

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-121225

(P2004-121225A)

(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 P 3/02	A 6 1 P 3/02	4 B O 6 5
	審査請求 有 請求項の数 15 O L	(全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-170024 (P2003-170024)	(71) 出願人	399037243
(22) 出願日	平成15年6月13日 (2003. 6. 13)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレー ション
(62) 分割の表示	特願平4-510035の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン フルート ストリート 55
原出願日	平成4年4月6日 (1992. 4. 6)		
(31) 優先権主張番号	681, 702	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成3年4月5日 (1991. 4. 5)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(72) 発明者	セグレ ギノ ブイ
テフロン			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ エイランド セジメドウロード 58
		(72) 発明者	クロネンベルグ ヘンリー エム
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベ ルモント ヘイスティングスロード 48
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 副甲状腺ホルモンのレセプターとそれをコードしているDNA

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 副甲状腺ホルモンレセプターの提供と利用。

【解決手段】 副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA、組換え及び合成副甲状腺ホルモンレセプターポリペプチド及びその断片、副甲状腺ホルモンレセプター及びレセプター断片に対する抗体、候補化合物を副甲状腺ホルモンレセプターの作用に対するアンタゴニストあるいはアンタゴニスト効果についてスクリーニングする方法、及びこれらの化合物の利用による診断と治療法の提供。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脊椎動物の細胞レセプターをコードしている DNA 配列からなる分離された DNA であって、前記レセプターが、図 3 に示されているアミノ酸配列に少なくとも 30% の同一性を持つアミノ酸配列を持つことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA 配列が図 1 に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 1) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 3 に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 3) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記分離された DNA が (8 A 6) であって、ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 68570 と呼ばれていることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 6 に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 4) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が、図 1 に示されている DNA 配列 (SEQ ID NO. 1) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 3 に示されている DNA 配列 (SEQ ID NO. 3) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 6 に示されている DNA 配列 (SEQ ID NO. 4) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

【請求項 9】

ベクターの精製標品であって、前記ベクターが副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている DNA 配列からなることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載されている分離されている DNA を含む細胞であることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載されている細胞であって、前記細胞が前記の分離されている DNA から上記細胞レセプターを発現する能力のあることを特徴とする方法。

【請求項 12】

本質的に均質な細胞群であって、その各々が請求項 1 に記載されている分離された DNA を含むことを特徴とする方法。

【請求項 13】

分離された DNA が、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合することの出来るポリペプチドをコードしている DNA 配列からなることを特徴とする方法。

【請求項 14】

ポリペプチドを生成する方法で、前記方法が以下のことからなることを特徴とする：

10

20

30

40

50

副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を提供する方法、及び

前記DNAからポリペプチドの発現を可能にする条件下に前記細胞を培養する方法。

【請求項15】

副甲状腺ホルモンレセプター遺伝子の1部からなる1本鎖DNAであって、前記部分が少なくとも18核酸の長さであることを特徴とする方法。

【請求項16】

請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、前記部分が前記副甲状腺ホルモンレセプター遺伝子のすべてよりも短いことを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、上記DNAが標識されて検出可能であることを特徴とする方法。

【請求項18】

副甲状腺ホルモンレセプターcDNAの1部からなる1本鎖DNAであって、上記部分が少なくとも18ヌクレオチドの長さであることを特徴とする方法。

【請求項19】

請求項18に記載されている1本鎖DNAであって、前記DNAがアンチセンスであることを特徴とする方法。

【請求項20】

副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている組換えDNA分子の発現によって生成される副甲状腺ホルモンレセプターを特徴とする方法。 20

【請求項21】

請求項20に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターの本質的に精製された標品を特徴とする方法。

【請求項22】

請求項5に記載されているDNAの発現によって、生成される副甲状腺レセプターの本質的に精製された標品を特徴とする方法。

【請求項23】

少なくとも6個のアミノ酸、そして副甲状腺ホルモンレセプターの完全なアミノ酸配列よりは少ないアミノ酸からなるポリペプチドであって、上記ポリペプチドが副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来ることを特徴とする方法。 30

【請求項24】

請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記副甲状腺ホルモンレセプターがヒト副甲状腺レセプターであることを特徴とする方法。

【請求項25】

請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記断片が以下のものからなることを特徴とする方法。

(a) TNETREREVFDR LGMIYTVG、

(b) YLYSGFTLDEAERL TEEEL、

(c) VTFFLYFLATNYYWILVEG、

(d) Y-RATLAN TG CWDLS SGHKKWI IQVP、

(e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM、

(f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA、

(g) FFRLHCTRNY、

(h) EKKYLWGFTL、

(i) VLATKLRETNAGRCGTRQQYRKLLK、あるいは

(j) 副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来る(a)から(i)の断片。 40

【請求項26】

製剤上許容される担体中に、(a) 副甲状腺ホルモンレセプターあるいは(b) 上記レセ 50

プターの断片からなるポリペプチドを含む治療混合物を特徴とする方法。

【請求項 27】

副甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成することが出来る抗体を特徴とする方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載されている抗体と製剤上許容される担体からなる治療混合物を特徴とする方法。

【請求項 29】

動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項 26 に記載されている治療混合物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の阻害に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。 10

【請求項 30】

動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項 28 に記載されている治療混合物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の阻害に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。

【請求項 31】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする： 20

(a) 請求項 23 に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモンと、候補化合物の (i) 存在下あるいは (i i) 非存在下に接触させる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル (i) を、上記候補化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル (i i) と比較する；上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物は上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

【請求項 32】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする： 30

(a) 請求項 23 に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモン関連蛋白質と、候補化合物の (i) 存在下あるいは (i i) 非存在下に接触させる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベル (i) を、上記候補化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連化合物への結合レベル (i i) と比較する；

上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物が上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のあることを示唆する。

【請求項 33】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする： 40

(a) 副甲状腺ホルモンを請求項 11 に記載されている細胞と、候補化合物の (i) 存在下あるいは (i i) 非存在下に組み合わせる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル (i) を、上記候補化合物の非存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプター結合レベル (i i) と比較する；上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物は上記レセプターへの結合に対し上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

【請求項 34】

副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質の細胞表面上の副甲状腺レセプターへの結合を阻害する能力のある化合物を特徴とする方法。

【請求項 35】

請求項 34 に記載されている化合物と製剤上許容される担体からなる治療混合物を特徴とする方法。

【請求項 36】

副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている DNA 配列に相同な DNA 配列を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

ゲノムあるいは cDNA ライブラリーを提供し；

上記ライブラリーを請求項 18 に記載されている 1 本鎖 DNA と、上記 1 本鎖 DNA 及び
上記ライブラリー中の相同 DNA 配列間にハイブリッド形成が可能なような条件下に接触
させ；及び

上記ライブラリーから、上記 1 本鎖 DNA とハイブリッドを形成しているクローンを割り
出し確認する。そして、ハイブリッド形成は、上記クローンの中に、副甲状腺ホルモンレ
セプターをコードしている DNA 配列に相同な DNA 配列の存在することを示唆する。

【請求項 37】

副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしている DNA 配列からなるトランス遺伝子を持つ形質転換されたヒト以外の脊椎動物を特徴とする方法。

【請求項 38】

以下の内容からなる診断法を特徴とする方法：

(a) 動物から 1 回目の血液試料取り；

(b) 請求項 35 に記載されている混合物を上記動物に投与し；

(c) 上記混合物の上記投与のあとに上記動物から 2 回目の血液試料を取り；

(d) 上記 1 回目の血液試料中のカルシウムレベルを上記 2 回目の血液試料中のものと比較し、上記 2 回目の血液試料中のカルシウムレベルが低い場合は、副甲状腺ホルモン関連の状態をの診断に役立つ。

【請求項 39】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、上記 DNA の配列が副甲状腺ホルモンレセプターをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 40】

請求項 20 に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

【請求項 41】

請求項 23 に記載されているポリペプチドを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

【請求項 42】

請求項 27 に記載されている抗体を治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

【請求項 43】

請求項 26 に記載されている治療混合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

【請求項 44】

請求項 28 に記載されている治療混合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

【請求項 45】

請求項 20 に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 6】

請求項 2 3 に記載されているポリペプチドを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

【請求項 4 7】

請求項 2 7 に記載されている抗体を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

10

【請求項 4 8】

患者における副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質によって仲介される高カルシウム血症状態を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする方法：

(a) 患者からの 1 回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、

(b) 請求項 2 8 に記載されている治療混合物の投与後のある時期に患者から採取された 2 回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、

(c) 2 つの血液試料のカルシウムレベルを比較して、2 回目の血液試料中のカルシウムレベルの方がより低い場合は、患者に副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質に関係のある状態であることを示唆する。

20

【発明の詳細な説明】**【0 0 0 1】****【発明の属する技術分野】**

ここに記載する研究の助成金は一部アメリカ合衆国政府によって提供されたものであり、同政府は本発明に対し一定の権利を保有する。

本発明は内分泌レセプターに関する。

【0 0 0 2】**【従来の技術】**

ホルモン作用発現の重要な段階は、ホルモンと標的細胞の原形質膜表面上にあるレセプターとの相互作用である。ホルモナーレセプター複合体の形成によって、細胞外シグナルを細胞内に導入して種々の生物学的反応を顕現化することが可能となる。例えば、濾胞刺激ホルモン (F S H)、黄体形成ホルモン (L H)、甲状腺刺激ホルモン (T S H)、及び絨毛性性腺刺激ホルモン (C G) のようなホルモンの、その細胞表面レセプターへの結合はレセプターの高次構造の変化を誘発し、その結果、レセプターと導入分子、即ち、その一成分が (G_s) である刺激性グアニンヌクレオチド (G T P) 結合蛋白質との連携が起こる。この連携はアデニル酸シクラーゼを刺激し、次いで蛋白質のリン酸化、ステロイドの合成と分泌、及びイオンフラックスの調節のような他の細胞の過程を刺激する。アルギニンバソプレッシン (A V)、アンギオテンシン I I、及びノルエピネフリンを含む他のホルモンの、その細胞表面レセプターへの結合の結果、(G_p) のような別のタイプの G T P 結合蛋白質成分の活性化をもたらし、次いで酵素ホスホリパーゼ C の活性を刺激する。ホスホリパーゼ C による加水分解の生成物は、細胞内カルシウムの動員と蛋白質のリン酸化を含む細胞内現象の複雑なカスケードを引き起こす。

30

40

【0 0 0 3】**【発明が解決しようとする課題】**

副甲状腺ホルモン (P T H) はカルシウムの恒常性の主要な調節物質であり、その重要な標的細胞は骨と腎臓に存在する。カルシウム濃度の調節は、胃腸、筋肉、神経、神経筋、及び心臓血管などの系の正常な機能のために必要である。P T H の合成と分泌は、主として血漿のカルシウムレベルによって制御される：低レベルでホルモンの合成と分泌の両方を刺激し、高レベルは抑制する。次いで P T H は、直接的または間接的に、3 つのカルシウム交換部位、即ち、腸、骨、及び腎臓におけるカルシウムの血中への流入を促進するこ

50

とによって血漿カルシウムレベルを維持する。PTHは腎臓における活性型ビタミンDの生合成を助成することによってカルシウムの胃腸からの正味の吸収に寄与する。PTHは造骨細胞を阻害し、また、間接的に、骨吸収細胞である破骨細胞の分化を促進することによって骨からのカルシウム再吸収を促進する。このホルモンは、また、腎臓に対する少なくとも3つの効果：尿細管のカルシウム再吸収の刺激、リン酸クリアランスの向上、及び活性型ビタミンDの合成を完結する酵素量の増大促進を仲介する。PTHによるレセプター仲介のホスホリパーゼCの活性化も報告されているが(Hruska et al., J. Clin. Invest. 79:230, 1987)、PTHはこれらの効果を主としてレセプター仲介によるアデニル酸シクラーゼの活性化を通じて発揮する。

【0004】

10

カルシウム恒常性の崩壊は多くの臨床的障害（例えば、重症な骨の疾患、貧血、腎障害、潰瘍、筋障害、及び神経障害）を引き起こすことがあり、普通は、副甲状腺ホルモンのレベルの変化を起こすような状態に起因するものである。高カルシウム血症は血漿カルシウムレベルの上昇を特徴とする症状である。それは、しばしば、副甲状腺の病変（例えば、腺腫、増殖、または癌腫）の結果としてPTHの生産過剰が起こる一次性副甲状腺機能亢進症に関連している。もう一つのタイプの高カルシウム血症、悪性の体液性高カルシウム血症(HHM)はもっとも普通の腫瘍の症候群である。それは大抵の場合、腫瘍（鱗状、腎臓、卵巣または膀胱の癌種）によるPTHとアミノ酸相同性を共有する新しいクラスの蛋白質ホルモンの生成に起因するようである。これらのPTH関連蛋白質(PTHrP)は一見、PTHの腎臓と筋肉に対する作用のあるものを模倣し、これらの組織におけるPTHレセプターと相互作用すると信じられている。PTHrPは、通常、ケラチノサイト、脳、下垂体、副甲状腺、副腎皮質、髄質、胎児の肝臓、造骨細胞様細胞、及び授乳期の乳腺を含む多くの組織に少量見出だされる。多くのHHM悪性腫瘍において、PTHrPは循環系に高レベルで見出だされ、HHM関連の高カルシウムレベルを生じる。

20

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は脊椎動物の細胞のレセプター、望むべくは、副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列からなる分離されたDNAを特徴とする。このレセプターは、図3に示されているアミノ酸配列（配列番号：3）に対し少なくとも30%（望ましいのは少なくとも50%、更に望ましいのは少なくとも60%、そして最も望ましいのは少なくとも75%）同一のアミノ酸配列を持つものである：即ち、2つのアミノ酸配列間で（標準の方法を用いて）最近似部位を求める場合、前者の配列のアミノ酸残基の少なくとも30%が後者の配列のアミノ酸残基と同一ということである。“分離された”とは、このDNAが、本発明のDNAが由来する（何であれ）生物に本来あるゲノム内で、本発明のDNAをコードしている遺伝子に直接隣接している遺伝子のコーディング配列を全く持たないということを意味する。分離されたDNAは一本鎖、または二本鎖でもよく、また、ゲノムDNA、cDNA、組換えハイブリッドDNA、あるいは合成DNAでもよい。それは自然に存在する細胞のレセプター（例えば、PTHレセプター）をコードしているDNA配列と同一かも知れず、あるいは、このような配列とは、1つあるいはそれ以上のヌクレオチドの欠落、付加、または、置換によって異なるかも知れない。本発明の一本鎖DNAは、一般に少なくとも8ヌクレオチドの長さを持ち（望ましいのは、少なくとも18ヌクレオチドの長さ、そして更に望ましいのは30ヌクレオチドの長さ）、遺伝子あるいはcDNAの全長に及ぶこともある。これらはハイブリッド形成プローブとして用いるため、検出され易いように標識されていることが望ましく、また、アンチセンスのこともあり得る。出来れば、この分離されたDNAは高度緊縮条件下に、図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、あるいは図6（配列番号：4）に示されているDNA配列の全体、あるいは一部とハイブリッドを形成することが望ましい。“高度緊縮”とは、例えばヒト腎臓のPTHレセプターcDNAの分離のための以下に記載されているような条件を意味する(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York

30

40

50

、 1989も参照のこと、ここには引用して組み込まれている）。最も望ましいのは動物が哺乳類（オポッサム、ラットあるいはヒト）であり、DNA配列が図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、あるいは図6（配列番号：4）に示されているアミノ酸配列を本質的にすべてコードしており、あるいはAmerican Type Culture Collection（ATCC）に寄託され、ATCC受託番号68570あるいは68571と名付けられているプラスミドの1つのコーディング配列によってコードされていることである。本発明のDNAは、この発明の細胞レセプター（例えば、副甲状腺ホルモンレセプター）、あるいはそのレセプターの断片をコードするDNA配列を含むあるベクター〔それは精製票品（例えば、ライブラリーを形成するベクターの混合物から分離されたあるベクター）として提供されるかも知れない〕に、及びそのベクター（あるいは上記の分離されたDNA）を含む細胞、または本質的に相同な細胞集団（例えば、原核細胞、あるいは哺乳動物細胞のような真核細胞）に組み込まれることもあり得る。“本質的に相同”とは、少なくとも99%の細胞が本発明のベクター（あるいは、場合によっては分離されたDNA）を含むことを意味する。望ましいのは、このベクター（例えば、R15B）が副甲状腺ホルモンレセプターの発現を（例えば、ベクターを移入され、あるいはベクターで形質転換された細胞に）指示する能力を持つことである。

【0006】

別の観点から見ると、本発明は、細胞レセプターをコードしている組換えDNA分子の発現によって生成される細胞レセプター、望むべくは副甲状腺ホルモンレセプター（あるいはその本質的に精製された標品）を特徴とする。“本質的に精製された標品”とは、それが自然状態で結合している蛋白質や脂質を実質的には含まない標品のことである。

