Cys Glu Gln Thr Glu Glu Lys Lys Lys Leu Lys Arg His Leu Ala Leu	
405 410 415	
ttt agg tct gaa ctg gct gag aat tct cct tta gac agt ggg cat taa	1296
Phe Arg Ser Glu Leu Ala Glu Asn Ser Pro Leu Asp Ser Gly His	
420 425 430	
<210> 2	
<211> 431	

10

20

30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 52

<223> serine

10

<220>

<221> VARIANT

<222> 410

<223> phenylalanine

<220>

<221> VARIANT

<222> 388

<223> arginine

20

<220>

<221> VARIANT

<222> 371

<223> tryptophan

30

<220>

<221> VARIANT

<222> 344

<223> serine

<220>

<221> VARIANT

<222> 250
<223> cysteine

<220>
<221> VARIANT
<222> 149
<223> glutamine

10

<220>
<221> VARIANT
<222> 70
<223> leucine

<220>
<221> VARIANT
<222> 69
<223> glycine

20

<220>
<221> VARIANT
<222> 61
<223> valine

30

<400> 2

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Pro Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Arg
1 5 10 15

Asp His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile Ala Leu Tyr Arg Leu Arg
20 25 30

Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Gly Arg Ala Lys Leu Ala Leu
35 40 45

Val Leu Thr Gly Val Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ala

40

Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Ile Phe Ala Ile Val Gln Ile Ile
 305 310 315 320

Gly Phe Ser Asn Ser Ile Cys Asn Pro Ile Val Tyr Ala Phe Met Asn
 325 330 335

Glu Asn Phe Lys Lys Asn Val Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val
 340 345 350

Asn Lys Thr Phe Ser Pro Ala Gln Arg His Gly Asn Ser Gly Ile Thr
 355 360 365

Met Met Arg Lys Lys Ala Lys Phe Ser Leu Arg Glu Asn Pro Val Glu
 370 375 380

Glu Thr Lys Gly Glu Ala Phe Ser Asp Gly Asn Ile Glu Val Lys Leu
 385 390 395 400

Cys Glu Gln Thr Glu Glu Lys Lys Lys Leu Lys Arg His Leu Ala Leu
 405 410 415

Phe Arg Ser Glu Leu Ala Glu Asn Ser Pro Leu Asp Ser Gly His
 420 425 430

10

20

<210> 3

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> 1..411

<223>

<220>

<221> VARIANT

<222> 76

<223> c

30

<220>

<221> VARIANT

<222> 103

<223> a

<220>

<221> VARIANT

<222> 139

<223> t

10

<220>

<221> VARIANT

<222> 203

<223> a

<220>

<221> VARIANT

<222> 239

<223> g

20

<400> 3

atg gta agg cct tac ccc ctg atc tac ttc ctc ttc ctg ccg ctg ggc	48
Met Val Arg Pro Tyr Pro Leu Ile Tyr Phe Leu Phe Leu Pro Leu Gly	
1 5 10 15	

gcc tgc ttc cct cta ctg gac aga aga gag ccc aca gac gcc atg ggt	96
Ala Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Glu Pro Thr Asp Ala Met Gly	
20 25 30	

ggc ctc gga gct gga gaa cgc tgg gcc gac ctg gcc atg ggg ccc cga	144
Gly Leu Gly Ala Gly Glu Arg Trp Ala Asp Leu Ala Met Gly Pro Arg	
35 40 45	

30

ccc cac tcc gtg tgg ggt tcc tct cgg tgg ctg aga gct tca cag cca	192
Pro His Ser Val Trp Gly Ser Ser Arg Trp Leu Arg Ala Ser Gln Pro	
50 55 60	

cag gcc ctg ctt gtc ata gcc agg ggg ctg cag aca tcg gcc aga gag	240
Gln Ala Leu Leu Val Ile Ala Arg Gly Leu Gln Thr Ser Gly Arg Glu	
65 70 75 80	

cat gct ggc tgc aga ttc cgc ttc ggg agg cag gac gaa ggc agt gag	288
His Ala Gly Cys Arg Phe Arg Phe Gly Arg Gln Asp Glu Gly Ser Glu	
85 90 95	

gcc acc ggc ttc ctc cct gct gcg ggg gag aag acc agc gcc ccg tta	336
Ala Thr Gly Phe Leu Pro Ala Ala Gly Glu Lys Thr Ser Gly Pro Leu	

