

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-534319

(P2005-534319A)

(43) 公表日 平成17年11月17日(2005.11.17)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A01K 67/027
A61K 45/00
A61P 9/04
A61P 9/10

F 1

C12N 15/00
A01K 67/027
A61K 45/00
A61P 9/04
A61P 9/10

Z N A A
4 B O 2 4
4 B O 5 0
4 B O 6 3
4 B O 6 5
4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-526159 (P2004-526159)
(86) (22) 出願日 平成15年7月25日 (2003.7.25)
(85) 翻訳文提出日 平成17年3月29日 (2005.3.29)
(86) 國際出願番号 PCT/US2003/023296
(87) 國際公開番号 WO2004/013285
(87) 國際公開日 平成16年2月12日 (2004.2.12)
(31) 優先権主張番号 60/400,774
(32) 優先日 平成14年8月1日 (2002.8.1)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 504381423
アーナ ファーマシューティカルズ,
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
21, サン デイエゴ, ナンシー リ
ッジ ドライブ 6166
(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】虚血性心疾患および鬱血性心不全の処置のためのヒトGタンパク質共役レセプターおよびそのモジュレーター

(57) 【要約】

本発明は、候補化合物がオーファンGタンパク質共役型レセプター(GPCR)のモジュレーターであるか否かを同定する方法に関する。好ましくは、GPCRは、ヒトである。いくつかの実施形態では、GPCRは、心筋細胞によって内因的に発現される。ある実施形態では、GPCRは、Giに結合されて、細胞内cAMPのレベルを低下させる。いくつかの実施形態では、GPCRの過剰発現が、心筋細胞の生存を促進する。いくつかの実施形態では、GPCRの過剰発現が、低酸素/再酸素化誘発性アポトーシスから心筋細胞を救出する。いくつかの実施形態では、GPCRは、鬱血性心不全を有する個体においてダウンレギュレーションされる。本発明のアゴニストは、虚血性心疾患(心筋梗塞、心筋梗塞後リモデリング、および鬱血性心不全を含む)の処置のための治療剤として有用であると想起される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

候補化合物が R U P 4 1 G P C R のモジュレーターであるか否かを同定する方法であって、該レセプターは、以下：

- (a) 配列番号 2 に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号 3 に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号 5 に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含み、ここで該レセプターは、G タンパク質に結合し、該方法は、以下の工程：

- (a') 該候補化合物を該レセプターと接触させる工程；
- (b') レセプター機能性が調整されるか否かを決定する工程；

を包含し、ここでレセプター機能性の変化は、該候補化合物が該 G P C R のモジュレーターであることの指標である、方法。

【請求項 2】

候補化合物が心臓保護のモジュレーターであるか否かを同定する方法であって、以下の工程：

- (a) 該候補化合物を G P C R と接触させる工程であって、該レセプターは、以下：
- (i) 配列番号 2 に記載のポリペプチド；
- (ii) 配列番号 3 に記載のポリペプチド；および
- (iii) 配列番号 5 に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントを含み、ここで該レセプターは、G タンパク質に結合する、工程；および

(b) レセプター機能性が調整されるか否かを決定する工程；
を包含し、

ここでレセプター機能性の変化は、該候補化合物が心臓保護のモジュレーターであることの指標である、方法。

【請求項 3】

前記レセプターは組換え体である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記決定する工程は、サイクリック AMP (c A M P)、サイクリック GMP (c G M P)、イノシトール三リン酸 (I P₃)、ジアシルグリセロール (D A G)、および Ca²⁺ からなる群から選択されるセカンドメッセンジャーのレベルの測定による、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記セカンドメッセンジャーは c A M P である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 c A M P の細胞内レベルが低下している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記決定する工程は、メラニン保有細胞アッセイの使用による、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記決定する工程は、前記 G P C R を含む膜への G T P S 結合の測定による、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 または請求項 2 に記載の方法であって、前記候補化合物により引き起こされる前記レセプターの調整を、該レセプターを該レセプターの既知のモジュレーターと接触させることにより引き起こされる該レセプターの第二の調整に対して比較する工程をさらに包含する、方法。

【請求項 10】

請求項 1 または請求項 2 に記載の方法に従って同定されたモジュレーター。

10

20

30

40

50

【請求項 11】

アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される、請求項10に記載のモジュレーター。

【請求項 12】

前記モジュレーターがcAMPの細胞内レベルを低下させる、請求項11に記載のモジュレーター。

【請求項 13】

前記モジュレーターがアゴニストである、請求項11または請求項12に記載のモジュレーター。

【請求項 14】

RUP41 GPCRの活性を調整する方法であって、該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含み、ここで該レセプターは、Gタンパク質に結合し、該方法は、該レセプターを、請求項10～13のいずれか一項に記載のモジュレーターと接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 15】

前記接触させる工程は、前記レセプターを含む膜への前記モジュレーターの投与を包含する、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記接触させる工程は、前記レセプターを含む細胞または組織への前記モジュレーターの投与を包含する、請求項14に記載の方法。

【請求項 17】

前記接触させる工程は、前記レセプターを含む個体への前記モジュレーターの投与を包含する、請求項14に記載の方法。

【請求項 18】

請求項17に記載の方法であって、前記個体は、心血管障害の予防または処置の必要があり、該心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される、方法。

【請求項 19】

請求項17に記載の方法であって、前記個体は、虚血性心疾患の予防または処置の必要があり、該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される、方法。

【請求項 20】

請求項17に記載の方法であって、前記個体が、心血管機能の変化の必要があり、該心血管機能の変化が、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される、方法。

【請求項 21】

心血管機能の変化を必要とする個体において該変化を行う方法であって、該方法が、第2の局面のモジュレーターの治療有効量をRUP41 GPCRと接触させる工程を包含し

10

20

30

40

50

、該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号 2 に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号 3 に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号 5 に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはその対立遺伝子改変体を含む、方法。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の方法であって、前記心血管機能の変化が、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

10

からなる群から選択される、方法。

【請求項 2 3】

心血管障害の予防または処置の必要のある個体における心血管障害の予防または処置の方法であって、該方法は、第 2 の局面のモジュレーターの治療有効量を R U P 4 1 G P C R と接触させる工程を包含し、該レセプターは、以下：

- (a) 配列番号 2 に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号 3 に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号 5 に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはその対立遺伝子改変体を含む、方法。

20

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の方法であって、前記心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される、方法。

【請求項 2 5】

虚血性心疾患の予防または処置の必要のある個体における虚血性心疾患の予防または処置の方法であって、該方法は、第 2 の局面のモジュレーターの治療有効量を R U P 4 1 G P C R と接触させる工程を包含し、該レセプターは、以下：

- (a) 配列番号 2 に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号 3 に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号 5 に記載のポリペプチド；

30

からなる群から選択されるポリペプチドまたはその対立遺伝子改変体を含む、方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される、方法。

【請求項 2 7】

組成物を調製する方法であって、該方法は、

R U P 4 1 G P C R のモジュレーターを同定する工程、次いで
キャリアおよび該モジュレーターを混合する工程
を包含し、ここで該モジュレーターは、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法によって同定可能である、方法。

40

【請求項 2 8】

薬学的または生理学的に受容可能な組成物であって、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載のモジュレーターを含むか、該モジュレーターから本質的になるか、または該モジュレーターからなる、組成物。

【請求項 2 9】

50

心血管機能を変化させる方法であって、該方法は、

該変化の必要のある個体に、請求項 28 に記載の薬学的または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程

を包含し、ここで該心血管機能の変化は、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される、方法。

【請求項 30】

心血管障害を予防または処置する方法であって、該方法は、

該処置の必要のある個体に、請求項 28 に記載の薬学的または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程

を包含し、ここで該心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される、方法。

【請求項 31】

虚血性心疾患を予防または処置する方法であって、該処置の必要のある個体に、請求項 28 に記載の薬学的または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含し、ここで該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される、方法。

【請求項 32】

個体における心血管障害の予防または処置のための医薬の調製のために、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載のモジュレーターを使用する方法であって、ここで該心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される、方法。

【請求項 33】

個体における虚血性心疾患の予防または処置のための医薬の調製のために、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載のモジュレーターを使用する方法であって、ここで該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される、方法。

【請求項 34】

前記個体は哺乳動物である、請求項 17 ~ 26 および 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

ノックアウトマウスを作製する方法であって、ここで該ノックアウトマウスに、心血管障害の素因が与えられ、該心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、該方法は、

配列番号 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子をノックアウトする工程

10

20

30

40

50

を包含する、方法。

【請求項 3 6】

ノックアウトマウスを作製する方法であって、ここで該ノックアウトマウスに、虚血性心疾患の素因が与えられ、該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択され、該方法は、

配列番号 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子をノックアウトする工程
を包含する、方法。

10

【請求項 3 7】

請求項 3 5 または請求項 3 6 に記載のノックアウトマウス。

【請求項 3 8】

候補化合物が、心血管障害または虚血性心疾患の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために、請求項 3 7 に記載のノックアウトマウスを使用する方法。

【請求項 3 9】

ノックアウトラットを作製する方法であって、ここで該ノックアウトラットに、心血管障害の素因が与えられ、該心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、該方法は、

配列番号 6 に記載のポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーでハイブリダイズする
遺伝子をノックアウトする工程
を包含する、方法。

20

【請求項 4 0】

ノックアウトラットを作製する方法であって、ここで該ノックアウトラットに、虚血性心疾患の素因が与えられ、該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

30

からなる群から選択され、該方法は、

配列番号 6 に記載のポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーでハイブリダイズする
遺伝子をノックアウトする工程
を包含する、方法。

【請求項 4 1】

請求項 3 9 または請求項 4 0 に記載のノックアウトラット。

【請求項 4 2】

候補化合物が、心血管障害または虚血性心疾患の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために、請求項 4 1 に記載のノックアウトラットを使用する方法。

【請求項 4 3】

単離されたラット R U P 4 1 ポリヌクレオチドまたはその相補体であって、該単離されたラット R U P 4 1 ポリヌクレオチドは、以下：

- (a) 配列番号 6 の少なくとも 75 ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号 6 の少なくとも 150 ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号 6 の少なくとも 250 ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号 6 の少なくとも 350 ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；および

40

50

(e) 配列番号6の少なくとも500ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチドからなる群から選択される、ポリヌクレオチドまたはその相補体。

【請求項44】

組換えベクターであって、該組換えベクターは、請求項43に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、組換えベクター。

【請求項45】

請求項44に記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項46】

G P C R 融合タンパク質構築物であって、該構築物は、構成的活性型Gタンパク質共役型レセプターおよびGタンパク質を含み、該レセプターは、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるR U P 4 1 ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含む、構築物。

【請求項47】

候補化合物がR U P 4 1 G P C R のリガンドであるか否かを同定する方法であって、該レセプターは、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含み、該方法が、以下の工程：

(a') 該ポリペプチドを、必要に応じて標識される既知のモジュレーターと、該候補化合物の存在下または不在下で接触させる工程；

(b') 該既知のモジュレーターと該ポリペプチドとの間の複合体を検出する工程；および

(c') 該化合物の不在下よりも該化合物の存在下で、該複合体がより少量で形成されるか否かを決定する工程

を包含し、ここで、該決定は、該候補化合物が該レセプターのリガンドであることの指標となる、方法。

【請求項48】

放射線画像化の方法であって、該方法は、

該放射線画像化を必要とする個体に、請求項2に記載のモジュレーターおよび請求項47に記載のリガンドからなる群から選択される放射性標識された化合物を提供または投与する工程

を包含する、方法。

【請求項49】

ヒトR U P 4 1 G P C Rについてトランスジェニックである非ヒト哺乳動物であって、該レセプターは、以下：

(a) 配列番号2に記載のポリペプチド；

(b) 配列番号2に記載のポリペプチドであって、ここで配列番号2のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンで置換されている、ポリペプチド；

- (c) 配列番号3に記載のポリペプチド；および

(d) 配列番号3に記載のポリペプチドであって、ここで配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンで置換されている、ポリペプチド

からなる群から選択されるポリペプチドを含む、哺乳動物。

【請求項50】

化合物が心臓保護についての効力を有するか否かを同定するために、請求項49に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を使用する方法であって、該化合物は、請求項2に記

10

20

30

40

50

載のモジュレーターおよび請求項 4 7 に記載のリガンドからなる群から選択される、方法。
。

【請求項 5 1】

R U P 4 1 G P C R のモジュレーターを作製するためのプロセスであって、以下の工程：
：

(a) 請求項 1 または請求項 2 に記載の方法に従って、該モジュレーターを同定する工
程；および

(b) (a) において同定されたモジュレーターを合成する工程
を包含する、プロセス。

【請求項 5 2】

前記モジュレーターが、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニ
ストからなる群から選択される、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 3】

前記モジュレーターは、c A M P の細胞内レベルを低下させる、請求項 5 1 に記載のプロ
セス。

【請求項 5 4】

前記モジュレーターは、アゴニストである、請求項 5 2 または請求項 5 3 に記載のプロセ
ス。

【請求項 5 5】

心血管機能の変化に使用するための請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のモジュー
ラー。 20

【請求項 5 6】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記心血管機能の変化が、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される、方法。

【請求項 5 7】

心血管障害の予防または処置に使用するための請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の
モジュー 30 ラー。

【請求項 5 8】

請求項 5 7 に記載の方法であって、前記心血管障害が、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される、方法。

【請求項 5 9】

虚血性心疾患の予防または処置に使用するための請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか一項に記載
のモジュー 40 ラー。

【請求項 6 0】

請求項 5 9 に記載の方法であって、前記虚血性心疾患が、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本特許出願は、示した日に米国特許商標庁に U . S . E x p r e s s メールにて出願し
た以下の仮出願からの優先権の利益を主張する：米国仮出願番号 6 0 / 4 0 0 , 7 7 4 (50

2002年8月1日出願)。前出の出願は、その全体の内容が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、候補化合物がオーファンGタンパク質共役型レセプター(GPCR)のモジュレーターであるか否かを同定する方法に関する。好ましくは、GPCRはヒトである。いくつかの実施形態では、GPCRは、心筋細胞によって内因的に発現される。いくつかの実施形態では、GPCRは、Giに結合されて、細胞内cAMPのレベルを低下させる。いくつかの実施形態では、GPCRの過剰発現が、心筋細胞の生存を促進する。いくつかの実施形態では、GPCRの過剰発現が、低酸素/再酸素化誘発性アポトーシスから心筋細胞を救出する。いくつかの実施形態では、GPCRは、鬱血性心不全を有する個体においてダウンレギュレートされる。本発明のアゴニストは、虚血性心疾患(心筋梗塞、心筋梗塞後リモデリング、および鬱血性心不全を含む)の処置のための治療剤として有用であると想起される。10

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

(A. 虚血性心疾患および鬱血性心不全)

鬱血性心不全(CHF)は、ほぼ500万人の米国人が罹患しており、毎年500,000人を超える新たな症例が診断されている。定義によると、CHFは、心疾患が、心拍出量を低下させ、静脈圧を上昇させ、かつ欠陥心臓の進行性の悪化および成熟前心筋細胞(心筋細胞(myocyte))の死を引き起こす分子異常を伴う、臨床症状である(出典; Heart Failure: Pathophysiology, Molecular Biology, and Clinical Management, Katz, A M, Lippincott Williams and Wilkins, 2000)。成人心臓では、筋細胞(心筋細胞)の死は、心不全既往歴の必須要素である。なぜなら、失われた細胞は、代わりが効かないからである。一旦心不全の症状になった場合の5年生存率は50%未満なので、心筋細胞死を促進する分子プロセスを考慮しない心不全の定義は、この症状の主要な臨床特性を見過ごしてしまう。この目的のために、多くのグループによる現行の研究は、筋細胞の死および生存を調節する分子機構およびシグナリング経路に集中している。細胞培養物および小動物の研究により、心筋細胞上のGタンパク質共役型レセプターが、心臓収縮機能の非常に重要な調節因子であり、また筋細胞の死および生存の調節に関与していることが明確に実証されている[概説について、AdamsおよびBrown, Oncogene (2001) 20:1626-1634を参照のこと]。しかし、心筋細胞の死を阻害するか、または生存経路を直接的に活性化するように設計された、臨床現場で現在利用可能な薬物はない。マウスおよびラットにおいて近年発表された証拠は、生存経路の活性化[Leeら, Endocrinology (1999) 140:4831-40]または心筋細胞死経路の阻害因子[Laugwitzら, Hum Gene Ther (2001) 12:2051-63]が心機能および動物生存を有意に改善することを実証する。従って、ヒト心不全の処置のための同様の治療ストラテジーに大いに見込みがあることが明らかである。203040

【0004】

(B. Gタンパク質共役型レセプター)

多数のレセプタークラスがヒトにおいて存在するが、断然、最も豊富で治療関連性があるのは、Gタンパク質共役型レセプター(GPCR)クラスによって代表される。ヒトゲノム内には約30,000~40,000の遺伝子があると概算されており、これらのうち、約2%がGPCRをコードすると概算されている。内因性のリガンドが同定されているレセプター(GPCRを含む)は、「既知の」レセプターと呼ばれるが、内因性のリガンドが同定されていないリガンドは、「オーファン」レセプターと呼ばれる。

【0005】

G P C R は、薬剤製品の開発のための重要なエリアを代表する：100の既知のG P C R のうち約20のG P C R から、全処方薬の約60%が開発された。例えば、1999年では、上位100の商標の処方剤のうち、以下の薬物が、G P C R と相互作用する（この薬物に関して処置される主要な疾患および／または障害を括弧内に示す）：

クラリチン (C l a r i t i n) (登録商標) (アレルギー症)	
プロザック (P ro z a c) (登録商標) (鬱病)	
ヴァソテック (V a s o t e c) (登録商標) (高血圧症)	
パキシル (P a x i l) (登録商標) (鬱病)	
ゾロフト (Z o l o f t) (登録商標) (鬱病)	10
ジプレキサ (Z y p r e x a) (登録商標) (精神病性障害)	
コザール (C o z a a r) (登録商標) (高血圧)	
イミトレックス (I m i t r e x) (登録商標) (片頭痛)	
ザンタック (Z a n t a c) 登録商標 (逆流)	
プロブルシド (P r o p u l s i d) (登録商標) (逆流性疾患)	
リスペルダル (R i s p e r d a l) (登録商標) (精神分裂病)	
セレベント (S e r e v e n t) (登録商標) (喘息)	
ペプシド (P e p c i d) (登録商標) (逆流)	
ガスター (G a s t e r) (登録商標) (潰瘍)	
アトロベント (A t r o v e n t) (登録商標) (気管支痙攣)	
エフェクサー (E f f e x o r) (登録商標) (鬱病)	20
デパコテ (D e p a k o t e) (登録商標) (癲癇)	
カルデュラ (C a r d u r a) (登録商標) (前立腺肥大 (p r o s t a t i c y p e r t r o p h y))	
アレグラ (A l l e g r a) (登録商標) (アレルギー症)	
リュープロン (L u p r o n) (登録商標) (前立腺癌)	
ゾラデックス (Z o l a d e x) (登録商標) (前立腺癌)	
ディプリバン (D i p r i v a n) (登録商標) (感覚脱失)	
バスパー (B u S p a r) (登録商標) (不安)	
ヴェントリン (V e n t o l i n) (登録商標) (気管支痙攣)	
ハイトリリン (H y t r i n) (登録商標) (高血圧症)	30
ウェルブトリン (W e l l b u t r i n) (登録商標) (鬱病)	
ジルテック (Z y r t e c) (登録商標) (鼻炎)	
プラヴィックス (P l a v i x) (登録商標) (M I / 脳卒中)	
トプロール - X L (T o p r o l - X L) (登録商標) (高血圧症)	
テノルミン (T e n o r m i n) (登録商標) (アンギナ)	
キサラタン (X a l a t a n) (登録商標) ((緑内障))	
シングレア (S i n g u l a i r) (登録商標) (喘息)	
ディオバン (D i o v a n) (登録商標) (高血圧症)	
ハルナール (H a r n a l) (登録商標) (前立腺過形成)	
(M e d A d N e w s 1 9 9 9 D a t a) .	40

【0006】

G P C R は、共通の構造モチーフを共有し、このモチーフは、7つのヘリックスを形成する22～24の疎水性アミノ酸でなる7つの配列を有し、その各々は膜にまたがる（各範囲は、数で表される（すなわち、膜貫通-1 (T M - 1)、膜貫通-2 (T M - 2)など）。これらの膜貫通ヘリックスは、細胞膜の外部、すなわち「細胞外」側で、膜貫通-2と膜貫通-3との間、膜貫通-4と膜貫通-5との間、および膜貫通-6と膜貫通-7との間のアミノ酸の鎖（これらはそれぞれ、「細胞外」領域1、「細胞外」領域2、および「細胞外」領域3 (E C - 1、E C - 2、およびE C - 3)と呼ばれる）で連結される。これらの膜貫通ヘリックスはまた、細胞膜の内部、すなわち「細胞内」側で、膜貫通-1と膜貫通-2との間、膜貫通-3と膜貫通-4との間、および膜貫通-5と膜貫通-

6との間のアミノ酸の鎖（これらはそれぞれ、「細胞内」領域1、「細胞内」領域2、および「細胞内」領域3（I C - 1、I C - 2、およびI C - 3）と呼ばれる）で連結される。レセプターの「カルボキシ」（「C」）末端は、細胞内の細胞内空間にあり、レセプターの「アミノ」（「N」）末端は、細胞の外側の細胞外空間にある。

【0007】

一般に、リガンドがレセプターと結合する場合（しばしば、レセプターの「活性化」と呼ばれる）、細胞内領域と細胞内「Gタンパク質」との間の結合を促進する、レセプターの構造変化がある。G P C Rは、Gタンパク質に関して「無差別」である、すなわち、G P C Rは、1つより多くのGタンパク質と相互作用し得ることが報告されている。Kenakin, T., 43 Life Sciences 1095 (1988) を参照のこと。他のGタンパク質も存在するが、現在では、G_q、G_s、G_i、G_z、およびG_oが、同定されているGタンパク質である。Gタンパク質とのリガンド活性化G P C Rの結合が、シグナリングカスケードプロセス（「シグナル伝達」と呼ばれる）を開始させる。正常な条件下では、シグナル伝達は、最終的には、細胞活性化または細胞阻害を生じる。理論に束縛されることを望まないが、I C - 3ループならびにレセプターのカルボキシ末端がGタンパク質と相互作用すると考えられる。

【0008】

生理的条件下で、G P C Rは、以下の2つの異なる構造の間で平衡して、細胞膜中に存在する：「不活性」状態および「活性」状態。不活性状態のレセプターは、シグナル伝達を開始させる細胞内シグナリング伝達経路に関連することができず、生物学的応答を生じることができない。活性状態へのレセプター構造の変化は、（Gタンパク質を介して）伝達経路への関連を可能にし、生物学的応答を生じる。

【0009】

レセプターは、リガンドまたは化合物（例えば、薬物）によって、活性状態で安定化され得る。近年の発見（レセプターのアミノ酸配列に対する改変を含むがもっぱらこれに限定されない）は、レセプターを活性状態構造に促進し、かつ安定化させるための、リガンドや薬物以外の手段を提供する。これらの手段は、レセプターへのリガンド結合の効果を刺激することにより、レセプターを活性状態で有効に安定化させる。このようなリガンド独立手段による安定化は、「構成的レセプター活性化」と呼ばれる。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

（発明の要旨）

本発明は、本明細書中でR U P 4 1と称されるオーファンG P C Rに関する。R U P 4 1は、G P R 2 2（GenBank（登録商標）Accession No. U 6 6 5 8 1）に関連する。

【0011】

R U P 4 1は、心筋細胞（cardiac myocytes）（心筋細胞（cardiomyocytes））によって内因的に発現される。ヒトR U P 4 1の発現プロファイルは、Affymetrix遺伝子チップによって決定され、複組織ドットプロットおよびノーザンプロットによって検証された。ゲノムDNAから増幅されたR U P 4 1のラットオルソログの部分コード配列が同定されており、開示されている。ラットR U P 4 1ポリヌクレオチド配列（XM_137998）に対して97%同一である。R U P 4 1は、G_iに結合されて、アデニリルシクラーゼの阻害およびcAMP生産の抑制を生じることが、本明細書中に開示される。さらに、虚血性心臓および肥厚性心臓の実験モデルにおいて、内因性R U P 4 1レベルの発現が減少していることが、開示される。さらに、R U P 4 1の過剰発現が心筋細胞の生存を促進することが、開示される。R U P 4 1の開示された特性は、R U P 4 1のアゴニストが、心筋細胞アポトーシスと関連した心疾患の処置に有用であると思われることを示している。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

一部、本発明は、候補化合物がRUP41のモジュレーターであるか否かを同定する方法に関する。他のいくつかの実施形態では、本発明は、RUP41の活性を調整する方法であって、RUP41をRUP41のモジュレーターと接触させる工程を包含する、方法に関する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、cAMPの細胞内レベルを低下させる。いくつかの実施形態では、このモジュレーターは、アゴニストである。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、インビトロで起こる。いくつかの実施形態では、RUP41モジュレーターが、心筋細胞アポトーシスの阻害において当該モジュレーターが有効であるか否かを決定する方法において、心筋細胞アポトーシスの細胞培養モデルに導入される。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、cAMPの細胞内レベルを低下させる。いくつかの実施形態では、このモジュレーターは、アゴニストである。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、インビオで起こる。いくつかの実施形態では、RUP41モジュレーターが、虚血性心疾患および心不全に関連した病状を軽くするのに当該モジュレーターが有効であるか否かを決定する方法において、虚血性心疾患および心不全の外科手術モデルを受けているマウスおよびラットに投与される。なお他のいくつかの実施形態では、RUP41モジュレーターが、心臓リモデリングおよび心機能にとって当該モジュレーターが利点を有するか否かを決定する方法において、実験的心筋梗塞に罹患した動物に投与される。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、cAMPの細胞内レベルを低下させる。いくつかの実施形態では、このモジュレーターは、アゴニストである。

【 0 0 1 5 】

RUP41のモジュレーターは、虚血性心疾患（心筋梗塞、心筋梗塞後リモデリング（post-myocardial infarction remodeling）、および鬱血性心不全を含む）の処置のための治療剤として有用であると想起される。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、cAMPの細胞内レベルを低下させる。いくつかの実施形態では、このモジュレーターは、アゴニストである。

【 0 0 1 6 】

ヒトRUP41の第一の対立遺伝子のポリヌクレオチド配列およびそのコードされたポリペプチド配列をそれぞれ、配列番号1および配列番号2として配列表（Sequence Listing）中に提供する（配列番号2のポリペプチドのコード配列は、配列番号1のヌクレオチド237-1, 538に相当する）。ヒトRUP41ポリペプチド（GenBank（登録商標）Accession No. AAB63815）の第二の対立遺伝子のアミノ酸配列（これは、配列番号2のアミノ酸425位でリジンの代わりにシステインを用いる単一置換を含む）を、配列番号3として提供する（相当するコード配列は、GenBank（登録商標）Accession No. AC002381のヌクレオチド79, 559-80, 860として提供される）。マウスRUP41のポリヌクレオチド配列およびコードされたポリペプチド配列をそれぞれ、配列番号4および配列番号5として提供する。ラットRUP41の部分コード配列を含むポリヌクレオチド配列を、配列番号6として開示する。

【 0 0 1 7 】

第1の局面では、本発明は、候補化合物がRUP41 GPCRのモジュレーターであるか否かを同定する方法であって、該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含み、ここで該レセプターが、Gタンパク質に結合し、該方法が、以下の工程：

10

20

30

40

50

(a') 該候補化合物を該レセプターと接触させる工程；
 (b') レセプター機能性が調整されるか否かを決定する工程を包含し、ここでレセプター機能性の変化が、該候補化合物が該GPCRのモジュレーターであることの指標となる、方法を特徴とする。