【0007】

関連した観点からは、本発明は、自然状態で存在するこの発明の細胞レセプターの断片を含むポリペプチドを特徴とする。望ましいのは、このポリペプチドが、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質と結合する能力を持つ自然状態で存在する副甲状腺ホルモンレセプターの断片を含むことである。好適な実施態様では、この断片は少なくとも6つのアミノ酸の長さで、以下のグループから選ばれた配列を持つ：

(a) TNETREREVEVFDRLGMIYTVG；（配列番号：5）

(b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL；（配列番号：6）

(c) VTFFLYFLATNYYWILVEG；（配列番号：7）

(d) Y-RATLAN TG CWDLS SGHKKWI IQVP；（配列番号：8）

(e) PYTEYS GTLWQIQMHYEM；（配列番号：9）

(f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA；（配列番号：10）

(g) FFRLHCTRNY；（配列番号：11）

(h) EKKYLWGFTL；（配列番号：12）

(i) VLATKLRETNAGRC DTRQQYRKLLK；（配列番号：13） あるいは

(j) 断片（即ち、少なくとも6残基の長さを持つが、全体よりは短い部分）あるいは（a）－（i）の類似体（アナログ）で、副甲状腺ホルモン、あるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質〔ここで“類似体（アナログ；analog）”とは、それが類似体であるペプチドと少なくとも50%（そして望ましいのは少なくとも70%）同等の配列を持つペプチドを指す〕を結合する能力を持つもの。出来れば、本発明のポリペプチドは組換えDNA分子の発現によって生成されるか、または合成品（即ち、生物学的よりも化学的な手段によって組み立てられた）であることが望ましい。本発明はこのようなポリペプチドを生成する方法を提供し、この方法には、本発明の細胞レセプター、あるいはレセプターの断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を提供すること、及びこの細胞を、分離されたDNAからポリペプチドの発現を可能にするような条件下で培養することが含まれる。

【0008】

本発明は、また、この発明の細胞レセプター（出来ればヒトのPTHレセプターのような副甲状腺ホルモンレセプター）と免疫複合体を形成する能力のある抗体（単クローン性または多クローン性）及び抗体の精製標品を特徴とする。このような抗体は、抗原として（1）本発明の細胞レセプターの断片を含むポリペプチド、あるいは（2）細胞表面上に存在する本発明の細胞レセプターを用いることによって生成される。この抗体は、出来れば、本発明の細胞レセプターの活性（即ち、レセプターにそのリガンドが結合する時、レセプターによって本来引き起こされるカスケード反応の一部を構成するもの）を中和（即ち、部分的に、または完全に阻害する）する能力を持つことが望ましい。好適な実施態様において、本発明の抗体は副甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成する能力を持ち、PTHレセプターの生物学的活性（即ち、アデニル酸シクラーゼの活性化、あるいはホスホリパーゼCの刺激）を中和することが出来る。

10

【0009】

また本発明には、製剤上許容出来る担体中に、（a）本発明の細胞レセプター、（b）本発明の細胞レセプターの断片を持つポリペプチド、あるいは（c）本発明の細胞レセプターに対する抗体を含む治療混合物が包含される。これらの治療混合物は、本発明の細胞レセプターのリガンドによる過剰刺激を特徴とする種々の疾病を処置する手段を提供する。好適な実施態様において、本発明のポリペプチドにはPTHレセプター、PTHレセプターの断片、及びPTHレセプターと免疫複合体を形成する抗体が含まれる。これらのポリペプチド及び抗体は、PTHあるいはPTHrPに関連する高カルシウム血症の症例を、これとは関連のないものと識別するための診断用薬として有用である。

20

【0010】

本発明の核酸プローブは、遺伝子工学の一般研究者が、細胞レセプター同族体、あるいは本発明の細胞レセプターに関連した、いかなる動物由来にせよ、その細胞レセプターを同定し、クローン化することを可能にし、本発明の配列の有用性を拡大する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明の他の特徴と利点は、以下の好適な実施態様の説明と請求の範囲から明らかになるであろう。

【0012】

材料と方法

一般：[Nle^{8, 18}, Tyr³⁴] bPTH(1-34)アミド (PTH(1-34))、[Nle^{8, 18}, Tyr³⁴] bPTH(3-34)アミド (PTH(3-34)) 及び [Nle^{8, 18}, Tyr³⁴] bPTH(7-34)アミド (PTH(7-34)) は Bachem Fine Chemicals, Torrance, CA から購入した；[Tyr³⁶] PTHrP(1-36)アミド (PTHrP(1-36)) は記載 (Keutman et al., Endocrinology 117:1230, 1985) されているように、Applied Biosystems Synthesizer 420A を用いて合成した。ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、EDTA/トリプシン及びゲンタマイシンは GIBCO (Grand Island, NY) から；牛胎児血清 (FBS) は Hyclone Laboratory, Logan, UT から入手した。ヒト腎臓の総RNAはスエーデン、ウプサラ、大学病院の Per Hellmann 氏によって提供された。オリゴヌクレオチドプライマーは Applied Biosystems 380B DNA Synthesizer を用いて合成した。制限酵素類、クレノウ酵素、T4 ポリヌクレオチドキナーゼと T4 DNA リガーゼは、New England Biolabs, Beverly, MA から購入した。子牛アルカリホスファターゼは、Boehringer Mannheim, ドイツから購入した。すべての他の試薬は入手可能な最高純度のものであった。

30

40

【0013】

細胞

使用された細胞には、COS細胞、OK細胞、SaOS-2細胞、CHO細胞、AtT2

50

0細胞、LLC-PK1細胞及びUMR-106細胞が含まれ、American Type Culture Collection (Rockland, Maryland)、受託番号、夫々、CRL1650、CRL6551、HTB85、CCL61、CCL89、CL101及びCRL1161を含む種々の供給源から入手した。ROS17/2及びROS 17/2.8はGideon Rodan博士(Merck Laboratories, West Point, PA)を含むいくつかの供給源から入手した。MC-3T3細胞はマウスの骨細胞から誘導されるが、滋野長平博士(医化学、医学部、京都大学、京都、日本)を含む種々の供給源からも入手出来る。

【0014】

すべての細胞は湿度95%の空気、CO₂ 5%を含む気相で培養され、牛胎児血清(M. A. Bioproducts, Walkerville, MD)を5%、あるいは、10%添加したハムF-12培地、あるいはDMEM培地(Grand Island Biological Co.)で単層培養として維持された。培地は3乃至4日ごとに交換され、細胞は2乃至3週ごとに標準の方法を用い、トリプシン処理によって継代培養された。

【0015】

クローニング

ラット及びオポッサムのPTH/PTHrPレセプターをコードしているcDNAクローンの分離：

総RNAは、最初にラットの骨肉腫(ROS)細胞(ROS 17/2.8)とオポッサムの腎臓(OK)細胞から、グアニジンイソチオシアネートを用いる標準法(Ullrich et al., Science 196: 1313, 1977; Chirgwin et al., Biochemistry 24: 5294, 1979)と塩化セシウム密度勾配遠心法(Gilsenet al., Biochemistry 13: 2633, 1974)によって分離された。次いでポリA+RNAs(mRNAs)は、AvivとLeder(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 14087, 1972)の方法により、総RNAsをオリゴdTカラム(Pharmacia, Piscataway, NJ)を通した後回収された。ROS 17/2.8 mRNAからのcDNAライブラリーは、ポリA+RNAからGublerとHoffman(Gene(Amst.) 25: 263, 1983)の方法を用いて作られた。オリゴdTをプライマーとする、及びランダムプライマーをプライマーとするcDNAは、夫々、ポリA+ROS 17/2.8及びOK細胞のmRNAから合成された(AvivとLeder, 前記)。cDNAはBstX1リンカー(Invitrogen, San Diego, CA)に連結され、5-20%の酢酸カリウム密度勾配遠心(3時間、55,000xg)によってサイズ選別が行われた。サイズ選別されたcDNAは、次いで、非自己アニーリングBstX1制限部位を用いてプラスミドベクター、pcDNA1(Invitrogen)に挿入された。その結果得られたプラスミドライブラリーは、次に、より大きなヘルパープラスミド、p3を持つE. coli(MC1061/P3, Invitrogen)を形質転換するのに用いられた。p3プラスミドは、2つの遺伝子にアンバー変異を持ち、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性をコードしている。アンピシリン及びテトラサイクリンを用いると、p3とpcDNA 1内に含まれているtRNAサプレッサー遺伝子の両方を持つ細胞のみが成長することが出来た。変異した細菌は、次いで集密状態まで培養され、プラスミドcDNAは標準技法(例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley Sons, New York, 1989を参照のこと)により分離された。これらDNAは、次いでDEAE-デキストラン溶液に取り込まれ、予め“サイドフラスコ”(Nunc、デンマーク)中で75%の集密度にまで培養されたアフリカミドリザルの腎臓(COS)細胞に移入するのに用いられた。

【0016】

ROSあるいはOK細胞の機能的に完全な副甲状腺ホルモン／副甲状腺ホルモン関連蛋白質（PTH／PTHrP）のレセプターを発現する能力のあるプラスミドを含むCOS細胞のスクリーニングは、Gearringらの方法（EMBOJ. 8: 3676, 1989）に従い、これにサイドフラスコ中でのDEAEーデキストラン移入を含むいくらかの変法を加えて行った。移入して48時間後、細胞は既述の方法（Yamamoto et al., Endocrinology 122: 1028, 1988）を用い、ただし例外として、インキュベーションの時間と温度は、夫々、2時間と室温に変更して、¹²⁵Iー標識[³⁶Tyr]PTHrP（1-36）アミドとの結合能を検査された。洗浄後、細胞は1.25%のグルタルアルデヒドで固定され、1%のゼラチンで洗浄された。サイドフラスコの先を折った後、残りの顕微鏡用スライドをNTB-2写真用乳液（Eastman Kodak, Rochester, NY）に浸した。4℃で3-4日間反応後、スライドは現像、固定され、そして0.03%のトルエンブルーで染色された。各スライドのスクリーニングは光学顕微鏡（オリンパス）下で行われた。ROS細胞からのプラスミド-DNAの1プール及びOK細胞からのプラスミド-DNAの2プール、（10,000個の独立クローン）から、夫々、PTH／PTHrプレセプターを発現している3-4個の移入されたCOS細胞が得られた。これらのプールは後に再分割された。サブプールはCOS細胞に移入するのに用いられ、そして個々のクローンは、放射性リガンドを結合することの出来るレセプター蛋白質を発現したことが確認された。

10

【0017】

ヒトのPTH／PTHrプレセプターをエンコードするcDNAとゲノムDNAクローンの分離

20

ラムダGT10中のヒト腎臓のオリゴdTをプライマーとするcDNAライブラリー（ 1.7×10^6 独立クローン）及びEMBL3（Sp6／T7）（Clontech, Palo Alto, CA）中のヒト胎盤DNAのゲノムライブラリー（ 2.5×10^6 独立クローン）は、³²Pー標識（ランダムプライマーをプライマーとする標識キット、ベリンガー、マンハイム、ドイツ）されたBamHI／NotI 1.8kbの制限酵素断片で、ラットの骨のPTH／PTHrプレセプターをコーディング配列の大部分をコードしているものとのブランクハイブリッド形成法（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2版、108-113頁、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989）によってスクリーニングされた（図3）。ニトロセルロースフィルターは、50%ホルムアミド、4xクエン酸ナトリウム生理食塩水（SSC；1xSSC：300mM NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0）、2xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、100μg/mlのサケ精子DNA（最終濃度）を含む前ハイブリッド形成溶液中、42℃で4時間インキュベートした。ハイブリッド形成は、同じ溶液中で42℃で18-24時間行われた。フィルターは、2xSSC／0.1%SDSで室温で30分間、次いで、1xSSC／0.1%SDSで45℃で30分間洗浄した。フィルムは、増強スクリーンを用い、-80℃で18-24時間、露出した。

30

【0018】

40

各ライブラリーから、約百万個のクローンがスクリーニングされた。陽性のクローンはブランク法で精製され、ラムダファージDNAが分離された（Sambrook et al., 上記）。クローン化された挿入断片は、ファージDNAから、制限酵素エンドヌクレアーゼ HindIIおよびEcoRI（ラムダGT10ライブラリー）、あるいはXhoIおよびSstI（EMBL3ライブラリー）を用いて取り出され、次いで適当な脱リン酸化された制限酵素部位を用いてpcDNAI（Invitrogen, San Diego, CA）中にサブクローンされた。CsCl₂（密度勾配）で精製されたサブクローンの配列決定は、Sangerら（Biochem. 74: 5463, 1977）の方法に従い、ジデオキシターミネーション法（Sequenase バージョン 2 sequencing キット、United States Bioch

50

emical Corporation, Cleveland, OH) によって行われた。

【0019】

逆転写とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

3 μ g のヒト腎臓由来のポリ (A) + RNA (Clontech, Palo Alto, CA) を 73.5 μ l の水の中で 100 °C で 30 秒 インキュベートし、氷冷して反応を静め、20 μ l の 5xRT 緩衝液 (1xRT 緩衝液: 40 mM トリス塩酸、pH 8.2、40 mM KCl、6.6 mM MgCl₂、10 mM ジチオトレイトールと各 5 mM のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP))、2 μ l (4 単位) の RNasin (Promega Biotech, Madison, WI)、1 μ l (80 pmol/ μ l) のヒト cDNA プライマー H12 (5'-AGATGAGGCTGTGCAGGT-3'; 配列番号: 14) と 80 単位のトリ骨髄芽球炎ウイルスの逆転写酵素 (Life Sciences, St. Petersburg, FL) に加えた。反応混合物を 42 °C で 40 分間 インキュベートした。次いで、10 分の 1 容の最初の鎖を合成する反応混合物は、PCR により、3 mM MgSO₄、200 μ M の dNTP、2 単位の Vent ポリメラーゼ (New England Biolab, Beverly, MA) と各 2 μ M の正方向と逆方向のプライマー (PCR の条件: 変性、1 分間、94 °C; アニール、1 分間、50 °C; 延長、72 °C で 3 分間; 40 サイクル) を含む最終容量 100 μ l の中で増幅された。

10

20

2 つの独立した PCR は、以下の 2 つの異なった正方向のプライマーを用いて行われた:

i) 2 つの以前にクローン化された PTH/PTHrP レセプター

G C C

(上述) コーディング末端に基づく変性プライマー RK-1 (5'-GGAAATTC CATGGGAGCGGCGCCGGAT-3'; 配列番号: 15)、及び、ii) ヒトゲノムクローン HPG1 の 5'-非コーディング領域に基づくプライマー RK-2 (5'-CGGGAATCCCGCGGCGCCCTAGGCGGT-3'; 配列番号: 16)。両 PCR 反応はヒトの PTH/PTHrP レセプターのコーディング領域の 713 ~ 731 番目のヌクレオチドを現す逆プライマー H26 (5'-AGTATAGCGTCCCTTGACGA-3') を用いた (図 4)。PCR の生成物はクレノー酵素により末端を平滑にされ、EcoRV で切断されて、脱リン酸された pcDNA1 にクローン化された。

30

【0020】

ノーザンブロット分析: 総 RNA は SaOS-2 細胞及びヒト腎臓からグアニジウムチオシアネート法 (Chirgwin et al., Biochem. 18: 5294, 1979) によって抽出された。ノーザンブロット分析のため、~10 μ g の総 RNA が 1.5 % / 3.7 % ホルムアルデヒドゲル上での電気泳動にかけられ、ニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell, Keene, NH) にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった (上記参照)。フィルターは、0.5 x SSC / 0.1 % SDS の最終洗浄条件で 30 分間、60 °C で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

40

【0021】

サザンブロット分析: ヒトゲノム DNA は SDS / プロテイナーゼ K 法 (Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36: 32, 1973) を用いて生成された。サザン分析のため、~10 μ g の DNA が SstI、PvuII 及び XhoI によって消化され、0.8 % アガロースゲル上の電気泳動にかけられ、ニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell, Keene, NH) にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった (上記参照)。フィルターは、0.5 x SSC / 0.1 % SDS の最終洗浄条件で 30 分間、55 °C で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

【0022】

機能分析

50

COS細胞に発現されたクローン化レセプターの機能的諸性質を特徴づける試験には以下のものが含まれた：

- I) PTHとPTHrPの断片及び類似体の結合、
- II) PTHとPTHrPの断片及び類似体によるサイクリックAMP蓄積の刺激、
- III) PTHとPTHrPの断片及び類似体による細胞内の遊離カルシウムの増大、及び
- IV) PTHとPTHrPの断片及び類似体によるイノシトールリン酸代謝の活性化。方法論は次の通りである：