40

100	105	110	
ggg aac ctg gct gag gag ctc aat ggc tac agc agg aag aaa ggc ggc			384
Gly Asn Leu Ala Glu Glu Leu Asn Gly Tyr Ser Arg Lys Lys Gly Gly			
115	120	125	
ttc agc ttc cgc ttc ggt cgg cgg tga			411
Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg Arg			
130	135		

<210> 4

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> VARIANT

<222> 47

<223> serine

20

<220>

<221> VARIANT

<222> 80

<223> glycine

<220>

<221> VARIANT

<222> 68

<223> histidine

30

<220>

<221> VARIANT

<222> 35

<223> arginine

<220>

<221> VARIANT

<222> 26

<223> glutamine

<400> 4

Met	Val	Arg	Pro	Tyr	Pro	Leu	Ile	Tyr	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Gly
1				5					10					15	

10

Ala	Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Arg	Glu	Pro	Thr	Asp	Ala	Met	Gly
			20					25					30		

Gly	Leu	Gly	Ala	Gly	Glu	Arg	Trp	Ala	Asp	Leu	Ala	Met	Gly	Pro	Arg
		35					40					45			

Pro	His	Ser	Val	Trp	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Arg	Ala	Ser	Gln	Pro
	50					55					60				

Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	Leu	Gln	Thr	Ser	Gly	Arg	Glu
65					70					75					80

20

His	Ala	Gly	Cys	Arg	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	Gln	Asp	Glu	Gly	Ser	Glu
			85						90					95	

Ala	Thr	Gly	Phe	Leu	Pro	Ala	Ala	Gly	Glu	Lys	Thr	Ser	Gly	Pro	Leu
			100					105					110		

Gly	Asn	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Asn	Gly	Tyr	Ser	Arg	Lys	Lys	Gly	Gly
		115					120					125			

Phe	Ser	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg
	130					135	

30

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu	His	Ala	Gly	Cys	Arg	Phe	Arg	Phe
1				5				

40

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly	Leu	Gln	Thr	Ser	Gly	Arg	Glu	His	Ala	Gly	Cys	Arg	Phe	Arg	Phe
1				5					10					15	

<210> 7

10

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala	Ser	Gln	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	Leu	Gln	Thr
1				5					10					15	

Ser	Gly	Arg	Glu	His	Ala	Gly	Cys	Arg	Phe	Arg	Phe
			20					25			

20

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly	Gly	Phe	Ser	Phe	Arg	Phe
1				5		

30

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Lys	Gly	Gly	Phe	Ser	Phe	Arg	Phe
1				5			

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe
1 5

<210> 11

10

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Thr Ser Gly Pro Leu Gly Asn Leu Ala Glu Glu Leu Asn Gly Tyr Ser
1 5 10 15

Arg Lys Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe
20 25

20

<210> 12

<211> 375

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> mouse

30

<220>

<221> CDS

<222> 1..375

<223>

<400> 12
atg agg ggc ttc cgg cct ttg ctt tcc cta ctt ctc cct ctg agt gcc 48
Met Arg Gly Phe Arg Pro Leu Leu Ser Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ala
1 5 10 15

tgc ttt ccc ctg ctg gac aga agg gga ccc aca gac atc ggt gac atc 96
 Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Gly Pro Thr Asp Ile Gly Asp Ile
 20 25 30

gga gcc agg atg aac tgg gcc cag ctg gct gag gga cat ccc ccc aac 144
 Gly Ala Arg Met Asn Trp Ala Gln Leu Ala Glu Gly His Pro Pro Asn
 35 40 45

tgc gtt caa aat cca cag cca cag gcc ctg ctt gtg gtg gcc agg gag 192
 Ser Val Gln Asn Pro Gln Pro Gln Ala Leu Leu Val Val Ala Arg Glu
 50 55 60

cag cag gcc tcc cac agg gag cac acc ggc ttc cgt cta ggg agg caa 240
 Gln Gln Ala Ser His Arg Glu His Thr Gly Phe Arg Leu Gly Arg Gln
 65 70 75 80

gac ggt agc agt gag gcc gca ggg ttc ctg ccc gcc gac tcg gag aag 288
 Asp Gly Ser Ser Glu Ala Ala Gly Phe Leu Pro Ala Asp Ser Glu Lys
 85 90 95

gcc agc ggc cct ctg ggg act ctg gca gag gag ctg agc agc tac agc 336
 Ala Ser Gly Pro Leu Gly Thr Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser
 100 105 110

cgg agg aag gga ggc ttc agc ttc cgc ttt gga cgg tga 375
 Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg
 115 120