【0018】

本発明はまた、候補化合物が心臓保護のモジュレーターであるか否かを同定する方法であって、以下の工程：

(a) 該候補化合物をGPCRと接触させる工程であって、該レセプターが、以下：

- (i) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (ii) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (iii) 配列番号5に記載のポリペプチド；

10

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含み、ここで該レセプターが、Gタンパク質に結合する、工程；および

(b) レセプター機能性が調整されるか否かを決定する工程；
 を包含し、

ここでレセプター機能性の変化が、該候補化合物が心臓保護のモジュレーターであることの指標となる、方法に関する。

【0019】

いくつかの実施形態では、当該レセプターは、配列番号2のアミノ酸2-433および配列番号3のアミノ酸2-433からなる群から選択される当該ポリペプチドフラグメントを含む。 20

【0020】

いくつかの実施形態では、当該RUP41-GPCRは、内因性である。

【0021】

RUP41-GPCRの対立遺伝子改変体は、本発明の範囲内であると想起される。

【0022】

配列番号2または配列番号3のヒトRUP41ポリペプチドの哺乳動物オルソログは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物オルソログは、マウスRUP41、ラットRUP41、ブタRUP41、および非ヒト靈長類RUP41を包含する。 30

【0023】

配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP41ポリペプチドに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。特にいくつかの実施形態では、ポリペプチド配列相同性は、Basic Local Alignment Search Tool(「BLAST」)を用いて評価され、これは当該分野で周知である[例えば、KarlinnおよびAltschul, Proc Natl Acad Sci USA(1990)87:2264-8; Altschulら, J Mol Biol(1990)215:403-410; Altschulら, Nature Genetics(1993)3:266-72; およびAltschulら, Nucleic Acids Res(1997)25:3389-3402; これらの開示内容は、その全体が参考として援用される、を参照のこと]。当該改変体ポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸欠失、挿入、および置換を含み得る。配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP41ポリペプチドの構成的活性化バージョンから選択される改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該構成的活性化バージョンのRUP41ポリペプチドは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンに置換されている、配列番号2または配列番号3のポリペプチドである。 40

【0024】

いくつかの実施形態では、当該RUP41-GRCRは、組換え体である。

50

【0025】

いくつかの実施形態では、当該RUP41 GPCRは、1つ以上のエピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、当該エピトープタグは血球凝集素(HA)エピトープタグである。いくつかの実施形態では、当該エピトープタグはFLAGエピトープタグである。いくつかの実施形態では、当該エピトープはV5エピトープタグである。当該HA、FLAGまたはV5エピトープタグを提供するための手順は、当業者に周知である(例えば、Clontech, Palo Alto, CAおよびInvitrogen, Carlsbad, CA)。

【0026】

いくつかの実施形態では、当該Gタンパク質は、細胞内cAMPのレベルを調整する。
いくつかの実施形態では、当該Gタンパク質はGiである。

【0027】

いくつかの実施形態では、当該決定する工程は、メラニン保有細胞アッセイの使用による。いくつかの実施形態では、色素凝集が高くなる。いくつかの実施形態では、色素分散が減少する。

【0028】

いくつかの実施形態では、当該決定する工程は、サイクリックAMP(cAMP)、サイクリックGMP(cGMP)、イノシトール三リン酸(IP₃)、ジアシルグリセロール(DAG)、およびCa²⁺からなる群から選択されるセカンドメッセンジャーのレベルの測定による。いくつかの実施形態では、当該セカンドメッセンジャーはcAMPである。いくつかの実施形態では、cAMPのレベルが低下している。いくつかの実施形態では、当該決定する工程は、CART-TSHで共トランスフェクトされたCOS-7細胞において実施される。

【0029】

いくつかの実施形態では、当該決定する工程は、当該GPCRを含む膜を用いて実施される。いくつかの実施形態では、当該膜は、ブリンクマンポリトロン(Brinkman Polyttron)TMを用いた細胞のホモジナイゼーションによって作製される。いくつかの実施形態では、当該膜調製物は、当該ポリトロンの各々10~20秒期間の3バーストでのホモジナイゼーションによって作製される。

【0030】

いくつかの実施形態では、当該決定する工程は、細胞内cAMPレベルの低下によって仲介される活性の測定による。いくつかの実施形態では、当該活性は、細胞生存の促進である。いくつかの実施形態では、当該細胞は、新生児ラット心室筋細胞(NRVM)である。いくつかの実施形態では、当該活性は、低酸素/再酸素化誘発性アポトーシスからの細胞救助である。いくつかの実施形態では、当該細胞はNRVMである。

【0031】

いくつかの実施形態では、当該Gタンパク質は、キメラGq(de1)/Giサブユニットであり、そして当該決定する工程は、IP₃またはCa²⁺の測定による。

【0032】

いくつかの実施形態では、当該決定する工程は、当該GPCRを含む膜へのGTP-S結合の測定による。さらなるいくつかの実施形態では、当該GTP-Sは、[³⁵S]で標識される。

【0033】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、GPCRの既知のリガンドの存在下で実施される。いくつかの実施形態では、当該既知のリガンドは、GPCRのアゴニストである。

【0034】

いくつかの実施形態では、当該方法は、候補化合物により引き起こされるレセプターの調整を、このレセプターをこのレセプターの既知のモジュレーターと接触させることにより引き起こされるこのレセプターの第二の調整に対して比較する工程をさらに包含する。

10

20

30

40

50

【0035】

第2の局面では、本発明は、第1の局面の方法に従って同定されたRUP41 GPCRのモジュレーターまたは心臓保護のモジュレーターを特徴とする。

【0036】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ 、 $20 \mu M$ 、 $30 \mu M$ 、 $40 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $60 \mu M$ 、 $70 \mu M$ 、 $80 \mu M$ 、 $90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M$ 、 $2 \mu M$ 、 $3 \mu M$ 、 $4 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 、 $6 \mu M$ 、 $7 \mu M$ 、 $8 \mu M$ 、 $9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

【0037】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0038】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0039】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0040】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0041】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、抗体、または少なくとも1つの結合ドメインを含むその誘導体である。

【0042】

第3の局面では、本発明は、RUP41 GPCRの活性を調整する方法であって、当該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変形体を含み、ここで当該レセプターが、Gタンパク質に結合し、当該方法が、レセプターを、第2の局面のモジュレーターと接触させる工程を包含する、方法を特徴とする。

【0043】

いくつかの実施形態では、当該レセプターは、配列番号2のアミノ酸2-433および配列番号3のアミノ酸2-433からなる群から選択される当該ポリペプチドフラグメントを含む。

【0044】

RUP41 GPCRの対立遺伝子変形体は、本発明の範囲内であることが想起される。

【0045】

配列番号2または配列番号3のヒトRUP41ポリペプチドの哺乳動物オルソログは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物オルソログは、マウスRUP41、ラットRUP41、ブタRUP41、および非ヒト靈長類RUP

10

20

30

40

50

41を包含する。

【0046】

配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP41ポリペプチドに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。特にいくつかの実施形態では、ポリペプチド配列相同性は、Basic Local Alignment Search Tool(「BLAST」)を用いて評価され、これは当該分野で周知である[例えば、KarlinおよびAltschul, Proc Natl Acad Sci USA(1990)87:2264-8; Altschulら, Nature Genetics(1993)3:266-72; およびAltschulら, Nucleic Acids Res(1997)25:3389-3402; これらの開示内容は、その全体が参考として援用される、を参照のこと]。当該改変体ポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸欠失、挿入、および置換を含み得る。配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP41ポリペプチドの構成的活性化バージョンである改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該構成的活性化バージョンのRUP41ポリペプチドは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンに置換されている、配列番号2または配列番号3のポリペプチドである。

【0047】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、1 μM～100 μMの区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、1 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、および100 μMからなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、1 μM～10 μMの区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、1 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、および10 μMからなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

【0048】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0049】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0050】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0051】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0052】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、レセプターを含む膜へのモジュレーターの投与を包含する。

【0053】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、レセプターを含む細胞または組織へのモジュレーターの投与を包含する。

【0054】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、レセプターを含む個体へのモジュレーターの投与を包含する。

【0055】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト靈長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【0056】

いくつかの実施形態では、当該方法は、モジュレーターが心血管障害の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために使用され、この心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、

この方法は、以下の工程：

(a') 当該モジュレーターを心筋細胞アポトーシスの細胞培養モデルに投与する工程；および

(b') 当該アポトーシスが阻害されるか否かを決定する工程であって、当該決定する工程が、以下：

- (i) 細胞数の測定；

- (ii) DNAフラグメント化の測定；および

(iii) 核染色質濃縮(nuclear chromatin condensation)の測定；

からなる群から選択される測定による、工程を包含し、ここでアポトーシス阻害の決定が、モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる。

【0057】

いくつかの実施形態では、核染色質濃縮の測定が、DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)染色を用いて実施される。

【0058】

いくつかの実施形態では、当該方法は、モジュレーターが虚血性心疾患の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために使用され、この虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択され、

この方法は、以下の工程：

(a') 当該モジュレーターを心筋細胞アポトーシスの細胞培養モデルに投与する工程；および

(b') 当該アポトーシスが阻害されるか否かを決定する工程であって、当該決定する工程が、以下：

- (i) 細胞数の測定；

- (ii) DNAフラグメント化の測定；および

(iii) 核染色質濃縮(nuclear chromatin condensation)の測定；

からなる群から選択される測定による、工程を包含し、ここでアポトーシス阻害の決定が、モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる。

【0059】

いくつかの実施形態では、核染色質濃縮の測定が、DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)染色を用いて実施される。

【0060】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、当該方法は、モジュレーターが心血管障害の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために使用され、この心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、

この方法は、以下の工程：

(a') モジュレーターを、心血管障害のマウスまたはラットモデルに投与するまたは投与しない工程；および

- (b') モジュレーターの投与が、以下：

- (i) 心肥大の減少；
- (ii) 心臓駆出量の増大；
- (iii) 心室体積の減少；および
- (iv) 心筋細胞アポトーシスの減少

10

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる。

【0061】

いくつかの実施形態では、当該方法は、モジュレーターが虚血性心疾患の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために使用され、この虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

20

からなる群から選択され、

この方法は、以下の工程：

(a') モジュレーターを、虚血性心疾患のマウスまたはラットモデルに投与するまたは投与しない工程；および

- (b') モジュレーターの投与が、以下：
- (i) 心肥大の減少；
- (ii) 心臓駆出量の増大；
- (iii) 心室体積の減少；および
- (iv) 心筋細胞アポトーシスの減少

30

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる。

【0062】

いくつかの実施形態では、当該個体は、心血管障害の予防または処置の必要があり、この心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

40

からなる群から選択される。

【0063】

いくつかの実施形態では、当該個体は、虚血性心疾患の予防または処置の必要があり、この虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される。

【0064】

いくつかの実施形態では、当該個体は、心血管機能の変化の必要があり、この心血管機

50

能の変化は、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される。

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、当該個体は、心血管障害に対して遺伝的素因を有するマウスまたはラットであり、この心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、当該方法は、モジュレーターが心血管障害の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために使用され、この心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、

この方法は、以下の工程：

(a') モジュレーターを、心血管障害に対して遺伝的素因を有する当該マウスまたはラットに投与するまたは投与しない工程；および

(b') モジュレーターの投与が、以下：

- (i) 心肥大の減少；
- (ii) 心臓駆出量の増大；
- (iii) 心室体積の減少；および
- (iv) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、

ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、当該個体は、虚血性心疾患に対して遺伝的素因を有するマウスまたはラットであり、この虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態では、当該方法は、モジュレーターが虚血性心疾患の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために使用され、この虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択され、

この方法は、以下の工程：

(a') モジュレーターを、虚血性心疾患に対して遺伝的素因を有する当該マウスまたはラットに投与するまたは投与しない工程；および

(b') モジュレーターの投与が、以下：

- (i) 心肥大の減少；
- (ii) 心臓駆出量の増大；

10

20

30

40

50

- (i i i) 心室体積の減少；および
- (i v) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる。

【 0 0 6 9 】

第4の局面では、本発明は、心血管機能の変化を必要とする個体において該変化を行う方法であって、当該方法が、第2の局面のモジュレーターの治療有効量を R U P 4 1 G P C R と接触させる工程を包含し、当該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはその対立遺伝子改変体を含む、方法を特徴とする。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、当該心血管機能の変化は、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内 c A M P のレベルを低下させる。

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、当該モジュレーターの経口投与によって実施される。

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当

10

20

30

40

50

該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト靈長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【0078】

第5の局面では、本発明は、その予防または処置の必要のある個体における心血管障害の予防または処置の方法であって、当該方法が、第2の局面のモジュレーターの治療有効量をRUP41 GPCRと接触させる工程を包含し、当該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

10

からなる群から選択されるポリペプチドまたはその対立遺伝子改変体を含む、方法を特徴とする。

【0079】

いくつかの実施形態では、当該心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される。

【0080】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

20

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

30

【0081】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0082】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0083】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

40

【0084】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0085】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、当該モジュレーターの経口投与によって実施される。

【0086】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト靈長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【0087】

50

第6の局面では、本発明は、その予防または処置の必要のある個体における虚血性心疾患の予防または処置の方法であって、当該方法が、第2の局面のモジュレーターの治療有効量をRUP41 GPCRと接触させる工程を包含し、当該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはその対立遺伝子改変体を含む、方法を特徴とする。

【0088】

いくつかの実施形態では、当該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される。

【0089】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M$ 、 $10 \mu M$ 、 $20 \mu M$ 、 $30 \mu M$ 、 $40 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $60 \mu M$ 、 $70 \mu M$ 、 $80 \mu M$ 、 $90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M$ 、 $2 \mu M$ 、 $3 \mu M$ 、 $4 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 、 $6 \mu M$ 、 $7 \mu M$ 、 $8 \mu M$ 、 $9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

【0090】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0091】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0092】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0093】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0094】

いくつかの実施形態では、当該接触させる工程は、当該モジュレーターの経口投与によって実施される。

【0095】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【0096】

第7の局面では、本発明は、組成物を調製する方法であって、RUP41 GPCRのモジュレーターを同定する工程および次いでキャリアおよびこのモジュレーターを混合する工程を包含し、ここでこのモジュレーターは、第1の局面の方法によって同定可能であ

10

20

30

40

50

る、方法を特徴とする。

【0097】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。
10 いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

【0098】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0099】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0100】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0101】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0102】

いくつかの実施形態では、第1の局面の方法によって同定可能な当該モジュレーターは、第1の局面の方法によって同定される。

【0103】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、第2の局面のモジュレーターである
30 。

【0104】

第8の局面では、本発明は、薬学的または生理学的に受容可能な組成物であって、第2の局面のモジュレーターを含む、当該モジュレーターから本質的になる、または当該モジュレーターからなる、組成物を特徴とする。

【0105】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。
40 いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内 cAMP のレベルを低下させる。

【 0 1 0 7 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【 0 1 0 9 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【 0 1 1 0 】

第 9 の局面では、本発明は、心血管機能を変化させる方法であって、当該変化の必要のある個体に、第 8 の局面の薬学的または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含し、ここで当該心血管機能の変化が、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される、方法を特徴とする。

【 0 1 1 1 】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【 0 1 1 2 】

第 10 の局面では、本発明は、心血管障害を処置する方法であって、当該処置の必要のある個体に、第 8 の局面の薬学的または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含し、ここで当該心血管障害が、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される、方法を特徴とする。

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【 0 1 1 4 】

第 11 の局面では、本発明は、虚血性心疾患を処置する方法であって、当該処置の必要のある個体に、第 8 の局面の薬学的または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含し、ここで当該虚血性心疾患が、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される、方法を特徴とする。

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【 0 1 1 6 】

第 12 の局面では、本発明は、個体における心血管障害の処置のための医薬の調製のた

10

20

30

40

50

めに、第2の局面のモジュレーターを使用する方法を特徴とする。

【0117】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。
10 いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

【0118】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0119】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0120】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0121】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0122】

いくつかの実施形態では、当該心血管障害は、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される。

30

【0123】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト靈長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【0124】

第13の局面では、本発明は、個体における虚血性心疾患の処置のための医薬の調製のために、第2の局面のモジュレーターを使用する方法を特徴とする。

【0125】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

40

50

番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、および10μMからなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

【0126】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0127】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0128】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。 10

【0129】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0130】

いくつかの実施形態では、当該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される。

【0131】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。 20

【0132】

第14の局面では、本発明は、ノックアウトマウスを作製する方法であって、ここで当該ノックアウトマウスが、心血管障害の素因が与えられ、当該心血管障害が、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、

当該方法が、配列番号5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子をノックアウトする工程を包含する、方法を特徴とする。 30

【0133】

いくつかの実施形態では、当該ノックアウトは、心筋細胞選択的である。

【0134】

第15の局面では、本発明は、ノックアウトマウスを作製する方法であって、ここで当該ノックアウトマウスが、虚血性心疾患の素因が与えられ、当該虚血性心疾患が、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択され、 40

該方法が、配列番号5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子をノックアウトする工程を包含する、方法を特徴とする。

【0135】

いくつかの実施形態では、当該ノックアウトは、心筋細胞選択的である。

【0136】

第16の局面では、本発明は、第14または第15の局面のノックアウトマウスを特徴とする。

【0137】

第17の局面では、本発明は、候補化合物が、心血管障害の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために、第16の局面のノックアウトマウスを使用する

方法であって、当該心血管障害が、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、当該方法が、以下の工程：

- (a') 化合物を、このマウスに投与するまたは投与しない工程；および
- (b') モジュレーターの投与が、以下：

 - (i) 心肥大の減少；
 - (ii) 心臓駆出量の増大；
 - (iii) 心室体積の減少；および
 - (iv) 心筋細胞アポトーシスの減少

10

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる、方法を特徴とする。

【0138】

第18の局面では、本発明は、候補化合物が、虚血性心疾患の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために、第16の局面のノックアウトマウスを使用する方法であって、当該虚血性心疾患は、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

20

からなる群から選択され、当該方法が、以下の工程：

- (a') 化合物を、このマウスに投与するまたは投与しない工程；および
- (b') モジュレーターの投与が、以下：

 - (i) 心肥大の減少；
 - (ii) 心臓駆出量の増大；
 - (iii) 心室体積の減少；および
 - (iv) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる、方法を特徴とする。

30

【0139】

第19の局面では、本発明は、ノックアウトラットを作製する方法であって、ここで該ノックアウトラットが、心血管障害の素因が与えられ、当該心血管障害が、以下：

- (a) 心拍出量低下；および
- (b) 静脈圧上昇

からなる群から選択され、

当該方法が、配列番号6に記載のポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーでハイブリダイズする遺伝子をノックアウトする工程を包含する、方法を特徴とする。

40

【0140】

いくつかの実施形態では、当該ノックアウトは、心筋細胞選択的である。

【0141】

第20の局面では、本発明は、ノックアウトラットを作製する方法であって、ここで該ノックアウトラットが、虚血性心疾患の素因が与えられ、当該虚血性心疾患が、以下：

- (a) 心筋梗塞；
- (b) 心筋梗塞後リモデリング；および
- (c) 鶯血性心不全

からなる群から選択され、

当該方法が、配列番号6に記載のポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーでハイブリダイズする遺伝子をノックアウトする工程を包含する、方法を特徴とする。

50

【0142】

いくつかの実施形態では、当該ノックアウトは、心筋細胞選択的である。

【0143】

第21の局面では、本発明は、第19または第20の局面のノックアウトラットを特徴とする。

【0144】

第22の局面では、本発明は、候補化合物が、心血管障害の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために、第21の局面のノックアウトラットを使用する方法であって、当該心血管障害が、以下：

(a) 心拍出量低下；および

(b) 静脈圧上昇

10

からなる群から選択され、当該方法が、以下の工程：

(a') 化合物を、このラットに投与するまたは投与しない工程；および

(b') モジュレーターの投与が、以下：

(i) 心肥大の減少；

(ii) 心臓駆出量の増大；

(iii) 心室体積の減少；および

(iv) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、

ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる、方法を特徴とする。

20

【0145】

第23の局面では、本発明は、候補化合物が、虚血性心疾患の予防または処置について治療効力を有するか否かを同定するために、第21の局面のノックアウトラットを使用する方法であって、当該虚血性心疾患が、以下：

(a) 心筋梗塞；

(b) 心筋梗塞後リモデリング；および

(c) 鶯血性心不全

からなる群から選択され、当該方法が、以下の工程：

(a') 化合物を、このラットに投与するまたは投与しない工程；および

(b') モジュレーターの投与が、以下：

30

(i) 心肥大の減少；

(ii) 心臓駆出量の増大；

(iii) 心室体積の減少；および

(iv) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される効果を有するか否かを決定する工程；を包含し、

ここで当該効果の決定が、当該モジュレーターが当該治療効力を有することの指標となる、方法を特徴とする。

【0146】

第24の局面では、本発明は、単離されたラットRUP41ポリヌクレオチドであって、以下：

40

(a) 配列番号6の少なくとも75ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；

(b) 配列番号6の少なくとも150ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；

(c) 配列番号6の少なくとも250ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；

(d) 配列番号6の少なくとも350ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチド；および

(e) 配列番号6の少なくとも500ヌクレオチドの連続した範囲を含むポリヌクレオチドからなる群から選択される、ポリヌクレオチドを特徴とする。

50

【0147】

いくつかの実施形態では、当該連続した範囲は、配列番号6のヌクレオチド514位を含まない。

【0148】

いくつかの実施形態では、当該単離されたラットRUP41ポリヌクレオチドは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRに対してオルソログである内因性ラットRUP41 GPCRをコードするヌクレオチド配列を含むか、当該ヌクレオチド配列から本質的になるか、または当該ヌクレオチド配列からなる。

【0149】

上記(a)から(b)のいずれか1つのRUP41ポリヌクレオチドに対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である改変体ポリヌクレオチドは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列相同性は、Basic Local Alignment Search Tool(「BLAST」)を用いて評価され、これは当該分野で周知である[例えば、KarlinおよびAltschul, Proc Natl Acad Sci USA(1990)87:2264-8; Altschulら, J Mol Biol(1990)215:403-410; Altschulら, Nature Genetics(1993)3:266-72; およびAltschulら, Nucleic Acids Res(1997)25:3389-3402; これらの開示内容は、その全体が参考として援用される、を参照のこと]。このような改変体ポリヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチド欠失、挿入、および置換を含み得る。

【0150】

さらなる実施形態では、本発明は、当該単離されたポリヌクレオチドの相補体を特徴とする。

【0151】

第25の局面では、本発明は、組換えベクターであって、当該組換えベクターが、第24の局面の単離されたポリヌクレオチドを含む、組換えベクターを特徴とする。いくつかの実施形態では、当該組換えベクターは、発現ベクターである。いくつかの実施形態では、当該発現ベクターは、真核生物発現ベクターである。適切な発現ベクターは、当業者に容易に明らかである。

【0152】

いくつかの実施形態では、当該組換えベクターは、一過性トランスフェクションまたは安定トランスフェクションの方法において使用される。いくつかの実施形態では、当該組換えベクターは、感染の方法において使用される。

【0153】

いくつかの実施形態では、当該組換えベクターは、RUP41遺伝子を不活性化する方法において使用されるターゲティングベクターである。

【0154】

いくつかの実施形態では、当該組換えベクターは単離される。

【0155】

第26の局面では、本発明は、第25の局面の組換えベクターを含む原核生物または真核生物宿主細胞を特徴とする。いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、原核生物であり、当該組換えベクターを用いて安定に形質転換される。いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、真核生物であり、当該組換えベクターを用いて一過的にトランスフェクトされる。他のさらなるいくつかの実施形態では、当該宿主細胞は、真核生物であり、当該組換えベクターを用いて安定にトランスフェクトされる。

【0156】

いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、真核生物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、293細胞、293T細胞、CHO細胞、およびCOS-7細胞からなる群か

10

20

30

40

50

ら選択される。いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、真核生物であり、より好ましくは、メラニン保有細胞である。他の適切な宿主細胞は、当業者に容易に明らかである。

【0157】

いくつかの実施形態では、この宿主細胞が、哺乳動物胚性幹細胞または胚性幹様細胞であり、そして当該組換えベクターが、RUP4-1遺伝子を不活性化する方法において使用される。いくつかの実施形態では、この宿主細胞が、哺乳動物胚性体細胞であり、そして当該組換えベクターが、RUP4-1遺伝子を不活性化する方法において使用される。

【0158】

さらなる実施形態は、第24の局面のポリヌクレオチドについて組換え体である原核生物または真核生物宿主細胞を包含する。

10

【0159】

いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、単離される。

【0160】

第27の局面では、本発明は、GPCR融合タンパク質構築物であって、当該構築物が、構成的活性型Gタンパク質共役型レセプターおよびGタンパク質を含み、当該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるRUP4-1ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含む、構築物を特徴とする。

20

【0161】

いくつかの実施形態では、当該レセプターは、配列番号2のアミノ酸2-433および配列番号3のアミノ酸2-433からなる群から選択される当該ポリペプチドフラグメントを含む。

【0162】

RUP4-1 GPCRの対立遺伝子改変体は、本発明の範囲内であることが想起される。

【0163】

配列番号2または配列番号3のヒトRUP4-1ポリペプチドの哺乳動物オルソログは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物オルソログは、マウスRUP4-1、ラットRUP4-1、ブタRUP4-1、および非ヒト靈長類RUP4-1を包含する。

30

【0164】

配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP4-1ポリペプチドに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。特にいくつかの実施形態では、ポリペプチド配列相同性は、Basic Local Alignment Search Tool(「BLAST」)を用いて評価され、これは当該分野で周知である[例えば、Karlin et al. (1990) 87:2264-8; Altschul et al., Molecular Biology (1990) 215:403-410; Altschul et al., Nature Genetics (1993) 3:266-72; およびAltschul et al., Nucleic Acids Research (1997) 25:3389-3402; これらの開示内容は、その全体が参考として援用される、を参照のこと]。当該改変体ポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸欠失、挿入、および置換を含み得る。配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP4-1ポリペプチドの構成的活性化バージョンである改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該構成的活性化バージョンのRUP4-1ポリペプチドは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンに置換されている、配列番号2または配列番号3の

40

50

ポリペプチドである。

【0165】

第28の局面では、本発明は、候補化合物がRUP41 GPCRのリガンドであるか否かを同定する方法であって、当該レセプターが、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (c) 配列番号5に記載のポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体を含み、当該方法が、以下の工程：

(a') 当該レセプターを、このレセプターに対する必要に応じて標識された既知のリガンドと、当該候補化合物の存在または不在下で接触させる工程；

(b') 当該既知のリガンドと当該レセプターとの間の複合体を検出する工程；および

(c') この候補化合物の不在下よりもこの候補化合物の存在下で、当該複合体がより少量で形成されるか否かを決定する工程

を包含し、ここで、当該決定が、この候補化合物が、当該レセプターのリガンドであることの指標となる、方法を特徴とする。

【0166】

いくつかの実施形態では、当該レセプターは、配列番号2のアミノ酸2-433および配列番号3のアミノ酸2-433からなる群から選択される当該ポリペプチドフラグメントを含む。

【0167】

RUP41 GPCRの対立遺伝子改変体は、本発明の範囲内であることが想起される。

【0168】

配列番号2または配列番号3のヒトRUP41ポリペプチドの哺乳動物オルソログは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物オルソログは、マウスRUP41、ラットRUP41、ブタRUP41、および非ヒト靈長類RUP41を包含する。

【0169】

配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP41ポリペプチドに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。特にいくつかの実施形態では、ポリペプチド配列相同性は、Basic Local Alignment Search Tool(「BLAST」)を用いて評価され、これは当該分野で周知である[例えば、Karlin and Altschul, Proc Natl Acad Sci USA(1990)87:2264-8; Altschul et al., J Mol Biol(1990)215:403-410; Altschul et al., Nucleic Acids Res(1997)25:3389-3402;これらの開示内容は、その全体が参考として援用される、を参照のこと]。当該改変体ポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸欠失、挿入、および置換を含み得る。配列番号2、配列番号3、または配列番号5のRUP41ポリペプチドの構成的活性化バージョンである改変体ポリペプチドは、本発明の範囲内であると想起される。いくつかの実施形態では、当該構成的活性化バージョンのRUP41ポリペプチドは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンに置換されている、配列番号2または配列番号3のポリペプチドである。