【0023】

ラジオレセプターアッセイ

[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH-(1-34) アミド (NlePTH) 及び [Tyr³⁶] PTHrP (1-36) アミド (PTHrP) は Na¹²⁵I (担体なし、New England Nuclear, Boston, MA) により既報 (Segre et al., J. Biol. Chem. 254: 6980, 1979) に従ってヨード化され、逆相HPLCによって精製された。簡略に述べると、標識されたペプチドは0.1%のトリフルオロ酢酸 (TFA) に溶かされ、C₁₈ Sep-pakカートリッジ (Waters Associates, Inc., Milford, MA) にかけて、0.1% TFA中60%アセトニトリル溶液によって溶出された。凍結乾燥後、ラジオリガンドは、次いで、C₁₈-μBondapakカラム (3.9mm x 30cm, Waters Associates) にかけて、0.1% TFA中30-50%のアセトニトリルの直線密度勾配を用い、2ml/分の流速で30分かけて溶出した。ラジオリガンドは、2つのピークに別れて溶出した；最初のピークは約38%のアセトニトリルのところで溶出し、より高い総結合と特異的結合を示したので、この研究に用いられた。比活性は500±75mCi/mgで、これは平均のヨードペプチド比1に相当する。

【0024】

COS-7細胞は15cmのプレートで、DMEM、10%の熱不活性化FBS、10mg/Lゲンタマイシン中、80-90%の密集度まで培養された。DEAE/デキストラン法 (Sambrook et al., 上記) により1-2μgのプラスミドDNAを移入した24時間後、細胞をトリプシン処理し、多穴プラスチック皿 (直径16あるいは35mm, Costar, Cambridge, MA) に、細胞濃度5x10⁴ 細胞/cm² で再配分した。細胞数は移入後わずかに増加したのみであった。更に培養を48時間続けた後、ラジオレセプターアッセイが行われた。培養培地は、研究開始直前、50mMトリス塩酸 (pH7.7)、100mM NaCl、2mM CaCl₂、5mM KCl、0.5%熱変性牛胎児血清 (GIBCO)、5%熱変性ウマ血清 (KC Biological Inc., Lenexa, KS) を含む緩衝液と交換された。特に指示のない限り、研究は、細胞をこの緩衝液中、15℃、4時間、4x10⁵ cpm/ml (9.6x10⁻¹¹ M) の¹²⁵I-標識のNlePTHあるいはPTHrPとインキュベートして行われた。

【0025】

インキュベーションは、緩衝液を吸引除去し、粘着性細胞を含む培養皿を0.9% NaCl溶液で繰り返し (3回)、15秒間にわたって洗浄することによって終焉させた。細胞に結合した放射能は、各ウェルに連続 (3回) 1N NaOH (200μl) を加えることによって回収された。室温で30分後、このNaOHはガラス管に移された。二回目、三回目の1N NaOH (200μl) による抽出を、一回目のものと合わせ、総放射能はγスペクトロメーター (Packard Instruments, Downers Grove, IL) で測定された。細胞を含め培養皿へのトレイサーの付着は、たとえば容器が培養培地とプレインキュベーションされても、無視出来る程度であった (加えられた総カウントの0.2%以下)。

【0026】

cAMP蓄積の測定

細胞内cAMPの蓄積は既述(Abou-Samra et al., J. Biol. Chem. 262:1129, 1986)のようにして測定された。24穴プレート内の細胞を0.1%BSAと2mMIBMXを含む培地で洗浄した。次いで、細胞はPTHまたはPTHrPと15分間、37℃でインキュベートした。上清を除き、細胞は直ちにプレート全体をドライアイス粉末中に置くことによって凍結した。細胞内cAMPは1mlの50mMHCl中で細胞を融かすことによって抽出され、抗cAMP抗体(例、Sigma, St. Louis, MO)を用い、特異的ラジオイムノアッセイによって分析された。cAMPの代わりにトレーサーとして用いられたcAMP類似体(2'-オモノサクシニル-アデノシン3':5'-サイクリックモノリン酸トシルメチルエステル、Sigmaより購入)は、クロラミンT法によりヨウ素化された。遊離のヨウ素は、ヨウ素化されたcAMP類似体をC18 Sep-pakカートリッジ(Waters, Milford, MA)に吸着することによって除去した。dH₂Oで洗浄後、ヨウ化cAMP類似体はSep-pakカートリッジから40%アセトニトリル(ACN)と0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)によって溶出された。ヨウ化cAMP類似体は凍結乾燥され、1mlの0.1%TFAにもどし、C18逆相FPLCカラム(Waters)に注入された。カラムを0.10%ACNの1%TFA溶液で平衡化し、0.1%TFA中、10-30%ACNの密度勾配で溶出した。この操作によりモノヨウ化cAMP類似体を、非ヨウ化cAMP類似体から分離することが可能となる。トレーサーは-20℃で保存する時は、4ヶ月までは安定である。アッセイに用いられた標準品、アデノシン3', 5'りん酸はSigmaから購入した。試料(1-10μlのHCl抽出液)あるいは標準品(0.04-100fmol/チューブ)を50mM酢酸ナトリウム(pH5.5)で希釈し、トリエチルアミンと無水酢酸の混合物(容量比2:1)10μlでアセチル化した。アセチル化後、cAMP抗血清を、PBS(pH7.4)、5mMEDTA及び1%正常ウサギ血清中に作られた原液(1:4000)から加えた。トレーサーは、0.1%BSAを含むPBS(pH7.4)で希釈して加えられた(20,000cpm/チューブ)。アッセイは4℃で一晩インキュベートした。結合したトレーサーは100μlのヤギの抗ウサギ抗血清(1:20、PBS中)及び1mlの7%ポリエチレングリコール(分子量5000-6000)を加えて沈殿させ、2000rpmで30分間、4℃で遠心した。上清を除き、結合した放射能をγ-カウンター(Micromedix)で測定した。標準曲線はMicromedixから提供された4-パラメーターRIAプログラムを用いて算定した。典型的な例では、アッセイ感度は0.1fmol/チューブで、トレーサーの50%を置換する標準濃度は5fmol/チューブである。

【0027】

cAMP蓄積をアッセイする別法では、PTH/PTHrPレセプターcDNAを移入されたCOS細胞は、プラスチックポリスマンによって、10mMトリス-塩酸(pH7.5)、0.2mMMgCl、0.5mMエチレングリコールビス(2-アミノエチル)N, N'-四酢酸(EGTA)(Sigma)と1mMジチオトレイトール(Sigma)を含む溶液に集められる。細胞は緊密に合ったダウンスホモジェナイザーの20ストロークでホモジェナイズし、13,000xgで15分間4℃で遠心する(Eppendorf, 5412型, Brinkmann Instruments, Inc., Westburg, NY)。原形質膜を含むペレットはダウンスホモジェナイザーで数ストロークにより同じ緩衝液に再度懸濁し、更に同緩衝液で希釈して蛋白質濃度を、Lowryらの方法(Lowry et al., J. Biol. Chem. 193:265, 1951)で測定して約1.2mg/mlとする。約30μg(25μl)の膜を、種々の濃度のホルモン、または媒体のみと10分間、37℃(最終容量、100μl)で、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、0.8mMATP、4x10⁶cpm[α-³²P]ATP(New England Nuclear, Boston, MA)、9mMテオフィリン、4.2mMMgCl₂、26mMKCl、0.12%BSA、及び5mMクレアチンりん酸(Schwartz/Mann Division, 50

Becton-Dickens & Co., Orangeburg, NY) とクレアチンホスホキナーゼ (Schwartz/Mann) を含む ATP 再生系とインキュベートする。インキュベーションは、膜懸濁液を加えることによって開始され、100 μ l の 20 mM cAMP、約 50,000 cpm の [3 H] cAMP と 80 mM ATP を含む溶液を加えることによって終了させる。反応混合物を煮沸し、生成された [3 2 P] cAMP はイオン交換カラム (Dowex 50 W-X4, Biorad Lab, Richmond, CA) とアルミナ (Sigma) 上の連続カラムクロマトグラフィーによって精製される。[3 2 P] cAMP は β -シンチレーションカウンター (Packard Instrument Co.) で、[3 2 P] cAMP の回収に対する補正をして測定される。

10

【0028】

細胞内遊離カルシウムの測定

PTH/PTHrP レセプター cDNA を移入された細胞の細胞内カルシウムレベルの測定は、Fura-2 AM (Fura-2 のアセトメトキシエステル、Molecular Probes Inc., Eugene, OR) を負荷した細胞を用いて行われた。方法論の詳細は以下の通りである：

COS 細胞を塗布したカバーガラスを、Fura-2 AM を負荷し、以下のものを含む (mM 濃度) 緩衝液中でインキュベートした：HEPES (N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸])、20；CaCl₂、1；KCl、5；NaCl、145；MgSO₄、0.5；NaHCO₃、25；K₂HPO₄、1.4；グルコース、10；および Fura-2 AM (1-[2-(5'-カルボキシオキサゾール-2'-イル)-6-アミノベンゾフラン-5-オキシ]-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)、0.5；37℃で pH 7.4、95% 空気と 5% CO₂

20

とを 45 分間通した。Fura-2 AM を負荷した細胞は、次いで、以下のものを含む (mM 濃度) 修正クレブス・ヘンゼライト (KH) 緩衝液で洗浄した：HEPES、20；CaCl₂、1；KCl、5；NaCl、145；MgSO₄、0.5；Na₂HPO₄、1；グルコース、5；pH 7.4。エステルの開裂が起きたことをチェックするために、Fura-2 AM インキュベーション後、時間を変えて励起スペクトルを測定した。インキュベーション開始後 5 分で、励起スペクトルは約 360 nm にピークがあり、Fura-2 AM の不完全な加水分解を反映していたが、30 分を越えると、励起スペクトルは Fura-2 の特徴である約 345 nm にピークがあった。

30

個々の細胞の蛍光を測定するために、カバーガラスを顕微鏡の組織チャンバー (Biophysica Technologies, Inc., MD) に置いた。チャンバーは、シリコンラバーシールを持つテフロン製の浅い、傾斜のついたコンパートメントからなっていた。カバーガラスはチャンバーの底の役割をした。カバーガラスを所定の場所に密着させるシリコンラバーには、ヒーター/クーラーリングが封じ込められていた。温度はヒーターに 0-7.4 ボルトを加えることによって、22℃-37℃の間で変動させた。温度を特定しない限り、実験は 37℃で施行された。チャンバーは倒立顕微鏡 (Zeiss IM-35, Thornwood, NY) の載物台に載せた。Fura-2 の蛍光のために、コンデンサー (Photon Technologies International (PTI) Inc., NJ) の焦点におかれた 75 ワットのキセノンアーク灯で励起された。鏡板が透過光分割器と交番する回転チョッパーによって交番される回折格子単色光分光器が、波長選定に使用された。単色光分光器の出力は結集されて一本の共通の光路を形成し、調節可能な虹彩を通して発光源のハウジングを励起した。次いで、光は石英レンズを、そして 100 倍のニコン蛍光対物レンズを通して二色性の鏡を通過した。光量子計算 PMT 装置による検出が光の出力測定に使用された。データの分析は、MS-DOS 操作系を用いる IBM 互換性 AT/286 コンピュータに PTI ソフトウェアを使用して行った。データは圧縮二者択一形式に保存、操作された。

40

50

【0029】

細胞内のカルシウム濃度は次式に従って計算された： $[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R) B$ 、ここで、 R は340と380nmにおける細胞の蛍光の比であり； R_{max} と R_{min} は、夫々、飽和量のカルシウムと實際上ゼロのカルシウムの存在下の、Fura-2の340と380nm励起波長における蛍光強度の比であり； B は380nmにおけるゼロカルシウム存在下のFura-2の蛍光の、飽和量のカルシウム存在下の蛍光に対する比であり； K_d はFura-2のカルシウムに対する解離常数である。 R_{max} を測定するために、実験の終末にイオノマイシンをFura-2を負荷した細胞に加えて細胞外（1mM）と細胞内環境の間の Ca^{2+} を平衡化した。次いで、 R_{min} を計算するために、1mMのEGTAを細胞浸液に加えた。異なった温度では異なった解離常数が用いられた：34-37℃においては224nM、及び24-27℃においては135nMである。

10

【0030】

イノシトールりん酸の測定

PTH/PTHrPレセプターを移入されたCOS細胞におけるイノシトールりん酸の代謝レベルは既報の方法を用いて測定された（Bonventre et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990）。

【0031】

結果分子的性質

2つの別個のクローン（OK-H及びOK-O）は、ともにOK細胞のcDNAライブラリーから分離されたが、およそ2キロベースの長さを持っていた。これらのクローンの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は、夫々、図1（配列番号：1）及び図2（配列番号：2）に示されている。ROS細胞のcDNAライブラリーから分離されたR15Bクローンは、およそ4キロベースの長さであった。ラットの骨のPTH/PTHrPレセプターの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は図3（配列番号：3）に示されている。

20

【0032】

3つのcDNAクローンは、イニシエーターメチオニンとして有望な候補者と予想されるメチオニン残基をコードしているコドンを持つという範疇によって完全な長さのものと思われる。これらメチオニンコードンの後ろには、“シグナルペプチド”配列であることを示唆する性質を持つアミノ酸配列（DNAから演繹して）が続く。3つのレセプターcDNAはすべて、G-蛋白質関連のレセプターに典型的なモデル、推定の7回一貫膜モデルへの“適合”を可能にする位置に終止コドンを持つ。最も重要なことは、3つのクローン化されたレセプターが、すべて、リガンドと結合して活性化された時、細胞内のエフェクターを活性化する能力を有することである。これらの諸性質は、分離された3つのクローンすべてが、完全長のcDNAをエンコードすることを示唆する。

30

【0033】

図4は、OK-O及びROS 15BからのcDNAによってコードされているアミノ酸配列間の高度の相同性を示す。これら2つのレセプター間には、全体で87%の相同性があり、77.8%のアミノ酸の一致がある。このアミノ酸の長い範囲にわたっての高度の一致は、PTHレセプターのアミノ酸配列が進化の上で高度に保持されていることを証明している。これは、OK-OとR15B両者からのデータをヒトを含む他の動物種に外挿することを可能にする。

40

【0034】

図5は、3つのクローン化されたcDNAすべての推定アミノ酸配列を配列相同性に従って一線に整列させたものである。OK-H配列はOK-OとC-末端尾部を除き同一である。ここでOK-O配列は全部で585アミノ酸残基を持つが、OK-H配列は515アミノ酸で止まっている。これは、OK-O配列と比べてOK-H配列に欠けているただ1個のヌクレオチド（G）に起因し、前者におけるフレームシフトと早期の終止コードンの原

50

因となっている。OK-OとOK-Hが2つの別個の遺伝子の産物か、あるいは実験室の人為産物かは不明である。

【0035】

G蛋白質に共役したレセプターのいくつかは、イントロン無しの遺伝子によってコードされている(Kobilka et al., Nature 329:75, 1987; Kobilka et al., J. Biol. Chem. 262:7321, 1987; Heckert et al., Mol. Endocrinol., 6:70, 1992; Kobilka et al., Science 238:650, 1987; Bonner et al., Science 237:527, 1987; Sunahara et al., Nature 347:80, 1990)。ヒトのPTH/PTHrPレセプターcDNAを単離するために、ヒトcDNAライブラリーとヒトゲノムライブラリーの両者を、ラットの骨のPTH/PTHrPレセプターのコーディング領域の大部分を代表するプローブ(BamHI/NotI)を用いてスクリーニングした(図3)。ヒト腎臓のcDNAライブラリーのスクリーニングの結果、クローンHK-1が分離されるに至った(図6) [配列番号:4]。ラムダGT10の2つのEcoRIクローニングサイトの1つが、ライブラリー構成の結果、除去されたことが判明したので、cDNA挿入断片及び37kb(左)ラムダアームの~250bpを含むHindIII/EcoRIファージ断片をp cDNA Iの相当する制限部位にサブクローニングした。DNA配列決定の結果、クローン化されたcDNAは、3'コーディング領域の~1000bpと、Aの多い3'末端を含む3'非コーディング領域の~200bpを含むことが判明した。XhoI部位に対する5'側コーディング領域は、次いでライブラリーを再スクリーニングするのに使用され、クローンHK-2の分離を導いたが、これは、p cDNA Iへのサブスクリーニング後、コーディング領域の~1400bpを含むことが判明した。ライブラリーの第三のスクリーニングに対しては、HK-2のPvuII/PstIが用いられた; 分離されたクローンHK-3はHK-2と同一であることが判明した。