10

<210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> mouse

20

<400> 13

Met Arg Gly Phe Arg Pro Leu Leu Ser Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ala
 1 5 10 15

Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Gly Pro Thr Asp Ile Gly Asp Ile
 20 25 30

Gly Ala Arg Met Asn Trp Ala Gln Leu Ala Glu Gly His Pro Pro Asn
 35 40 45

Ser Val Gln Asn Pro Gln Pro Gln Ala Leu Leu Val Val Ala Arg Glu
 50 55 60

30

Gln Gln Ala Ser His Arg Glu His Thr Gly Phe Arg Leu Gly Arg Gln
65 70 75 80

Asp Gly Ser Ser Glu Ala Ala Gly Phe Leu Pro Ala Asp Ser Glu Lys
85 90 95

Ala Ser Gly Pro Leu Gly Thr Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser
100 105 110

Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg
115 120

10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> mouse

<400> 14

20

Glu His Thr Gly Phe Arg Leu
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> mouse

30

<400> 15

Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe
1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> mouse

<400> 16

Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> mouse

<400> 17

Arg Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe
1 5

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> mouse

<400> 18

Ala Ser Gly Pro Leu Gly Thr Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe
20 25

<210> 19

<211> 1302

<212> DNA

10

20

30

<213> Unknown

<220>

<223> mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1302)

<223>

10

<400> 19

atg	cag	gcg	ctc	aac	atc	acc	gcg	gag	cag	ttt	tcc	cgg	ctg	ctg	agc	48
Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Ser	Arg	Leu	Leu	Ser	
1			5					10					15			
gca	cac	aac	ctg	act	cgg	gaa	cag	ttc	att	cat	cgc	tat	ggg	ctg	cga	96
Ala	His	Asn	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Phe	Ile	His	Arg	Tyr	Gly	Leu	Arg	
		20					25					30				
cgc	ctg	gtc	tac	acc	cgg	gag	ctg	ccc	gcg	cgc	gct	aaa	ctg	gcc	ttt	144
Pro	Leu	Val	Tyr	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro	Ala	Arg	Ala	Lys	Leu	Ala	Phe	
		35				40						45				
gcg	ctg	gct	gga	gca	ctc	att	ttt	gcc	ctg	gcg	ctc	ttt	ggc	aac	tct	192
Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	Phe	Ala	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Asn	Ser	
	50				55						60					
ctg	gtc	atc	tat	gtg	gtg	acc	cgc	agc	aag	gcc	atg	cac	acc	gtc	acc	240
Leu	Val	Ile	Tyr	Val	Val	Thr	Arg	Ser	Lys	Ala	Met	His	Thr	Val	Thr	
65				70					75					80		
aac	atc	ttc	atc	tgc	tct	ctg	gca	ctc	agt	gat	ctg	ctc	att	gcc	ttc	288
Asn	Ile	Phe	Ile	Cys	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Ala	Phe	
			85						90					95		
ttc	tgc	atc	ccc	gtc	acg	atg	ctc	cag	aac	atc	tcc	gac	aag	tgg	ctg	336
Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Ser	Asp	Lys	Trp	Leu	
			100					105					110			
ggc	ggc	gcc	ttc	atc	tgc	aag	atg	gtg	ccc	ttc	gtc	cag	tcc	act	gct	384
Gly	Gly	Ala	Phe	Ile	Cys	Lys	Met	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Ser	Thr	Ala	
		115				120						125				
ggt	gtg	acg	gaa	atc	ctc	acc	atg	act	tgc	atc	gct	ggt	gag	agg	cac	432
Val	Val	Thr	Glu	Ile	Leu	Thr	Met	Thr	Cys	Ile	Ala	Val	Glu	Arg	His	
	130				135						140					
caa	gga	ctc	atc	cat	cct	ttt	aaa	atg	aag	tgg	cag	tac	act	acc	cga	480
Gln	Gly	Leu	Ile	His	Pro	Phe	Lys	Met	Lys	Trp	Gln	Tyr	Thr	Thr	Arg	
145				150						155					160	
agg	gct	ttc	aca	atc	ttg	ggc	gtg	gtc	tgg	ttg	gca	gcc	atc	atc	gta	528
Arg	Ala	Phe	Thr	Ile	Leu	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Ala	Ala	Ile	Ile	Val	