【0170】

いくつかの実施形態では、レセプターの当該既知のリガンドは、第2の局面のモジュレーターである。

【0171】

10

20

40

50

いくつかの実施形態では、当該既知のリガンドは、以下：

- (a) 放射性同位体；
- (b) 酵素；および
- (c) 蛍光体

からなる群から選択される標識を含む。

【0172】

いくつかの好ましい実施形態では、当該標識は、放射性同位体である。いくつかの実施形態では、当該放射性同位体は、³Hである。

【0173】

第29の局面では、本発明は、放射線画像化の方法であって、当該放射線画像化を必要とする個体に、放射性標識された化合物を提供または投与する工程を包含し、当該化合物が、第2の局面のモジュレーターおよび第28の局面のリガンドからなる群から選択される、方法を特徴とする。

【0174】

いくつかの実施形態では、当該個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、当該哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。マウス、ラット、またはヒトがより好ましく、ヒトが最も好ましい。

【0175】

第30の局面では、本発明は、ヒトRUP41 GPCRについてトランスジェニックである非ヒト哺乳動物を特徴とする。いくつかの実施形態では、当該非ヒト哺乳動物は、マウス、ラット、またはブタである。

【0176】

いくつかの実施形態では、当該ヒトRUP41 GPCRは、以下：

- (a) 配列番号2に記載のポリペプチド；
- (b) 配列番号2に記載のポリペプチドであって、ここで配列番号2のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンと置換されている、ポリペプチド；
- (c) 配列番号3に記載のポリペプチド；および
- (d) 配列番号3に記載のポリペプチドであって、ここで配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンと置換されている、ポリペプチド

からなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【0177】

RUP41 GPCRの対立遺伝子改変体は、本発明の範囲内であることが想起される。

【0178】

いくつかの実施形態では、ヒトRUP41の当該トランスジェニック発現は、心筋細胞選択的である。

【0179】

第31の局面では、本発明は、本発明の化合物が心臓保護についての効力を有するか否かを同定するために、第30の局面のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を使用する。

【0180】

いくつかの実施形態では、当該非ヒト哺乳動物は、マウス、ラット、またはブタである。

【0181】

当該化合物は、当該化合物を当該トランスジェニック非ヒト哺乳動物に投与し、実施例18のインビボラットモデルにおいて、またはそれに類似したマウスもしくはブタにおけるインビボモデルにおいて、当該投与が、ビヒクルのみが投与された当該トランスジェニック非ヒト哺乳動物よりもIS/AARを減少させるかどうかを決定することにより、心臓保護についての治療効力について評価され得る。

【0182】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、当該化合物は、当該化合物を当該トランスジェニック非ヒト哺乳動物に投与し、当該投与が、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される効果を生じるか否かを決定する（ここで当該効果の決定が、当該化合物が当該治療効力を有することの指標となる）ことにより、心臓保護についての治療効力について評価され得る。

【0183】

いくつかの実施形態では、本発明の当該化合物は、第2の局面のモジュレーターである。

【0184】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

【0185】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0186】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0187】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0188】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0189】

いくつかの実施形態では、本発明の当該化合物は、第30の局面のリガンドである。

【0190】

第32の局面では、本発明は、RUP41 GPCRのモジュレーターを作製するためのプロセスであって、以下の工程：

(a) 請求項1または請求項2に記載の方法に従って、当該モジュレーターを同定する工程；および

(b) (a)において同定されたモジュレーターを合成する工程を包含する、プロセスを特徴とする。

【0191】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さい

10

20

30

40

50

E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号 2 または配列番号 3 のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M$ 、 $10 \mu M$ 、 $20 \mu M$ 、 $30 \mu M$ 、 $40 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $60 \mu M$ 、 $70 \mu M$ 、 $80 \mu M$ 、 $90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号 2 または配列番号 3 のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号 2 または配列番号 3 のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M$ 、 $2 \mu M$ 、 $3 \mu M$ 、 $4 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 、 $6 \mu M$ 、 $7 \mu M$ 、 $8 \mu M$ 、 $9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。

10

【 0 1 9 2 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内 c A M P のレベルを低下させる。

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【 0 1 9 4 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【 0 1 9 5 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【 0 1 9 6 】

第 3 3 の局面では、本発明は、心血管機能の変化に使用するための (f o r u s e t h e c h a n g i n g c a r d i o v a s c u l a r f u n c t i o n) 第 2 の局面のモジュレーターを特徴とする。

20

【 0 1 9 7 】

いくつかの実施形態では、当該心血管機能の変化は、以下：

- (a) 心肥大の減少；
- (b) 心臓駆出量の増大；
- (c) 心室体積の減少；および
- (d) 心筋細胞アポトーシスの減少

からなる群から選択される。

30

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号 2 または配列番号 3 のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号 2 または配列番号 3 のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M$ 、 $10 \mu M$ 、 $20 \mu M$ 、 $30 \mu M$ 、 $40 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $60 \mu M$ 、 $70 \mu M$ 、 $80 \mu M$ 、 $90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号 2 または配列番号 3 のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号 2 または配列番号 3 のヒト R U P 4 1 G P C R において、 $1 \mu M$ 、 $2 \mu M$ 、 $3 \mu M$ 、 $4 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 、 $6 \mu M$ 、 $7 \mu M$ 、 $8 \mu M$ 、 $9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さい E C 5 0 または I C 5 0 を有する。

40

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内 c A M P のレベルを低下させる。

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

50

【0201】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0202】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0203】

第34の局面では、本発明は、心血管障害の予防または処置に使用するための第2の局面のモジュレーターを特徴とする。

【0204】

いくつかの実施形態では、当該心血管障害は、以下：

(a) 心拍出量低下；および

(b) 静脈圧上昇

からなる群から選択される。

10

【0205】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 10 \mu M, 20 \mu M, 30 \mu M, 40 \mu M, 50 \mu M, 60 \mu M, 70 \mu M, 80 \mu M, 90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトRUP41 GPCRにおいて、 $1 \mu M, 2 \mu M, 3 \mu M, 4 \mu M, 5 \mu M, 6 \mu M, 7 \mu M, 8 \mu M, 9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいEC50またはIC50を有する。

20

【0206】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

30

【0207】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0208】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0209】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0210】

第35の局面では、本発明は、虚血性心疾患の予防または処置に使用するための第2の局面のモジュレーターを特徴とする。

【0211】

40

いくつかの実施形態では、当該虚血性心疾患が、以下：

(a) 心筋梗塞；

(b) 心筋梗塞後リモデリング；および

(c) 鶯血性心不全

からなる群から選択される。

【0212】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群から選択される。

【0213】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒト

50

R U P 4 1 G P C Rにおいて、 $1 \mu M \sim 100 \mu M$ の区間から選択される値より小さいE C 5 0またはI C 5 0を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトR U P 4 1 G P C Rにおいて、 $1 \mu M$ 、 $10 \mu M$ 、 $20 \mu M$ 、 $30 \mu M$ 、 $40 \mu M$ 、 $50 \mu M$ 、 $60 \mu M$ 、 $70 \mu M$ 、 $80 \mu M$ 、 $90 \mu M$ 、および $100 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいE C 5 0またはI C 5 0を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトR U P 4 1 G P C Rにおいて、 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ の区間から選択される値より小さいE C 5 0またはI C 5 0を有する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、配列番号2または配列番号3のヒトR U P 4 1 G P C Rにおいて、 $1 \mu M$ 、 $2 \mu M$ 、 $3 \mu M$ 、 $4 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 、 $6 \mu M$ 、 $7 \mu M$ 、 $8 \mu M$ 、 $9 \mu M$ 、および $10 \mu M$ からなる群から選択される値より小さいE C 5 0またはI C 5 0を有する。

10

【0214】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、細胞内cAMPのレベルを低下させる。

【0215】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、選択的である。

【0216】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。

【0217】

いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、アゴニストである。

【0218】

出願人は、本発明の実施形態のいずれかから任意の1つ以上の候補化合物を排除する権利を保持する。出願人はまた、本発明の実施形態のいずれかから任意の1つ以上のモジュレーターを排除する権利もまた保持する。出願人はさらに、本発明の実施形態のいずれかから任意のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを排除する権利も保持する。出願人はさらに、本発明の実施形態のいずれかから任意の虚血性心疾患または任意的心血管障害または心筋細胞アポトーシスの任意の障害を排除する権利も保持する。

20

【0219】

(詳細な説明)

レセプターに関して展開した科学文献は、レセプターに関して種々の効果を有するリガンドに言及する多数の用語を採用している。明確でかつ一貫性を持たせるために、本発明特許文書を通して以下の定義を使用する。これらの定義がこれらの用語についての他の定義と抵触する範囲で、以下の定義が支配する：

30

「アゴニスト」は、それらがレセプターに結合する場合に細胞内応答を活性化する物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。いくつかの実施形態では、アゴニストは、それらがレセプターに結合する場合に細胞内応答を活性化する（例えば、膜へのGTP-S結合を増強する、または細胞内cAMPレベルを低下させる）ことが以前に知られていない物質である。いくつかの実施形態では、アゴニストは、それらがレセプターに結合する場合に脂肪分解を阻害することが以前に知られていない物質である。

40

【0220】

「アロステリックモジュレーター」は、レセプターの機能的活性に影響するが、内因性リガンドをレセプターへの結合から阻害しない物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。アロステリックモジュレーターは、逆アゴニスト、部分アゴニスト、およびアゴニストを包含する。

【0221】

本明細書中で使用する「アミノ酸略語」を表Aに示す：

(表A)

【0222】

【表1-1】

アラニン	ALA	A
アルギニン	ARG	R
アスパラギン	ASN	N
アスパラギン酸	ASP	D
システイン	CYS	C
グルタミン酸	GLU	E
グルタミン	GLN	Q
グリシン	GLY	G
ヒスチジン	HIS	H
イソロイシン	ILE	I
ロイシン	LEU	L
リジン	LYS	K
メチオニン	MET	M
フェニルアラニン	PHE	F
プロリン	PRO	P
セリン	SER	S
トレオニン	THR	T

10

20

30

40

【0223】

【表1-2】

トリプトファン	TRP	W
チロシン	TYR	Y
バリン	VAL	V

「アンタゴニスト」は、アゴニストと同じ部位でレセプターに競合的に結合するが細胞内応答を活性化せず、それにより、アゴニストにより惹起された細胞内応答を阻害し得る物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。アンタゴニストは、アゴニストの不在下ではベースラインの細胞内応答を減少させない。いくつかの実施形態では、アンタゴニストは、それらがレセプターに結合する場合に細胞応答を阻害するようにアゴニストと競合することが以前に知られていない物質である。ここで、例えば、細胞応答は、膜へのGTP-S結合または細胞内cAMPレベルの低下である。

【0224】

50

「抗体」は、本明細書中では、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を包含することが意図される。抗体は、IgG、IgA、IgD、IgE、およびIgMを包含することがさらに意図される。抗体は、全抗体(单鎖全抗体を含む)、およびそれらの抗原結合フラグメント(Fab、Fab'、F(ab)2、およびF(ab')2を含む)を包含する。抗体は、任意の動物起源であり得る。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ラクダ、ロバ、ヒツジ、ウマ、またはトリである。好ましくは、抗体は、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、および 10^{-15} M未満の解離定数またはKd値である結合親和力を有する。本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって調製され得る。
10

【0225】

「アポトーシス」(プログラム細胞死としても公知)は、細胞内で作動するシグナル伝達系によってその細胞が死亡するようにプログラムされている細胞死の形態をいうために使用される。対して、壊死は、細胞が外在性因子によって殺傷される場合である。

【0226】

「候補化合物」は、スクリーニング技術に従う分子(例えば(かつ限定ではない)、化学化合物)を意味する。好ましくは、用語「候補化合物」は、レセプターに対する逆アゴニスト、アゴニスト、またはアンタゴニストからなる群から選択される化合物であると公に知られていた化合物を含まず；より好ましくは、少なくとも1つの哺乳動物において治療効力を有すると以前に確定していた化合物を含まず；そして、最も好ましくは、ヒトにおいて治療有用性を有することが以前に確定していた化合物を含まない。
20

【0227】

「心臓駆出率」は、1回の収縮で左心室から駆出される血液の割合をいうために使用される。例えば、100mlの血液が左心室中にあって90mlが収縮の際に駆出される場合、心臓駆出率は90%である。

【0228】

「心肥大」は、心筋(heart muscle)(心筋(myocardium))の肥大をるために使用される。心肥大は、通常(常にではないが)、心筋の上に負荷される血行力学荷重の増大に対する適応応答である。
30

【0229】

「コドン」は、一般に、リン酸基に結合されたヌクレオシド(アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)、およびチミジン(T))を含み、かつ翻訳された場合にアミノ酸をコードする、3つのヌクレオチド(またはヌクレオチドの等価物)の一揃いを意味する。

【0230】

「組成物」は、少なくとも1つの成分を含む物質を意味する；「薬学的組成物」は、組成物の一例である。

【0231】

「化合物効力」は、レセプター結合親和力に対してレセプター機能性(すなわち、シグナル伝達経路を活性化/阻害する能力)を阻害または刺激する化合物の能力の測定値を意味する。化合物効力を検出する例示的な手段は、本特許文書の実施例の節に開示される。
40

【0232】

「～を含む」、「～から本質的になる」、および「～からなる」は、本明細書中においては、それらの標準的な意味に従って定義される。M.P.E.P.に記載された規定の意味が、当該分野における規定の意味を支配し、そして規制する控訴裁判所の判例に記載の規定の意味が、M.P.E.P.に記載の意味を支配する。

【0233】

「鬱血性心不全(CHF)」は、心臓が血液を効率的に汲み出す能力を失う障害をいう
50

。鬱血性心不全は、老齢になるにつれて、より蔓延する。虚血性心疾患は、鬱血性心不全の最も一般的な原因であり、全ての症例の 60 ~ 70 % を占める。12 mmHg より大きい「静脈圧上昇」は、25 秒より大きな循環時間に等価な「心拍出量低下」と同様に、鬱血性心不全についての主要フラミングガム (Framingham) 判定基準の 1 つである。

【0234】

「構成的活性型レセプター」は、そのリガンドまたはその化学的等価物へのレセプターの結合を介する以外の手段によって、活性状態で安定化されたレセプターを意味する。構成的活性型レセプターは、内因性または非内因性であり得る。

【0235】

「構成的に活性化されたレセプター」は、構成的に活性であるように改変された内因性レセプターを意味する。「CART」は、構成的活性化レセプター技術 (Constiutively Activated Receptor Technology) の頭字語であり、GPCR に接頭辞としてつけて本明細書中で使用される場合、当該接頭辞を付けられた GPCR は構成的に活性化されたレセプターであると識別することが理解される。

【0236】

「構成的レセプター活性化」は、そのリガンドまたはそれらの化学的等価物への結合が存在しないレセプターの活性化を意味する。

【0237】

「接触」または「接触する」は、インピトロ系またはインピボ系のいずれであれ、少なくとも 2 つの部分を一緒にすることを意味する。

【0238】

「減少する (DECREASE)」は、測定可能な量の減少をいうために使用され、用語「減ずる (reduce)」、「少なくする (diminish)」、「低下する (lower)」、および「減らす (lessen)」と同義で使用される。

【0239】

「超音波心臓検査法」は、生存している動物において心臓の構造および機能を測定するために音波を使用する方法をいうために使用される。

【0240】

「内因性」は、哺乳動物が天然に生成する物質を意味する。内因性（例えば（かつ限定ではない）用語「レセプター」に関して）とは、そのものが哺乳動物（例えば（かつ限定でない）ヒト）によって天然に生成されることを意味する。内因性は、当該哺乳動物のゲノム内に表される遺伝子の対立遺伝子改变体ならびにそこでコードされた対立遺伝子ポリペプチド改变体を包含することが理解される。対照的に、本文脈において用語「非内因性」とは、そのものが、哺乳動物（例えば（かつ限定ではない）ヒト）によって天然に生成されないことを意味する。例えば（かつ限定ではない）、内因性形態で構成的活性型でないが、操作された場合に構成的活性型になるレセプターは、最も好ましくは、本明細書中において、「非内因性の構成的に活性化されたレセプター」と呼ばれる。両用語とも、「インピボ」系および「インピトロ」系の両方を記載するように使用され得る。例えば（かつ限定ではない）、スクリーニングアプローチでは、この内因性または非内因性のレセプターは、インピトロスクリーニング系に関してであり得る。さらなる例として（かつ限定ではない）、哺乳動物のゲノムが非内因性の構成的に活性化されたレセプターを含むように操作された場合、インピボ系による候補化合物のスクリーニングが実現可能である。

【0241】

「発現ベクター」は、本明細書中においては、当該発現ベクターにとって組換え体である適切な宿主細胞におけるクローン化 DNA の転写および転写 mRNA の翻訳に必要である DNA 配列として定義される。適切に構築された発現ベクターは、宿主細胞における自律複製のための複製起点、選択マーカー、制限された数の有用な制限酵素部位、高コピー能 (potential for high copy number)、および活性

10

20

30

40

50

プロモーターを含む。転写されるべき当該クローン化DNAは、当該発現ベクター内で構成的活性型プロモーターまたは条件的活性型プロモーターに作動可能に連結される。例示では（限定ではない）、pCMVが発現ベクターである。

【0242】

「Gタンパク質共役型レセプター融合タンパク質」および「GPCR融合タンパク質」は、本明細書中に開示された本発明の文脈において、各々、少なくとも1つのGタンパク質、最も好ましくは、このようなGタンパク質のアルファ（ α ）サブユニット（これは、GTPに結合するサブユニットである）に融合された内因性の構成的活性型GPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRを含む非内因性タンパク質を意味し、このGタンパク質は、内因性オーファンGPCRと天然に結合するGタンパク質と同じタイプであることが好ましい。例えば（かつ限定ではない）、内因性状態において、Gタンパク質「Gs」が、GPCRと結合する優勢Gタンパク質である場合、この特定のGPCRに基づくGPCR融合タンパク質は、Gsに融合されたGPCRを含む非内因性タンパク質である；以下に記載するようないくつかの状況では、非優勢Gタンパク質が、GPCRに融合され得る。このGタンパク質は、構成的活性型GPCRのC末端に直接融合され得るか、またはこれら2つの間にスペーサーが存在し得る。

【0243】

「宿主細胞」は、ベクターをその中に取り込み得る細胞を意味する。この宿主細胞は、原核生物または真核生物であり得る。いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、真核生物であり、好ましくは、哺乳動物であり、より好ましくは、293細胞、293T細胞、CHO細胞、およびCOS-7細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、真核生物であり、より好ましくは、メラニン保有細胞である。

【0244】

本明細書中で使用される「処置の必要がある」とは、個体または動物が処置を必要とするか、または処置の利益を得るとの、治療奉仕者（例えば、人の場合、医師、看護士、臨床看護士など；動物（非ヒト哺乳動物を含む）の場合、獣医）によりなされる判断がをいう。この判断は、種々の要因に基づいてなされ、この要因は、治療奉仕者の意見の領域内にあるが、本発明の化合物により処置可能である状態の結果として、その個体または動物が現在病気であるかまたは将来的に病気になるとの認識を含む。

【0245】

「静脈圧上昇」は、循環系の衰弱により引き起こされる静脈での血液の貯留に起因して静脈系（静脈）において発生する血圧上昇をいうために使用される。

【0246】

本明細書中で使用される「個体」とは、任意の動物（哺乳動物を含む）、好ましくは、マウス、ラット、他のげっ歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、または靈長類、最も好ましくは、ヒトをいう。

【0247】

用語「応答」に関連して「阻害」または「阻害する」とは、化合物の不在下に対して、当該化合物の存在下で応答が減少するまたは妨害されることを意味する。

【0248】

「逆アゴニスト」は、レセプターの内因性形態または構成的に活性化された形態のいずれかに結合して、アゴニストの不在下で観察されるレセプターのベースラインの細胞内応答を減少させる物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。

【0249】

「虚血性心疾患」とは、心臓の組織への酸素の欠乏によって引き起こされる障害をいう。本障害では、心臓の筋肉が罹患され、心臓が適切に汲み上げできなくなる。虚血性心疾患は、米国において最も一般的な心筋症である。

【0250】

「単離された」は、その本来の環境（例えば、それが天然に存在する場合天然環境）から取り出された物質を意味する。例えば、生存している動物中に存在する、天然に存在す

10

20

30

40

50

るポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然系中の共存する物質のいくらかまたは全てから分離された同じポリヌクレオチドまたはDNAまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であり得、かつ／またはこののようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物の一部であり得るのであれば、そのベクターまたは組成物はその天然環境の一部ではないので、これらもなお単離されている。

【0251】

「ノックアウトマウス／ラット」は、本明細書中において、組換え手段によって、全ての他の遺伝子は影響を受けずに選択した単一の遺伝子が不活性化されている、または「ノックアウト」されているように操作されたマウスまたはラットを包含することが意図される。10

【0252】

「既知のレセプター」は、そのレセプターに対して特異的である内因性リガンドが同定されている内因性レセプターを意味する。

【0253】

「リガンド」は、天然に存在するレセプターに対して特異的である分子を意味する。

【0254】

本明細書中で使用される用語「調整する（MODULATE）」または「改変する（MODIFY）」は、特定の活性、機能、または分子の量、質、または効果を増大または減少させることをいうことが意図される。20

【0255】

「心筋梗塞」は、心筋のある領域への酸素の供給が不十分であることによるその領域の損傷または死をいう。心筋梗塞は、冠状動脈（血液および酸素を心筋にもたらす血管）の1つを遮断する血餅によりしばしば引き起こされる。この血餅により、血液および酸素が心臓のその領域に到達することが妨害され、その領域における心臓細胞の死に至る。

【0256】

「非オーファンレセプター」とは、同定されたリガンドに特異的な内因性の天然に存在する分子を意味し、ここでレセプターへのリガンドの結合は、細胞内シグナリング経路を活性化する。

【0257】

「オーファンレセプター」は、そのレセプターに対して特異的であるリガンドが同定されていない、または既知でない内因性レセプターを意味する。30

【0258】

「部分アゴニスト」は、完全アゴニストよりも弱い程度／範囲で、それらがレセプターに結合した場合に細胞内応答を活性化させる物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。

【0259】

「薬学的組成物」は、少なくとも1つの活性成分を含む組成物を意味し、それにより当該組成物は、哺乳動物（例えば（かつ限定ではない）ヒト）において仕様の効果的な結果についての研究に従う。当業者は、活性成分が、当業者の必要性に基づく所望の効果的な結果を有するか否かを決定するために適切な技術を理解し認識する。40

【0260】

「ポリヌクレオチド」は、一本鎖または二重鎖のいずれかの形態での1ヌクレオチドより多くのヌクレオチドのRNA、DNA、またはRNA/DNAハイブリッドの配列を意味する。本発明のポリヌクレオチドは、任意の公知の方法（合成、組換え、エクスピボ生成、またはそれらの組み合わせを含む）によって、ならびに当該分野で公知の任意の精製方法を使用して、調製され得る。

【0261】

「ポリペプチド」は、そのポリマーの長さに関わらず、アミノ酸のポリマーをいう。従って、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質は、ポリペプチドの定義内に含まれ50

る。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾を特定しないし、排除もしない。例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸基、脂質基などの共有結合を含むポリペプチドは、用語ポリペプチドによって明白に包含される。

【0262】

「心筋梗塞後リモデリング（POST-MYOCARDIAL INFARCTION REMODELING）」。心筋梗塞のために心筋組織が喪失されることにより、過度の血行力学荷重が持続して心室にかかり続ける。心室肥大は、心臓が荷重の増大を補償する主要な機構の1つを構成する。しかし、血行力学過荷重に直面して心機能（cardiac performance）を維持するこの適応の能力は、限りがあり、慢性的に維持された場合、適応不良になる。徐々に、この適応肥大表現型は、肥大した心室が漸進的に拡張し、収縮機能が弱まるにつれて、明白な心不全に移行する。心臓における心筋梗塞に対する適応応答および適応不良応答の既往歴は、「リモデリング」といわれる。10

【0263】

心筋梗塞後リモデリングに関して、病状の進行に関する情報となる多数のパラメーターがある：

- (a) 心肥大が増大する場合、それは有害である；
- (b) 心筋細胞アポトーシスが増大する場合、それは有害である；
- (c) 心臓駆出率が減少する場合、それは有害である；および
- (d) 心室体積が増大する場合、それは有害である。

駆出率、肥大、および心室拡張の測定は全て、超音波心臓検査法を用いて、生存する動物（ラットおよびマウスを含む）においてなされ得る。代表的には、これらのパラメーターがまず注目される。しかし、関与する病原機構を正確に確認するためには、代表的には、心筋細胞アポトーシスを測定するためにこの動物をさらに屠殺する必要がある。20

【0264】

「プライマー」は、本明細書中で、標的ヌクレオチド配列に相補的であり、かつこの標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズさせるために使用される、特定のオリゴヌクレオチド配列を示すために使用される。プライマーは、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、または逆転写酵素により触媒されるヌクレオチド重合のための開始点として働く。

【0265】

「レセプター機能性」とは、細胞において刺激を受容し、効果を調整するレセプターの正常な作動をいい、これは、遺伝子転写の調節、イオンの流入または流出の調節、触媒反応の遂行、および／またはGタンパク質による活性の調整を含むがこれらに限定されない。30

【0266】

「心拍出量低下」は、心臓の心室の各収縮で循環系（動脈）に汲み上げられる血液が少なくなるように、欠陥心臓のポンピング能が低下したことをいうために使用される。

【0267】

「セカンドメッセンジャー」は、レセプター活性化の結果として生成される細胞内応答を意味する。セカンドメッセンジャーは、例えば、イノシトール三リン酸（IP₃）、ジアシルグリセロール（DAG）、サイクリックAMP（cAMP）、サイクリックGMP（cGMP）、およびCa²⁺を含み得る。セカンドメッセンジャー応答は、レセプター活性化の決定のために測定され得る。さらに、セカンドメッセンジャー応答は、候補化合物（例えば、逆アゴニスト、部分アゴニスト、アゴニスト、およびアンタゴニストを含む）の直接の同定のために測定され得る。40

【0268】

「シグナル対ノイズ比」は、活性化、增幅、または刺激に応答して生じたシグナルであって、ここでこのシグナルが、非活性化、非増幅、または非刺激に応答してバックグラウンドノイズまたは基底レベルを上回るものと意味する。

【0269】

- 「スペーサー」は、遺伝子（例えば、目的のGPCR）の最後のコドンまたは最後のア

10

20

30

40

50

ミノ酸の後ろで、目的のGタンパク質の開始コドンまたは出発領域の前に位置する翻訳された数のアミノ酸を意味し、ここでこの翻訳された数のアミノ酸は、目的のGタンパク質の出発領域とインフレームに配置される。翻訳されたアミノ酸の数は、1、2、3、4などであり得、そして20まであり得る。

【0270】

用語「応答」と関連して「刺激」または「刺激する」は、応答が、化合物の不在下に対して、化合物の存在下で増大することを意味する。

【0271】

「被験体」は、靈長類（ヒトおよびヒヒを含むが、これらに限定されない）、ならびにペット動物（例えば、イヌおよびネコ）、実験動物（例えば、ラットおよびマウス）、および家畜動物（例えば、ウマ、ヒツジ、およびウシ）を意味する。
10

【0272】

本明細書中で使用される「治療有効量」とは、研究者、獣医、医師、または他の臨床家によって調べられている組織、系、動物、個体、またはヒトにおいて生物学的または医学的応答を惹起する活性化合物または薬学的薬剤の量をいう。これは、以下の1つ以上を含む：