【0036】

ゲノムライブラリーのスクリーニング(~10⁶ pfu)の結果、4つの独立したクローンが分離された。これらのクロンの制限酵素消化断片のサザンブロット分析を正常ゲノムDNAのそれとの比較した結果、1つの15kbのゲノムクローン、HPG1(また、HG4Aとも呼ばれる)は、SstIで消化された正常のヒトゲノムDNAからの、ハイブリッドを形成するDNA種と同じサイズのSstI/SstI断片を含むことが判明した(下記参照)。SstI/SstI断片を構成するハイブリッドを形成する2.3kbのSstI/SstI DNA断片と、~8kb XhoI断片は、共にp cDNA Iにサブクローニングされた。さらにSstI/SstI DNA断片のサザンブロット分析の結果、ある~1000bpのBamHI/SstI断片がヒトのPTH/PTHrPレセプターの一部をコードしており、これが、後に、推定のシグナルペプチドと~1000bpのイントロンによって中断されている5'非コーディング領域をコードしているエクソンを代表していることが判明した(図7)。

【0037】

コーディング領域の残る~450ヌクレオチドを分離するために、ヒト腎臓からのポリ(A)+RNAをH12でプライミングの後、逆転写した(図7)。一本鎖合成後、2つの独立したPCRを以下の2つの別個の正方向プライマーを用いて行った: i) 2つの以前にクローン化されたPTH/PTHrPレセプター、OK-OとR15Bの5'コーディング末端に基づく変性プライマーRK-1, 及び、ii) HPG1の5'非コーディング領域に基づくプライマーRK-2である。H-26が両反応の逆プライマーとして用いられた。サザンブロットおよび制限地図分析によって、ヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている増幅されたDNAの予想されたサイズが確認された。ヒトのPTH/PTHrPの5'末端をコードしている平滑末端のPCR生成物は、脱リン酸されたEcoRV部位を用いてp cDNA Iにクローン化された。各PCRクロンの配

列分析によって、それらの 5'ヌクレオチドの違いは正方向プライマーの配列の違いによることが確認されたが、それ以外は同一の配列であることが明らかとなった。ヒトの PTH/PTHrP レセプター cDNA の両鎖のヌクレオチド配列決定により、593 アミノ酸残基を持つ蛋白質をコードしている開放読取り枠が明らかとなった (図 6、配列番号: 4)。

【0038】

完全長のヒト腎臓の PTH/PTHrP レセプター cDNA、HKrk は、PCR クローン #2 と HK-2 の BamHI/PvuII 断片を用いて構成された。ヒトの PTH/PTHrP レセプターをコードしている完全長の cDNA を用いて、ヒト腎臓と SaOS-2 細胞からの総 RNA (~10 µg/レーン) のノーザンブロット分析の結果、~2.5 kb の 1 つの主要なハイブリッドを形成する DNA 種が明かにされた (図 19)。正常のヒトゲノム DNA の XhoI 消化物は、同じ完全長の cDNA (図 20) でプローブされると、1 つの主要な約 5.5 kb のハイブリッドを形成する種と、弱くハイブリッドを形成する 4 と 8 kb の 2 つの DNA 種が現れた。これらのデータは、ヒトの PTH/PTHrP レセプターが単一の遺伝子の産物であることを示唆している。完全長のクローンは、次いで、機能的及び生物学的諸性質検討のため、上述の方法により COS 細胞に一過性に発現された。

10

【0039】

ヒトのレセプターのオポッサム腎臓の PTH/PTHrP レセプター及びラット骨の PTH/PTHrP レセプターとの比較により、夫々、81%と91%のアミノ酸配列の同一性が明らかになり、結果として非常に類似した疎水性プロットを示した (図 8)。すべての細胞外システインは、推定シグナルペプチドにおける 2 つのシステイン残基を含めて、すべての可能性のある細胞外の N-グルコシル化部位のように、保存されている。ヒトの腎臓とラットの骨の PTH/PTHrP の間で同一でないアミノ酸のいくつかは、ヒトとオポッサムのレセプターの間では保存されていることが判明した。これらの保存されているアミノ酸残基は、51 位の Arg から Leu、58 位の Arg から Trp、262 位の Arg から His、358 位の Asp から His、422 位の Ile から Thr、及び、427 位の Thr から Leu である。

20

【0040】

生物学的諸性質の検討

オポッサムとラットの PTH/PTHrP レセプターの生物学的性質の機能的特性の検討は一過性に移入された COS 細胞において、放射性リガンドとして ^{125}I -PTHrP と ^{125}I -NlePTH の両方を用いるラヂオレセプターアッセイ法により、また、リガンドによる cAMP の蓄積、細胞内遊離カルシウムの増加、及びイノシトールリン酸代謝の促進を測定するバイオアッセイにより、上記の方法によって行われた。

30

【0041】

図 9 は OK-H を発現している COS 細胞が、 ^{125}I -PTHrP を結合することを示している。これらのデータは、また、無傷の PTH (1-34)、またはアミノ末端で短縮されている (即ち、3-34 及び 7-34 類似体、これらは 8 位と 18 位にメチオニンの代わりに Nle 置換を、そして 34 位のフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持っている) PTH 類似体が結合の競合阻害剤として用いられた場合、PTHrP の結合が阻害されることを示している。同様に、OK-H を発現している COS 細胞への ^{125}I -NlePTH の結合は、PTHrP あるいは PTHrP 断片が競合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTH と PTHrP は共に OK-H によってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

40

【0042】

図 10 は、OK-H を発現している COS 細胞が、NlePTH に暴露されると細胞内の遊離カルシウムの濃度を増大するが、OK-O あるいは R15B レセプターを発現し (図 12 と図 14)、NlePTH で刺激されている COS 細胞と比べると、増加は程度が低い (平均 = 39 nm)、あるいは全く無いことを示している。OK-O あるいは R15

50

Bを発現しているCOS細胞とは異なり、OK-Hを発現しているCOS細胞はNlePTHで刺激された時、イノシトールリン酸の代謝の増加は検出されない（図15）。

【0043】

図11はOK-Oを発現しているCOS細胞が、¹²⁵I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、PTHrPの結合が、無傷のPTH（1-34）、またはアミノ末端で短縮されている（即ち、3-34及び7-34類似体、これらは8位と18位にメチオニンの代わりにNle置換を、そして34位にフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持つ）PTH類似体が結合の競合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への¹²⁵I-NlePTHの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が競合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTHとPTHrPが共にOK-Oによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

10

【0044】

図12はOK-Oを発現しているCOS細胞が、NlePTHとPTHrPによる刺激後、細胞内の遊離カルシウム濃度及びイノシトールリン酸の代謝速度を増大することを示している（図15）。

【0045】

図13はR15Bを発現しているCOS細胞が、¹²⁵I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、PTHrPの結合が、無傷のPTH（1-34）、またはアミノ末端で短縮されている（即ち、3-34及び7-34類似体、これらは8位と18位にメチオニンの代わりにNle置換を、そして34位にフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持つ）PTH類似体が結合の競合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への¹²⁵I-NlePTHの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が競合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTHとPTHrPが共にR15Bによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

20

【0046】

図14は、R15Bを発現しているCOS細胞が、OK-Oを発現しているCOS細胞が刺激された場合と同程度に細胞内カルシウム濃度を増大することを示している。

【0047】

図15は、R15BあるいはOK-Oを発現しているCOS細胞が、NlePTHあるいはPTHrPによる細胞の刺激後、イノシトール三リン酸（IP₃）とイノシトール二リン酸（IP₂）蓄積の急速な増加によって証明されるように、フォスファチジルイノシトールの加水分解速度を増大することを示している。逆に、OK-Hを発現しているCOS細胞は、NlePTH、あるいはPTHrPによる刺激後も、イノシトール三リン酸とイノシトール二リン酸の蓄積にいかなる増加も検出出来なかった。これらのデータは、R15BとOK-OによってコードされているPTHレセプターはホスホリパーゼCに、恐らくG_pを介して共役していることを示唆する。OK-OとOK-Hの間の唯一の違いはC末端尾部にあるので、これらのデータはOK-OとR15BによってコードされているPTHレセプターのC末端はホスホリパーゼCの活性化に関与していることを強く示唆する。

30

40

【0048】

図16は、R15BとOK-Hを発現しているCOS細胞が、NlePTHによる刺激後、cAMP蓄積を増大することを示している。同様の結果は、OK-Oを発現しているCOS細胞においても得られた。cDM18ベクターのみを移入されたCOS細胞ではcAMP刺激は認められなかった。これらのデータは、アデニル酸シクラーゼに共役しているPTHレセプターは、レセプターのC末端の細胞質側の完全長の尾部を必要としないことを示唆している。これらのデータは、OK及びROS細胞のcDNAライブラリーの双方からクローン化された3つのPTH/PTHrPレセプターのすべてが、両ペプチドのアミノ末端リガンドを同等に結合することを示唆している。リガンドによるこれらすべての

50

レセプターの活性化は、アデニル酸シクラーゼを、恐らくはグアニンヌクレオチド結合蛋白質（G-蛋白質）の1つの活性化を通じて、刺激する（細胞内cAMPの増加によって測定されるように）。G-蛋白質は、三量体ペプチド構造を持ち、そのうち、サブユニットの1つ、アルファは、夫々、別個であるが、他の2つ、ベータとガンマは同一か、または相溶性が高い。これらG-蛋白質の1つ、(G_s)はG-アルファ“刺激性”(G-アルファ-s)を含み、これはアデニル酸シクラーゼの活性化に関与する。

【0049】

リガンドのOK-Hへではなく、OK-OとR15Bへの結合もまた、細胞内の遊離カルシウムを増加してイノシトルリン酸の代謝を刺激する。これらの性質は、OK-OとR15Bレセプターのリガンドによる活性化は、共に第二の細胞内エフェクター、ホスホリパーゼCの刺激をもたらすことを強く示唆している。これら活性化されたレセプターとホスホリパーゼCとの共役機構は、G_sとは全く異なるG-蛋白質であるらしい。対照的に、カルボキシ末端で切り詰められている活性化されたOK-Hレセプターは、活性化された時のその性質が、ホスホリパーゼCを活性化しないか、あるいはホスホリパーゼCを効果のない活性化をすることを示唆する。 10

【0050】

PTH/PTHrPレセプターのカルボキシ末端尾部の生化学的役割は、鋳型としてR15Bを、そして481位に終止コドン挿入された上流プライマーとを用いる標準PCR技法により、カルボキシ末端短縮ラットレセプターR480を構成することによって、さらに検討された。簡略に述べると、上流プライマーはラットcDNA配列（図3；配列番号：3を見よ）の1494-1513番のヌクレオチドに基づく合成オリゴヌクレオチドで、これに終止コドンとXbaIクロニング部位が加えられたものであった。30回のPCRサイクルが行われ、各サイクルは変性92℃、1分；アニーリング60℃、1分；延長72℃1分からなっていた。生成物はNsiIとXbaIによって切断され、ゲル電気泳動によって精製された。R15Bは、XbaIとNsiIによって順次消化され、精製されたPCR生成物は、次いで、XbaI-NsiIで切断されたR15Bベクターに連結された。その結果出来たプラスミド、R480は細菌中で増幅され、配列が決定された。 20

【0051】

R480は、591アミノ酸残基を持つレセプター中のものと同一な480のアミノ酸をコードしている。この短縮cDNAはCOS-7（一過性発現）とCHO細胞（安定発現）に発現された。短縮レセプター、R480と自然型レセプター、RBを発現しているCOS-7とCHO細胞は共にPTH（1-34）を同等の親和性を持って結合する。活性化されると、R480は、正常型レセプターと同様にCOS-7とCHO細胞におけるcAMP蓄積を刺激した。正常型レセプターとは対照的に、R480はPTHで刺激された時、COS-7細胞、あるいはCHO細胞にも[Ca²⁺]イオンの増加を仲介しなかった。これらのデータは、PTH/PTHrPレセプターによるホスホリパーゼCとアデニル酸シクラーゼの活性化に対する分子的要求性はお互いに異なっていることを示唆し、PTH/PTHrPレセプターのカルボキシ末端尾部のホスホリパーゼCとの、しかしアデニル酸シクラーゼとではない、共役における主要な役割を指摘している。勿論、活性化されたPTH/PTHrPレセプターが追加のG-蛋白質および/または細胞内のエフェクター分子を活性化する可能性もまたある。 30 40

【0052】

クローン化されたヒトのPTH/PTHrPレセプターを移入されたCOS-7細胞の分析によって、放射標識PTH（1-34）とPTHrP（1-36）（～200,000 cpm）が発現されたレセプターに、R15B（特異的結合：夫々、8.1±3.5%と7.1±4.1%）を発現しているCOS-7細胞に対して観察されたのと同様の効率（特異的結合：夫々、10.1±3.7%と7.6±6.0%）で結合することが明らかとなった。発現されたヒトPTH/PTHrPレセプターは、ラット骨のレセプターよりも2倍高い見掛けのK_dでPTH（1-34）と結合した：～5nM対～10nM（図 50

17)。しかしながら、それらの高度のアミノ酸相同性にも拘らず、2つのレセプターはPTH(3-34)とPTH(7-34)に対する親和性に著しい差異を表した。PTHrP(1-36)はヒトのPTH/PTHrPレセプターに対し、ラットのレセプターに対するよりも2から4倍低い親和性を示した(HKrkに対する ~ 35 nM対R15Bに対する ~ 10 nM)。このことはPTHrP(1-36)がラジオリガンドとして用いられた時の方が、さらに著明であった。PTH(3-34)及びPTH(7-34)に対する親和性は、発現されたHKrkの方がR15Bよりも7から35倍も高かった(PTH(3-34)に対して、夫々、 ~ 7 nM対 ~ 45 nM; PTH(7-34)に対して、夫々、 ~ 60 nM対 ~ 2000 nM)。いずれかのレセプターを発現しているCOS細胞において、PTH(1-34)とPTHrP(1-36)は共に細胞内の遊離カルシウムとcAMPの蓄積を同程度に刺激した(図18)。

【0053】

PTH/PTHrPレセプターの関係

ヒトのPTH/PTHrPレセプターのアミノ酸配列は、ラット、真獣類動物からの骨PTH/PTHrPレセプターと比べて、非常に高度の保存を示すが、オポッサム、有袋動物のPTH/PTHrPレセプターとの配列の相同性はそれほど著明ではない。オポッサムの腎臓及びラットの骨のレセプターのように、ヒトの腎臓のレセプターは、PTHまたはPTHrPで刺激された時、細胞内のcAMPと遊離のカルシウムの増加を誘引する。ヒトのPTH/PTHrPレセプターとオポッサム及びラットの同族体間の高度の相同性にも拘らず、一過性に発現されたヒトのレセプターは、ラットの骨のレセプターとは異なった機能的特徴を持っている。これには、PTH(1-34)に対するやや高い親和性とPTHrP(1-36)に対する著しく低い親和性が含まれる。より高い親和性はPTH(3-34)と特にPTH(7-34)に対して認められ、そのヒトのレセプターに対する親和性はラット骨レセプターと比較して約35倍も高かった。これらの発見は、PTH/PTHrP類自体の将来の開発に重要な意味を持つかも知れない、それは種得異的な組織は、インビトロでアンタゴニスト(とアゴニスト)の有効性検査に対する適当な組織であることを予言するからである。

【0054】

PTH/PTHrPレセプターの他のレセプターに対する関係

PTHとPTHrPレセプターの生化学的諸性質は、これらがG-蛋白質連携の膜レセプターとして知られている膜レセプター分子群のメンバーであることを示唆している。よく調べられているG-蛋白質レセプターの構造的特徴は、それらがすべて、数個の連続した疎水性アミノ酸からなる少なくとも7つの領域を持ち、これらの領域の各々が原形質膜を貫通するのに十分な長さのものであることである。

【0055】

G-蛋白質連繋の膜レセプターの1つのサブファミリー、糖ペプチドレセプターサブファミリーと呼ばれるものには、糖ペプチドホルモン(甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、及び絨毛性性腺刺激ホルモン)によって結合され、活性化されるレセプターが含まれる。これらのレセプターは、すべて以下のような特徴がある：(1)リガンド結合ドメインの一部またはすべてを含むと思われる広範な推定アミノ末端細胞外ドメイン(300アミノ酸残基よりも大)を持ち、(2)著しいアミノ酸相同性を、殊に、7つの推定貫膜ドメインに示すことである。もう1つのサブファミリー、アドレナリン作動性/ムスカリン作動性サブファミリーと呼ばれるものには、カテコールアミン、神経筋伝達物質、及びレチノールのような小分子のリガンドによって活性化されるレセプターが含まれる。これらのレセプターは、すべて、特に7つの推定貫膜ドメインにおける著しいアミノ酸相同性に加えて、比較的短い(25-75アミノ酸)推定アミノ末端細胞外ドメインが特徴である。これらのレセプターのリガンドによる活性化には、多数の貫膜ドメインの内の少なくとも幾つかが関与すると思われ、レセプターのアミノ末端部が関与するとは思われない。