40

			165				170				175					
			gga tca ccc atg tgg cac gta caa cgc ctc gag att aag tat gac ttc											576		
	Gly	Ser	Pro	Met	Trp	His	Val	Gln	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Tyr	Asp	Phe
				180					185					190		
			ctc tat gag aaa gaa cat gtc tgc tgt ttg gaa gag tgg gcc agc ccc											624		
	Leu	Tyr	Glu	Lys	Glu	His	Val	Cys	Leu	Glu	Glu	Trp	Ala	Ser	Pro	
			195					200					205			
			atg cac cag aga atc tac acc acc ttc atc ctc gtc atc ctc ttc ctc											672		
	Met	His	Gln	Arg	Ile	Tyr	Thr	Thr	Phe	Ile	Leu	Val	Ile	Leu	Phe	Leu
			210				215					220				
			ctg ccg ctt gtg gtg atg ctt gtc ctc tac agc aag att ggc tat gaa											720	10	
	Leu	Pro	Leu	Val	Val	Met	Leu	Val	Leu	Tyr	Ser	Lys	Ile	Gly	Tyr	Glu
	225					230					235					240
			ctg tgg atc aag aag aga gtt gga gac agt tca gca ctt cag act atc											768		
	Leu	Trp	Ile	Lys	Lys	Arg	Val	Gly	Asp	Ser	Ser	Ala	Leu	Gln	Thr	Ile
				245					250					255		
			cac ggg aaa gaa atg tcc aaa ata gcc agg aag aag aag cgg gct gtc											816		
	His	Gly	Lys	Glu	Met	Ser	Lys	Ile	Ala	Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Ala	Val
			260					265					270			
			gtt atg atg gtg aca gtg gtg gct ctc ttc gct gcg tgc tgg gca cct											864		
	Val	Met	Met	Val	Thr	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Ala	Ala	Cys	Trp	Ala	Pro
			275					280					285			
			ttc cat gtt gtt cac atg atg gtt gag tac agt aac ttt gaa aaa gag											912	20	
	Phe	His	Val	Val	His	Met	Met	Val	Glu	Tyr	Ser	Asn	Phe	Glu	Lys	Glu
			290				295					300				
			tat gat gat gtc aca atc aag atg gtt ttt gct gtt gca caa aca att											960		
	Tyr	Asp	Asp	Val	Thr	Ile	Lys	Met	Val	Phe	Ala	Val	Ala	Gln	Thr	Ile
	305				310					315				320		
			ggc ttt ttc aac tcc atc tgt aat ccc ttt gtg tat gca ttt atg aat											1008		
	Gly	Phe	Phe	Asn	Ser	Ile	Cys	Asn	Pro	Phe	Val	Tyr	Ala	Phe	Met	Asn
				325					330					335		
			gaa aac ttc aaa aag aat ttt ttg tct gcg gtt tgt tat tgc ata gta											1056		
	Glu	Asn	Phe	Lys	Lys	Asn	Phe	Leu	Ser	Ala	Val	Cys	Tyr	Cys	Ile	Val
				340				345					350			
			aaa gaa acc ttc tcc cca gga cag aag cct gga aat tct ggg att tca											1104	30	
	Lys	Glu	Thr	Phe	Ser	Pro	Gly	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ser	Gly	Ile	Ser
				355				360					365			
			atg atg caa aag aga gca aag tta tca cga tca cag cgt cca gtg gcg											1152		
	Met	Met	Gln	Lys	Arg	Ala	Lys	Leu	Ser	Arg	Ser	Gln	Arg	Pro	Val	Ala
				370			375					380				
			gaa gcc aaa gga gac tta ttc agc gat gcc aac gtt gat gtc aaa ttg											1200		
	Glu	Ala	Lys	Gly	Asp	Leu	Phe	Ser	Asp	Ala	Asn	Val	Asp	Val	Lys	Leu
	385				390					395				400		
			tgt gag cag cca ggg gag aaa agg caa ctc aag cga cag ctt gcc ttc											1248		
	Cys	Glu	Gln	Pro	Gly	Glu	Lys	Arg	Gln	Leu	Lys	Arg	Gln	Leu	Ala	Phe
				405					410					415		40

ttt agt tct gaa ctt tct gaa aac tct act ttc ggc agt gga cat gaa 1296
 Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu
 420 425 430

ctg taa 1302
 Leu

<210> 20

<211> 433

<212> PRT

<213> Unknown

10

<220>

<223> mouse

<400> 20

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg
 20 25 30

20

Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Leu Ala Phe
 35 40 45

Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser
 50 55 60

Leu Val Ile Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met His Thr Val Thr
 65 70 75 80

Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Ala Phe
 85 90 95

30

Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Lys Trp Leu
 100 105 110

Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala
 115 120 125

Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His
 130 135 140

Gln Gly Leu Ile His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Thr Arg
145 150 155 160

Arg Ala Phe Thr Ile Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala Ile Ile Val
165 170 175

Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Arg Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe
180 185 190

Leu Tyr Glu Lys Glu His Val Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro
195 200 205

10

Met His Gln Arg Ile Tyr Thr Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu
210 215 220

Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu
225 230 235 240

Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gln Thr Ile
245 250 255

His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val
260 265 270

20

Val Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro
275 280 285

Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu
290 295 300

Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile
305 310 315 320

Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn
325 330 335

30

Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val
340 345 350

Lys Glu Thr Phe Ser Pro Gly Gln Lys Pro Gly Asn Ser Gly Ile Ser
355 360 365

Met Met Gln Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Ser Gln Arg Pro Val Ala
370 375 380
Glu Ala Lys Gly Asp Leu Phe Ser Asp Ala Asn Val Asp Val Lys Leu
385 390 395 400

40

Cys Glu Gln Pro Gly Glu Lys Arg Gln Leu Lys Arg Gln Leu Ala Phe
405 410 415

Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu
420 425 430

Leu

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C

(72)発明者 ジャン, イン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 0 7 6 , スコッチ プレインズ, スブルース ミル
 レーン 2 9 1

(72)発明者 ザン, ファン リヤン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 0 2 3 , ファンウッド, モントローズ アベニュー
 8 0

(72)発明者 ムーゴロ, ニコラス ジェイ.
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 9 4 6 , ミリントン, ローリング ヒル ドライブ
 9 9

(72)発明者 ルオ, リン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 8 2 0 , エディソン, カンターパリー レーン 1

(72)発明者 サイモン, ジェイソン エス.
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 0 9 0 , ウエストフィールド, サミット アベニュー
 - 1 0 1 9

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第00/078809(WO, A1)
 特開2006-254916(JP, A)
 "Human DNA sequence from clone RP11-83J21 on chromosome 9, complete sequenc
 e.", Accession No. AL161733, AL161733.20, [online], National Center for Biotechnology
 Information, 2001年12月3日掲載, 2008年12月24日検索, インターネット, [http://www.ncbi.n
 lm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?17384056:OLD03:1270167](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?17384056:OLD03:1270167)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C07K 7/00-7/66

C12Q 1/00-1/70

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	G蛋白偶联受体配体及方法		
公开(公告)号	JP4594623B2	公开(公告)日	2010-12-08
申请号	JP2003584089	申请日	2003-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	先灵公司 先灵葆雅有限公司		
申请(专利权)人(译)	先灵公司		
当前申请(专利权)人(译)	先灵公司		
[标]发明人	ジャンイン ザンファンリャン ムーゴロニコラスジェイ ルオリン サイモンジェイソンエス		
发明人	ジャン, イン ザン, ファン リャン ムーゴロ, ニコラス ジェイ. ルオ, リン サイモン, ジェイソン エス.		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/02 C07K14/47 C07K7/06 C07K7/08 C12P21/02 G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61P3/04 A61P25/04 C07H21/04 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/567 G01N33/68		
CPC分类号	A61P1/00 A61P3/00 A61P3/04 A61P11/06 A61P25/00 A61P25/04 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/723 G01N33/566 G01N2333/726 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/02 C07K14/47 C07K7/06 C07K7/08 C12P21/02.C		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/372640 2002-04-12 US		
其他公开文献	JP2005528894A JP2005528894A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及RF-酰胺肽及其在治疗, 预防和治疗神经和代谢医学疾病中的用途。本发明还涉及调节G蛋白偶联受体和鉴定调节受体的物质的方法。

ポリペプチドまたはポリヌクレオチド	配列の識別子
ヒトSP9155ヌクレオチド配列	配列番号1
ヒトSP9155アミノ酸配列	配列番号2
ヒトRF7アミドペプチド前駆体	配列番号3