(1) 疾患の予防；例えば、疾患、状態、または障害の素因があり得るが、その疾患の病状または症状をまだ経験も提示もしていない個体における当該疾患、状態、または障害の予防、
20

(2) 疾患の阻害；例えば、疾患、状態、または障害の病状または症状を経験しているかまたは提示している個体における当該疾患、状態、または障害の阻害（すなわち、当該病状および/または症状のさらなる発症の阻止）、および

(3) 疾患の改善；例えば、疾患、状態、または障害の病状または症状を経験しているかまたは提示している個体における当該疾患、状態、または障害の改善（すなわち、当該病状および/または症状の逆転）。

【0273】

「トランスジェニックマウス／ラット」は、本明細書中において、選択された外来遺伝子、すなわち導入遺伝子をそれ自身の遺伝物質の一部として有するように組換え手段によって操作されたマウスまたはラットを包含することが意図される。

【0274】

「心室体積」は、心臓の左心室または右心室の心室の内部寸法の測定値をいうために使用される。欠陥心臓では、心室の拡大がある。

【0275】

(A.序文)

以下の節の順序は、提示の効率のために記載され、続く開示または請求項に対する限定であることを意図しておらず、またそのような限定としてみなされるべきでない。

【0276】

(B.候補化合物のスクリーニング)

(1.包括(generic) GPCRスクリーニングアッセイ技術)

Gタンパク質レセプターが活性になる場合、これは、Gタンパク質（例えば、Gq、Gs、Gi、Gz、Go）に結合し、Gタンパク質へのGTPの結合を刺激する。次いで、このGタンパク質は、GTPアーゼとして作用し、GTPをGDPにゆっくりと加水分解する。それにより、このレセプターは、正常条件下では、非活性化される。しかし、活性化されたレセプターは、GDPをGTPに交換し続ける。GTPの加水分解可能でないアナログである[³⁵S]GTP-Sが、活性化されたレセプターを発現する膜への結合の増強をモニタリングするために使用され得る。[³⁵S]GTP-Sが、リガンドの不在および存在下で膜へのGタンパク質結合をモニタリングするために使用され得ることが報告されている。当業者に周知でありかつ利用可能である他の例のうち、このモニタリングの一例が、1995年にTraynorおよびNahorskiによって報告された。このアッセイ系の好ましい使用は、候補化合物の初期スクリーニング用である。なぜなら、
40
50

この系は、そのレセプターの細胞内ドメインと相互作用する特定のGタンパク質に関わらず、全てのGタンパク質共役型レセプターに包括的に適用可能であるからである。

【0277】

(2. 特定(specific) GPCRスクリーニング技術)

「包括」Gタンパク質共役型レセプター・アッセイ(すなわち、アゴニストまたは逆アゴニストである化合物を選択するアッセイ)を用いて、候補化合物が一旦同定されれば、いくつかの実施形態では、その化合物がレセプター部位で相互作用したことを確認するさらなるスクリーニングが好ましい。例えば、「包括」アッセイにより同定された化合物は、レセプターに結合しないかもしれない、それよりも、単に細胞内ドメインからGタンパク質を「脱結合(uncouple)」するものであり得る。

10

【0278】

(a. Gs、GzおよびGi)

G_sは、酵素アデニリルシクラーゼを刺激する。他方で、G_i(およびG_zおよびG_o)は、アデニリルシクラーゼを阻害する。アデニリルシクラーゼは、ATPのcAMPへの変換を触媒する; 従って、G_sタンパク質を結合する活性化されたGPCRは、cAMPの細胞レベルの増大と関連している。他方で、G_i(またはG_z、G_o)タンパク質を結合する活性化されたGPCRは、cAMPの細胞レベルの減少と関連している。一般的には、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission」、Chpt. 8, From Neuron To Brain(第3版)Nichols, J. G. ら編、Sinauer Associates, Inc.(1992)を参照のこと。従って、cAMPを検出するアッセイは、候補化合物が、例えば、レセプターに対する逆アゴニストである(すなわち、このような化合物は、cAMPのレベルを減少させる)かどうかを決定するために使用され得る。cAMPを測定することについて当該分野で公知の種々のアプローチが使用され得る; いくつかの実施形態では、好ましいアプローチは、ELISAベースのフォーマットでの抗cAMP抗体の使用に依存する。使用され得る別のタイプのアッセイは、全細胞セカンドメッセンジャー・レポーター系アッセイである。遺伝子におけるプロモーターは、特定の遺伝子がコードするタンパク質の発現を駆動する。サイクリックAMPは、cAMP応答性DNA結合タンパク質または転写因子(CREB)の結合を促進することにより、遺伝子発現を駆動し、後者タンパク質または転写因子は、次いで、cAMP応答エレメントと呼ばれる特定部位でプロモーターに結合し、遺伝子の発現を駆動する。レポーター遺伝子(例えば、-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼ)の前に複数のcAMP応答エレメントを含有するプロモーターを有するレポーター系が、構築され得る。従って、活性化されたG_s連結レセプターはcAMPの蓄積を生じ、このことが、次いで、遺伝子およびレポータータンパク質の発現を活性化する。次いで、レポータータンパク質(例えば、-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼ)が、標準的な生化学アッセイ(Chenら、1995)を用いて検出され得る。

20

30

30

【0279】

(b. GoおよびGq)

G_qおよびG_oは、酵素ホスホリパーゼCの活性化と関連しており、引き続きこの酵素がリン脂質PIP₂を加水分解し、以下の2つの細胞内メッセンジャーを放出する:ジアシルグリセロール(DAG)およびイノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)。IP₃の蓄積の増大は、G_q会合レセプターおよびG_o会合レセプターの活性化と関連している。一般的には、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission」Chpt. 8, From Neuron To Brain(第3版)Nichols, J. G. ら編、Sinauer Associates, Inc.(1992)を参照のこと。IP₃蓄積を検出するアッセイは、候補化合物が、例えば、G_q会合レセプターまたはG_o会合レセプターに対する逆アゴニストである(すなわち、このような化合物は、IP₃のレベルを減少させる)かどうかを決定するために使用され得る。G_q会合レセプターはまた、G_q依存性ホスホリパーゼCが、AP1エレ

40

50

メントを含有する遺伝子の活性化を生じるので、A P 1 レポーターアッセイを用いて調べられ得る；従って、活性化されたG q 会合レセプターは、このような遺伝子の発現の増大の証拠となる。それにより、それに対する逆アゴニストが、このような発現の減少の証拠となり、そしてアゴニストは、このような発現における増大の証拠となる。このような検出のための市販のアッセイが利用可能である。

【 0 2 8 0 】

(3 . G P C R 融合タンパク質)

内因性の構成的活性型 G P C R または非内因性の構成的に活性化された G P C R の使用は、定義により、当該レセプターは、それに結合される内因性リガンドの不在下でさえ活性であるので、逆アゴニストまたはアゴニストの直接的な同定のための候補化合物のスクリーニングにおける使用のために、興味深いスクリーニングの挑戦を提供する。従って、例えば、候補化合物の存在下での非内因性レセプターと、その化合物の不在下での非内因性レセプターとを区別するために、このような区別により、このような化合物が逆アゴニストであるかアゴニストであるか、あるいはこののようなレセプターに対して何の影響もないかに関する理解がなされることを目標として、いくつかの実施形態では、このような区別を増強し得るアプローチを使用することが好ましい。いくつかの実施形態では、好ましいアプローチは、G P C R 融合タンパク質の使用である。

【 0 2 8 1 】

一般には、非内因性 G P C R が、上述したアッセイ技術（ならびに当業者に公知の他の技術）を用いて構成的に活性化されたことが一旦決定されれば、内因性 G P C R と結合する優勢 G タンパク質を決定することが可能である。G P C R への G タンパク質の結合は、評価され得るシグナリング経路を提供する。いくつかの実施形態では、哺乳動物発現系を用いてスクリーニングが行われることが好ましい。なぜなら、このような系は、その中に内因性 G タンパク質を有することが予期されるからである。従って、定義により、このような系では、非内因性の構成的に活性化された G P C R が連続的にシグナルを出す。いくつかの実施形態では、例えば、レセプターに対する逆アゴニストの存在下で、特にスクリーニングの情況において、レセプターが逆アゴニストと接触された場合にそのレセプター間をより容易に区別し得る見込みがより高くなるように、このシグナルが増強されることが好ましい。

【 0 2 8 2 】

G P C R 融合タンパク質は、非内因性 G P C R との G タンパク質結合の効力を増強することが意図される。いくつかの実施形態では、G P C R 融合タンパク質が、内因性の構成的活性型 G P C R または非内因性の構成的に活性化された G P C R のいずれかを用いたスクリーニングに好ましい。なぜなら、このようなアプローチは、このようなスクリーニング技術において生成されるシグナルを増強するからである。これは、有意な「シグナル対ノイズ」比を助長することにおいて重要である；このような有意な比は、本明細書中に開示される候補化合物のスクリーニングに好ましい。

【 0 2 8 3 】

G P C R 融合タンパク質の発現に有用な構築物の構築は、当業者の範囲内である。市販の発現ベクターおよび系は、研究者の特定の必要性に適合し得る種々のアプローチを提供する。このような G P C R 融合タンパク質構築物の構築における重要な判断基準としては、G P C R 配列および G タンパク質配列が共にインフレームにあること（好ましくは、内因性 G P C R の配列が G タンパク質配列の上流にある）、および G P C R の「停止」コドンが欠失または置換されて、G P C R の発現の際に、G タンパク質もまた発現され得るようになることが挙げられるが、これらに限定されない。G P C R が G タンパク質に直接的に連結され得るか、またはこれら二者間にスペーサー残基が存在し得る（好ましくは、約 12 以下であるが、この数は当業者に容易に確認され得る）。便宜に基づいて、スペーサーを使用することが好ましい。いくつかの実施形態では、G P C R 融合タンパク質構築物の作製前に、非内因性 G P C R に結合する G タンパク質が同定されていることが好ましい。同定されている G タンパク質が本発明の少数しか存在しないため、G タンパク質の配列

10

20

30

40

50

を含む構築物（すなわち、ユニバーサルGタンパク質構築物、以下の実施例5(a)を参照のこと）がその中に内因性GPCR配列を挿入するために利用可能であることが好ましい；これは、異なる配列を有する種々の異なる内因性GPCRの大規模スクリーニングの情況においてさらなる効率を提供する。

【0284】

上述のように、Gi、Gz、およびGoに結合する活性化されたGPCRは、cAMPの形成を阻害することが予期され、これらのGPCRタイプに基づくアッセイを挑戦的なものとする[すなわち、cAMPシグナルは活性化の際に減少し、従って、例えば、アゴニスト（これは、このシグナルをさらに減少させる）の直接的な同定を挑戦的なものとする]。本明細書中で開示されるように、これらのレセプタータイプについて、生存シクラーゼベースアッセイを確立する試みで、GPCRの内因性のGタンパク質に基づいていないGPCR融合タンパク質を作出することが可能であることが確認されている。従って、例えば、内因性Gi共役型レセプターは、タンパク質に融合され得る-このような融合構築物は、発現の際に、内因性GPCRを、例えば、「天然」Giタンパク質よりもむしろGsと結合するように「駆動」または「強行」し、これにより、シクラーゼベースアッセイが確立され得る。従って、Gi、Gz、およびGo共役型レセプターについては、いくつかの実施形態では、GPCR融合タンパク質が使用され、かつこのアッセイがアデニリルシクラーゼ活性の検出に基づく場合、Gs（または酵素アデニリルシクラーゼの形成を刺激する等価Gタンパク質）を用いて、融合構築物が確立され得ることが好ましい。

【0285】

(表B)

【0286】

【表2】

Gタンパク質	GPCRの活性化（すなわち、構成的活性化またはアゴニスト結合）の際のcAMP生成の効果	GPCRの活性化（すなわち、構成的活性化またはアゴニスト結合）の際のIP3蓄積の効果	逆アゴニストとの接触の際のcAMP生成の効果	逆アゴニストとの接触の際のIP3蓄積の効果
Gs	増大	N/A	減少	N/A
Gi	減少	N/A	増大	N/A
Gz	減少	N/A	増大	N/A
Go	減少	増大	増大	減少
Gq	N/A	増大	N/A	減少

Gs、Gi、Gz、またはGoタンパク質と融合されたGqタンパク質を使用するGタンパク質融合構築物は、等しく有効である。いくつかの実施形態では、好ましい融合構築物は、以下のようなGqタンパク質を用いて成し遂げられ得る。ここでこのGqタンパク質では、Gタンパク質-サブユニット（「Gq」）の最初の6アミノ酸が欠失され、そしてGqのC末端の最後の5アミノ酸が、目的のGタンパク質のGの相当するアミノ酸と置換されている。例えば、融合構築物は、Giタンパク質と融合されたGq（6アミノ酸欠失）を有し得、「Gq/Gi融合構築物」を生じる。この融合構築物は、内因性Gi共役型レセプターをその非内因性Gタンパク質、Gqに結合するように強行し、これにより、セカンドメッセンジャー（例えば、イノシトール三リン酸またはジアシルグリセロール）が、cAMP生成の代わりに測定され得る。

【0287】

(4. シグナルエンハンサーGs共役型GPCRを用いた標的Gi共役型GPCRの共トランスフェクション(cAMPベースアッセイ))

10

20

30

40

50

G_i 共役型レセプターは、アデニリルシクラーゼを阻害することが公知であり、従って、cAMP生成のレベルを減少させ、このことにより、cAMPレベルの評価を挑戦的なものとし得る。いくつかの実施形態では、活性化の際に優勢にG_iに結合するレセプターの活性化の指標としてcAMPの生成の減少を測定するのに有効な技術は、シグナルエンハンサー（例えば、活性化の際にG_sと優勢に結合する非内因性の構成的に活性化されたレセプター（例えば、TSHR-A623I；以下を参照のこと））を、G_i連結GPCRと共にトランスフェクトすることにより、成し遂げられ得る。明らかなように、G_s共役型レセプターの活性化は、cAMPの生成の増大に基づいて決定され得る。G_i共役型レセプターの活性化は、cAMPの生成の減少に至る。従って、共トランスフェクションアプローチは、これらの「反対の」作用を有利に活用することが意図される。例えば、非内因性の構成的に活性化されたG_s共役型レセプター（「シグナルエンハンサー」）の発現ベクター単独との共トランスフェクションは、ベースラインのcAMPシグナルを提供する（すなわち、G_i共役型レセプターはcAMPレベルを減少させるが、この「減少」は、構成的に活性化されたG_s共役型シグナルエンハンサーによって確立されたcAMPレベルのかなりの増大に対してである）。次いでシグナルエンハンサーを「標的レセプター」と共トランスフェクトすることにより、G_i共役型標的レセプターの逆アゴニストは、測定cAMPシグナルを増大させ、一方、G_i共役型標的レセプターのアゴニストは、このシグナルを減少させる。

10

20

30

40

50

【0288】

このアプローチを用いて直接的に同定された候補化合物は、これらがシグナル増強レセプターを標的としないことを確実にすることが独立して評価されるべきである（これは、共トランスフェクトレセプターに対してスクリーニングする前または後になされ得る）。

【0289】

（C．医薬化学）

（候補化合物）

当該分野で公知の任意の分子が、当該分子が本発明のGPCRの活性を調整する（増大するまたは減少する）能力について試験され得る。活性を調整する化合物の同定のために、候補化合物は、レセプターを発現する細胞に直接提供され得る。

【0290】

本発明のこの実施形態は、レセプターの量または活性を調整する（例えば、阻害する、拮抗する（antagonize）、またはアゴニスト作用する（agonize）分子について化学ライブラリーをスクリーニングするために十分に適合される。この化学ライブラリーは、ペプチドライブラリー、ペプチド模倣物ライブラリー（peptidomimetic libraries）、化学合成ライブラリー、組換え体（例えば、ファージディスプレイライブラリー、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー）、他の非ペプチド合成有機ライブラリーなどであり得る。本発明のこの実施形態はまた、生物学的材料（血漿および組織抽出物を含むがこれらに限定されない）を含む内因性候補化合物をスクリーニングするため、および生物学的活性を有することが公知の内因性化合物のライブラリーをスクリーニングするために十分に適合される。

【0291】

いくつかの実施形態では、候補化合物の直接同定が、コンビナトリアル化学技術（それにより数千もの化合物がこのような分析のためにランダムに調製される）を介して生じた化合物と共に実施される。この候補化合物は、化学ライブラリーのメンバーであり得る。これは、任意の便宜的な数の個々のメンバー（例えば、数十から数百から数千から数百万の適切な化合物（例えば、ペプチド、ペプトイド、および他のオリゴマー化合物（環状または直鎖状）、および錆型ベースのより低い分子量の分子（例えば、ベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ビアリール、炭素環式化合物および多環式化合物（例えば、ナフタレン、フェノチアジン、アクリジン、ステロイドなど）、炭水化物誘導体およびアミノ酸誘導体、ジヒドロピリジン、ベンズヒドリル、および複素環（例えば、トリジン、インドール、チアゾリジンなど）））を含み得る。引用した数および列挙した化合物のタイプは例示で

あるが、限定ではない。好ましい化学ライブラリーは、低分子量の化学化合物および潜在的な治療剤を含む。

【0292】

例示の化学ライブラリーは、いくつかの供給源から市販されている (A r Q u l e , T r i p o s / P a n L a b s , C h e m D e s i g n , P h a r m a c o p o e i a)。いくつかの場合では、これらの化学ライブラリーは、メンバー化合物が付着されている基材上のライブラリーの各メンバーの正体をコードするコンビナトリアル戦略を用いて生成され、これにより有効なモジュレーターである分子の直接かつ即時の同定が可能になる。従って、多くのコンビナトリアルアプローチでは、化合物のプレート上の位置が、その化合物の組成を特定する。また、一例では、1つのプレート位置が、目的の相互作用を含むウェルへの投与によりスクリーニングされ得る化学物質を1~20からで有し得る。従つて、調整が検出された場合、相互作用する対のプールをだんだん小さくして、調整活性についてアッセイし得る。このような方法により、多くの候補化合物がスクリーニングされ得る。

【0293】

使用するのに適切な多くの多様性ライブラリー (d i v e r s i t y l i b r a r i e s) が当該分野で公知であり、本発明に従つて試験される化合物を提供するために使用され得る。あるいは、ライブラリーは、標準的な方法を用いて構築され得る。さらに、より概括的な、構造的に束縛された有機多様性 (例えば、非ペプチド) ライブラリーもまた、使用され得る。例示のために、ベンゾジアゼピンライブラリー (例えば、B u n i n l a , 1994 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 91 : 4708 - 4712 を参照のこと) が使用され得る。

【0294】

本発明の別の実施形態では、コンビナトリアル化学が、本発明のG P C R のモジュレーターを同定するために使用され得る。コンビナトリアル化学は数十万もの化合物を含むライブラリーを作出し得、その化合物の多くは構造的に類似し得る。高スループットスクリーニングプログラムが、公知の標的にに対する親和力についてこれらの巨大ライブラリーをスクリーニングし得るが、より小規模であるが最大の化学多様性を提供するライブラリーを達成する新規なアプローチが開発されている。(例えば、M a t t e r , 1997 , J o u r n a l o f M e d i c i n a l C h e m i s t r y 40 : 1219 - 1229 を参照のこと)。

【0295】

コンビナトリアル化学の1つの方法であるアフィニティフィンガープリンティングは、規定群のタンパク質に対する結合親和力について低分子量分子の別個のライブラリーを試験するために以前、使用された。当該スクリーンにより得られたフィンガープリントは、他のタンパク質または目的のレセプター (本発明では、本発明のレセプター) に対する個々のライブラリーメンバーの親和力を推定するために使用される。このフィンガープリントを、目的のタンパク質と反応することが公知の他の化合物から得られたフィンガープリントと比較し、ライブラリー化合物が同様に反応するか否かを推定する。例えば、複合体またはタンパク質成分との相互作用について大きなライブラリーで全てのリガンドを試験するのではなく、その活性を有することが公知の他の化合物に類似のフィンガープリントを有するリガンドのみが試験され得る。(例えば、以下を参照のこと: Kauvarら , 1995 , C h e m i s t r y a n d B i o l o g y 2 : 107 - 118 ; Kauvar , 1995 , A f f i n i t y f i n g e r p r i n t i n g , P h a r m a c e u t i c a l M a n u f a c t u r i n g I n t e r n a t i o n a l . 8 : 25 - 28 ; およびKauvar , T o x i c - C h e m i c a l D e t e c t i o n b y P a t t e r n R e c o g n i t i o n i n N e w F r o n t i e r s i n A g r o c h e m i c a l I m m u n o a s s a y , D . K u r t z . L . S t a n l e r およびJ . H . S k e r r i t t . 編者 , 1995 , A O A C : W a s h i n g t o n , D . C . , 305 - 312)。

10

20

30

40

50

【0296】

(モジュレーターとして同定された候補化合物)

一般に、このようなスクリーニングの結果は、独特のコア構造を有する化合物である；その後、これらの化合物は、好ましいコア構造の周囲でさらなる化学的改変に供せられて、それらの医薬特性をさらに増強させ得る。このような技術は、当業者に公知であり、本特許文書においては詳細には述べない。

【0297】

いくつかの実施形態では、当該同定されたモジュレーターは、生物学的に利用可能である。薬物の経口生物学的利用能 (oral bioavailability) の推定のために、当業者に利用可能な多数のコンピューターアプローチが開発されている [Oomsら, *Biochim Biophys Acta* (2002) 1587: 118 - 25 ; Clark & Grootenhuis, *Curr Opin Drug Discov Devel* (2002) 5: 382 - 90 ; Chengら, *J Comput Chem* (2002) 23: 172 - 83 ; Norinder & Haeberlein, *Adv Drug Deliv Rev* (2002) 54: 291 - 313 ; Matherら, *Comb Chem High Throughput Screen* (2001) 4: 453 - 75 ; Podlogar & Muegge, *Curr Top Med Chem* (2001) 1: 257 - 75 ; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される)。さらに、陽電子断層撮影法 (PET) が、薬物の経口投与後の哺乳動物身体 (非ヒト靈長類およびヒト身体を含む) 内における薬物分布の直接的な測定 (経口生物学的利用能の評価を含む) を得るために、多数のグループによって首尾よく用いられている [Nodaら, *J Nucl Med* (2003) 44: 105 - 8 ; Gulyasら, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2002) 29: 1031 - 8 ; Kanervaら, *Psychopharmacology* (1999) 145: 76 - 81 ; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。また、以下の実施例 19 を参照のこと。

【0298】

(D. 薬学的組成物)

本発明は、そのような処置 (または予防) を必要とする個体への、本発明のモジュレーターの治療有効量の投与による処置 (および予防) の方法を提供する [また、例えば、以下を参照のこと : PCT 出願番号 PCT / I B 02 / 01461 (WO 02 / 066505 として 2002 年 8 月 29 日に公開) ; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。好ましい局面では、モジュレーターは精製される。好ましくは、個体は、動物であり、これは、以下のような動物を含むがこれらに限定されない：ウシ、ブタ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、ウサギ、ラット、マウスなど。そして好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【0299】

本発明のモジュレーターは、非ヒト動物 [以下の実施例を参照のこと] および / またはヒトに、単独で、または薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物中で、投与され得、この組成物は、当業者に周知の技術を用いて適切なキャリアまたは賦形剤と混合される。適切な薬学的に受容可能なキャリアは、当業者に利用可能である；例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, 1980, Mack Publishing Co., (Osloら, 編) を参照のこと。

【0300】

薬学的または生理学的に受容可能な組成物は、次いで、治療有効用量で提供される。治療有効用量とは、本明細書中に記載の方法 (例示であって限定ではない) によって決定されるような、虚血性心疾患 (心筋梗塞、心筋梗塞後リモデリング、および鬱血性心不全を含む) の症状または生理的状態の予防または改善を生じるのに十分なモジュレーター量をいう。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、本明細書中に記載の方法 (例示であって限定ではない) によって決定されるような、心血管障害 (心拍出量低下および静脈圧上

10

20

30

40

50

昇を含む)の症状または生理的状態の予防または改善を生じるのに十分なモジュレーター量をいう。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、本明細書中に記載の方法(例示であって限定ではない)によって決定されるような、心血管機能の必要とされる変化(心肥大の減少、心臓駆出量の増大、心室体積の減少、および心筋細胞アポトーシスの減少を含む)を生じるのに十分なモジュレーター量をいう。

【0301】

本発明のモジュレーターは、単独で、または他の薬学的もしくは生理学的に受容可能な化合物と合わせて提供され得ることが明らかに考慮される。本発明の障害の処置のための他の化合物は、当該分野で現在周知である。本発明の一局面は、本明細書中に開示された実施形態に従った使用を包含し、1つ以上以下の以下からなる群から選択される薬剤をさらに含む:カプトプリル、マレイン酸エナラプリル、リニノプリル(lininopril)、ラミプリル、ペリンドプリル、フロセミド、トラセミド、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、塩酸アミロライド、スピロノラクトン、アテノロール、ビソプロロール、カルベディロール、酒石酸メトプロロール、およびジゴキシン。

【0302】

いくつかの実施形態では、虚血性心疾患は、心筋梗塞、心筋梗塞後リモデリング、および鬱血性心不全からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、心血管障害は、心拍出量低下および静脈圧上昇からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、心血管機能の必要とされる変化は、心肥大の減少、心臓駆出量の増大、心室体積の減少、および心筋細胞アポトーシスの減少からなる群から選択される。

【0303】

(投与経路)

適切な投与経路は、経口、経鼻、直腸、経粘膜または腸内投与、非経口送達(筋内、皮下、髄内注射、ならびに髄腔内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻内、肺内(吸入)または眼内注射を含む)(当該分野で公知の方法を用いる)を含む。他の特に好ましい投与経路は、エアロゾルおよび貯留物処方物(depot formulation)である。発明された医薬の徐放性処方物(特に貯留物)は明らかに意図される。いくつかの実施形態では、投与経路は経口である。

【0304】

(組成物/処方物)

本発明に従って使用するための使用される薬学的または生理学的に受容可能な組成物および医薬は、1つ以上の生理学的に受容可能なキャリア(賦形剤および助剤を含む)を用いて従来の方法で処方され得る。適切な処方は、選択される投与経路に依存する。

【0305】

本明細書中に記載の医薬のいくらかは、薬学的または生理学的に受容可能なキャリアおよび本発明の少なくとも1つのモジュレーターを含む。注射のために、本発明の薬剤は、水溶液中に、好ましくは、生理的適合性緩衝液(例えば、ハンクス溶液、リンガー溶液、または生理塩類緩衝液(例えば、リン酸緩衝液または炭酸緩衝液)中に処方され得る。経粘膜投与のために、透過されるべき障壁に適切な浸透剤が処方において使用される。このような浸透剤は、当該分野で一般に知られている。

【0306】

経口摂取され得る薬学的または生理学的に受容可能な調製物は、ゼラチン製の押しばめカプセル、ならびにソフト密封カプセル(capsule)(ゼラチンおよび可塑材(例えば、グリセロールまたはソルビトール)製)を含む。押しばめカプセルは、充填剤(例えば、ラクトース)、結合剤(例えば、デンプン)、および/または滑沢剤(例えば、滑石またはステアリン酸マグネシウム)、および必要に応じて安定剤と混合して、活性成分を含有し得る。ソフトカプセルでは、活性化合物は、適切な液体(例えば、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコール)中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤が添加され得る。経口投与のための全処方物は、このような投与に適した投薬量でなければならない。

10

20

30

40

50

【0307】

経頸投与のために、組成物は、従来の様式で処方された錠剤またはロゼンジの形態を取り得る。

【0308】

吸入投与のために、本発明に従って使用される化合物は、適切な推進ガス（例えば、二酸化炭素）の使用と共に、ネブライザー用に加圧パックからのエアロゾルスプレー提示の形態で便宜的に送達される。加圧エアロゾルの場合、投薬量単位は、バルブを提供することにより決定されて、計量量（metered amount）を送達し得る。カプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチン製）（吸入器または注入器において使用される）が処方され得、これは、化合物および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）の粉末混合物を含有する。10