【0056】

ラットの PTH/PTHrP レセプター (図 3) の推定アミノ酸配列から推論され得るいくつかの構造的特徴は、PTH/PTHrP が 1 つの G-蛋白質連繋のレセプターであることを示唆している。アミノ末端は、1 つの疎水性ドメイン及び 3 つの連続したロイシン残基を含むシグナルペプチドの特性を示す。この 20-28 アミノ酸残基からなるアミノ酸範囲は、他の糖蛋白質レセプターの細胞外ドメインに先行するアミノ末端のように、リーダー配列として役立つのかも知れない。また、推定貫膜ドメインを代表する 7 つの疎水性部分の集団がある (図 19)。

【0057】

オポッサムの腎臓、ラットの骨、及びヒト腎臓の PTH/PTHrP レセプターの予想されるアミノ酸配列は、これらが G-蛋白質連繋のレセプターサブファミリーのいずれにもうまく当て嵌まらないことを示唆している。ラット及びヒトの PTH/PTHrP レセプターの糖ペプチドレセプター及びアドレナリン作動性/ムスカリン作動性サブファミリーとの全般的相同性はおよそ 10 から 20 % であるが、貫膜ドメイン内の相同性はこれより幾分高い。後のことは、これらの領域に出て来る疎水性アミノ酸のすべては限られているので、当然のことと予想される。20 % 相同性は、これらサブファミリーの夫々のメンバーとして一般に受け入れられているレセプター間で見出だされる相同性よりも遥かに低い。加えて、これらの配列には、限られた領域にさえ、強い相同性 (即ち、正確に合っているアミノ酸配列) として特徴付けられるようなものを持つ部分は全く存在しない。

【0058】

新たに特性が解明されたセクレチン及びカルシトニンレセプターとの最近の比較 (Ishihara et al., EMBO J. 10:1635, 1991; Lin et al., Science 254:1022, 1991) によって、これらのレセプターと PTH/PTHrP レセプターの間には 30 から 40 % の同一性のあることが判明している。PTH/PTHrP レセプターはカルシトニンレセプターより 100 個以上アミノ酸が長いけれども、オポッサム腎臓の PTH/PTHrP レセプター (配列番号: 2) とブタ腎臓のカルシトニンレセプター (GenBank 受託番号 M74420) のアミノ酸配列の間には ~32 % の一致がある。推定貫膜ドメイン V I I の 18 アミノ酸のうち 17 の範囲は同一である。また、4 つの N-連結グルコシル化部位のうち 2 つ、及び 8 つの細胞外システインとして可能性のあるもののうち 7 つの位置が保存されている。2 つのレセプター間の主要な差異は、それらの NH₂-末端と COOH-末端のドメインにあると思われる。ラットのセクレチンレセプター (GenBank 受託番号 X59132) とヒトの PTH/PTHrP レセプターのアミノ酸配列の比較により、推定貫膜ドメイン V I I の 25 のアミノ酸のうち 21 の範囲が一致していて、これら 2 つのレセプター間には 43 % の相同性のあることが示唆されている。PTH/PTHrP、カルシトニン、及びセクレチンのレセプター間の類似性は、こいれらが 7 回膜貫通の G 蛋白質に共役してアデニル酸シクラーゼを活性化するレセプターの新しいファミリーを代表することを示唆している。これらレセプターのアミノ酸配列が与えられれば、この道の専門家はこれらの配列を比較し、一致して核酸プローブ設計に役立つ領域を求め、このファミリーに属する他のレセプターの確認と分離に用いることが出来るであろう。

【0059】

クローンの寄託

特許手続きの目的のための微生物寄託についての国際的承認に関するブダペスト条約の約条の下に、cDNA 発現プラスミド R15B、OK-O 及び OK-H; ファージ HPG1; 及びヒトのクローンの一部を含むプラスミド (名称 8A6) が、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、そこでは、夫々の受託番号 ATCC No. 68571, 68572, 68573, 40998, 及び 68570 を付けられている。申請者の指定代理人、The General Hospital Corporation は、ATCC がこの寄託の永続性と、もし、特許が許可された場合には、その容易な分譲を提供する寄託所であることを申し立てる。このように寄託物質の分譲に関するすべての制限は、特許の許可と共に改変されることなく撤去

10

20

30

40

50

される。物質は特許申請の未決期間中は、37 C F R 1. 14 及び 35 U. S. C. 122 の下、コミッショナーによって資格ありと決定された者に分譲される。寄託された物質はあらゆる必要な注意を払って維持され、寄託されたプラスミドの試料提供に対する最も新しい要請後少なくとも5年間、そして、いかなる場合でも、寄託の日付後、少なくとも30年の期間、あるいは特許の実行期間、いずれか長い方の期間、生存状態で、汚染されないように保存を継続する。申請者の指定代理人は、もし、寄託物の状態のために、要請があっても寄託所が試料を提供出来ないならば、寄託物を取り替える責任のあることを認める。

【0060】

ポリペプチド

本発明によれば、ポリペプチドには、図1-3及び6に夫々、示されているオポッサム、ラット及びヒトの副甲状腺ホルモンレセプター、及びいかなる他の自然界に存在するレセプターにせよ、これらのレセプターをクローン化して発現するのに用いられたものに類似の方法により、あるいは、ここに記述されている配列の1つの全体または1部をプローブとして利用する方法によって生成され得るものを含む。さらに、副甲状腺ホルモン、または副甲状腺ホルモン関連蛋白質に対する結合能のあるPTHレセプターの類似体あるいは断片も本発明の範囲内にある。

【0061】

興味ある特異なレセプター類似体には、同類アミノ酸置換によってのみ異なる、例えば、同じクラスの他の代わりに1アミノ酸の置換（例えば、グリシンの代わりにバリン；リジンの代わりにアルギニン、等）、あるいは、1つ、またはそれ以上の非同類アミノ酸の置換、欠失、また副甲状腺ホルモン、または副甲状腺ホルモン関連蛋白質に結合するレセプターの能力を破壊しない位置にされた挿入によってのみ異なるアミノ酸配列を持つ完全長、あるいは部分長のレセプター蛋白質が含まれる。

【0062】

特に関心のある特異なレセプター断片には、これらに限られるわけではないが、レセプターの部分で、一次アミノ酸配列からChou-Fasman法（例えば、Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47: 251, 1978 参照）のような疎水性／親水性計算法を用いて細胞外であると推定されたものが含まれる。親水性ドメイン、特に少なくとも10個のアミノ酸からなる疎水性区間（参照、貫膜ドメイン）は、細胞外ドメインの有力な候補者として現れて来る。図21は、1つのPTHレセプターの細胞外、細胞内及び貫膜ドメインの予測される配置を図示している。

【0063】

特定のPTHレセプター断片の例には、R15Bクローンの推定アミノ酸配列に由来する以下のアミノ酸配列（標準の一字記号で示されている）が含まれている：

細胞外ドメイン：

RP-1: TNETREREVEVDRLGMIYTVG (配列番号：5)

RP-2: YLYSGFTLDEAERLTEEL (配列番号：6)

RP-3: VTFFLYFLATNYWILVEG (配列番号：7)

RP-4: Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP (配列番号：8 40)

RP-5: PYTEYSGLTWQIQMHYEM (配列番号：9)

RP-6: DDVFTKEEQIFLLHRAQA (配列番号：10)

細胞内ドメイン：

RPi-7: FFR LHCTRNY (配列番号：11)

RPi-8: EKKYLWGFTL (配列番号：12)

RPi-9: VLATKLRETNAGRC DTRQQYRKLLK (配列番号：13)

これらの断片はKeutmannらの方法（Ednocrinology 117: 1230, 1984）によって合成され、HPLCによって精製された。

10

20

30

50

【0064】

ポリペプチドの発現

本発明によるポリペプチドは、本発明の細胞レセプターの一部または全体をコードしている配列を持つ組換え核酸から、なにか適切な発現系、例えば、適当な宿主細胞（原核あるいは真核）の、適当な発現伝達体（例、p c D N A I）内の組換え核酸による突然変異を用いて、発現することにより生成することが可能である。正確にいかなる細胞を用いるかは、本発明にとって重要ではない。しかしながら、本発明のポリペプチドが P T H / P T H r P レセプターの全体または一部を含む場合には、以下の宿主細胞が好適である：C O S 細胞、L L C - P K 1 細胞、O K 細胞、A t T 2 0 細胞、及び C H O 細胞。移入の方法及び発現伝達体の選択は選ばれた宿主系に依存する。哺乳類細胞の移入の方法は、例えば、*Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989)* に記載されており、発現伝達体は、例えば、*Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, 補遺、1987)* に論じられているものから選んでもよい。安定に移入された細胞は、レセプター D N A を宿主細胞の染色体に組み込むことによって作ることが出来る。適当な D N A は、p c D N A, p c D N A I - N e o、あるいは他の適切なプラスミドに挿入され、次いで、細胞は、このプラスミドにより、p s V - 2 - N e o、あるいは p s V - 2 - D H F R との共同移入をして、あるいはしないで、標準電気が孔、りん酸カルシウム、及び／あるいは D E A E / デキストラン技法によって移入される。移入された細胞の選択は、累進的に上昇するレベルの G 4 1 8 (G e n e t i c i n, G I B C O)、そしてもし必要ならば、メトトレキサートを用いて行われる。

【0065】

本発明のポリペプチドをコードしている D N A 配列は、また、原核宿主細胞にも発現することが出来る。細胞のレセプター、あるいはレセプター断片をコードしている D N A は、原核細胞宿主における発現をもたらすことの出来る制御シグナルに作動可能に連結されたベクター上を運ばれる。もし希望ならば、コーディング配列は、その 5' - 末端に、発現された蛋白質の宿主細胞の周辺腔への分泌をもたらし、それによって蛋白質の回収とその後の精製を容易にすることの出来る既知のシグナル配列をなにかコードしている配列を含むものも出来る。最も頻繁に用いられる原核細胞は種々の *E. coli* の株である。しかし、他の微生物の株もまた使用してよい。プラスミドベクターは、複製起点、選択可能のマーカー、及び宿主微生物に適合する株に由来する制御配列を含むものが用いられる。例えば、*E. coli* は、p B R 3 2 2、これは *Boliver et al. (Gene 2: 95, 1977)* によって、3つの自然界に存在するプラスミド、そのうち2つは *Salmonella* の株から、1つは *E. coli* から分離されたものであるが、に由来する断片を用いて構成されたプラスミドであるが、その誘導体を用いて変異させることが出来る。p B R 3 2 2 は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性由来の遺伝子を含み、そのため、希望する発現ベクターの構築において、保持され、あるいは破壊され得る多数の選択可能なマーカーを提供する。一般に用いられる原核細胞の制御配列（また、“調節因子”とも呼ばれる）は、ここでは、随意的にオペレーター、リボソーム結合部位配列と共に、転写開始のためのプロモーターを含むものと定義される。蛋白質の発現を指令するために一般に用いられるプロモーターには、ラムダー由来の P L プロモーター及び N - 遺伝子リボソーム結合部位 (*Simatake et al., Nature 292: 128, 1981*) ばかりでなく、β - ラクターマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトース (l a c) (*Chang et al., Nature 198: 1056, 1977*) 及びトリプトファン (T r p) プロモーター系 (*Goeddel et al., Nucl, Acids Res. 8: 4057, 1980*) も含まれる。

【0066】

本発明の細胞レセプター蛋白質は、以下のような性質を持っているので、細胞内に発現す

ると、それは細胞膜へ、部分的には膜を貫通して移動し、その結果、その一部は膜に埋め込まれて止まり、一部は細胞外に伸展し、一部は細胞内に止まる。このような埋め込まれた細胞レセプターを持つ形質転換された細胞は、それ自身、本発明の方法の中で用いられてもよく、あるいは、レセプター蛋白質は膜から抽出され、精製されることも可能である。

【0067】

無傷の蛋白質を細胞膜に繋ぎ止める責任を負う蛋白質の疎水性部分を欠くペプチド断片は、発現しても、膜に埋め込まれることは期待されない。これらが細胞内に止まるか、あるいは細胞外培地に分泌されるかは、分泌を促進する機構（例えば、シグナルペプチド）が含まれているか、否かによる。もし、分泌されれば、本発明のポリペプチドは培地から収穫することが出来る。もし、そうでなければ、細胞は解体して、所期のポリペプチドは細胞の全内容から分離しなければならない。発現される可能性のあるポリペプチドの特殊例は、限界はないが、以下のものが含まれる：

1) 図3に示されるようなラットの骨のPTH／PTHrPレセプターの、推定リーダー配列を含む、アミノ酸1－192からなるアミノ末端部分。

2) 図3に示されるようなラットの骨のPTH／PTHrPレセプターの、推定リーダー配列を除外した、アミノ酸27－192からなるアミノ酸末端部分。

3) 図3に示されるようなラットの骨の完全長のPTH／PTHrPレセプター。

4) PR－1（上記のような）。

5) PR－2（上記のような）。

【0068】

本発明のポリペプチドは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて容易に精製することが出来る。これらのポリペプチドの抗体、あるいはレセプター特異的リガンド（例、PTH／PTHrPレセプターに対するホルモンPTHとPTHrP）は、セファロース

CNB r－活性化セファロース（Pharmacia）のような固相支持体に共有結合し、本発明のポリペプチドをなんらかの混入物質から分離するのに用いてもよい。一般的には、1mgのリガンドあるいは抗体がCNB rで活性化されたセファロースと4℃で17－20時間（振盪下）インキュベートされる。セファロースは、1Mトリス塩酸（pH 8）で洗浄して過剰の活性部位をブロックする。セファロース－PTH、セファロース－PTHrP、あるいはセファロース－抗体は、次いで、粗ポリペプチドとりん酸緩衝食塩液（pH 7.4）中、4℃で2時間インキュベートされる（振盪下）。セファロースは、次いで、一般的にはカラムに充填され、入念にPBSで洗浄され（一般的にはカラム容の10倍）、水で希釈した塩酸（pH 1.85）で溶出される。溶出液は、次いで、凍結乾燥により濃縮され、その純度は、例えば、逆層HPLCで検査される。

【0069】

抗細胞レセプター抗体

本発明の細胞レセプターあるいはレセプター断片は、専門家にはよく知られているなにか通常の方法によって、ポリクローナル抗体を産生する方法、及びモノクローナル抗体を産生する方法を含め、抗体を産生するのに用いることが出来る。例えば、PTHレセプターの推定アミノ酸配列は、他のG蛋白質連鎖レセプターに見出だされる領域に類似した細胞外と細胞内と思われる領域（図21を見よ）を点々配置した数個の貫膜（即ち、疎水性）ドメインを持つと思われる蛋白質構造を示している。この情報は、レセプター蛋白質の、細胞外に露出している見込みがあり、従ってin vivoで抗体に提示されるであろう領域の選択を手引きするために用いることが出来る。このような領域の1つ、あるいはさらに多くを表現する短いペプチドを合成し（例えば、化学的に、あるいは組換えDNA技法により）、ポリクローナル、あるいはモノクローナル抗体を産生するために動物（例えば、ウサギ、あるいはマウス）を免疫するのに用いることが出来る。例えば、上記のPTH／PTHrPレセプターのペプチドのあるもの（RP－1、RP－5、及びRP－6）は、標準の技法を用いて化学的に合成され、以下の手順によりウサギにポリクローナル抗体を産生するのに用いられた：

【0070】

完全フロイントアジュバントで乳化された所定のペプチドの標品をウサギに皮内に注射する。追加免疫は、不完全あるいは完全アジュバントで、1月間隔で注射される。

抗体価は2つの方法のいずれかを用いて評価される。第一に、抗体を1%正常ウサギ血清で連続希釈し、¹²⁵I-標識PTH/PTHrPレセプター断片と常法（例えば、Segre et al., 上記）により24時間、4℃でインキュベーションする。結合した¹²⁵I-標識PTH/PTHrPレセプター断片は、非結合のものから、100μlの第二抗体（抗ウサギIgG、Sigma）を20倍に希釈したもの及び1mlの5%ポリエチレングリコールを加え、次いで、2000rpmで30分、4℃で遠心することによって分離される。上清を除去し、ペレットをγカウンターで、放射活性の分析をする。第二の方法では、自然型の（例えば、ROS 17/2.8、OK、SaOS-2細胞）あるいは組換え（R15B、OK-OあるいはOK-Hを移入されたCOS細胞あるいはCHO細胞）PTH/PTHrPレセプターを発現している細胞系が、連続希釈された抗体と4℃、20℃、あるいは37℃で1-4時間インキュベートされる。細胞をPBSで（3回）洗浄し、¹²⁵I-標識（NEM、Dupon t）あるいはFITC-標識（Sigma）の第二抗体と2時間、4℃でインキュベートする。洗浄後（PBSで3回）、細胞は0.1M NaOHで溶解してγカウンターで測定されるか（もし、¹²⁵I-標識の第二抗体が用いられた時）、あるいは1%パラフォルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡法で検査された（もし、FITC-標識の第二抗体が用いられた時）。