【0309】

化合物は、注射（例えば、ボーラス注射または連続注入）による非経口投与のために処方され得る。注射用処方物は、添加した保存剤と共に単位投薬量で提示され得る（例えば、アンプル中または複数投与容器中）。組成物は、水性ビヒクル中で懸濁液、溶液、またはエマルジョンのような形態をとり得、そして処方剤（例えば、懸濁化剤、安定剤、および／または分散剤）を含み得る。

【0310】

非経口投与のための薬学的または生理学的に受容可能な処方物は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を含む。水性懸濁液は、懸濁液の粘度を上昇させる物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン）を含有し得る。必要に応じて、懸濁液はまた、適切な安定剤または化合物の溶解度を上昇させる薬剤を含有し、高濃度の溶液の調製を可能にし得る。20

【0311】

あるいは、活性成分は、粉末または凍結乾燥形態であり得、これは、使用前に適切なビヒクル（例えば、滅菌の無発熱物質の水）を用いて構成される。

【0312】

以前に記載される処方物に加えて、化合物はまた、貯留調製物として処方され得る。このような長期作用処方物は、移植（例えば、皮下もしくは筋内）によってまたは筋内注射によって投与され得る。従って、例えば、化合物は、適切なポリマー材料または疎水性材料（例えば、受容可能なオイル中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂と共に、または溶解度の低い（sparingly soluble）誘導体として（例えば、低溶解度塩として）、処方され得る。30

【0313】

特定の実施形態では、化合物は、制御放出システムを介して送達され得る。1つの実施形態では、ポンプが使用され得る（Langer, 前出；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201-240；Buchwaldら, 1980, Surgery 88: 507-516；Sauderら, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574-579）。別の実施形態では、ポリマー材料が使用され得る（Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise, 編, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall, 編, Wiley, New York, 1984；RangerおよびPeppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61；Levyら, 1985, Science 228: 190-192；Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25: 351-356；Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71: 858-863）。他の制御放出システムは、Langer (1990, Science 249: 1527-1533) の概説において議論されている。4050

【 0 3 1 4 】

さらに、化合物は、徐放システム（例えば、治療剤を含有する固体疎水性ポリマー製半透過性マトリックス）を用いて送達され得る。種々の徐放性材料が確立されており、当業者に周知である。徐放性カプセルは、化学的性質に依存して、数週間から 100 日以上まで化合物を放出し得る。

【 0 3 1 5 】

治療剤の化学的性質および生物学的安定性に依存して、モジュレーター安定化のためのさらなる戦略が使用され得る。

【 0 3 1 6 】

薬学的または生理学的に受容可能な組成物はまた、適切な固相またはゲル相のキャリアまたは賦形剤を含み得る。このようなキャリアまたは賦形剤の例は、以下を含むがこれらに限定されない：炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース（c e l l u l o s ）誘導体、ゼラチン、およびポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）。

【 0 3 1 7 】**（有効用量）**

本発明における使用に適切な薬学的または生理学的に受容可能な組成物は、活性成分がそれらの意図された目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を包含する。より詳細には、治療有効量は、処置される被験体の存在する症状の進展を防ぐか、または症状を改善するのに有効な量を意味する。有効量の決定は、特に、本明細書中に提供される詳細な開示を考慮して、十分に（w l l ）当業者の能力内にある。

【 0 3 1 8 】

本発明の方法に用いられる任意の化合物について、治療有効用量は、細胞培養アッセイからまず概算され得る。例えば、用量は、インビトロ系において細胞死保護的であることが示された濃度の点または範囲を包含するかまたは網羅する循環濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて処方され得る。[インビトロアッセイおよびインビボ動物モデルについては、以下の実施例を参照のこと。]このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。

【 0 3 1 9 】

治療有効用量は、患者において症状の改善を生じる化合物の量をいう。このような化合物の毒性および治療効力は、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順（例えば、 $L D_{50}$ を決定するため（検定集団の 50 % が致死する用量）および $E D_{50}$ （検定集団の 50 % が治療的に有効な用量を決定するため））によって決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指數であり、これは、 $L D_{50}$ と $E D_{50}$ との間の比として表され得る。高い治療指數を示す化合物が好ましい。

【 0 3 2 0 】

これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおいて使用する範囲の投薬量を処方する際に使用され得る。このような化合物の投薬量は、好ましくは、ほとんど毒性のないかまたは全く毒性のない $E D_{50}$ を含む循環濃度の範囲内である。投薬量は、使用される投薬形態および使用される投与経路に依存してこの範囲内で変動し得る。正確な処方、投与経路および投薬量は、患者の状態を考慮して、個々の医師によって選択され得る。（例えば、F i n g l a , 1 9 7 5 , 「T h e P h a r m a c o l o g i c a l B a s i s o f T h e r a p e u t i c s」, Ch . 1 を参照のこと）。

【 0 3 2 1 】

投薬量および投薬間隔は、特定の状況に依存して、本発明の障害を予防または処置するのに十分である、活性化合物の血漿レベルを提供するように、個々に調整され得る。これらの効果を達成するのに必要な投薬量は、個体の特徴および投与経路に依存する。

【 0 3 2 2 】

投薬間隔はまた、最小有効濃度についての値を用いて決定され得る。化合物は、当節の

10

20

30

40

50

10 ~ 90 % の、好ましくは 30 ~ 99 % 、最も好ましくは 50 ~ 90 % 、最小有効濃度を上回る血漿レベルを維持するレジメンを用いて投与されるべきである。局所投与または選択的取り込みの場合、薬物の有効局所濃度は、血漿濃度に関連しないものであり得る。

【 0323 】

投与される組成物の量は、もちろん、処置される被験体、被験体の体重、疾患の重篤度 (the severity of the affliction) 、投与様式、および指示医の判断に依存する。

【 0324 】

本発明のモジュレーターの量についての好ましい投薬量範囲は、0.1 ~ 100 mg / kg 体重である。これは、所望の結果（本発明の虚血性心疾患の予防もしくは処置、本発明の心血管障害の予防もしくは処置、または本発明の心血管機能における必要とされる変化の遂行を含むがこれらに限定されない）を達成するために、一日または定期基準で投与され得る。他の好ましい投薬量範囲は、0.1 ~ 30 mg / kg 体重である。他の好ましい投薬量範囲は、0.1 ~ 10 mg / kg 体重である。もちろん、これらの一日投薬量は、一日が進行する間に定期的に、少量で送達または投薬され得る。これらの投薬量範囲は、単に好ましい範囲であり、本発明に対して限定することを意図されないことが留意される。

【 0325 】

(E . 処置の方法)

本発明は、とりわけ、虚血性心疾患（心筋梗塞、心筋梗塞後リモデリング、および鬱血性心不全を含む）の予防または処置の方法であって、本発明のモジュレーターを当該処置を必要とする個体に提供する工程を包含する、方法に関する。本発明はまた、とりわけ、心血管障害（心拍出量低下および静脈圧上昇を含む）の予防または処置の方法であって、本発明のモジュレーターを当該処置を必要とする個体に提供する工程を包含する、方法に関する。本発明はまた、心血管機能の必要とされる変化（心肥大の減少、心臓駆出容積の増大、心室体積の減少、および心筋細胞アポトーシスの減少を含む）を行う方法であって、本発明のモジュレーターを当該処置を必要とする個体に提供する工程を包含する、方法に関する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、経口摂取される薬学的組成物中で個体に提供される。好ましくは、当該個体は、哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【 0326 】

(F . 他の有用性)

心筋細胞保護的 RUP41 レセプター機能性を調整（すなわち、増大、減少、または遮断）する因子（agent）は、候補化合物を RUP41 レセプターと接触させ、そして RUP41 レセプター機能性に関するこの候補化合物の効果を決定することにより同定され得る。RUP41 レセプターの機能性を調整する化合物の選択性は、RUP41 レセプターに関するその効果を、他のレセプターに関するその効果と比較することによって評価され得る。RUP41 レセプター機能性を調整する化合物の同定後、このような候補化合物は、それらの活性を確認または定量するために、他のアッセイ（インビボモデルを包含するが、これに限定されない）においてさらに試験され得る。RUP41 レセプター機能性のモジュレーターは、正常型または異常型の RUP41 レセプターの機能性が関与する疾患および生理的状態の処置において治療的に有用である。

【 0327 】

心臓保護のモジュレーターである（すなわち、増大する、減少する、または遮断する）因子は、候補化合物を RUP41 レセプターと接触させ、そして RUP41 レセプター機能性に関するこの候補化合物の効果を決定することにより同定され得る。いくつかの実施形態では、当該心臓保護は、心筋細胞死の防止または減少を包含する。いくつかの実施形態では、当該心筋細胞死は、心筋細胞アポトーシスを包含する。いくつかの実施形態では、当該心臓保護は、虚血に対する心筋保護を包含する。いくつかの実施形態では、当該心

10

20

30

40

50

臓保護は、梗塞の大きさの減少を包含する。いくつかの実施形態では、当該心臓保護は、虚血後収縮回復の改善 (improved postischemic contractile recovery) を包含する。いくつかの実施形態では、当該心臓保護は、悪性虚血誘発性不整脈の抑制を包含する。RUP41レセプターの機能性を調整する化合物の選択性は、RUP41レセプターに関するその効果を、他のレセプターに関するその効果と比較することによって評価され得る。RUP41レセプター機能性を調整する化合物の同定後、このような候補化合物は、それらの活性を確認または定量するために、他のアッセイ（インビボモデルを包含するが、これに限定されない）においてさらに試験され得る。RUP41レセプター機能性のモジュレーターは、正常型または異常型のRUP41レセプターの機能性が関与する疾患および生理的状態の処置において治療的に有用である。10

【0328】

本発明はまた、RUP41のモジュレーターまたはリガンドとして同定された本発明の化合物の放射性同位体標識バージョンに関し、これは、放射線画像化 [例えば、以下を参照のこと: Lemstraら, Gerontology (2003) 49: 55-60; Myersら, J Psychopharmacol (1999) 13: 352-7; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] だけでなく、組織サンプル（ヒトを含む）においてRUP41を局在化および定量するための、および放射性同位体標識化合物の阻害結合によりRUP41リガンドを同定するためのアッセイ（インビトロおよびインビボの両方）においても有用である。このような放射性同位体標識化合物を包含する新規なRUP41アッセイを開発することが、本発明のさらなる目的である。例示のためであって限定ではないが、放射線画像化によるRUP41の可視化は、虚血性心疾患（心筋梗塞、心筋梗塞後リモデリング、および鬱血性心不全を含む）に対する危険性のある個体またはその進行を有する個体を同定し得る。20

【0329】

本発明は、RUP41のモジュレーターまたはリガンドとして同定された本発明の化合物の放射性同位体標識バージョンを包含する。

【0330】

いくつかの実施形態では、化合物の放射性同位体標識バージョンは、1つ以上の原子が、天然において代表的に見出される（すなわち、天然に存在する）原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子によって置換（replacedまたはsubstituted）されること以外は、その化合物と同一である。本発明の化合物に取り込まれ得る適切な放射性核種は、²H（ジュウテリウム）、³H（トリチウム）、¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O、¹⁸F、³⁵S、³⁶Cl、⁸²Br、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁷⁷Br、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、および¹³¹Iを包含するが、これらに限定されない。当該の放射性標識化合物において取り込まれる放射性核種は、放射性標識化合物の特定の適用に依存する。例えば、インビトロRUP41標識および競合アッセイのためには、³H、¹⁴C、⁸²Br、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵Sを取り込む化合物が、一般に、最も有用である。放射性画像化適用のためには、¹¹C、¹⁸F、¹²⁵I、¹²³I、¹²⁴I、¹³¹I、⁷⁵Br、⁷⁶Brまたは⁷⁷Brが、一般に最も有用である。いくつかの実施形態では、放射性核種は、³H、¹¹C、¹⁸F、¹⁴C、¹²⁵I、¹²⁴I、¹³¹I、³⁵S、および⁸²Brからなる群から選択される。3040

【0331】

放射性同位体を有機化合物に取り込むための合成方法が、本発明の化合物に適用可能であり、当業者に周知である。これらの合成方法（例えば、標的分子へのトリチウムの活性レベルの取り込み）は、以下の通りである：

A. トリチウムガスでの触媒的還元 - この手順は、通常、高い比活性の産物を生じ、ハロゲン化されたまたは不飽和の前駆体を必要とする。

B. 水素化ホウ素ナトリウム (Sodium Borohydride) [³H]での還

10

20

30

40

50

元 - この手順は、割合安価であり、還元性官能基を含有する前駆体（例えば、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステルなど）を必要とする。

C . 水素化リチウムアルミニウム (Lithium Aluminum Hydride) [³ H] での還元 - この手順は、ほぼ理論上の比活性で産物を提供する。これはまた、還元性官能基を含有する前駆体（例えば、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステルなど）を必要とする。

D . トリチウムガス曝露標識 - この手順は、適切な触媒の存在下で、交換可能なプロトンを含有する前駆体をトリチウムガスに曝露することを包含する。

E . ヨウ化メチル (Methyl Iodide) [³ H] を用いる N - メチル化 - この手順は、通常、高い比活性のヨウ化メチル (³ H) で適切な前駆体を処理することにより 10 N - メチルまたは N - メチル (³ H) 産物を調製するために使用される。この方法は、一般に、より高い非活性（例えば、約 70 ~ 90 Ci / mmol のような）を可能にする。

【 0332 】

^{1 2 5} I の活性レベルを標的分子に取り込むための合成方法は、以下を包含する：

A . Sandmeyer 反応および同様の反応 - この手順は、アリールまたはヘテロアリールのアミンをジアゾニウム塩（例えば、テトラフルオロホウ酸塩）に、および続いて Na ^{1 2 5} I を用いて ^{1 2 1} I 標識化合物に変換する。代表的な手順は、 Zhu , D. - G . および共同研究者によって J . Org . Chem . 2002 , 67 , 943 - 948 において報告された。

B . フェノールのオルト ^{1 2 1} I ヨウ素化 (Iodination) - この手順は、 Collie , T. L . および共同研究者により J . Labeled Compd Radiopharm . 1999 , 42 , S 264 - S 266 において報告されたように、フェノールのオルト位での ^{1 2 5} I の取り込みを可能にする。

C . ^{1 2 5} I でのアリールおよびヘテロアリールプロミド交換 - この方法は、一般に、二工程プロセスである。第一の工程は、トリアルキルスズハライドまたはヘキサアルキルジスズ [例えば、 (CH₃)₃ SnSn (CH₃)₃] の存在下で、例えば、 Pd 触媒反応 [すなわち、 Pd (Ph₃P)₄] を用いて、またはアリールまたはヘテロアリールのリチウムを通して、アリールまたはヘテロアリールプロミドを対応するトリアルキルスズ中間体に変換することである。代表的な手順は、 Bas , M. - D . および共同研究者によって J . Labeled Compd Radiopharm . 2001 , 44 , S 280 - S 282 において報告された。

【 0333 】

いくつかの実施形態では、化合物の放射性同位体標識バージョンは、放射性核種を含む 1 つ以上の置換基の付加以外は、その化合物と同一である。いくつかのさらなる実施形態では、化合物はポリペプチドである。いくつかのさらなる実施形態では、化合物は、抗体またはそれらの抗原結合フラグメントである。いくつかのさらなる実施形態では、当該抗体はモノクローナルである。適切な当該放射性核種は、 ² H (ジュウテリウム) 、 ³ H (トリチウム) 、 ^{1 1} C 、 ^{1 3} C 、 ^{1 4} C 、 ^{1 3} N 、 ^{1 5} N 、 ^{1 5} O 、 ^{1 7} O 、 ^{1 8} O 、 ¹ F 、 ^{3 5} S 、 ^{3 6} Cl 、 ^{8 2} Br 、 ^{7 5} Br 、 ^{7 6} Br 、 ^{7 7} Br 、 ^{1 2 3} I 、 ^{1 2 4} I 、 ^{1 2 5} I 、 ^{1 3 1} I を包含するが、これらに限定されない。当該の放射性標識化合物において取り込まれる放射性核種は、放射性標識化合物の特定の適用に依存する。例えば、インビトロ R U P 4 1 標識および競合アッセイのためには、 ³ H 、 ^{1 4} C 、 ^{8 2} Br 、 ^{1 2 5} I 、 ^{1 3 1} I 、 ^{3 5} S を取り込む化合物が、一般に、最も有用である。放射性画像化適用のためには、 ^{1 1} C 、 ^{1 8} F 、 ^{1 2 5} I 、 ^{1 2 3} I 、 ^{1 2 4} I 、 ^{1 3 1} I 、 ^{7 5} Br 、 ^{7 6} Br または ^{7 7} Br が、一般に最も有用である。いくつかの実施形態では、放射性核種は、 ³ H 、 ^{1 1} C 、 ^{1 8} F 、 ^{1 4} C 、 ^{1 2 5} I 、 ^{1 2 4} I 、 ^{1 3 1} I 、 ^{3 5} S 、 ^{8 2} Br からなる群から選択される。

【 0334 】

放射性核種を含む 1 つ以上の置換基を付加する方法は、当業者の範囲内であり、以下を包含するが、これらに限定されない：酵素法による [Marchalonic JJ , B

10

20

30

40

50

biochemical Journal (1969) 113: 299 - 305; Thorleif JIおよびJohansson BG, Biochimica et Biophysica Acta (1969) 251: 363 - 9; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] およびまたはクロラミン-T/ヨードゲン/ヨードビーズ法 (Chloramine-T/Iodogen/Iodobead methods) による [Hunter WMおよびGreenwood FC, Nature (1962) 194: 495 - 6; Greenwood FCら, Biochemical Journal (1963) 89: 114 - 23; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] 放射性同位体ヨウ素の付加。

【0335】

開示されたレセプターおよび方法の他の使用は、とりわけ本特許文書の検討に基づいて、当業者に明らかになる。

【0336】

(実施例)

以下の実施例は、本発明の解明の目的のために提示するものであって、限定ではない。特定の核酸およびアミノ酸の配列が本明細書中に開示されるが、当業者は、以下に報告した同じまたは実質的に同様の結果を達成させながらもこれらの配列に対して微調整を行うことができると考えられる。本明細書中に開示した変異アプローチは、このアプローチ頼みではなく、代わりにアルゴリズムアプローチおよびヒトG P C RのT M 6領域内に位置する保存プロリン残基からの位置的距離に基づく。このアプローチが一旦確保されると、当業者は、本明細書中に開示の実質的に同じ結果(すなわち構成的活性化)を達成するようそれらの微改変を行うことができると考えられる。このような改変アプローチは、本開示の範囲内であるとみなされる。

【0337】

以下の実施例は、例示の目的のために提供されるのであって、限定の手段としてではない。当業者は、本明細書中の開示に基づいて等価のアッセイおよび方法を設計し得、それらの全てが本発明の一部をなす。

【0338】

種々の発現ベクターが当業者に入手可能であるが、内因性および非内因性の両方のG P C Rの使用の目的のために、いくつかの実施形態では、使用されるベクターはp C M Vであることが好ましい。このベクターは、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定の下に、アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) (ATCC) (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110 - 2209 USA) に、1998年10月13日に寄託された。そのDNAはATCCによって試験され、そして生存可能であることが確定された。ATCCは、p C M Vに、以下の寄託番号を指定した: ATCC #203351)。いくつかの実施形態では、使用されるベクターは、アデノウイルス発現ベクターであることが好ましい。

【0339】

本発明のかかる事項に関し、かつ当業者に周知である組換えDNA技術は、例えば、Maniatis Tら, Molecular Cloning : A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory; 米国特許番号6,399,373; およびPCT出願番号PCT/IB02/01461 (WO 02/066505として2002年8月29日に公開) (これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される)において見い出され得る。

【0340】

(実施例1)

(内因性ヒトR U P 4 1の全長クローニング)

開示されたヒトR U P 4 1を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定

10

20

30

40

50

した。このデータベースを検索する間に、Accession Number U66581のcDNAクローンを第7染色体由来のヒトゲノム配列として同定した。全長RUP41を、以下のプライマー：

【0341】

【化1】

5'-TCCCCCGGGAAAAAAACCAACTGCTCCAAA-3' (配列番号7;センス),

5'-TAGGATCCATTGAATGTGGATTGGTGAAA-3' (配列番号8;アンチセンス、BamHI部位を含む)

および鋳型としてヒトゲノムDNAを用いて、PCRによってクローニングした。増幅を
10
、製造者により提供された緩衝液システムと共にrTthポリメラーゼ(Perkin Elmer)、0.25mMの各プライマー、および0.2mMの4つの各々のスクレオチドを用いて実施した。サイクル条件は、94で1分間、50で1分間、および72で1.5分間の30サイクルであった。5'PCRプライマーをキナーゼ処理し、そして1.38kbのPCRフラグメントをBamHIで消化し、そしてpCMV発現ベクターのEcoRV-BamHI部位にクローニングした。核酸配列については配列番号1を、そして推定アミノ酸配列については配列番号2を参照のこと。

【0342】

(実施例2)

(非内因性の構成的に活性化されたヒトRUP41の調製)

当業者は、核酸配列の変異のための技術を選択できること、考えられる。以下に示すのは、ヒトGPCRの非内因性バージョンを作出するために使用されるアプローチである。RUP41について以下に開示した変異は、アルゴリズムアプローチに基づき、これにより、保存されたプロリン（またはそれに代わる内因性の保存的置換）残基(TM6/IC3境界近傍のGPCRのTM6領域に位置する)から16番目のアミノ酸(GPCRのIC3領域に位置する)が変異される（最も好ましくは、アラニン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンアミノ酸残基に、最も好ましくは、リジンアミノ酸残基に）。

【0343】

非内因性の構成的に活性化された全長ヒトRUP41は、配列番号2または配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニン残基のリジンへの変異(F312K)によって成し遂げる。

【0344】

(1.トランスフォーマー部位特異的^{T M}変異誘発)

非内因性ヒトGPCRの調製は、とりわけ、トランスフォーマー部位特異的^{T M}変異誘発キット(Transformer Site-Directed^{T M} Mutagenesis Kit)(Clontech)を製造者の指示書に従って用いて、ヒトGPCRにおいて成し遂げられ得る。2つの変異誘発プライマーを使用し、最も好ましくは、リジン変異を作出するリジン変異誘発オリゴスクレオチド、および選択マーカーオリゴスクレオチドである。便宜上、ヒトGPCRに取り込まれるべきコドン変異もまた、標準型で記す。

【0345】

(2.クイックチェンジ^{T M}部位特異的^{T M}変異誘発)

非内因性ヒトGPCRの調製はまた、クイックチェンジ^{T M}部位特異的^{T M}変異誘発キット(Quick Change^{T M} Site-Directed^{T M} Mutagenesis Kit)(Stratagene、製造者の指示書に従う)を用いることにより成し遂げられ得る。最も好ましくは、内因性GPCRが鋳型として使用され、そして2つの変異誘発プライマーが使用される。同様に、最も好ましくは、リジン変異誘発オリゴスクレオチドおよび選択マーカーオリゴスクレオチド(キットに含まれる)である。便宜上、新規ヒトGPCRに取り込まれるコドン変異およびそれぞれのオリゴスクレオチドを標準型で記す。

10

20

40

50

【0346】

(実施例3)

(レセプター発現)

タンパク質発現のために、種々の細胞が当該分野で利用可能であるが、哺乳動物細胞またはメラニン保有細胞が使用されることが最も好ましい。この主な理由は、実用性に基づく、すなわち、G P C R の発現のための、例えば酵母細胞の利用は、おそらくではあるが、このプロトコルに、哺乳動物系に関して進化しているレセプター共役、遺伝機構、および分泌経路を含まないかもしれない（実際、酵母の場合、含まない）非哺乳動物細胞を導入する - 従って、非哺乳動物細胞で得られた結果は、使用の可能性はあるが、哺乳動物細胞またはメラニン保有細胞から得られる結果ほど好ましくはない。哺乳動物細胞のうち、C H O 細胞、C O S - 7 細胞、2 9 3 細胞、および 2 9 3 T 細胞が特に好ましいが、使用される特定の哺乳動物細胞は、当業者の特定の必要性に基づき得る。メラニン保有細胞に関しては以下を参照のこと（実施例8を含む）。

10

【0347】

(a. 一過性トランスフェクション)

1日目に、 $6 \times 10^6 / 10 \text{ cm}^2$ 皿の2 9 3 細胞（ウェル）を広げる。2日目に、2つの反応チューブを調製する（各チューブについて従う割合は、プレート当たりである）：チューブAを、0.5 ml無血清D M E M (G i b c o B R L) 中に4 μg D N A（例えば、p C M V ベクター；レセプター c D N A を有する p C M V ベクターなど）を混合することにより調製し；チューブBを、0.5 ml無血清D M E M 中に2 4 μl リポフェクタミン（G i b c o B R L）を混合することにより調製する。チューブAおよびBを倒立（数回）させて混合し、続いて3 0 ~ 4 5 分間室温でインキュベートする。この混合物を、「トランスフェクション混合物」と呼ぶ。播種した2 9 3 細胞を1 × P B S で洗浄し、続いて5 ml無血清D M E M を添加する。1 mlのトランスフェクション混合物を細胞に添加し、続いて3 7 / 5 % C O₂ で4時間インキュベートする。このトランスフェクション混合物を吸引により取り出し、続いて1 0 mlのD M E M / 1 0 % ウシ胎児血清を添加する。細胞を3 7 / 5 % C O₂ でインキュベートする。4 8 時間インキュベートした後、細胞を回収し、分析のために使用する。

20

【0348】

(b. 安定細胞系)

30

約1 2 \times 1 0⁶ の2 9 3 細胞を1 5 cm組織培養プレート上に播種する。1 0 % ウシ胎児血清および1 % ピルビン酸ナトリウム、L - グルタミン、および抗生物質を含有するD M E 高グルコース培地（H i g h G l u c o s e M e d i u m）中で増殖させる。2 9 3 細胞播種の2 4 時間後（またはおよそ8 0 % 集密度（c o n f l u e n c y）まで）、細胞を、1 2 μg のD N A を用いてトランスフェクトする。この1 2 μg のD N A を、6 0 μl のリポフェクタミンおよび2 mLのD M E 高グルコース培地（無血清）と合わせる。この培地をプレートから吸引し、細胞を無血清培地で1回洗浄する。このD N A、リポフェクタミン、および培地混合物を、1 0 mLの無血清培地と共にプレートに添加する。3 7 で4 ~ 5 時間インキュベートした後、この培地を吸引し、そして2 5 mlの血清含有培地を添加する。トランスフェクションの2 4 時間後、この培地を再度吸引し、そして新鮮な血清含有培地を添加する。トランスフェクションの4 8 時間後、この培地を吸引し、そしてゲネチシン（G 4 1 8 薬物）を5 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の最終濃度で含有する血清含有培地を添加する。このトランスフェクトされた細胞は、G 4 1 8 耐性遺伝子を含有するポジティブにトランスフェクトされた細胞についての選択を受ける。この培地を、選択が生じるにつれ4 ~ 5 日毎に取り替える。選択の間、細胞を増殖させて安定なプールを作製するか、または安定クローン選択のために分割する。

40

【0349】

(実施例4)

(G P C R 活性化の決定のためのアッセイ)

ヒトG P C R の活性化の評価のために、種々のアプローチが利用可能である。以下は、

50

例示的である；当業者は、当業者の必要性に優先的に有利である技術を決定できると、考えられる。

【0350】

(1) 膜結合アッセイ：[³⁵S]GTP-Sアッセイ)

Gタンパク質共役型レセプターが活性状態にある場合（リガンド結合または構成的活性化のいずれかの結果として）、このレセプターは、Gタンパク質に結合し、GDPの放出および続いてGタンパク質へのGTPの結合を刺激する。Gタンパク質-レセプター複合体のサブユニットは、GTPアーゼとして作用し、GTPをGDPにゆっくりと加水分解する。その時点で、通常、このレセプターは非活性化される。活性化されたレセプターは、GDPをGTPに対して交換し続ける。加水分解可能でないGTPアナログである[³⁵S]GTP-Sは、活性化レセプターを発現する膜への[³⁵S]GTP-Sの結合の増強を実証するために使用され得る。活性化を測定するために[³⁵S]GTP-S結合を用いる利点は、以下である：(a) 全てのGタンパク質共役型レセプターに対して包括的に利用可能である；(b) 膜表面で近位であり、細胞内カスケードに影響する分子を選択する確率が低くなる。

10

【0351】

このアッセイは、Gタンパク質共役型レセプターが、関連レセプターを発現する膜への[³⁵S]GTP-Sの結合を刺激する能力を利用する。従って、このアッセイは、内因性GPCRおよび非内因性の構成的に活性化されたGPCRに対する候補化合物をスクリーニングする直接同定方法において使用され得る。このアッセイは包括的であり、全てのGタンパク質共役型レセプターでの薬物発見に対する適用を有する。

20

【0352】

[³⁵S]GTP-Sアッセイは、20mM HEPESおよび1から約20mMのMgCl₂（この量は結果の最適化のために調整される（20mMが好ましい））（pH 7.4）、約0.3から約1.2nMの[³⁵S]GTP-S（この量は結果の最適化のために調整される（1.2が好ましい））を有する結合緩衝液、および12.5~75μg膜タンパク質（この量は最適化のために調整される）および10μM GDP（この量は結果の最適化のために変更され得る）中で、1時間インキュベートされる。次いで、コムギ麦芽凝集素ビーズ（25μl；Amersham）を添加し、そしてこの混合物を室温でさらに30分インキュベートする。次いで、このチューブを1500×gで、室温で5分間遠心分離し、次いでシンチレーションカウンターで計数する。

30

【0353】

(2) アデニリルシクラーゼ)

フラッシュプレートTMアデニリルシクラーゼキット（Flash PlateTM Adenyllyl Cyclase kit）（New England Nuclear；Cat. No. SMP004A）（細胞ベースアッセイについて設計された）は、粗製原形質膜との使用のために改変され得る。このフラッシュプレートウェルは、シンチラントコーティング（scintillant coating）を含み得、これはまた、cAMPを認識する特異的抗体を含有する。ウェル中に生成されたcAMPは、cAMP抗体への放射性cAMPトレーサーの結合についての直接競合によって定量され得る。以下を、レセプターを発現する細胞全体におけるcAMPレベルの変化の測定のための簡潔なプロトコルとして供する。

40

【0354】

一過性トランスフェクションのおよそ24時間後に、トランスフェクトされた細胞を回収する。培地を慎重に吸引して取り除き、捨てる。10mlのPBSを、各細胞皿に静かに添加し、続いて慎重に吸引する。1mlのSigma細胞解離緩衝液および3mlのPBSを、各プレートに添加する。細胞をプレートからピペットで除き、そして細胞懸濁液を50ml円錐状遠心分離管に採集する。次いで、細胞を室温で1,100rpmで5分間遠心分離する。細胞ペレットを、適當容積のPBS（約3ml/プレート）中に慎重に再懸濁する。次いで、細胞を血球計を用いて計数し、そしてさらなるPBSを添加し、適

50

当数の細胞（最終容量約 $50\text{ }\mu\text{l}$ / ウェル）を得る。

【0355】

cAMP 標準および検出緩衝液 (Detection Buffer) [11m1 検出緩衝液に対して $1\text{ }\mu\text{Ci}$ のトレーサー¹²⁵I cAMP ($50\text{ }\mu\text{l}$) を含む] を製造者の指示書に従って調製および維持する。アッセイ緩衝液 (Assay Buffer) をスクリーニングのために新たに調製し、これは、 $50\text{ }\mu\text{l}$ の刺激緩衝液 (Stimulation Buffer)、 $3\text{ }\mu\text{l}$ の試験化合物 ($12\text{ }\mu\text{M}$ 最終アッセイ濃度)、および $50\text{ }\mu\text{l}$ 細胞を含んだ。アッセイ緩衝液は、使用するまで氷上で保存する。このアッセイを、 $50\text{ }\mu\text{l}$ の cAMP 標準を適当なウェルに添加し、続いて $50\text{ }\mu\text{l}$ の PBSA を H-1 10 のウェルおよび H-12 のウェルに添加することにより開始する。 $50\text{ }\mu\text{l}$ の刺激緩衝液を全てのウェルに添加する。DMSO (または選択された候補化合物) を、 $3\text{ }\mu\text{l}$ の化合物溶液を分配し得るピンツールを用いて適当なウェルに添加し、最終アッセイ濃度は $12\text{ }\mu\text{M}$ 試験化合物および $100\text{ }\mu\text{l}$ 全アッセイ容積であった。次いで、この細胞をウェルに添加し、そして室温で 60 分間インキュベートする。次いで、トレーサー cAMP を含有する $100\text{ }\mu\text{l}$ の検出混合物 (Detection Mix) をウェルに添加する。次いで、プレートをさらに 2 時間インキュベートし、続いて Wallac MicroBeta シンチレーションカウンターで計数する。次いで、cAMP / ウェルの値を、各アッセイプレート内に含まれた cAMP 標準曲線から外挿する。

【0356】

(3. Gi 共役型標的 GPCR についての細胞ベース cAMP)

TSHR は、活性化の際に cAMP の蓄積を引き起こす Gs 共役型 GPCR である。TSHR は、アミノ酸残基 623 の変異 (すなわち、アラニン残基のイソロイシン残基への変更) により構成的に活性化される。Gi 共役型レセプターは、アデニリルシクラーゼを阻害し、従って、cAMP 生成のレベルを減少させることが予期され、これは、cAMP レベルの評価を挑戦的なものとし得る。Gi 共役型レセプターの構成的活性化の指標としての cAMP の生成の減少を測定するための有効な技術は、最も好ましくは、Gi 連結標的 GPCR と共に「シグナルエンハンサー」としての非内因性の構成的に活性化された TSHR (TSHR-A623I) (または内因性の構成的活性型 Gs 共役型レセプター) を共トランスフェクトすることにより成し遂げられて、cAMP のベースラインレベルを確立し得る。Gi 共役型レセプターの非内因性バージョンを作出する際に、標的 GPCR のこの非内因性バージョンを、次いで、シグナルエンハンサーと共にトランスフェクトし、この物質をスクリーニングに使用され得るものとする。本発明者らは、cAMP アッセイが使用される場合にシグナルを有効に生成させるために、このようなアプローチを使用する；このアプローチは、好ましくは、Gi 共役型レセプターに対する候補化合物の直接的な同定において使用される。Gi 共役型 GPCR について、このアプローチが使用される場合、標的 GPCR の逆アゴニストが cAMP シグナルを増大させ、そしてアゴニストが cAMP シグナルを減少させることが留意される。

【0357】

1 日目に、 2×10^4 293 細胞 / ウェルを広げる。2 日目に、2 日目に、2 つの反応チューブを調製する (各チューブについて従う割合は、プレート当たりである) : チューブ A を、1.2m1 無血清 DMEM (Irvine Scientific, Irvine, CA) 中に哺乳動物細胞にトランスフェクトされた各レセプター DNA $2\text{ }\mu\text{g}$ を、全体で $4\text{ }\mu\text{g}$ の DNA [例えば、pCMVベクター ; 変異 TSHR (TSHR-A623I) を有する pCMVベクター ; TSHR-A623I および GPCR など] で混合することにより調製し；チューブ B を、1.2m1 無血清 DMEM 中に $120\text{ }\mu\text{l}$ リポフェクタミン (Gibco BRL) を混合することにより調製する。次いで、チューブ A および B を倒立 (数回) させて混合し、続いて 30 ~ 45 分間室温でインキュベートする。この混合物を、「トランスフェクション混合物」と呼ぶ。播種した 293 細胞を $1 \times$ PBS で洗浄し、続いて $10\text{ }\text{m}\text{l}$ 無血清 DMEM を添加する。 $2.4\text{ }\text{m}\text{l}$ のトランスフェクション混合物を細胞に添加し、続いて $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ で 4 時間インキュベートする。この

10

20

30

40

50

トランスフェクション混合物を吸引により取り出し、続いて25mlのD MEM / 10%ウシ胎児血清を添加する。次いで、細胞を37 / 5%CO₂でインキュベートする。24時間インキュベート後、細胞を回収し、分析のために使用する。

【0358】

しかし、フラッシュプレートTMアデニリルシクラーゼキット(Flash PlateTM Adenyllyl Cyclase kit)(New England Nuclear; Cat. No. SMP004A)(細胞ベースアッセイについて設計された)は、当業者の必要性に依存して、粗製原形質膜との使用のために改変され得る。このフラッシュプレートウェルは、シンチラントコーティング(scintillant coating)を含み、これはまた、cAMPを認識する特異的抗体を含有する。ウェル中に生成されたcAMPは、cAMP抗体への放射性cAMPトレーサーの結合についての直接競合により定量され得る。以下を、レセプターを発現する細胞全体におけるcAMPレベルの変化の測定のための簡潔なプロトコルとして供する。10

【0359】

一過性トランスフェクションのおよそ24時間後に、トランスフェクトされた細胞を回収する。培地を慎重に吸引して取り除き、捨てる。10mlのPBSを、各細胞皿に静かに添加し、続いて慎重に吸引する。1mlのSigma細胞解離緩衝液および3mlのPBSを、各プレートに添加する。細胞をプレートからピペットで除き、そして細胞懸濁液を50ml円錐状遠心分離管に採集する。次いで、細胞を室温で1,100 rpmで5分間遠心分離する。細胞ペレットを、適當容積のPBS(約3ml/プレート)中に慎重に再懸濁する。次いで、細胞を血球計を用いて計数し、そしてさらなるPBSを添加し、適當数の細胞(最終容量約50μl/ウェル)を得る。20

【0360】

cAMP標準および検出緩衝液(11ml検出緩衝液に対して1μCiのトレーサー¹²⁵I cAMP(50μl)を含む)を製造者の指示書に従って調製および維持する。アッセイ緩衝液をスクリーニングのために新たに調製し、これは、50μlの刺激緩衝液、3μlの試験化合物(12μM最終アッセイ濃度)、および50μl細胞を含んだ。アッセイ緩衝液は、使用するまで氷上で保存され得る。このアッセイを、50μlのcAMP標準を適當なウェルに添加し、続いて50μlのPBS AをH-11のウェルおよびH12のウェルに添加することにより開始し得る。50μlの刺激緩衝液を全てのウェルに添加する。選択された化合物(例えば、TSH)を、3μlの化合物溶液を分配し得るピンツールを用いて適當なウェルに添加し、最終アッセイ濃度は12μM試験化合物および100μl全アッセイ容積である。次いで、この細胞をウェルに添加し、そして室温で60分間インキュベートする。次いで、トレーサー-cAMPを含有する100μlの検出混合物(Detection Mix)をウェルに添加する。次いで、プレートをさらに2時間インキュベートし、続いてWallac MicroBetaシンチレーションカウンターで計数した。次いで、cAMP/ウェルの値を、各アッセイプレート内に含まれるcAMP標準曲線から外挿する。30

【0361】

(4. レポーター-ベースアッセイ)

(a. CRE-Lucレポーター-アッセイ(Gs会合レセプター))

293細胞および293T細胞を、1ウェル当たり 2×10^4 細胞の密度で96ウェルプレート上に広げ、そして後日、製造者の指示書に従ってリポフェクタミン試薬(Lipofectamine Reagent)(BRL)を用いてトランスフェクトした。DNA/脂質混合物を、以下のようにして、各6ウェルトランスフェクションのために調製する: 100μlのD MEM 中 260ng のプラスミドDNAを、100μlのD MEM 中の2μlの脂質と静かに混合した(この260ngのプラスミドDNAは、8×CRE-Lucレポーター-プラスミド200ng、内因性レセプターまたは非内因性レセプターを含むpCMVまたはpCMV単独50ng、およびGPRS発現プラスミド(pCDNA3(Invitrogen)中GPRS)10ngからなった)。この8×CRE-L

10

20

30

40

50

u c レポータープラスミドを、以下のようにして調製した：ベクター-S R I F - - g a 1を、ラットソマトスタチンプロモーター（-71/+51）をp gal-Basic Vector (Clontech)においてBglV-HindIII部位でクローニングすることにより得た。8コピーのcAMP応答エレメントをアデノウイルス鑄型Ad pCF126CRE8 (7 Human Gene Therapy 1883 (1996) を参照のこと) からPCRにより得、そしてS R I F - - g a 1ベクターにKpn-BglV部位でクローニングし、8×CRE--g a 1レポーターべクターを生じさせた。この8×CRE-Lucレポータープラスミドを、8×CRE--g a 1レポーターべクター中の--ガラクトシダーゼ遺伝子をpGL3-basicベクター(Promega)から得られるルシフェラーゼ遺伝子とHindIII-BamHI部位で置換することにより生成した。室温で30分のインキュベーションの後、このDNA/脂質混合物を400μlのDMEMで希釈し、そして100μlの希釈混合物を各ウェルに添加した。10%FCSを有する100μlのDMEMを、細胞培養インキュベーター中に4時間のインキュベーション後に、各ウェルに添加する。後日、トランスフェクトされた細胞を、10%FCSを有する200μl/ウェルのDMEMで交換する。8時間後、PBSで1回洗浄した後、このウェルを、フェノールレッドを含まない100μl/ウェルのDMEMで交換する。翌日、ルシフェラーゼ活性を、LucLiteTMレポーター遺伝子アッセイキット(LucLiteTM reporter gene assay kit) (Packard)を製造者の指示書に従って使用して測定し、そして1450 MicroBetaTMシンチレーションおよびルミネセンスカウンター(1450 MicroBetaTM scintillation and luminescence counter) (Wallac)で読み取る。

【0362】

(b. AP1レポーターアッセイ(Gq会合レセプター))

Gq刺激を検出する方法は、それらのプロモーター中にAP1エレメントを含有する遺伝子の活性化を引き起こすGq依存性ホスホリパーゼCの公知の特性に依存する。PathdetectTM AP-1シス-レポーティングシステム(PathdetectTM AP-1 cis-Reporting System) (Stratagene, Catalogue #219073)が、CREBレポーターアッセイに関して上述したプロトコルに従って(但し、リン酸カルシウム沈降物の成分が410ng pAP1-Luc、80ng pCMV-レセプター発現プラスミド、および20ng CMV-SEAPであったことを除いて)使用され得る。

【0363】

(c. SRF-Lucレポーターアッセイ(Gq会合レセプター))

Gq刺激を検出する1つの方法は、それらのプロモーター中に血清応答因子を含有する遺伝子の活性化を引き起こすGq依存性ホスホリパーゼCの公知の特性に依存する。PathdetectTM SRF-Luc-レポーティングシステム(PathdetectTM SRF-Luc-Reporting System) (Stratagene)が、例えばCOS7細胞においてGq共役型活性についてアッセイするために使用され得る。哺乳動物トランスフェクションTMキット(Mammalian TransfectionTM Kit) (Stratagene, Catalogue # 200285)を製造者の指示書に従って用いて、系のプラスミド成分および内因性または非内因性GPCRをコードする示した発現プラスミドで、細胞をトランスフェクトする。簡潔には、410ng SRF-Luc、80ng pCMV-レセプター発現プラスミドおよび20ng CMV-SEAP(分泌アルカリホスファターゼ発現プラスミド；アルカリホスファターゼ活性を、トランスフェクトした細胞の培地内で測定し、サンプル間のトランスフェクション効率における変動について調節する)を、製造者の指示書に従ってリン酸カルシウム沈降物中で合わせる。沈降物の半分を、96ウェルプレート中で3ウェルにわたって等しく分配し、24時間、無血清培地中の細胞上に維持する。最後の5時間、示したとおり、細胞を1μM Angiotensinとインキュベートする。次いで、細

10

20

30

40

50

胞を溶解し、LuceliteTM Kit (Packard, Catalogue # 6016911) および「Tri lux 1450 Microbeta」液体シンチレーションルミネセンスカウンター(liquid scintillation and luminescence counter) (Wallac)を製造者の指示書に従って使用してルシフェラーゼ活性についてアッセイする。データは、GraphPad PrismTM 2.0a (GraphPad Software Inc.)を用いて分析され得る。

【0364】

(細胞内IP₃蓄積アッセイ(Gq会合レセプター))

1日目に、レセプター(内因性および/または非内因性)を含む細胞を、24ウェルプレート上に播種し得る(通常、 1×10^5 細胞/ウェル(この数は最適化され得る))。2日目に、50 μl無血清D MEM /ウェル中DNA 0.25 μgおよび50 μl無血清D MEM /ウェル中2 μlリポフェクタミンをまず混合することによりトランスフェクトし得る。この溶液を静かに混合し、室温で15~30分間インキュベートする。細胞を0.5 ml PBSで洗浄し、そして400 μlの無血清培地をトランスフェクション培地と混合し、細胞に添加する。次いで、細胞を37/5%CO₂で3~4時間インキュベートし、次いで、このトランスフェクション培地を取り出し、1 ml/ウェルの正規増殖培地と交換する。3日目に、細胞を³H-ミオイノシトールで標識する。簡潔には、培地を取り出し、細胞を0.5 ml PBSで洗浄する。次いで、0.5 mlイノシトール非含有/無血清培地(GIBCO BRL)をウェルにつき添加し、0.25 μCiの³H-ミオイノシトール/ウェルとし、細胞を37/5%CO₂で16~18時間(o/n)インキュベートする。4日目に、細胞を0.5 ml PBSで洗浄し、0.45 mlのアッセイ培地(イノシトール非含有/無血清培地10 μMパルギリン10 mM塩化リチウムを含む)または0.4 mlのアッセイ培地および50 μlの10×ケタンセリン(keit)を10 μlの最終濃度に添加する。次いで、細胞を37で30分間インキュベートする。次いで、細胞を0.5 ml PBSで洗浄し、そして200 μlの新鮮/氷冷停止溶液(1 M KOH; 18 mM Na-ホウ酸塩; 3.8 mM EDTA)をウェルにつき添加する。この溶液を5~10分間または細胞を溶解するまで氷上に保持し、次いで、200 μlの新鮮/氷冷中和溶液(7.5% HCL)により中和する。次いで、この溶解物を1.5 mlのエッペンドルフチューブに移し、そして1 mlのクロロホルム/メタノール(1:2)をチューブにつき添加する。この溶液を15秒間ボルテックスにかけ、上の相を、Biorad AG1-X8TM アニオン交換樹脂(100~200メッシュ)に適用する。まず、この樹脂を1:1.25(W/V)で水で洗浄し、そして上の相の0.9 mlをカラム上に流す。このカラムを10 mlの5 mMミオイノシトールおよび10 mlの5 mM Na-ホウ酸塩/60 mM Na-ギ酸塩で洗浄する。イノシトール三リン酸を、2 mlの0.1 M ギ酸/1 M ギ酸アンモニウムで、10 mlのシンチレーションカクテルを含有するシンチレーションバイアル中に溶出させる。カラムを、10 mlの0.1 M ギ酸/3 M ギ酸アンモニウムで洗浄することにより再生し、dd H₂Oで2回リヌスし、そして水中で4で保存する。

【0365】

(実施例5)

(融合タンパク質調製)

(a. GPCR: Gs融合構築物)

構成的活性型GPCR-Gタンパク質融合構築物の設計を、以下のように成し遂げた: ラットGタンパク質Gs(長形; Itoh, H.ら, 83 PNAS 3776 (1986))の5'末端および3'末端の両方を、そこにHindIII(5'-AAGCTT-3')配列を含むように操作した。正確な配列(隣接するHindIII配列を含む)の確認後、配列全体を、pcDNA3.1(-)(Invitrogen, cat. no. V795-20)に、そのベクターのHindIII制限部位を用いてサブクローニングすることにより両方向ではめ込んだ。Gs配列の正確な向きを、pcDNA3.1

10

20

30

40

50

(-)へのサブクローニング後に決定した。次いで、Hind III配列でラットG_s遺伝子を含有する改変pCDNA3.1(-)を検証した；このベクターは、いまや、「ユニバーサル」G_sタンパク質ベクターとして入手可能であった。pCDNA3.1(-)ベクターは、Hind III部位の上流に種々の周知の制限部位を含み、従って、G_sタンパク質の上流に、内因性の構成的活性型GPCRのコード配列を挿入する能力を有利に提供する。この同じアプローチは、他の「ユニバーサル」Gタンパク質ベクターを作出するために使用され得、もちろん、当業者に公知の他の市販または専売のベクターは使用され得る-重要な判断基準は、GPCRの配列が、Gタンパク質の配列の上流にあり、かつこれとインフレームであることである。

【0366】

10

(b. Gq(6アミノ酸欠失)/Gi融合構築物)

Gq(del)/Gi融合構築物の設計は、以下のように成し遂げられ得る：N末端の6アミノ酸(G_qサブユニットのアミノ酸2位から7位(TLESIMの配列を有する))が欠失され、そしてC末端の5アミノ酸(EYNLVの配列を有する)がGiタンパク質の対応するアミノ酸(DCGLFの配列を有する)と置換される。この融合構築物は、以下のプライマー：

【0367】

【化2】

5'-gatcAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGGAG-3' (配列番号9) および

20

5'-gatcGGATCCTTAGAACAGGCCGCAGTCCTCAGGTTAGCTGCAGGATGGT-3'

(配列番号10)

および鋸型としてプラスミド63313(Plasmid 63313)(これは、血球凝集素タグと共にマウスG_q野生型バージョンを含む)を用いるPCRによって得られる。小文字のヌクレオチドは、スペーサーとして含まれる。

【0368】

30

Taq Plus Precision DNAポリメラーゼ(Taq Plus Precision DNA polymerase)(Stratagene)が、以下のサイクル(ステップ2から4を35回繰り返す)による増幅のために使用される：95度2分；95度20秒；56度20秒；72度2分；および72度7分。このPCR産物をpCR II-TOPOベクター(Invitrogen)にクローニングし、ABI Big Dye Terminatorキット(ABI Big Dye Terminator kit)(PE Biosystems)を用いて配列決定する。融合構築物の配列を含むTOPOクローンからの挿入片を発現ベクター-pCDNA3.1(+)にHind III/Bam HI部位で二段階クローニングプロセスによって両方向にはめ込む。また、PCT出願番号PCT/US02/05625(2002年9月6日にWO02068600として公開、この開示内容は本明細書によってその全体が参考として援用される)を参照のこと。

【0369】

40

(実施例6)

(プロトコル：逆アゴニストおよびアゴニストの直接同定)

(A. [³⁵S]GTP Sアッセイ)

いくつかの実施形態では、内因性GPCRが、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストとしての候補化合物の直接同定のために使用される。いくつかの実施形態では、内因性の構成的活性型GPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRが、例えば、逆アゴニストまたはアゴニストとしての候補化合物の直接同定のために使用される。いくつかの実施形態では、内因性の構成的活性型GPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRを含むGPCR融合タンパク質が、例えば、逆アゴニストとしての候補化合物の直接同定のために使用される。当該実施形態では、以下のアッセイプロトコルを、当該直接同定のために提供する。

50

【0370】

(膜調製)

いくつかの実施形態では、目的の、かつ候補化合物（例えば、逆アゴニスト、アゴニスト、またはアンタゴニストとしての）の直接同定に使用するG P C R / 融合タンパク質を含む膜を、好ましくは、以下のように調製する。

【0371】

(a. 材料)

「膜掻き取り緩衝液（Membrane Scrape Buffer）」は、20 mM HEPESおよび10 mM EDTAで構成される（pH 7.4）；「膜洗浄緩衝液（Membrane Wash Buffer）」は、20 mM HEPESおよび0.1 mM EDTAで構成される（pH 7.4）；「結合緩衝液（Binding Buffer）」は、20 mM HEPES、100 mM NaCl、および10 mM MgCl₂で構成される（pH 7.4）。

【0372】

(b. 手順)

全ての材料をこの手順を通して氷上で保持する。まず、培地を細胞のコンフルエントな単層から吸引し、続いて10 ml冷PBSでリヌスし、続いて吸引する。その後、5 mlの膜掻き取り緩衝液を添加して細胞を掻き取る；この後に、細胞抽出物を50 ml遠心分離管に移す（4で17分間20,000 rpmで遠心分離する）。その後、上清を吸引し、そしてペレットを30 ml膜洗浄緩衝液中に再懸濁し、続いて4で17分間20,000 rpmで遠心分離する。次いで、上清を吸引し、そしてペレットを結合緩衝液中に再懸濁する。次いで、これをBrinkman PolytronTMホモジナイザー（Brinkman PolytronTM homogenizer）（全ての材料が懸濁するまで15～20秒バースト）を用いてホモジナイズする。これを、本明細書中で「膜タンパク質（Membrane Protein）」という。

【0373】

(ブラッドフォードタンパク質アッセイ)

ホモジナイゼーション後、膜のタンパク質濃度をブラッドフォードタンパク質アッセイ（Bradford Protein Assay）を用いて決定する（タンパク質は、約1.5 mg/mlに希釈し、アリコートに分け、そして後の使用のために凍結し得る（-80）；凍結した場合、使用のためのプロトコルは以下の通りである：アッセイの日に、凍結した膜タンパク質を室温で解凍し、続いてボルテックスにかけ、次いで約5～10秒間約12×1,000 rpmでPolytronでホモジナイズする；多重調製のために、ホモジナイザーは、異なる調製物のホモジナイゼーションの間に完全に清浄されなければならないことに留意した）。

【0374】

(a. 材料)

結合緩衝液（上記の通り）；ブラッドフォード染料試薬（Bradford Dye Reagent）；ブラッドフォードタンパク質標準（Bradford Protein Standard）を、製造者の指示書（Biorad, cat. no. 500-0006）に従って使用する。

【0375】

(b. 手順)

二連のチューブを調製し、一方は膜を含み、そして一方はコントロール「プランク」とする。各々は、800 μl結合緩衝液を含んだ。その後、10 μlのブラッドフォードタンパク質標準（1 mg/ml）を各チューブに添加し、次いで、10 μlの膜タンパク質を1つのチューブに添加する（プランクには添加しない）。その後、200 μlのブラッドフォード染料試薬を各チューブに添加し、次いで各々をボルテックスにかける。5分後、これらチューブを再度ボルテックスにかけ、そしてその中の材料をキュベットに移す。次いで、これらキュベットをCECIL 3041分光光度計を用いて595の波長で読

10

20

30

40

50

み取る。

【0376】

(直接同定アッセイ)

(a. 材料)

GDP緩衝液(GDP Buffer)は、37.5m1結合緩衝液および2mg GDP(Sigma, cat. no. G-7127)からなり、続いて結合緩衝液中の一連の希釈により0.2μM GDPを得た(各ウェル中のGDP最終濃度は0.1μM GDPであった);候補化合物を含む各ウェルは、最終容積200μlを有し、100μl GDP緩衝液(最終濃度0.1μM GDP)、50μl膜タンパク質(結合緩衝液中)、および50μl[³⁵S]GTP S(0.6nM)(結合緩衝液中)(2.5μl [³⁵S]GTP S/10m1結合緩衝液)からなる。10

【0377】

(b. 手順)