10

【0071】

抗体を生成するもう1つの方法は、抗原として細胞（例えば、レセプターをコードしているDNAを移入されたCOA細胞のような哺乳類の細胞）の表面に発現されている本発明の無傷の細胞レセプター蛋白質を利用する。このような細胞は、常法、例えば、DEAE-デキストラン移入法により、細胞レセプターの高度の発現をコードし、且つ、指令することの出来るベクターを用いて生成することが出来る。例えば、PTH/PTHrPレセプターに特異的なモノクローナル抗体は以下の手順で生成される。

20

【0072】

ラットの組換えPTHレセプターを細胞表面に高度に発現している無傷のCOS細胞をBalb-cマウス（Charles River Laboratories, Willmington, MA）の腹腔内（IP）に注射する。マウスは4週ごとにIP注射により追加免疫を受け、融合の3日前に、静脈内（IV）追加免疫により超免疫される。このマウスから脾臓細胞を分離し、ミエローマ細胞と常法により融合する。ハイブリドーマは、標準のヒポキサンチン/アミノプテリン/チミン（HAT）培地で常法に従って選別される。PTHレセプターを認識する抗体を分泌するハイブリドーマは、最初、細胞あたりPTHレセプターのコピーを元来豊富に発現する細胞系（POS 17/2.8あるいはOK細胞）で、標準の免疫的技法を用いてスクリーニングして確認される。PTHレセプターに結合することの出来る抗体を生成するこれらのハイブリドーマは培養して、サブクローニングされる。次いでモノクローナル抗体の性質を新たに検討するために、ラズオレセプター及びcAMP刺激アッセイを用いる二次スクリーニングを行うことが出来る（以下参照）。

30

40

【0073】

PTHレセプターアンタゴニスト及びアゴニストのスクリーニング

本発明のポリペプチド及び抗体ならびに他の化合物は、PTH競合性、及びアンタゴニスト的あるいはアゴニスト的な性質について、ここに記載のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。

【0074】

一例をあげると、無傷の細胞上のPTHレセプターを認識するこれらの抗体は、PTHあるいはPTHrPとPTH/PTHrPレセプターへの結合に対し競合する能力についてスクリーニングされる。細胞表面にPTHレセプターを発現している細胞は、¹²⁵I-PTH類似体である¹²⁵I-NlePTHあるいは¹²⁵I-PTHrPと、試

50

料のポリクローナルあるいはモノクローナル抗体の存在下、4時間、15℃でインキュベートされる。使用される抗体は、粗抗血清、細胞培地、あるいは腹水由来のものか、あるいは精製された形のものである。インキュベーション後、細胞は結合緩衝液（例えば、生理食塩水）で洗浄、融解され、ガンマカウンターを用いて放射活性を定量分析される。PTHレセプターへのPTH類似体の結合を低減する抗体は、競合的、低減しないものは非競合的と分類される。

【0075】

抗体及びポリペプチドを含め、化合物は、それらのアゴニストあるいはアンタゴニストとしての性質につき、上記のcAMP蓄積、細胞内カルシウム、及び／あるいはイノシトールリン酸のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。細胞表面上にPTHレセプターを発現している細胞は、PTH、PTHレセプター抗体、あるいは両者を組み合わせたものと、2mM IBMX（3-イソブチル-1-メチルキサンチン、Sigma, St. Louis, MO）の存在下、5-60分間、37℃でインキュベートされる。サイクリックAMPの蓄積は、上述のように、特異的ラジオイムノアッセイによって測定される。PTHレセプターへの結合に対してPTHと競合し、且つ、PTHのcAMP蓄積に対する効果を阻害する化合物は、競合的PTHアンタゴニストと見做される。反対に、PTHレセプターへのPTHの結合と競合しないが、なお、PTHによるcAMP蓄積促進を阻害する（恐らくは、レセプター活性化部位を妨害することにより）化合物は、非競合的アンタゴニストと見做される。PTHレセプターへの結合に対しPTHと競合し、PTHの存在あるいは非存在下にcAMPの蓄積を刺激する化合物は競合的アゴニストである。PTHレセプターへの結合に対してPTHと競合しないが、PTHの存在あるいは非存在下に、なお、cAMP蓄積を刺激する能力があるか、あるいはPTH単独によって観察されるよりも高い蓄積を刺激する化合物は、非競合的アゴニストと見做される。

【0076】

使用例

本発明のポリペプチド、抗体、及び他の化合物は、本発明の細胞レセプターとその特異的リガンド間の相互作用に関連すると特徴づけられるような疾病の診断、分類、予後、及び／あるいは処置に有用である。例えば、高カルシウム血症及び低カルシウム血症のいくつかの型は、PTH及びPTHrPとPTH／PTHrPレセプター（複数）間の相互作用に関連している。高カルシウム血症は、血清のカルシウムレベルに異常な上昇のある状態である；それは、しばしば、副甲状腺機能亢進症、骨粗鬆症、乳腺、肺、及び前立腺の癌腫、食道の頭部及び頸部の類表皮癌、多発性骨髄腫、及び副腎腫を含む他の病気に関連している。低カルシウム血症は、血清カルシウムレベルが異常に低い状態であり、例えば、甲状腺手術後に起こる有効PTHの不足から生じることがある。

【0077】

初めの例では、本発明の化合物は、診断薬の製造に用いられ、これらは、高カルシウム血症を診断し、種々の高カルシウム状態を区別する、即ち、PTHあるいはPTHrPによって媒介される高カルシウム血症（例えば、副甲状腺機能亢進症及び悪性の体液性高カルシウム血症）を、これらの因子を含めぬ病気（例えば、骨に直接接触している悪性腫瘍の存在によって媒介される局所的骨軟化症、及び破骨細胞活性化因子（インターロイキン）、リンホトキシン、カルシトリオール、タイプEプロスタグランジン、及びビタミンD様ステロールのような体液性因子の増大によって媒介されるいくつかの希少型悪性腫瘍関連の高カルシウム血症）から区別するために用いられる。

【0078】

診断の1つの方法においては、血清の総カルシウム及び／あるいはイオン化されたカルシウムのレベルは、本発明のPTHあるいはPTHrPアンタゴニストの投与の前後に常法によって測定される。PTHあるいはPTHrP関連の高カルシウム血症は、本発明のアンタゴニストの投与後の血清カルシウムレベルの低下として検出することが出来る。対照的に、PTHあるいはPTHrP以外の因子によって媒介される高カルシウム血症状態に対しては、血清カルシウムレベルはアンタゴニストの投与後でさえ、不変のままの筈であ

10

20

30

40

50

る。

【0079】

本発明の他の診断的応用として、PTHあるいはPTHrPに関連する癌、例えば、悪性の体液性高カルシウム血症に関連する癌、を診断するために、及び、癌治療の間、PTHあるいはPTHrPのレベルを監視するために、生物学的試料中のPTHあるいはPTHrPのレベルの測定が可能となる。この方法には、本発明の組換え副甲状腺ホルモンレセプターの、組織試料に存在するPTHあるいはPTHrPへの結合を、ここに記述されている結合アッセイを用いて、測定することが含まれている。結合のレベルは、直接測定することも出来る（例えば、放射標識をしたPTHレセプターを用い、内在性PTHに結合する放射能をアッセイすることによって）。代わりに、試料（例えば、組織切片）へのPTHレセプターの結合は、組織切片をPTHレセプターに特異的な抗体で、標準の免疫技法（Clin et al., Hybridoma 5: 339, 1986）を用い染色して追跡することが出来る。

【0080】

第三の診断的アプローチでは、細胞系を(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Publishers, New York, 1987に記載されている方法により)適当なプロモーターに連結されたPTHレセプター遺伝子で安定に移入することが出来る。代わりに、PTH/PTHrPレセプターは、真核のベクター、即ち、pcDNAIから発現され、そして変異DHFR遺伝子を共移入して、メトトレキサート選択(Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 2495-2499, 1983)を経てさらに遺伝子の増幅を可能にすることが出来る。遺伝子のこのような高度の発現によって、PTHあるいはPTHrPに超感受性である不滅の細胞系が生成される。このような細胞は、PTHあるいはPTHrPの血液レベルを検出するための特に有用な手段を提供する。このような細胞系は、上昇したPTHあるいはPTHrPレベルを伴う状態（例えば、上記の状態）、あるいは、PTHあるいはPTHrPの異常に低いレベルを伴う状態（例えば、上記の状態）の診断に用いることが出来る。このような細胞系は、また、高カルシウム血症あるいは低カルシウム血症の治療の間に、夫々、PTHあるいはPTHrPレベルの退行あるいは増昇の監視に有用である。

【0081】

高カルシウム血症の疑いのある患者は、本発明の化合物を用いて治療してもよい。症状は突如として現れることがあり、逆転しなければ致命的なこともあり得るので早急な介入が重要である。1つの応用において、血清カルシウムレベルは、PTHあるいはPTHrPのアンタゴニストを含む、即座の治療の1コースで安定化する。この様なアンタゴニストには、PTHレセプター媒介による細胞の活性化に介入することが決定されている（ここに記述のアッセイにより）本発明の化合物が含まれる。アンタゴニストを投与するために、適当な抗体あるいはペプチドは、一般に、生理食塩水のような適当な担体中に調剤することによって薬剤の製造に用いられ、PTHレセプターへのPTHあるいはPTHrPの結合に対し適切な競合を提供する用量で、静脈内注射される（例えば、血清カルシウムレベルを10mg/dl以下に下げるのに十分な用量）。代表的な用量は、一日当たり、体重1kgにつき、抗体あるいはペプチド、1ngから10mgである。治療は、許容カルシウムレベル（即ち、レベルは10.1mg/dl以下）の長期維持のため、必要な時は反復してもよい。これは、高カルシウム血症の切っ掛けとなる、根底にある病状の緊急処置に必要なかも知れない、あるいは、それは、例えば、骨粗鬆症のような病状の長期にわたる処置に用いてもよい。

【0082】

他の応用において、本発明の方法に従ってアゴニストであると特徴付けづけられている本発明の化合物は、治療上、例えば、副甲状腺の部分的あるいは完全な外科的除去から起こる低カルシウム血症の処置に用いられる。アゴニストは、適当な担体（例えば、生理食塩水）中で調剤され、血清のカルシウムを許容レベル（即ち、およそ8mg/dl）までの

上昇をもたらす用量で、出来れば静脈内投与されるのが望ましい。有用な用量範囲は、1日、体重1kg当たり、アゴニスト1ngから10mgである。適切な血清カルシウムレベルを維持するために必要な場合、処置を繰り返すことも出来る。長期の処置は、副甲状腺切除を受けた患者に必要なことがある。

【0083】

本発明の核酸もまた治療のために用いることが出来る。PTHレセプターmRNA（あるいはPTHレセプターmRNAにアンチセンスであるRNAを表現する核酸構成）にアンチセンスであるオリゴヌクレオチドは、抗癌治療として用いられることもある。このアプローチは、例えば、PTHレセプター、PTHあるいはPTHrPの量あるいは活性を増大するゲノムの再配列あるいは増幅から生じる高カルシウム血症に対して有用である。この方法には、*in vivo*で、アンチセンスオリゴヌクレオチドを癌細胞に挿入することが含まれている。アンチセンス鎖は、内在性PTHレセプターmRNAとハイブリッドを形成して、蛋白質の翻訳を妨害し、それによって、このような細胞におけるPTHレセプターの生成を低下させ、PTH/PTHrP関連の腫瘍増殖を抑制する。アンチセンスの設計及び宿主細胞への挿入方法は、例えば、Weinberg et al., U. S. 特許番号4, 740, 463に記載されており、ここでは引用して組み込まれている。本発明のOK-H, OK-O及びR15BPTH/PTHrPレセプターの生化学的特徴の検討は、PTHのそのレセプターとの相互作用によって引き起こされることが現在知られている2つの伝達経路は別個のものであり、分別されるかも知れないことを示している。これらレセプターの予想アミノ酸配列は、イノシトールリン酸代謝を検出可能な程度に活性化するには見えないOK-Hは、OK-OあるいはR15Bよりも70アミノ酸分短いことを示唆している。本発明の配列とここに開示されている情報を用いて、いかなる動物種からのPTH/PTHrPレセプター遺伝子にせよ、これをクローン化、次いで改変して（例えば、部位特異的変異誘発により）、ホスホリパーゼCを活性化しないPTH/PTHrPレセプターを生成することが出来る。このことは、骨の再吸収及び骨の造成を含め、PTHによって仲介される種々の作用を分別する可能性を示すものであり、骨粗鬆症のような骨の疾病の治療に対して大きな重要性を持つ。

【0084】

PTHレセプターをコードしている本発明の核酸は、また、選択された組織特異的プロモーター及び／あるいはエンハンサーに連鎖し、その結果生じたハイブリッド遺伝子を、常法により（例えば、Leder et al., U. S. 特許番号4, 736, 866に記述され、ここには参照して組み込まれているような）、初期の分化段階にある動物の胚（例えば、受精した卵母細胞）に導入して形質転換した動物を作り出し、選択した組織（例えば、骨のオステオカルシンプロモーター）にPTHレセプターを高レベルで発現することが出来る。このようなプロモーターは、形質転換動物におけるPTHレセプターの組織特異的発現を指令するために用いられる。利用されるPTHレセプターの型は、用いられる動物種のものに類似のPTHレセプターをコードしている型、あるいは、それは、別種のPTHレセプター類自体をコードすることも出来る。1つの特例において、形質転換されたニワトリが、ニワトリの輸卵管に高レベルの発現を指令するプロモーターからPTHレセプターを発現するように工作された。このような動物は、高いカルシウム含量と、従ってより固い殻を持つ卵を産むことが期待される。

【0085】

他の実施態様

他の実施態様は、以下の特許請求の範囲内にある。例えば、本発明の核酸には、トリ、あるいは有袋類、げっ歯類、またはヒトのような哺乳類を含むいかなる脊椎動物種にせよ、これらから本来分離された遺伝子、あるいはcDNAあるいはRNAを包含する。オポッサム、ラット、及びヒトのような多様な動物種からのPTHレセプターに対して証明された高度の相同性は、ここに開示されたPTHレセプターの分離方法が、多様な動物種からの関連した細胞レセプターの分離に広く応用されることを示唆している。

【0086】

10

20

30

40

50

【配列表】

DNA及びアミノ酸配列のコンピュータ寄託

(1) 一般情報

(i) 申請者 Segre, Gino V.

Kornenberg, Henry M.

Abou-Samra, Abdul-Badi

Juppner, Harald

Potts, John T., Jr.

Schipani, Ernestina

(ii) 発明の名称: 副甲状腺ホルモンレセプター及びこれをコードしているDNA 10

(iii) 配列の数: 3

(iv) 通信住所

(A) 受信者 Fish & Richardson

(B) 通り 225 Franklin Street

(C) 市 Boston

(D) 州 Massachusetts

(E) 国 U. S. A.