候補化合物を、好ましくは、96ウェルプレートフォーマットを用いて、スクリーニングする(これらは、-80で凍結され得る)。膜タンパク質(Membrane Protein)(またはコントロールとして、GPCR融合タンパク質を除く発現ベクターを有する膜)を、懸濁されるまで、短時間、ホモジナイズする。次いで、上述のブラッドフォードタンパク質アッセイを用いて、タンパク質濃度を決定する。次いで、膜タンパク質(およびコントロール)を結合緩衝液中0.25mg/m1に希釈する(最終アッセイ濃度、12.5μg/ウェル)。その後、100μl GDP緩衝液をWallac ScintistripTM(Wallac)の各ウェルに添加した。次いで、5ulピンツールを使用し、5μlの候補化合物をこのようなウェルに移す(すなわち、200μlの総アッセイ容量中の5μlは、候補化合物の最終スクリーニング濃度が10μMであるよう、1:40比である)。再度、コンタミネーションを避けるため、各移転工程後、ピンツールを3つのレザバー(水(1×)を含むレザバー、エタノール(1×)を含むレザバー、および水(2×)を含むレザバー)中でリーンしなければならない-過度の液体は、各リーン後にツールから振り落とし、ペーパーおよびキムワイプでふき取るべきである。その後、50μlの膜タンパク質を各ウェル(GPCR融合タンパク質を有さない膜を含むコントロールウェルもまた使用した)に添加し、そして室温で5~10分間プレインキュベートする。その後、結合緩衝液中[³⁵S]GTP S(0.6nM)50μlを各ウェルに添加し、続いて室温で60分間振盪器上でインキュベートさせる(本実施例では、再度、プレートを箱で覆った)。次いで、本アッセイを、プレートを22で15分間4000rpmで遠心させることにより停止する。次いで、このプレートを、8チャンネルマニホールドで吸引し、プレートカバーで密閉する。次いで、このプレートを、セッティング「Prot. #37」を(製造者の指示書に従って)用いてWallac 1450上で読み取る。203030

【0378】

(B. サイクリックAMPアッセイ)

候補化合物を、例えば、逆アゴニスト、アゴニスト、またはアンタゴニストとして、直接同定するための別のアッセイアプローチは、シクラーゼベースのアッセイを使用することにより成し遂げられる。直接同定に加えて、このアッセイアプローチが、上記の[³⁵S]GTP Sアプローチからの結果の確証を提供する独立したアプローチとして使用され得る。40

【0379】

好ましくは、改変型フラッシュプレートTMアデニリルシクラーゼキット(Flash PlateTM Adenylyl Cyclase kit)(New England Nuclear; Cat. No. SMP004A)が、以下のプロトコルに従って、内因性または構成的活性型のGPCRに対する逆アゴニストおよびアゴニストとしての候補化合物を直接同定するために使用される。

【0380】

50

トランスフェクションの約3日後に、トランスフェクトされた細胞を採取する。20 mM HEPES (pH 7.4) および 10 mM MgCl₂ を含有する緩衝液中で懸濁細胞をホモジナイズすることにより、膜を調製する。ホモジナイゼーションを、約10秒間に、Brinkmann PolytronTM を用いて氷上で実施する。得られたホモジネートを、4度で15分間 49,000 × g で遠心分離する。次いで、得られたペレットを、20 mM HEPES (pH 7.4) および 0.1 mM EDTA を含有する緩衝液中に再懸濁し、10秒間ホモジナイズし、続いて4度で15分間 49,000 × g で遠心分離する。次いで、得られたペレットを、使用するまで -80 度で保存する。直接同定スクリーニングの日に、膜ペレットを室温でゆっくりと解かし、20 mM HEPES (pH 7.4) および 10 mM MgCl₂ を含有する緩衝液中に再懸濁し、0.60 mg/ml の最終タンパク質濃度を得る（再懸濁した膜は、使用するまで氷上に置いておく）。 10

【0381】

cAMP 標準および検出緩衝液 [11 ml 検出緩衝液に対して 2 μCi のトレーサー¹
2⁵I cAMP (100 μl) を含む] を、製造者の指示書に従って調製および維持する。アッセイ緩衝液をスクリーニングのために新たに調製し、これは、20 mM HEPES (pH 7.4)、10 mM MgCl₂、20 mM ホスホクレアチニン (Sigma)、0.1 ユニット/ml クレアチニンホスホキナーゼ (Sigma)、50 μM GTP (Sigma)、および 0.2 mM ATP (Sigma) を含んだ。次いで、アッセイ緩衝液を、使用するまで氷上に保存する。

【0382】

候補化合物（凍結している場合、室温で解かす）を、40 μl 膜タンパク質 (30 μg / ウェル) および 50 μl のアッセイ緩衝液と共に、好ましくは、96 ウェルプレートウェル (3 μl / ウェル；12 μM 最終アッセイ濃度) に添加する。次いで、この混合物を、穏やかに振盪させながら、室温で 30 分間インキュベートする。

【0383】

インキュベーション後、100 μl の検出緩衝液を各ウェルに添加し、続いて 2 ~ 24 時間インキュベートする。次いで、プレートを「Prot. # 31」を（製造者の指示書に従って）用いて Wallac MicroBetaTM プレート読み取り器で計数する。

【0384】

例示のためであって限定はしないが、代表的なスクリーニングアッセイプレート (96 ウェルフォーマット) の結果を図1に示す。各棒は、各ウェル中で異なる化合物についての結果を示し、「標的レセプター」は、内因性の構成的活性型 Gs 共役型 GPCR の Gs 融合タンパク質構築物である。図1に示した代表的な結果はまた、各プレートの平均結果（「m」）に基づく標準偏差を提供し、そして一次スクリーンからの「リード」としての逆アゴニストの選択について平均 + 2 任意優先度 (arbitrary preference) は、応答%を少なくとも平均プレート応答だけ減少させる (- 2 標準偏差) 候補化合物の選択を包含する。逆に、一次スクリーンからの「リード」としてのアゴニストの選択についての任意優先度は、応答%を少なくとも平均プレート応答だけ増大させる (+ 2 標準偏差) 候補化合物の選択を包含する。これらの選択プロセスに基づいて、以下のウェル中の候補化合物はそれぞれ、ウェル A2、ウェル G9 中で当該内因性 GPCR に対する推定の逆アゴニスト（化合物 A）およびアゴニスト（化合物 B）として直接同定された。図1を参照のこと。明確にするため以下のことが留意される：これらの化合物は、この GPCR についての内因性リガンドに関するいかなる知識も有することなく直接同定された。化合物結合親和力ではなくレセプター機能に基づくアッセイ技術に集中することにより、本発明者らは、このレセプターの機能的活性を減少させ得る化合物（化合物 A）ならびにレセプターの機能的活性を増大させ得る化合物（化合物 B）を確かめ得る。 30 40

【0385】

（実施例 7）

（細胞内カルシウム濃度の測定のための蛍光測定画像化プレート読取器（FLIPR） 50

アッセイ)

それぞれのクローン系からの標的レセプター (Target Receptor) (実験) で安定にトランスフェクトされた細胞および pCMV (陰性コントロール) で安定にトランスフェクトされた細胞を、翌日、アッセイのために、完全培地 (D MEM (10% FBS、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウムを有する) を含んだボリ-D-リジン前処理した96ウェルプレート (Becton-Dickinson, #356640) 中に、 5.5×10^4 細胞 / ウェルで播種する。Fluo4-AM (Molecular Probe, #F14202) インキュベーション緩衝液ストックを調製するために、1 mg Fluo4-AM を $467 \mu\text{l}$ DMSO および $467 \mu\text{l}$ プルオロニック酸 (Pluronics acid) (Molecular Probe, #P3000) 中に溶解し、1 mMストック溶液を得、これは、1ヶ月間 - 20°で保存され得る。Fluo4-AM は、蛍光カルシウム指標染料である。

【0386】

候補化合物を、洗浄緩衝液 (1×HBSS / 2.5 mM プロブニシド (Probenicid) / 20 mM HEPES (pH 7.4)) 中で調製する。

【0387】

アッセイの時に、培地をウェルから除去し、そして細胞を $100 \mu\text{l}$ の 4 μM Fluo4-AM / 2.5 mM プロブニシド (Probenicid') (Sigma, #P8761) / 20 mM HEPES / 完全培地 (pH 7.4) に播種する。37 / 5% CO₂ でのインキュベーションを 60 分間進行させる。

【0388】

1 時間のインキュベーション後、Fluo4-AM インキュベーション緩衝液を除去し、そして細胞を、 $100 \mu\text{l}$ 洗浄緩衝液で 2 回洗浄する。各ウェルに、 $100 \mu\text{l}$ 洗浄緩衝液を入れておく。このプレートを、37 / 5% CO₂ で 60 分間インキュベーターに戻す。

【0389】

F L I P R (蛍光測定画像化プレート読取器 (Fluorometric Imaging Plate Reader); Molecular Device) を、30 秒目に $50 \mu\text{l}$ 候補化合物を添加し、さらなる 150 秒間に候補化合物によって誘発された細胞内カルシウム濃度 ([Ca²⁺]) の一過性の変化を記録するようにプログラムする。FLIPR ソフトウェアを使用してアゴニスト活性を決定するために、総蛍光変化計数を使用する。この機器ソフトウェアは、ゼロ点で等価の開始読取を得るように蛍光読取を標準化する。

【0390】

いくつかの実施形態では、標的レセプターを含む細胞は、混交の G 15 / 16 またはキメラ Gq/Gi ユニットをさらに含む。

【0391】

前出は、安定にトランスフェクトされた細胞を用いるアゴニスト活性のための FLIPR アッセイを提供するが、当業者は、アンタゴニスト活性を特徴付けるためにこのアッセイを容易に改変し得る。当該当業者はまた、代替的に、一過的にトランスフェクトされた細胞が使用され得ることもまた容易に認識する。

【0392】

(実施例 8)

(メラニン保有細胞技術)

メラニン保有細胞は、下等脊椎動物で見い出される皮膚細胞である。それらは、メラノソームと呼ばれる色素沈着小器官を含む。メラニン保有細胞は、Gタンパク質共役型レセプター (GPCR) 活性化の際に微小管網に沿ってこれらのメラノソームを再分布させ得る。この色素運動の結果は、細胞の明白な明化または暗化である。メラニン保有細胞では、Gi 共役型レセプターの活性化から生じる細胞内 cAMP のレベルの減少により、メラノソームが細胞の中心に移動し、色の劇的な明化を生じる。Gs 共役型レセプターの活性

化後に次いで cAMP レベルが上がると、メラノソームが再分散され、そして細胞は再度暗くなる。G_q 共役型レセプターの活性化から生じるジアシルグリセロールのレベルの増大もまた、この再分散を誘発し得る。さらに、この技術はまた、特定のレセプターチロシンキナーゼの研究に適応される。メラニン保有細胞の応答は、数分のレセプター活性化の間に起こり、単純で強い色の変化を生じる。この応答は、通常の吸光度マイクロプレート読取器または適度なビデオ画像化システムを用いて容易に検出され得る。他の皮膚細胞とは違い、メラニン保有細胞は、神経堤に由来し、シグナリングタンパク質の完全補体を発現するようである。特に、この細胞は、極度に広範な範囲の G タンパク質を発現し、そのためほとんど全ての GPCR を機能的に発現し得る。

【0393】

10

メラニン保有細胞は、GPCR に対して化合物（天然リガンドを含む）を同定するために使用され得る。この方法は、特定の刺激に応答してそれらの色素を分散させ得るかまたは凝集させ得る色素細胞系の試験細胞を導入し、そして GPCR をコードする外因性クローンを発現させることにより、実施され得る。GPCR の活性化が色素分散を誘発する場合、刺激（例えば、メラトニン）により、色素が試験細胞内で凝集される色素沈着の初期段階が生じる。しかし、GPCR の活性化が色素凝集を誘発する場合、刺激で細胞を刺激することにより、色素が分散される色素沈着の初期段階が生じる。次いで、この試験細胞を、化学化合物と接触させ、そして細胞における色素沈着が色素沈着の初期段階から変化したか否かを決定する。GPCR に結合する候補化合物（リガンドを含むがこれらに限定されない）に起因する細胞中の色素の分散はペトリ皿上で暗くなり、細胞中の色素の凝集は明るくなる。

20

【0394】

材料および方法は、米国特許番号 5,462,856 および米国特許番号 6,051,386 の開示内容に従う。これらの特許の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される。

【0395】

30

細胞を 96 ウェルプレート中に播種する（1 プレート当たり 1 レセプター）。トランスフェクションの 48 時間後、各プレート上の細胞の半分を 10 nM メラトニンで処理する。メラトニンは、メラニン保有細胞で内因性 G_i 共役型レセプターを活性化させ、細胞にそれらの色素を凝集させる。細胞の残りの半分を、無血清培地 0.7 × L - 15 (Gibco) に移す。1 時間後、無血清培地中の細胞は、色素分散状態になるが、メラトニン処理細胞は、色素凝集状態である。この時点で、細胞を候補化合物の用量応答 (dose response) で処理する。播種した GPCR が候補化合物に結合する場合、メラニン保有細胞は化合物に応答して変色を受けると予期される。レセプターが G_s または G_q のいずれかの共役型レセプターであり、かつ候補化合物がアゴニストである場合、メラトニン凝集メラニン保有細胞は色素分散を受ける。逆に、レセプターが G_i 共役型レセプターであり、かつ候補化合物がアゴニストである場合、色素分散細胞が用量依存性色素凝集を受けると予期される。

【0396】

40

(実施例 9)

(ヒト RUP41 の組織分布)

(A. アフィメトリックス遺伝子チップ (AFFYMETRIX GENECHIP)
(登録商標) 技術)

遺伝子チップ (GeneChip) (登録商標) 技術を用いて G タンパク質共役型レセプター (GPCR) の発現レベルをモニタリングする、オリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイの設計および製造のために、アミノ酸配列を Affymetrix に提出した。また、このマイクロアレイ上には、Harvard Brain Bank からのヒト脳組織を特徴付けたプローブまたは市販により得たプローブもまた存在した。製造者の指示書に従って、RNA サンプルを增幅させ、標識し、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、データ分析した。

50

【0397】

GeneChipを用いて、ヒトRUP41の発現プロフィールを問合せした（interrogate）。図2Aを参照のこと。図2Aは、種々の組織におけるヒトRUP41の発現レベルを表すプロットである。このプロットを調べると、脳および心臓においてRUP41が発現されることを示す。脳を除いた組織では、RUP41は、心臓によって選択的に発現される。RUP41の選択的発現は、RUP41のモジュレーターによる潜在的に望ましくない副作用の機会を減らすことができる。

【0398】

ドットプロットからの結果（図2B）およびノーザンプロットからの結果（図2C）は、GeneChipからの結果と一致する。

10

【0399】

(B. RT-PCR)

ヒトRUP41の発現を質問するために、RT-PCRを適用した。使用したオリゴヌクレオチドは、RUP41特異的であり、そしてcDNAを鋳型として使用した。Taq DNAポリメラーゼ（Stratagene）を、製造者の指示書に従って40μl反応での増幅のために使用した。PCR条件は、96で2分間、続いて96で30秒間、55で30秒間、および72で2分間を30サイクル、続いて72で10分間であった。RT-PCR産物を分析するために、反応物の20μlを1.5%アガロースゲル上に載せた。

20

【0400】

5' PCRプライマーは、以下の配列を有する：

【0401】

【化3】

5'-GTAATAATTGCCCTCCGGCGAGC-3'

（配列番号11）。

【0402】

3' PCRプライマーは、以下の配列を有する：

【0403】

【化4】

5'-CTAGTCTGTGACAACCTGAGG-3'

30

（配列番号12）。

【0404】

増幅されたDNAフラグメントは、390塩基対の大きさである。

【0405】

例示のために、ヒトRUP41についてのRT-PCRを、以下、図7に示す。ここでは、鬱血性心不全を有する患者由来の心臓組織におけるRUP41の発現を、正常心機能を有する患者由来の心臓組織におけるRUP41の発現と比較する。

40

【0406】

当業者は、マウスRUP41およびラットRUP41についても同様にRT-PCRを実施できると、考えられる。

【0407】

(C. ノーザンプロット)

ヒトRUP41発現のノーザンプロット分析を、当業者に周知の手順によって実施した。配列番号1のヌクレオチド1, 104-1, 538に対応するヒトRUP41コード領域フラグメントをプローブとして使用した。

【0408】

(実施例10)

（インサイチュハイブリダイゼーション：成体ラット心臓におけるRUP41発現）

50

インサイチュハイブリダイゼーションは、成体ラット心臓における広範な心筋発現を実証した(図3)。アンチセンスRUP41放射性標識プローブは、心臓の全心室においてRUP41発現を検出する。アンチセンスコントロール(GAPDH)プローブおよび心房特異的(心房性ナトリウム利尿因子、ANF)プローブをさらなる切片で使用し、心臓切片のプローブ標識の特異性を実証した。

【0409】

(インサイチュハイブリダイゼーション)

固定した心臓組織を、50:50混合のOCT: Aqua Mount(VWR, #41799-008, West Chester, PA)中に包埋し、ドライアイス/エタノール中に凍結した。このブロックを、凍結切片化まで-80で保存し、凍結切片化時に、10ミクロンの連続した切片を調製した。凍結切片化後、この組織切片を、密封したスライド箱中に-20で保存した。

【0410】

配列番号6のラットRUP41ポリヌクレオチドを、PCR II - TOP Oベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)にSP6プロモーターとT7プロモーターとを両側とした部位でサブクローニングした。配列番号6のポリヌクレオチドに相補的な³⁵S-放射性標識アンチセンスラットRUP41 mRNAプローブを、Promega Riboprobe Transcription Kit (#P1460; Madison, WI)からのSP6 RNAポリメラーゼを本質的に製造者の指示書に従って用いて調製した。コントロールの放射性標識センスプローブを、T7 RNAポリメラーゼを同様に用いて調製した。

【0411】

固定した組織切片を解かし、室温での一連の固定後インキュベーション(PBSで3分間；10%ホルマリンで10分間；PBSで10分間；およびPBSで10分間)にすぐに供した。

【0412】

次いで、組織切片を、透過処理およびアセチル化に供した。このために、組織切片を37で10分間プロテイナーゼK(Proteinase K(0.001% Proteinase K(0.5M Tris、0.25M EDTA、pH 8.0中)))とインキュベートし、続いて、室温で5分間水で洗浄した。次いで、組織切片を、トリエタノールアミン緩衝液(0.1M TEA、pH 8.0)と室温で5分間インキュベートし、続いて、2.5%無水酢酸(0.1M TEA pH 8.0中)と室温で5分間インキュベートした。次いで、組織切片を、室温で2時間、2×SSC；50%エタノール；95%エタノール；および100%エタノールの各々とインキュベートした。次いで、組織切片を、翌日のハイブリダイゼーションまで風乾し、乾燥下に置いた。

【0413】

組織切片のハイブリダイゼーションを、一切片当たり80~100μlの容量の0.47M NaCl、54%ホルムアミド中で60で20時間実施した。放射性標識したプローブを1×10⁷cpm/mlで使用した。次いで、組織切片を、4×SSCで4回、各回室温で10分間洗浄した。ハイブリダイズしていないプローブを37で30分間のRNase A(20μg/ml、0.5M NaCl、10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0中)とのインキュベーションで消化した。次いで、組織切片を、2×SSCで2回、各回室温で5分間、洗浄し、続いて1×SSCで、室温で10分間洗浄し、続いて0.5×SSCで、室温で10分間洗浄した。次いで、組織切片を、0.1×SSCで、65で30分間洗浄し、続いて0.1×SSCで、室温で5分間洗浄し、アルコール中で脱水した。

【0414】

次いで、ハイブリダイゼーションを受けた組織切片をX線フィルムに露出し、RUP41ハイブリダイゼーションシグナルをオートラジオグラフィーにより可視化した。このために、組織切片を、1日間、4日間、次いで1週間、Biomax MRフィルムに露出

10

20

30

40

50

した。オートラジオグラフィー後、組織切片を、NTB-2液体エマルジョン(VWR, #IB1654433, West Chester, PA)を用いてエマルジョン浸漬した。エマルジョン浸漬した組織切片を、1週間エマルジョンに曝露し、次いで展開させた。展開後、組織切片を、ビスベンズイミド(0.001% (PBS中))で対比染色しカバーガラスをかぶせた。組織切片を、暗視野集光レンズ(銀染は白く見える)およびDAPIフィルターキューブ(蛍光ビスベンズイミド対比染色を観察するため)を用いて写真撮影した。

【0415】

GAPDHおよび心房性ナトリウム利尿因子(ANF)の部分ラット配列から生成したプローブを放射性標識し、ハイブリダイズするのに同一の方法を使用した。

10

【0416】

(実施例11)

(肥大新生児ラット心室筋細胞におけるRUP41のダウンレギュレーション)

新生児ラット心室筋細胞(NRVM)を、以前に記載された通りに調製した[Adams, JWら, J Biol Chem(1996)271:1179-86;この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。簡潔には、1~2日齢のSprague-Dawleyラット仔から心臓を得、この心臓をコラゲナーゼで消化し、そして筋細胞をPercoll勾配を通過させることにより精製した。細胞を、1%ゼラチンでプレコーティングした組織培養皿上に播種し、4:1 DMEM/199培地(medium-199)(10%ウマ血清、5%ウシ胎児血清、および抗生物質(100ユニット/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシン)を補充)中で一晩維持した。プレート培地中で18時間後、筋細胞を維持培地(DMEM/199培地(medium-199)+抗生物質)で洗浄し、死細胞およびデブリを除去し、そして実験の期間中、維持培地を補給した。

20

【0417】

図4A。RT-PCRは、24時間無血清条件下で維持した新生児ラット心室筋細胞(NRVM)におけるRUP41転写物の発現を実証した。RUP41転写物レベルは、フェニレフリン(PE)または新生児ウシ血清(NCS)を培地に添加して24時間後に劇的に低下し、そしてこれは、肥大表現型に相關する。フェニレフリンを100μMで使用した(+2μMでアドレナリンレセプターを遮断し、それによりアドレナリンレセプターの選択的活性化を可能にする)。新生児ウシ血清を10%で使用した。G3PDH PCR産物は、PCR反応のために使用される鑄型が等しいレベルであること、およびゲルローディングのコンシスティンシー(consistency)を実証した。

30

【0418】

(RT-PCR)

上述のNRVMから単離した総RNAを、製造者の指示書に従ってPCRキット(Becton Dickinson)のRTを使用する逆転写DNA(RT-DNA)の生成のための鑄型として使用した。RUP41発現を、PCRによりRT-DNAサンプルにおいて検出した。PCR条件は、96度2分間、続いて96度30秒間、55度30秒間、および72度10分間の30サイクル、続いて72度10分間であった。RT-PCR産物を分析するために、反応物の20μlを1.5%アガロースゲル上に載せた。

40

【0419】

5'PCRプライマーは、以下の配列を有する:

【0420】

【化5】

5'-GTAATAATTGCCCTCCGGCGAGC-3'

(配列番号11)。

【0421】

50

3' PCR プライマーは、以下の配列を有する：

【0422】

【化6】

5'-CTAGTCTGTGACAACCTGAGG-3'

(配列番号12)。

【0423】

増幅されたDNAフラグメントは、390塩基対の大きさである。

【0424】

図4B。ノーザンプロットは、肥大因子(フェニレフリン(PE)、ホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸(PMA)、プロスタグランジンF2(PGF2)、および新生児ウシ血清(NCS)を含む)で24時間処理した後のNRVMにおけるRUP41 mRNA発現のレベルの減少を実証した。フェニレフリンを100μMで使用した(+2μMでアドレナリンレセプターを遮断し、それによりアドレナリンレセプターの選択的活性化を可能にする)。ホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸を100nMで使用した。プロスタグランジンF2を1μMで使用した。新生児ウシ血清を10%で使用した。心房性ナトリウム利尿因子(ANF)(これは、心筋細胞肥大の遺伝子マーカーである)は、全ての肥大刺激に応答してアップレギュレートされる。28S rRNAのメチレンブルー染色は、RNAの完全性および等しいローディングを実証する。

【0425】

(ノーザンプロット分析)

以前に記載されるように、1~2日齢ラット(Sprague-Dawley)心室筋細胞(NRVM)を単離し、培養皿に播種した。種々の処理後、総RNAを、製造者の指示書に従ってTrizol試薬(Invitrogen)を用いて単離した。15μgの総RNAを、ホルムアルデヒド含有アガロースゲル上で電気泳動により分離し、PVDF膜(Amersham)に転写させた。配列番号6のヌクレオチド53-488に相当するラットRUP41コード領域フラグメントを、ノーザンプロット分析のためのプローブとして使用した。³²P-標識したプローブを標準的な方法を用いて生成し、55°で膜にハイブリダイズさせた。膜を高いストリッジエンシーで洗浄し、2~4日間、-80°でX線フィルムに露出した。

【0426】

(実施例12)

(圧負荷肥大に罹患したマウス心臓におけるRUP41のダウンレギュレーション)

図5上。RUP41 mRNAは、圧負荷誘発性心肥大のインビボマウスマodelにおいてダウンレギュレートされた。7日間、横大動脈狭窄(transverse aortic constriction)に罹患したマウス(TAC)または偽手術マウス(偽)の左心室から単離した総RNAに対して、ノーザンプロット分析を実施した。ANF発現の増大は、TAC心臓における真の肥大応答の形成を実証する。28S rRNAのメチレンブルー染色は、RNAの完全性および等しいローディングを実証する。配列番号4のヌクレオチド775-1, 269に相当するマウスRUP41コード領域フラグメントを、ノーザンプロット分析のためのプローブとして使用した。³²P-標識したプローブを標準的な方法を用いて生成し、55°で膜にハイブリダイズさせた。膜を高いストリッジエンシーで洗浄し、2~4日間、-80°でX線フィルムに露出した。

【0427】

図5下。RUP41シグナルをデンシティメトリーで分析し、28S rRNAシグナルに対して標準化した。*6つの偽サンプルおよび6つのTACサンプルのANOVA統計学的解析は、P<0.00005でRUP41 mRNAの有意な減少を実証した。

【0428】

(横大動脈狭窄(TAC))

マウスにおける横大動脈の外科的狭窄を以前に記載される通りに実施した(Rockm

10

20

30

40

50

anら, Proc Natl Acad Sci. 1991 Sep 15; 88(18): 8277-81。簡潔には、8週齢マウス(C57/BL6)をケタミンおよびキシラジンの混合物で麻酔した。解剖顕微鏡下で、顕微手術技術によって、正中頸部切開を行い、気管および頸動脈を露出させた。気管内挿管の成功後に、カニューレを、0.2mLの一回換気量および110/分の呼吸数で酸素補給する従量式げっ歯類人工呼吸器(volume cuy lced rodent ventilation)(Harvard Apparatus)に接続した。胸腔を小切開を通して左上胸骨縁で2番目の肋間隙に入れ、27ゲージ針で7-0ナイロン縫合糸結紮を行うことにより大動脈狭窄を実施し、針を除去すると直径がだんだん狭くなつて0.4mmとなり、65~70%の再現可能な横大動脈狭窄(TAC)を生じた。大動脈絞扼後に、気胸を瀉出し、動物から抜管し、元に戻した。

10

【0429】

(実施例13)

(低酸素に罹患したNRVMにおけるRUP41のダウンレギュレーション)

ノーザンプロットは、RUP41 mRNAレベルが6時間、低酸素に罹患したNRVMから単離した総RNAにおいて減少することを実証した(図6)。RUP41 mRNAレベルは、低酸素後の24時間の再酸素化の後(H6/R24)に、コントロール(酸素正常状態)レベルに戻る。c-fos発現の増大(低酸素(Hypoxia)-6)は、低酸素状態に対する筋細胞ストレス応答を実証する。28S rRNAのメチレンブルー染色は、RNAの完全性および等しいローディングを実証する。配列番号6のヌクレオチド53-488に相当するラットRUP41コード領域フラグメントを、ノーザンプロット分析のためのプローブとして使用した。³²P-標識したプローブを標準的な方法を用いて生成し、55°で膜にハイブリダイズさせた。膜を高いストリンジエンシーで洗浄し、2~4日間、-80°でX線フィルムに露出した。