(F) 郵便番号 02110-2804

(v) コンピュータの解読可能型

(A) 媒体タイプ: 3.5" ディスケット、1.44メガビット記憶容量 20

(B) コンピュータ: IBM PS/2 モデル 50Zあるいは55X

(C) 作動系: IBM P. C. DOS (バージョン3.30)

(D) ソフトウェア: ワードパーフェクト (バージョン 5.0)

(vi) 現在の申請データ:

(A) 申請番号:

(B) 提出日時:

(C) 分類:

(vii) 以前の申請データ

(A) 申請番号: 07/681, 702

(B) 提出日時: 30

(viii) 代理人/代理事務所:

(A) 姓名: Paul T. Clark

(B) 登録番号: 30, 162

(C) 照会/証明書番号: 00786/071001

(ix) 遠距離通信情報:

(A) 電話: (617) 542-5070

(B) テレファックス: (617) 542-8906

(C) テレックス: 200154

(2) 配列番号: 1 に対する情報:

(i) 配列の特徴: 40

(A) 配列の長さ: 1862

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG	60
GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GGCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC	115
Met Gly Ala Pro Arg Ile	
1 5	
TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC	163
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val	
10 15 20	
TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC	211
Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile	
25 30 35	
ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG	259
Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu	
40 45 50	
GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA	307
Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser	
55 60 65 70	
AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC	355
Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro	
75 80 85	
CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT	403
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp	
90 95 100	
GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA	451
Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly	
105 110 115	
GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC	499
Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp	
120 125 130	
TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC	547
Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser	
135 140 145 150	

10

20

30

TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA	595
Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu	
155 160 165	
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT	643
Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp	
170 175 180	
CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC	691
Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser	
185 190 195	
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC	739
Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys	
200 205 210	
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG	787
Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg	
215 220 225 230	
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC	835
Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser	
235 240 245	
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA	883
Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr	
250 255 260	
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG	931
Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala	
265 270 275	
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG	979
Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu	
280 285 290	
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT	1027
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser	
295 300 305 310	
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT	1075
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro	
315 320 325	
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC	1123
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn	
330 335 340	
ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG	1171
Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln	
345 350 355	

10

20

30

40


```

GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT 1219
Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn
360 365 370

ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA 1267
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg
375 380 385 390

TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC 1315
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val
395 400 405

CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG 1363
Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro
410 415 420

TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA 1411
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu
425 430 435

ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT 1459
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys
440 445 450

TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA 1507
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg
455 460 465 470

TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT 1555
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser
475 480 485

ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG 1603
Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val
490 495 500

GGA CCT CGA GGG GGC TGG CCT TGT CCC TCA GCC CTC GAC TAGCTCCTGG 1652
Gly Pro Arg Gly Gly Trp Pro Cys Pro Ser Ala Leu Asp
505 510 515

GGCTGGAGCC AGTGCCAATG GCCATCACCA GTTGCTGGC TATGTGAAGC ATGGTTCCAT 1712
TTCTGAGAAC TCATTGCCTT CATCTGGCCC AGAGCCTGGC ACCAAAGATG ACGGGTATCT 1772
CAATGGCTCT GGA CTTTATG AGCCAATGGT TGGGGAACAG CCCCCTCCAC TCCTGGAGGA 1832
GGAGAGAGAG ACAGTCATGT GACCCATATC 1862

```

10

20

30

40

(2) 配列番号：2 に対する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ： 1 8 6 3

(B) 配列の型： 核酸

(C) 鎖の数： 一本鎖

(D) トポロジー： 直線状

(xi) 配列

30

TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC	547
Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser	
135 140 145 150	
TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA	595
Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu	
155 160 165	
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT	643
Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp	
170 175 180	
CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC	691
Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser	
185 190 195	
TTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC	739
Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys	
200 205 210	
CC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG	787
Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg	
215 220 225 230	
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC	835
Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser	
235 240 245	
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA	883
Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr	
250 255 260	
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG	931
Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala	
265 270 275	
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG	979
Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu	
280 285 290	
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT	1027
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser	
295 300 305 310	
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT	1075
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro	
315 320 325	
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC	1123
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn	
330 335 340	

10

20

30

40

ACT	GAG	TGC	TGG	GAC	CTG	AGT	TCG	GGG	AAT	AAG	AAA	TGG	ATC	ATA	CAG	1171
Thr	Glu	Cys	Trp	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	Asn	Lys	Lys	Trp	Ile	Ile	Gln	
		345					350					355				
GTG	CCC	ATC	CTG	GCA	GCT	ATT	GTG	GTG	AAC	TTT	ATT	CTT	TTT	ATC	AAT	1219
Val	Pro	Ile	Leu	Ala	Ala	Ile	Val	Val	Asn	Phe	Ile	Leu	Phe	Ile	Asn	
	360					365					370					
ATA	ATC	AGA	GTC	CTG	GCT	ACT	AAA	CTC	CGG	GAG	ACC	AAT	GCA	GGG	AGA	1267
Ile	Ile	Arg	Val	Leu	Ala	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	Thr	Asn	Ala	Gly	Arg	
375				380					385					390		
TGT	GAC	ACG	AGG	CAA	CAG	TAT	AGA	AAG	CTG	CTG	AAG	TCC	ACG	CTA	GTC	1315
Cys	Asp	Thr	Arg	Gln	Gln	Tyr	Arg	Lys	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Leu	Val	
				395					400					405		
CTC	ATG	CCG	CTA	TTT	GGG	GTG	CAC	TAC	ATC	GTC	TTC	ATG	GCC	ACG	CCG	1363
Leu	Met	Pro	Leu	Phe	Gly	Val	His	Tyr	Ile	Val	Phe	Met	Ala	Thr	Pro	
			410					415					420			
TAC	ACA	GAA	GTA	TCA	GGG	ATT	CTT	TGG	CAA	GTC	CAA	ATG	CAC	TAT	GAA	1411
Tyr	Thr	Glu	Val	Ser	Gly	Ile	Leu	Trp	Gln	Val	Gln	Met	His	Tyr	Glu	
		425					430					435				
ATG	CTC	TTC	AAT	TCA	TTC	CAG	GGA	TTT	TTC	GTT	GCC	ATT	ATA	TAC	TGT	1459
Met	Leu	Phe	Asn	Ser	Phe	Gln	Gly	Phe	Phe	Val	Ala	Ile	Ile	Tyr	Cys	
	440					445					450					
TTC	TGC	AAT	GGA	GAG	GTA	CAA	GCA	GAG	ATC	AAG	AAG	TCA	TGG	AGC	CGA	1507
Phe	Cys	Asn	Gly	Glu	Val	Gln	Ala	Glu	Ile	Lys	Lys	Ser	Trp	Ser	Arg	
455				460					465						470	
TGG	ACC	CTG	GCC	TTG	GAC	TTC	AAG	CGG	AAG	GCC	CGG	AGT	GGC	AGC	AGT	1555
Trp	Thr	Leu	Ala	Leu	Asp	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	
				475					480					485		
ACC	TAC	AGC	TAT	GGC	CCC	ATG	GTG	TCA	CAT	ACA	AGT	GTC	ACC	AAT	GTG	1603
Thr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Pro	Met	Val	Ser	His	Thr	Ser	Val	Thr	Asn	Val	
			490					495					500			
GGA	CCT	CGA	GGG	GGG	CTG	GCC	TTG	TCC	CTC	AGC	CCT	CGA	CTA	GCT	CCT	1651
Gly	Pro	Arg	Gly	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Arg	Leu	Ala	Pro	
		505					510					515				
GGG	GCT	GGA	GCC	AGT	GCC	AAT	GGC	CAT	CAC	CAG	TTG	CCT	GGC	TAT	GTG	1699
Gly	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Asn	Gly	His	His	Gln	Leu	Pro	Gly	Tyr	Val	
	520					525					530					
AAG	CAT	GGT	TCC	ATT	TCT	GAG	AAC	TCA	TTG	CCT	TCA	TCT	GGC	CCA	GAG	1747
Lys	His	Gly	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Glu	
535					540					545					550	

10

20

30

40

10

(x i) 配列

20

30

40

CTG CCC GAG TGG GAC AAC ATC GTT TGC TGG CCA TTA GGG GCA CCA GGT	444
Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Leu Gly Ala Pro Gly	
110 115 120	
GAA GTG GTG GCA GTA CCT TGT CCC GAT TAC ATT TAT GAC TTC AAT CAC	492
Glu Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Ile Tyr Asp Phe Asn His	
125 130 135 140	
AAA GGC CAT GCC TAC AGA CGC TGT GAC CGC AAT GGC AGC TGG GAG GTG	540
Lys Gly His Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Arg Asn Gly Ser Trp Glu Val	
145 150 155	
GTT CCA GGG CAC AAC CGG ACG TGG GCC AAC TAC AGC GAG TGC CTC AAG	588
Val Pro Gly His Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu Cys Leu Lys	
160 165 170	
TTC ATG ACC AAT GAG ACG CGG GAA CGG GAG GTA TTT GAC CGC CTA GGC	636
Phe Met Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp Arg Leu Gly	
175 180 185	
ATG ATC TAC ACC GTG GGA TAC TCC ATG TCT CTC GCC TCC CTC ACG GTG	684
Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Met Ser Leu Ala Ser Leu Thr Val	
190 195 200	
GCT GTG CTC ATC CTG GCC TAT TTT AGG CGG CTG CAC TGC ACG CGC AAC	732
Ala Val Leu Ile Leu Ala Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys Thr Arg Asn	
205 210 215 220	
TAC ATC CAC ATG CAC ATG TTC CTG TCG TTT ATG CTG CGC GCC GCG AGC	780
Tyr Ile His Met His Met Phe Leu Ser Phe Met Leu Arg Ala Ala Ser	
225 230 235	
ATC TTC GTG AAG GAC GCT GTG CTC TAC TCT GGC TTC ACG CTG GAT GAG	828
Ile Phe Val Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Glu	
240 245 250	
GCC GAG CGC CTC ACA GAG GAA GAG TTG CAC ATC ATC GCG CAG GTG CCA	876
Ala Glu Arg Leu Thr Glu Glu Glu Leu His Ile Ile Ala Gln Val Pro	
255 260 265	
CCT CCG CCG GCC GCT GCC GCC GTA GGC TAC GCT GGC TGC CGC GTG GCG	924
Pro Pro Pro Ala Ala Ala Ala Val Gly Tyr Ala Gly Cys Arg Val Ala	
270 275 280	
GTG ACC TTC TTC CTC TAC TTC CTG GCT ACC AAC TAC TAC TGG ATT CTG	972
Val Thr Phe Phe Leu Tyr Phe Leu Ala Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu	
285 290 295 300	
GTG GAG GGG CTG TAC TTG CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCC TTT TTC TCA	1020
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser	
305 310 315	

10

20

30

40

GAG AAG AAG TAC CTG TGG GGC TTC ACC ATC TTT GGC TGG GGT CTA CCG	1068
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Trp Gly Leu Pro	
320 325 330	
GCT GTC TTC GTG GCT GTG TGG GTC GGT GTC AGA GCA ACC TTG GCC AAC	1116
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Gly Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn	
335 340 345	
ACT GGG TGC TGG GAT CTG AGC TCC GGG CAC AAG AAG TGG ATC ATC CAG	1164
Thr Gly Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly His Lys Lys Trp Ile Ile Gln	
350 355 360	
GTG CCC ATC CTG GCA TCT GTT GTG CTC AAC TTC ATC CTT TTT ATC AAC	1212
Val Pro Ile Leu Ala Ser Val Val Leu Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn	
365 370 375 380	
ATC ATC CGG GTG CTT GCC ACT AAG CTT CGG GAG ACC AAT GCG GGC CGG	1260
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg	
385 390 395	
TGT GAC ACC AGG CAG CAG TAC CGG AAG CTG CTC AGG TCC ACG TTG GTG	1308
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Arg Ser Thr Leu Val	
400 405 410	
CTC GTG CCG CTC TTT GGT GTC CAC TAC ACC GTC TTC ATG GCC TTG CCG	1356
Leu Val Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Thr Val Phe Met Ala Leu Pro	
415 420 425	
TAC ACC GAG GTC TCA GGG ACA TTG TGG CAG ATC CAG ATG CAT TAT GAG	1404
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Thr Leu Trp Gln Ile Gln Met His Tyr Glu	
430 435 440 445	
ATG CTC TTC AAC TCC TTC CAG GGA TTT TTT GTT GCC ATC ATA TAC TGT	1452
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys	
450 455 460	
TTC TGC AAT GGT GAG GTG CAG GCA GAG ATT AGG AAG TCA TGG AGC CGC	1500
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Arg Lys Ser Trp Ser Arg	
465 470 475	
TGG ACA CTG GCG TTG GAC TTC AAG CGC AAA GCA CGA AGT GGG AGT AGC	1548
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser	
480 485 490	
AGC TAC AGC TAT GGC CCA ATG GTG TCT CAC ACG AGT GTG ACC AAT GTG	1596
Ser Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val	
495 500 505	
GGC CCC CGT GCA GGA CTC AGC CTC CCC CTC AGC CCC CGC CTG CCT CCT	1644
Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Ser Pro Arg Leu Pro Pro	
510 515 520 525	

10

20

30

40

```

GCC ACT ACC AAT GGC CAC TCC CAG CTG CCT GGC CAT GCC AAG CCA GGG 1692
Ala Thr Thr Asn Gly His Ser Gln Leu Pro Gly His Ala Lys Pro Gly
          530                      535                      540

GCT CCA GCC ACT GAG ACT GAA ACC CTA CCA GTC ACT ATG GCG GTT CCC 1740
Ala Pro Ala Thr Glu Thr Glu Thr Leu Pro Val Thr Met Ala Val Pro
          545                      550                      555

AAG GAC GAT GGA TTC CTT AAC GGC TCC TGC TCA GGC CTG GAT GAG GAG 1788
Lys Asp Asp Gly Phe Leu Asn Gly Ser Cys Ser Gly Leu Asp Glu Glu
          560                      565                      570

GCC TCC GGG TCT GCG CGG CCG CCT CCA TTG TTG CAG GAA GGA TGG GAA 1836
Ala Ser Gly Ser Ala Arg Pro Pro Pro Leu Leu Gln Glu Gly Trp Glu
          575                      580                      585

ACA GTC ATG TGA CTGGGCA CTAGGGGGCT AGACTGCTGG CCTGGGCACA 1885
Thr Val Met
          590

TGGACAGATG GACCAAGAAG CCAGTGTGTTG GCTGGTTGTC TATTCGGGAT CTGGACCAGG 1945
AAGATAACAA AAGGAAAATG GAAGTGGACG AAGCAGAGAA GAAGGAAGAG GTTTTGCAGG 2005
AATTAAATAT GTTTCCTCAG TTGGATGATG AGGACACAAG GAAGGC 2051

```

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 はオポッサムの腎臓の PTH/PTHrP レセプタークローン、OK-H をコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：1）。

【図 2】図 2 はオポッサムの腎臓の PTH/PTHrP レセプタークローン、OK-O をコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：2）。

【図 3】図 3 はラットの骨の PTH/PTHrP レセプターのクローン、R15B をコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：3）。

【図 4】図 4 はクローン OK-O 及び R15B からの cDNA にコードされている推定アミノ酸配列の比較である。

【図 5】図 5 は OK-O、OK-H と R15B の推定アミノ酸配列を配列相同性に従って並べて比較したものである。

【図 6】図 6 はヒトの PTH/PTHrP レセプターをコードしている核酸とアミノ酸配列の表示である（配列番号：4）。

【図 7】図 7 はラットの骨の PTH/PTHrP レセプターの cDNA、ヒトのゲノム DNA クローン及びヒトの PTH/PTHrP レセプターをコードしている 2 つの cDNA クローンの略図である。

【図 8】図 8 はヒトの腎臓の PTH/PTHrP レセプターの推定アミノ酸配列の疎水性プロットである。予測される貫膜ドメイン I～VII が示されている；A、B、C は追加の疎水性部位を示す。

【図 9】図 9 は OK-H を移入した COS 細胞への PTHrP の結合を示すグラフである。

【図 10】図 10 は OK-H を移入した COS 細胞における NlePTH による細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

【図 11】図 11 は OK-O を移入した COS 細胞への PTHrP の結合を示すグラフである。

【図 12】図 12 は OK-O を移入した COS 細胞における NlePTH による細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

【図13】図13はR15Bを移入したCOS細胞へのPTHrPの結合を示すグラフである。

【図14】図14はR15Bを移入したCOS細胞におけるNlePTHによる細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

【図15】図15はOK-H、OK-O、あるいはR15Bを移入したCOS細胞におけるNlePTHによるイノシトールリン酸代謝の刺激を示すグラフである。

【図16】図16はCDM-8、OK-H、R15Bを移入したCOS細胞におけるNlePTHによるサイクリックAMP刺激を示すグラフである。

【図17】図17はヒトの腎臓（AとC）及びラットの骨（BとD）のPTH／PTHrPレセプターを一過性に発現しているCOS細胞への¹²⁵I-標識PTH（1-34）（AとB）及び¹²⁵I-標識PTHrP（1-36）（CとD）の結合を示すグラフである。競合するリガンドには、PTH（1-34）（□）、PTHrP（1-36）（*）、PTH（3-34）（■）、PTH（7-34）（+）が含まれる。データは特異的結合のパーセントとして示され、少なくとも3つの独立した実験の平均値±標準偏差を表すものである。

【図18】図18はヒトの腎臓のレセプターを一過性に発現しているCOS細胞における細胞内cAMPの蓄積刺激を示すグラフである。データは平均値±標準偏差を示し、少なくとも3つの独立した実験を表すものである。

【図19】図19はヒトの腎臓（A）とSaOS-2細胞（B）から作られた総RNA（～10μg／レーン）のノーザンブロット分析の表示である。ブロットはヒト腎臓のPTH／PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAとハイブリッドを形成した。28Sと18SのリボソームRNAバンドの位置が示されている。

【図20】図20はヒトのゲノムDNAをSstI、HindIII及びXhoI（～10μg／レーン）で消化したもののサザンブロット分析を示す。ブロットはヒトの腎臓のPTH／PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAとハイブリッドを形成した。

【図21】図21はR15Bによってコードされているラットの骨のPTH／PTHrPレセプターの細胞膜における配置提案の略図である。

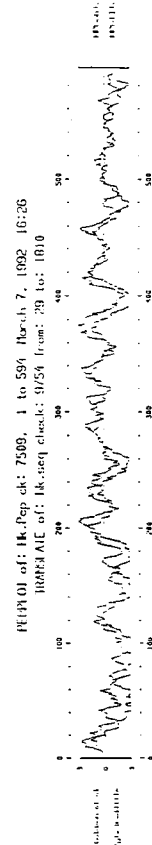
ギャップウェイト:	3.000	平均適合:	0.540
レンジスウェイト:	0.100	平均不適合:	-0.396
特性:	712.2	長さ:	595
比:	1.215	ギャップ:	6
相同性パーセント:	87.113	固有パーセント:	77.815

【図 6】

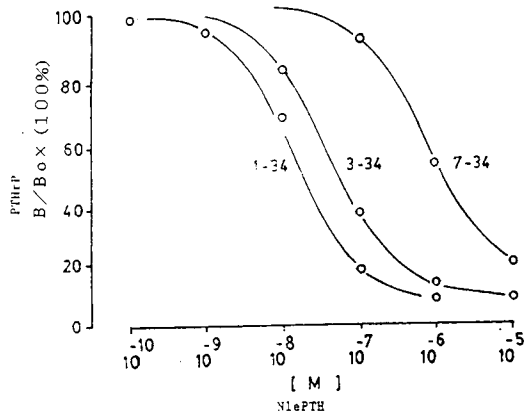
February 15, 1992 10:15

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
8

【图 8】

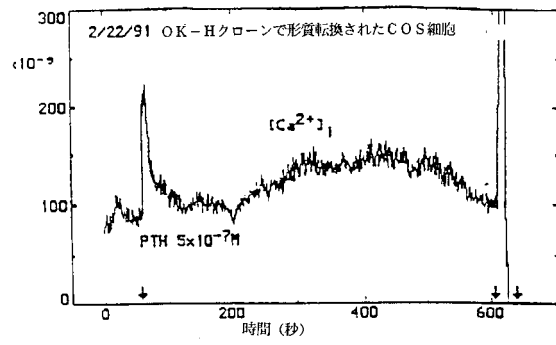


【図 9】

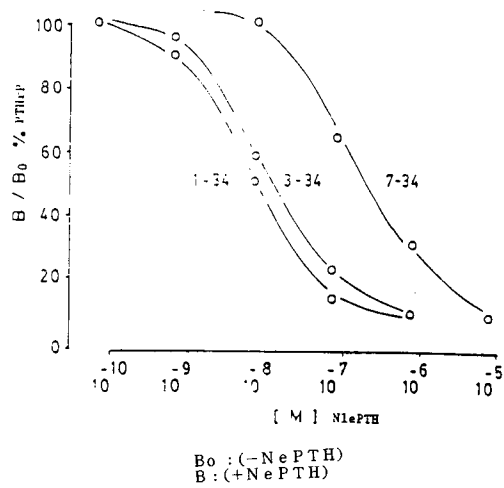


B₀: 特異的結合 (-N1ePTH)
B: 実測値 (+N1ePTH)

【図 10】

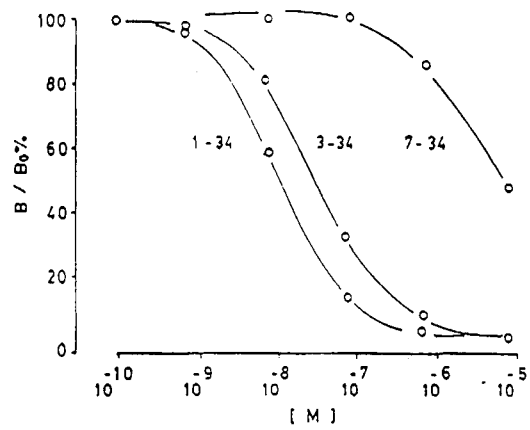


【図 11】



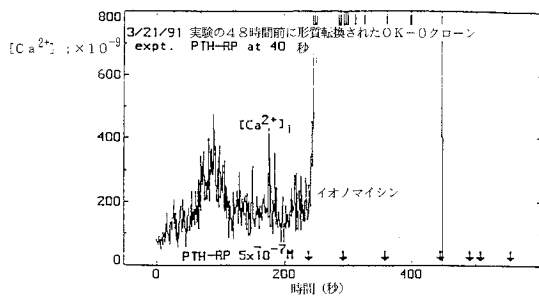
B₀: (-N1ePTH)
B: (+N1ePTH)

【図 13】



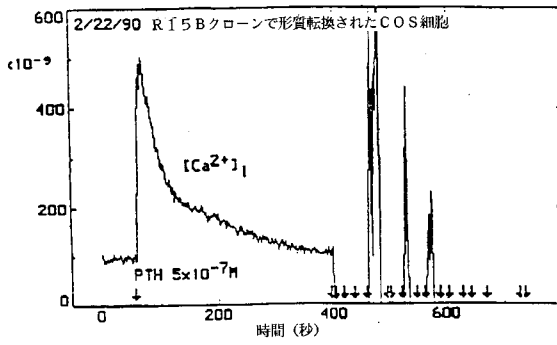
B₀: (-PTH analogu)
B: (+PTH analogu)

【図 12】

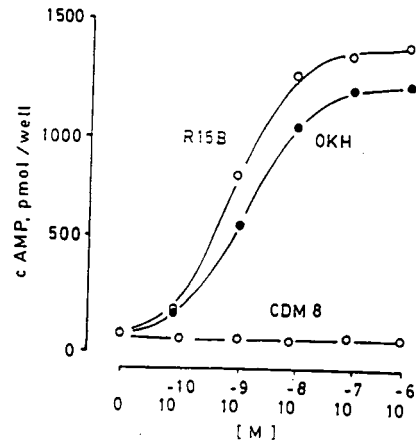


PTH-RP: PTH関連蛋白質

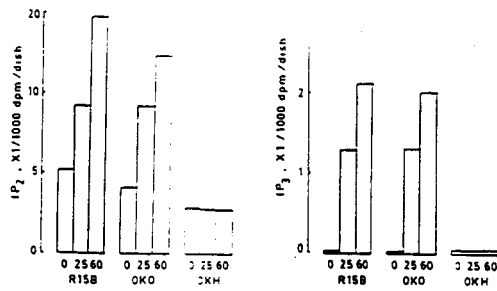
【図 14】



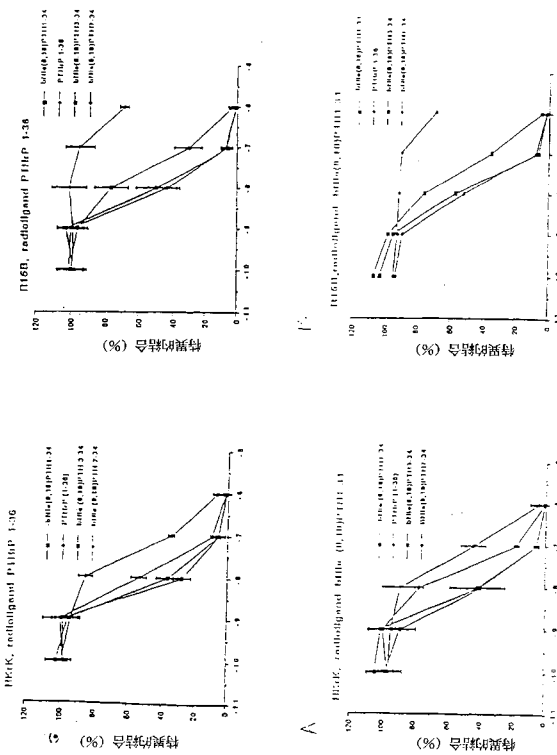
【図 16】



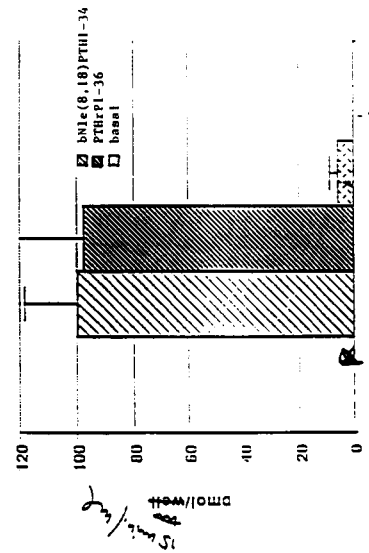
【図 15】



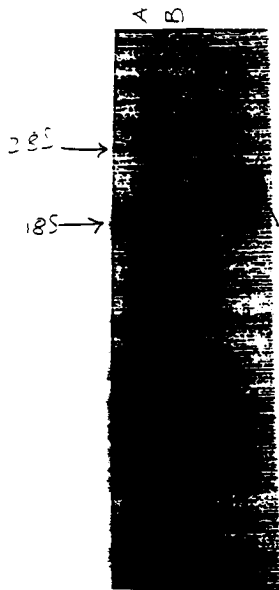
【図 17】



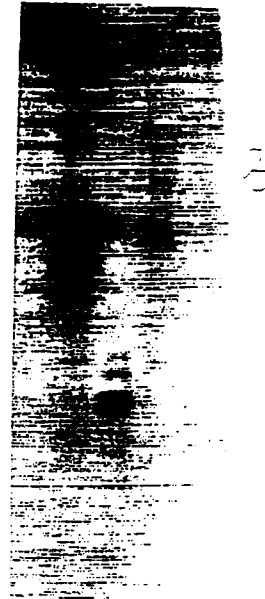
【図 18】



【図 19】

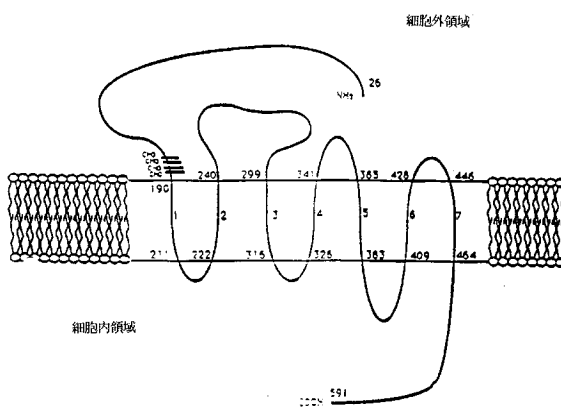


【図 20】

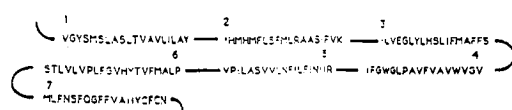


【図 21】

ラットの骨のPTH/PTHrPレセプター



7つの推定膜貫通領域のアミノ酸配列



【手続補正書】

【提出日】平成15年7月11日(2003.7.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも6個のアミノ酸を含み、且つ配列番号1、3及び4からなる群より選択される全長アミノ酸配列よりは少ないアミノ酸を含むポリペプチドであって、抗一副甲状腺ホルモンレセプター抗体と結合し得るポリペプチド。

【請求項 2】

請求項1記載のポリペプチドであって、

- (a) T N E T R E R E V F D R L G M I Y T V G (配列番号5)、
- (b) Y L Y S G F T L D E A E R L T E E E L (配列番号6)、
- (c) V T F F L Y F L A T N Y Y W I L V E G (配列番号7)、
- (d) Y - R A T L A N T G C W D L S S G H K K W I I Q V P (配列番号8)、
- (e) P Y T E Y S G T L W Q I Q M H Y E M (配列番号9)、
- (f) D D V F T K E E Q I F L L H R A Q A (配列番号10)、
- (g) F F R L H C T R N Y (配列番号11)、
- (h) E K K Y L W G F T L (配列番号12)、
- (i) V L A T K L R E T N A G R C D T R Q Q Y R K L L K (配列番号13)、

又は

(j) (a) から (i) からなる群より選択され、抗一副甲状腺ホルモンレセプター抗体と結合し得るポリペプチド断片を含むポリペプチド。

【請求項 3】

副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺関連ホルモンと結合し得るポリペプチドである、請求項1または2に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合において副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を同定する方法であって、

- (a) 候補化合物の存在下及び非存在下のそれぞれにおいて、請求項3記載のポリペプチドを副甲状腺ホルモンと接触させる工程、及び
 - (b) 前記候補化合物の存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベルを、前記候補化合物の非存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベルと比較する工程を含み、
- 前記候補化合物の存在下における結合レベルが、候補化合物の非存在下における結合レベルよりも低い場合に、前記候補化合物が前記レセプターへの結合において前記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることが示される方法。

【請求項 5】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合において副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を同定する方法であって、

- (a) 候補化合物の存在下又は非存在下で請求3記載のポリペプチドを副甲状腺ホルモン関連蛋白質と接触させる工程、及び
 - (b) 前記候補化合物の存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベルを前記候補化合物の非存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベルと比較する工程を含み、
- 前記候補化合物の存在下における結合レベルが、候補化合物の非存在下の結合レベルより

も低い場合に、前記候補化合物が前記レセプターへの結合において前記副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のあることが示される方法。

【請求項 6】

薬学的に許容される担体中に請求項 3 記載のポリペプチドを含む高カルシウム血症治療用組成物。

【請求項 7】

請求項 6 記載の治療用組成物であって、哺乳動物の血液中のカルシウムレベルを低減させる効果的な投与量又は、副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を抑制し得る効果的な投与量に構成されている、高カルシウム血症治療用組成物。

【請求項 8】

脊椎動物の副甲状腺ホルモンレセプターをコードする DNA であって、配列番号 1、3 または 4 に記載の DNA 配列中の少なくとも連続した 18 塩基からなる一本鎖 DNA と高度緊縮条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 9】

請求項 8 記載の DNA を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 8 記載の DNA であって、副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質と結合し得るポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 11】

請求項 8 記載の DNA によりコードされる副甲状腺ホルモンレセプター。

【請求項 12】

ポリペプチドを生成する方法であって、請求項 8 記載の DNA を含む細胞を調製する工程、及び、前記細胞を前記 DNA からポリペプチドを発現させ得る条件下で前記細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項 13】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合において、副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を同定する方法であって、

(a) 候補化合物の存在下あるいは非存在下で副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を請求項 11 記載のレセプターと混合する工程、及び

(b) 前記候補化合物の存在下における前記副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質への前記レセプターの結合レベルを、前記候補化合物の非存在下における前記副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質への前記レセプターの結合レベルと比較する工程を含み、

前記候補化合物の存在下における結合レベルが、候補化合物の非存在下における結合レベルよりも低い場合に前記候補化合物は前記レセプターへの結合において前記副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のあることが示される方法。

【請求項 14】

薬学的に許容される担体中に請求項 11 記載のレセプターを含む高カルシウム血症治療用組成物。

【請求項 15】

請求項 14 記載の治療用組成物であって、哺乳動物の血液中のカルシウムレベルを低減させる効果的な投与量又は、副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を抑制し得る効果的な投与量に構成されている、高カルシウム血症治療用組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/72	C 0 7 K 14/72	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

- (72)発明者 アボウサムラ アブダルバディ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 プレインビル フォー コロニアルウェイ
- (72)発明者 ジャプナー ハラルド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボルトン エイト ハリスストリート
- (72)発明者 ポッツ ジョーン テー ジュニア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェストニュートン チェスナットストリート 1 2 9
- (72)発明者 シパニ アーネスティーナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フォー ロングフェロープレイス アプト 1
0 0 4

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA02 EA04 GA11
4B063 QA01 QQ43 QR32 QR55 QS34
4B064 AG20 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01 BA22 CA53 DB63 NA05
ZC062 ZC212
4C085 AA13 AA14 BB11 DD63 DD88
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 EA20 EA50
FA74

专利名称(译)	甲状旁腺激素受体和编码它的DNA		
公开(公告)号	JP2004121225A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2003170024	申请日	2003-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	总医院集团		
[标]发明人	セグレギノブイ クロネンベルグヘンリーエム アボウサムラアブダルバディ ジャプナーハラルド ポッツジョーンテージュニア シパニアースティーナ		
发明人	セグレ ギノ ブイ クロネンベルグ ヘンリー エム アボウサムラ アブダルバディ ジャプナー ハラルド ポッツ ジョーン テー ジュニア シパニ アースティーナ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P3/00 A61P3/02 A61P3/14 A61P5/12 C07K5/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/435 C07K14/635 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/00 C07K16/28 C12N1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/113 C12N15/12 C12N15/85 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N33/78 G01N33/84		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2227/30 A01K2267/02 A61K38/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/02 A61P3/14 A61P5/12 A61P5/20 A61P7/06 A61P13/12 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/635 C07K14/705 C07K14/72 C07K14/721 C07K16/2869 C12N15/1138 C12N15/8509 G01N33/78 G01N33/84 G01N2800/04 G01N2800/046		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/02 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/113.140.P C12N15/113.140.Z C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DB63 4C084/NA05 4C084/ZC062 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD63 4C085/DD88 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	07/681702 1991-04-05 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：提供和使用甲状旁腺激素受体。 编码甲状旁腺激素受体的DNA，重组和合成的甲状旁腺激素受体多肽及其片段，甲状旁腺激素受体抗体和受体片段，候选化合物可对抗甲状旁腺激素受体的作用。 或者，提供了筛选拮抗作用的方法，以及通过使用这些化合物的诊断和治疗方法。 [选择图]无