20

【0430】

NRVMの低酸素処理は、Van Heugtenら, J Mol Cell Cardiol(1994)26:1513-24(この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される)に記載される。簡潔には、95%N₂および5%C₀₂を注入した気密インキュベーターを用いて、低酸素を達成した。示した時間の低酸素処理後、細胞をチャンバーから周囲空気に移し、無血清DMEM/F12培地を補給した。また、以下の実施例17も参照のこと。

30

【0431】

(実施例14)

(鬱血性心不全を有するヒトにおけるRUP41のダウンレギュレーション)

図7A。ヒト心臓から単離した総RNAに対して、RT-PCRを実施した。RUP41転写物レベルは、正常心機能(正常)を有する患者に比較して、鬱血性心不全(CHF)を有する患者由来のRNAで減少している。ヒトGAPDHプライマーを、鑄型濃度およびローディングコンシンテンシーについての内部コントロールとして各PCR反応に添加した。

40

【0432】

図7B。*ANOVA統計学的分析は、p<0.05で正常に対してCHF患者においてRUP41転写物の有意な減少を実証する。心筋梗塞(MI)を有する患者におけるRUP41転写物レベルは、正常心臓と差異がない。

(ヒト心疾患サンプル)

RT-PCR(上述を参照のこと)を、商業的(Clinomics)に得られた正常心機能、鬱血性心不全(CHF)、および心筋梗塞(MI)を有すると診断されたヒト患者の検死で採取された心臓由来の総RNAから実施した。RUP41発現の相対レベルを、GAPDH内部コントロールに対して標準化した後、各群において決定した。

【0433】

(実施例15)

50

(RUP41はCOS-7細胞においてGiと結合する)

図8上。COS-7細胞を、pCMV-HARUP41(HA-RUP41)またはpCMV-HAバックボーン(CMV)、および構成的活性型Gs共役型甲状腺刺激ホルモンレセプター(pCMV-TSHR-A623I)で共トランスフェクトした。[HARUP41は、血球凝集素(HA)タグ化RUP41に相当する。]さらに、CRE-ルシフェラーゼレポーター構築物を共トランスフェクトし、百日咳毒素(PTX)の存在または不在下でcAMP活性化経路の活性を決定した。CART-TSHRおよびHARUP41を共発現する細胞におけるルシフェラーゼレポーター活性は、CART-TSHRおよびpCMV-HAコントロールを共発現する細胞における活性より低かった。このことは、RUP41がGiに結合していることを示唆する。PTX処理したRUP41によるcAMP減少の阻害は、このレセプターのGi結合を確認する。

10

【0434】

図8下。COS-7細胞を、百日咳毒素(PTX)の存在または不在下でpCMV-HA(CMV)またはpCMV-HARUP41(RUP41)構築物でトランスフェクトした。フォルスコリン(1uM)刺激によるcAMPレベルの増大は、RUP41の発現によって阻害された。PTX処理したRUP41によるcAMP減少の阻害は、このレセプターのGi結合を確認する。

20

【0435】

RUP41ベクター構築 -

配列番号3のヒトRUP41ポリペプチドのアミノ酸2-433をコードするポリヌクレオチドを、一過性トランスフェクション発現研究のためにpCMV-HAに連結した。

20

【0436】

一過性トランスフェクション

DNAのトランスフェクションを、5'-HAタグ化RUP41発現構築物(HA-pCMVRUP41)を用いて実施した。簡潔には、HA-pCMVRUP41を、製造者の指示書(Roche)に従ってFugene-6トランスフェクション試薬を用いて、チャンバースライド上に播種したCOS-7細胞またはHEK細胞にトランスフェクトした。5'-HAタグ化GPR(オーファンGPCR; GenBank(登録商標)Accession No. NM007223)およびHA-pCMVベクターを、コントロールとして、COS-7細胞およびHEK細胞にトランスフェクトした。

30

【0437】

cAMP測定

RUP41発現プラスミドでのCOS-7細胞のトランスフェクションの24時間後、細胞をPBSで洗浄し、そして100ng/ml PTXを有するまたは有しない無血清培地と37度18時間インキュベートし、その後、FlashPlateアッセイ(FlashPlate assay)(PerkinElmer)のために細胞を採集した。製造者の指示書に従って、cAMPレベルを検出した。

30

【0438】

CRE-ルシフェラーゼレポーターアッセイ

pCMVRUP41およびTSHR-A623I発現プラスミドでCOS-7細胞の共トランスフェクションの24時間後(TSHR-A623I:RUP41(またはCMV)のDNA比=1:7(w/w))。細胞をPBSで洗浄し、そして100ng/ml PTXを有するまたは有しない無血清培地と37度18時間インキュベートし、その後、製造者の指示書に従ってLucLite Luciferase Reporter Assayキット(LucLite Luciferase Reporter Assay kit)(Packard)を用いてCREレポーターアッセイ検出を行った。

40

【0439】

(実施例16)

(RUP41のアデノウイルス媒介過剰発現はNRVMの生存を促進する)

図9A。NRVMを、一細胞当たりブラーク形成単位(PFU)でのウイルス価により

50

規定された種々の感染多重度のRUP41をコードする組換えアデノウイルス(AdRUP41)で処理した。アデノウイルス感染の24時間後、総RNAを単離し、ノーザンプロット分析を使用して、ウイルス発現RUP41のレベルを決定した。50PFU/細胞で、RUP41発現が検出可能であったが、高レベルの発現は、100PFU/細胞で示された。

【0440】

図9B。100PFU/細胞のAdRUP41で48時間感染したNRVMは、無血清培地中で細胞生存の増大を実証した。NRVMを、テキサスレッド結合体化ファロイジンおよびヘキスト33342で共染色した。

【0441】

(RUP41ベクター構築)

アデノウイルス実験のために、配列番号3のヒトRUP41ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをpShuttleCMV(Qbiogene)にサブクローニングし、その後、組換えアデノウイルスRUP41(AdRUP41)を生成した。

【0442】

(アデノウイルス感染)

アデノウイルスベクターでのNRVMの感染を、以前に記載の通りに実施した[Adams JWら, Circ Res (2000) 87: 1180-7; その開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。簡潔には、NRVMを、血清の存在下で一晩、ラミニンコーティングした(3.5mg/cm²)チャンバースライド(Nunc)上で培養し、洗浄し、そしてアデノウイルス感染前に無血清培地中でさらに8時間インキュベートした。最適な感染多重度(MOI)は、0.1~500PFU/細胞の用量範囲にわたって一細胞当たり50~100plaques形成単位(PFU)であると決定された。50PFU/細胞のMOIは、AdRUP41またはGFPをコードするコントロールアデノウイルス(AdGFP)のいずれかでの感染後最初の48時間の間にいかなる細胞傷害もなく、95%より高い感染効率を生じた(このコントロールウイルスで感染したNRVMにおけるGFP発現によって決定)。

【0443】

(実施例17)

(RUP41の過剰発現は低酸素/再酸素化誘発性アポトーシスからNRVMを救出する)

オリゴヌクレオソームDNAフラグメント化(oligonucleosomal DNA fragmentation)(akaラダー化 aka ladderizing)の分析は、低酸素(8時間)後の再酸素化(24時間)が、100PFU/細胞でコントロール(AdGFP)アデノウイルスに感染したNRVM(H8/N24)においてアポトーシスの増大を刺激することを実証した。しかし、配列番号3のヒトRUP41ポリペプチドのアデノウイルス媒介過剰発現(100PFU/細胞)は、血清枯渇(normal)および低酸素後再酸素化(H8/N24)により誘発されるDNAフラグメント化的レベルを減少させる(図10)。

【0444】

(低酸素/再酸素化)

単離されたNRVMを、血清(10%FBS、5%HS)の存在下で一晩培養し、次いで低酸素処理の前に24時間、この培地を無血清培地DMEM/F12(Sigma)と置換した。低酸素を、95%N₂および5%C₀₂を注入した気密インキュベーターを用いて達成した[Van Heugtenら, J Mol Cell Cardiol (1994) 26: 1513-24, この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。示した時間の低酸素処理後、細胞をチャンバーから周囲空気に移し、無血清DMEM/F12培地を補給した。

【0445】

(DNAフラグメント化)

10

20

30

40

50

製造者の指示書 (Gentra) に従ってPUREGENE DNA単離キット (PUREGENE DNA isolation kit) を用いて、NRVMからDNAを単離した。2%アガロース上で等量のDNAを分離し、そして紫外光下で臭化工チジウムでの染色により、フラグメント化を検出した。

【0446】

(実施例18)

(心臓保護)

本発明のモジュレーターは、Fryerらのインビボラットモデル [Circ Res (1999) 84:846-51; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] を用いて心臓保護的であることが示され得る。当該モジュレーターを、腹腔内注射によって投与する。好ましい用量は、0.1~100mg/kgである。他の好ましい用量は、以下からなる群から選択される: 0.1mg/kg、0.3mg/kg; 1.0mg/kg; 3.0mg/kg; 10mg/kg; 30mg/kgおよび100mg/kg。プラセボ群にビヒクルのみを投与する。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターはアゴニストである。

【0447】

雄Wistarラット(350~450g)を、本研究の全ての相のために使用する。当該モジュレーターまたは生理食塩水を、腹腔内注射によって、外科的プロトコルの1時間、12時間、24時間、48時間、または72時間前に、ラットに投与する。続けて、チオブタバルビタールナトリウム (Inactin, Research Biochemical International International; 100mg/kg) の腹腔内投与を介して、ラットを麻酔する。気管切開を実施し、そして気管に、げっ歯類人工呼吸器 (モデルCIV-101 (model CIV-101), Columbus Instruments, またはモデル683 (model 683), Harvard Apparatus) に接続したカニューレを挿管する。ラットを、1分当たり60~65息でO₂を補給した室内空気で人工呼吸する。5~10mmHgの呼気終末陽圧を維持することにより、無気肺を防ぐ。動脈pH、P_{CO₂}、およびP_{O₂}を、血液ガスシステム (AVL 995 pH / 血液ガス分析器 (AVL 995 pH / blood gas analyzer), AVL Medical Instruments) により、コントロール、15分の閉塞、ならびに60分および120分の再灌流でモニターし、そして呼吸数および/または一回換気量を調整することにより正常な生理的範囲 (pH 7.35~7.45; P_{CO₂} 25~40mmHg; およびP_{O₂} 80~110mmHg) 内に維持する。加熱パッドの使用により体温を38℃に維持し、そして動脈血pHを正常な生理的レベル内に維持するのに必要とされるだけ重炭酸イオンを静脈内投与する。

【0448】

Grass (モデル7 (model 7)) ポリグラフに接続したGould PE50またはGould PE23圧力変換器を介して血圧および心拍数を測定するために、右頸動脈にカニューレ挿入する。生理食塩水、重炭酸イオン、および薬物注入のために、右頸静脈にカニューレ挿入する。左開胸を5番目の肋間隙で実施し、次いで心嚢切開および左心耳の調整を行い、左冠状動脈の位置をあらわにする。結紮糸 (6-0 プロレン) を左心耳のすぐ下の領域から左心室の右側部分に、冠状動脈の下で通す。縫合糸の両端部をプロピレン管に通し、スネアを形成する。張り詰めた縫合糸の両端部を引っ張り、止血鉗子でそのスネア (snare) を心外膜 (epicardial) 表面上で締めることにより、冠状動脈を閉塞させる。心外膜チアノーゼおよび続く血圧低下により冠状動脈閉塞を検証する。止血鉗子を外し、スネアを緩めることによって心臓の再灌流を開始し、心外膜充血応答を可視化することによってこの再灌流を確認する。実験プロトコルを開始する前に、心拍数および血圧を安定にする。

【0449】

ラットを指定の実験群に無作為に分ける。30分の限局性虚血および2時間の再灌流 (I/R) の24時間前に、生理食塩水を、コントロールラットに投与する。当該モジュレ

10

20

30

40

50

ーターにより誘発された急性心臓保護を示すために、当該モジュレーターを長期の虚血性傷害の1時間前に投与する。急性虚血性傷害に対する遅延性心臓保護を示すために、当該モジュレーターを、I/Rの12時間前または24時間前のいずれかで指定用量で投与する。当該モジュレーターをまた、I/Rの48時間前または72時間前のいずれかで指定用量で投与する。

【0450】

上記プロトコルの完了時に、冠状動脈を閉塞し、そして頸静脈を介して投与したパントブルー染料を用いた陰性染色によって危険領域(area at risk)(AAR)を決定する。15%KC1溶液でラットを安樂死させる。心臓を摘出し、残りの組織から左心室を解剖し、続いて6つの薄横断片に切断する。これにより、AAR(続けてピンクになる)に対して正常領域(青色に染色)の描写が可能になる。AARを非虚血領域から切り出し、この組織を別々のバイアル中に置き、1.0%2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド(TTC)染料(100mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.4)中)と37度15分間インキュベートする。TTCは生存組織および非生存組織の指示薬である。TTCは、生存心筋中に存在するデヒドロゲナーゼ酵素によって還元され、ホルマサン沈降物を生じ、これは深紅色になるが、梗塞した領域は灰色のままである{Kleinら, Virchows Arch[Pathol Anat](1981)393:287-97}。組織を10%ホルムアルデヒドのバイアル中に一晩保存し、解剖顕微鏡(Cambridge Instruments)の照明下で梗塞した心筋をAARから解剖する。梗塞サイズ(IS)、AAR、および左心室重量(LV)を重量分析により決定する。AARは、LVのパーセントとして表され(AAR/LV)、そしてISは、AARのパーセントとして表される(IS/AAR)。

10

20

30

40

【0451】

ラットは、重度の低血圧(<30mmHg 収縮期血圧)を呈するか、または代謝性アシドーシスまたはアルカローシスのために正常生理的範囲内での十分な血液ガス値が維持できない場合、データ分析から除外する。

【0452】

全ての値を平均SEMとして表す。Bonferroni検定を伴う一元配置ANOVAを使用して、血行力学、IS、およびAARについて群間で有意差が存在するか否かを決定する。有意差は、P<0.05で決定する。IS/AARの減少が心臓保護の指標である。

30

【0453】

(実施例19)

(経口生物学的利用能)

経口生物学的利用能を直接的に評価するための物理化学分析アプローチが当業者に周知であり、かつ使用され得る[例えば、限定されずに、以下を参照のこと: Wong PCら, Cardiovasc Drug Rev(2002)20:137-52; および Buchan Pら, Headache(2002)Suppl 2:S54-62; これら各々の開示内容は、本明細書によってその全体が援用される]。さらなる例示のためであって限定ではないが、当該代替分析アプローチは、液体クロマトグラフィー直列質量分析器を含み得る[Chavez-Eng CMら, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci(2002)767:117-29; Jetter Aら, Clin Pharmacol Ther(2002)71:21-9; Zimmerman JJら, J Clin Pharmacol(1999)39:1155-61; および Barrish Aら, Rapid Commun Mass Spectrom(1996)10:1033-7; その各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。

40

【0454】

陽電子断層撮影法(PET)が、薬物の経口投与後の哺乳動物身体における薬物分布(経口生物学的利用能を含む)の直接測定を得るために、首尾よく使用されている[Gul

50

y a s ら , Eur J Nucl Med Mol Imaging (2002) 29 : 1031 - 8 ; その開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される】。

【0455】

あるいは、本発明のモジュレーターの経口生物学的利用能は、例えば、実施例18のラットモデルによるようにして（例示のためであって限定ではない）展開したインビボデータに基づいて決定され得る。モジュレーターは、 0.1 mg kg^{-1} ~ 100 mg kg^{-1} の範囲の用量で経口胃管栄養によって投与される。モジュレーターの経口投与は、心臓保護を付与することが示される。モジュレーターの効果は、用量依存性であることが示され、腹腔内投与後の効果に匹敵する。経口投与によるIS/AARの半最大減少を達成するのに必要なモジュレーターの用量を、腹腔内投与によるIS/AARの半最大減少を達成するのに必要なモジュレーターの用量に比較する。例示のために、当該経口用量が当該腹腔内用量の2倍である場合、モジュレーターの経口生物学的利用能は50%であるとみなされる。より一般には、当該経口用量が mg kg^{-1} であり、当該腹腔内用量が mg kg^{-1} である場合、モジュレーターの百分率としての経口生物学的利用能は、 $[(/) \times 100]$ であるとみなされる。

【0456】

本発明のモジュレーターの経口生物学的利用能の決定が、例示の目的で（限定ではない）ここに示したもの以外のインビボ動物モデルを用いて実施され得ることは、当業者に容易に明らかである。また、当該経口生物学的利用能についての生物活性読み出しが、IS/AAR以外のパラメーターであり得ることは、当業者に容易に明らかである。参考投与経路が、腹腔内以外であり得ることは、容易に想起される。いくつかの実施形態では、当該参考投与経路は静脈内であり得る。

【0457】

いくつかの実施形態では、本発明のモジュレーターの経口生物学的利用能は、腹腔内注射に対して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0458】

（実施例20）

（ヒトRUP41 GPCRの発現を含むトランスジェニックマウス／ラット／ブタ）

本発明はまた、ヒトRUP41 GPCRの発現を含むトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する方法および組成物を提供し、該レセプターが、以下：

（a）配列番号2に記載のポリペプチド；

（b）配列番号2に記載のポリペプチドであって、ここで配列番号2のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンと置換されている、ポリペプチド；

（c）配列番号3に記載のポリペプチド；および

（d）配列番号3に記載のポリペプチドであって、ここで配列番号3のアミノ酸312位のフェニルアラニンがリジンと置換されている、ポリペプチド

からなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【0459】

いくつかの実施形態では、当該非ヒト哺乳動物は、マウス、ラット、またはブタである。

【0460】

トランスジェニック動物（例えば、マウス、ラット、およびブタ）を作製する方法は当業者に周知であり、そして任意の方法が本発明において使用され得る。簡潔には、トランスジェニック哺乳動物は、例えば、ヒトRUP41 GPCRをコードするポリヌクレオチド（「トランスジーン」）で多能性幹細胞（例えばES細胞）をトランスクレクトすることにより、生成され得る。次いで、首尾よく形質転換されたES細胞を早期段階胚中に導入し得、次いで、この胚を同じ種の哺乳動物の子宮に移植する。特定の場合、形質転換された（「トランスジェニック」）細胞は、得られた動物の生殖細胞系の一部を含み、そ

10

20

30

40

50

して当該生殖細胞系においてトランスジェニック細胞を含む成体動物を他の動物に交配し得、それにより最終的にトランスジェニック動物を生じ、この動物は、細胞の各々中にトランスジーンを有し、それらの子孫の各々にトランスジーンを安定に伝達し得る。ポリヌクレオチドを導入する他の方法は、使用され得る。例えば、マイクロインジェクションを介してヒト R U P 4 1 G P C R をコードするポリヌクレオチドを受精卵または早期段階胚に導入する。あるいは、トランスジーンは、トランスジーンを含むレトロウイルスによる接合体の感染により、動物に導入され得る [Jaenisch, R., Proc Natl Acad Sci USA (1976) 73: 1260-4]。トランスジェニック哺乳動物を作製する方法は、例えば、以下に記載されている: Wall, J. Cell Biochem (1992) 49: 113-20; Hoganら, Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. (1986) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Costaら, FASEB J (1999) 13: 1762-73; WO 91/08216; 米国特許番号 4,736,866; および米国特許番号 6,504,080; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。

【0461】

いくつかの実施形態では、当該ヒト R U P 4 1 G P C R 発現は心筋細胞選択的である。いくつかの実施形態では、当該ヒト R U P 4 1 G P C R の当該心筋細胞選択的発現は、ミオシン重鎖プロモーターによって付与される [Subramaniam Aら, J Biol Chem (1991) 266: 24613-20; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。

【0462】

(実施例 21)

(心臓保護のトランスジェニックインビボ動物モデル)

本発明の化合物は、実施例 20 に記載のトランスジェニックインビボ動物モデルを用いて心臓保護について効力を有することが示され得る。いくつかの実施形態では、当該動物はマウス、ラット、またはブタである。

【0463】

当該化合物は、当該化合物を当該トランスジェニック動物に投与し、当該投与が、ビヒクルのみを投与した当該トランスジェニック動物に対して、実施例 18 のインビボラットモデルまたはそれに類似したマウスもしくはブタにおけるインビボモデルにおいて I S / A A R の減少を生じるかどうかを決定することにより、心臓保護についての効力について評価され得る。

【0464】

好ましい実施形態では、当該化合物は、本発明のモジュレーターである。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターは、cAMP の細胞内レベルを低下させる。いくつかの実施形態では、当該モジュレーターはアゴニストである。いくつかの実施形態では、当該化合物は、腹腔内注射によって投与される。好ましい用量は、0.1~100 mg / kg である。他の好ましい用量は、以下からなる群から選択される: 0.1 mg / kg, 0.3 mg / kg, 1.0 mg / kg, 3.0 mg / kg, 10 mg / kg, 30 mg / kg および 100 mg / kg。ビヒクルのみをプラセボ群に投与する。いくつかの実施形態では、当該用量が毎日投与される。いくつかの実施形態では、当該用量が、1週、2週、3週、および3週からなる群から選択される期間、投与される。この投与経路、これらの投薬量範囲、この用量投与頻度、およびこの用量投与期間は、本発明の例示であって限定ではないことが意図されることが留意される。

【0465】

(実施例 22)

(R U P 4 1 遺伝子のノックアウトを含むマウス / ラット / ブタ)

(マウス)

10

20

30

40

50

好ましいDNA構築物は、5'末端から3'末端に、以下を含む：(a)第一ヌクレオチド配列であって、これは、マウスRUP41ゲノム配列中に含まれる；(b)陽性選択マーカー（例えば、ネオマイシン耐性(neo)のマーカー）を含むヌクレオチド配列；および(c)第二ヌクレオチド配列であって、これは、マウスRUP41ゲノム配列中に含まれ、そして第一のマウスRUP41ヌクレオチド配列(a)の下流のゲノム上に位置する。マウスRUP41ゲノム配列は、当業者に周知の方法を用いて単離される(Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory；この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される)。マウスRUP41ゲノム配列の当該単離のためのプローブは、マウスRUP41ポリペプチドをコードするcDNAに由来し、ここで当該cDNAは、マウス心臓、肺、または脂肪組織由來のmRNAを鑄型として使用して得られ得る。

【0466】

好ましい実施形態では、このDNA構築物はまた陰性選択マーカーを含み、このマーカーは、ヌクレオチド配列(a)の上流または配列(c)の下流に位置する。好ましくは、この陰性選択マーカーは、チミジンキナーゼ(tk)遺伝子[Thomasら, Cell (1986) 44:419-28]、ハイグロマイシン遺伝子[Ter Rieleら, Nature (1990) 348:649-51]、hprt遺伝子[Van der Lugtら, Gene (1991) 105:263-7; Reidら, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:4299-4303]、またはジフテリア毒素Aフラグメント(Diphtheria toxin A fragment)(Dt-A)遺伝子[Nada et al., Cell (1993) 73:1125-35; Yagiら, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:9918-9922]を含み、これらの文献の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される。好ましくは、陽性(前出では「negative」ですが、この部分は「positive」です)選択マーカーは、マウスRUP41エキソン配列内に位置し、これによりマウスRUP41ポリペプチドをコードする配列を中断する。これらの置換ベクターは、例えば、以下により記載される: Thomasら, Cell (1986) 44:419-28; Thomasら, Cell (1987) 51:503-12; Mansourら, Nature (1988) 336:348-52; Kolleerら, Ann Rev Immunol (1992) 10:705-30; および米国特許番号5,631,153; これらの開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される。

【0467】

第一のヌクレオチド配列(a)および第二のヌクレオチド配列(c)は、マウスRUP41調節配列、イントロン配列、エキソン配列、または調節配列および/もしくはイントロン配列および/もしくはエキソン配列を含む配列内に無差別に(indiffrerently)位置し得る。ヌクレオチド配列(a)およびヌクレオチド配列(c)のサイズは、1~50kb、好ましくは1~10kb、より好ましくは2~6kb、および最も好ましくは2~4kbの範囲である。

【0468】

選択された遺伝子のノックアウトを含むマウスを製造する方法は、当業者に周知であり、そして広範な遺伝子を首尾よく不活性化するために使用してきた。

【0469】

(ラット)

ラットについての遺伝子ターゲティング技術は、マウスほど確固としたものではなく、活発な関心のある領域である。1つのアプローチは、ラット胚性幹細胞(ESc)様細胞においてラットRUP41遺伝子を不活性化し、次いで、不活性化したラットRUP41遺伝子を有する細胞を、二細胞胚の融合後に生じたラット胚盤胞に注入することである[Krivokarchenkoら, Mol Reprod Dev (2002) 61:

10

20

30

40

50

460-5]。

【0470】

ラット遺伝子は、配列番号6のラットRUP41ポリヌクレオチドを用いてストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でラットゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより同定する。全長または本質的に全長のラットRUP41cDNAを、同様の条件下でラット心臓または脳cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより同定する。ストリンジエントな核酸ハイブリダイゼーションの条件は当業者に周知である [Maniatis T, ら(1982) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York]。

10

【0471】

代替のアプローチは、ラットESC様細胞においてラットRUP41遺伝子を不活性化し、次いで不活性化したラットRUP41遺伝子を有するラットESC様細胞の核を脱核した卵母細胞に移入することである [Sato Kら, Hum Cell (2001) 14:301-4; WakayamaおよびYanagimachi, Semin Cell Dev Biol (1999) 10:253-8; HochdlingerおよびJaenisch, Nature (2002) 415:1035-8; Yanagimachi, Mol Cell Endocrinol (2002) 187:241-8; これらの開示内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される]。

20

【0472】

マウスについて記載の方法に類似または代替の方法 [また、例えば、以下を参照のこと: Zanら, Nature Biotechnology (2003) 21:645-51; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] は、RUP41遺伝子のノックアウトを含むラットを作製するために使用され得る。

20

【0473】

(ブタ)

類似または代替の方法が、RUP41遺伝子のノックアウトを含むブタを作製するために使用され得る [例えば、以下を参照のこと: Laiら, Science (2002) 295:1089-1092; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。

30

【0474】

Cre-LoxP系:

(RUP41遺伝子の心筋細胞選択的ノックアウトを含むマウス/ラット/ブタ)
(マウス)

これらの新規なDNA構築物は、P1相の部位特異的組換え系を使用する。P1相は、Creと呼ばれるリコンビナーゼを有し、これは、34塩基対のLoxP部位と相互作用する。LoxP部位は、8bp保存配列で分離される13bpの2つのパリンドローム配列で構成される [Hoess RHら, Nucleic Acids Res (1986) 14:2287-300; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。同一の向きを有する2つのLoxP部位間のCre酵素による組換えは、DNAフラグメントの欠失を生じる。

40

【0475】

相同組換え技術と合わせて使用されるCre-LoxP系は、最初にGuらによって記載されている [Gu Hら, Cell (1993) 73:1155-64; Gu Hら, Science (1994) 265:103-6; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。簡潔には、ゲノムの標的とした位置に挿入されるべき目的のヌクレオチド配列は、少なくとも2つのLoxP部位を有し、これは、同じ向きで、かつ組換えゲノムから切り出されるべきヌクレオチド配列のそれぞれの末端に位置する。この切り出し事象は、組換え細胞宿主の核内のリコンビナーゼ(Cre)酵素の存在を必要とする。リコンビナーゼ酵素は、(a)組換え細胞宿主を、この酵素を含む培養培地

50

中でインキュベートすること (Cre 酵素を直接所望の細胞に注入することにより (例えば、細胞への酵素のリポフェクションにより)) (例えば、Baubonis らに記載される通り [Baubonis W および Sauer B, Nucleic Acids Res (1993) 21: 2025-9; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]) ; (b) 組換え細胞宿主において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されたCreコード配列を含むベクターで細胞宿主をトランスフェクトすること (このプロモーターは必要に応じて誘導性であり、当該ベクターは組換え細胞宿主に導入される) (例えば、以下に記載される通り: Guら [Gu Hら, Cell (1993) 73: 1155-64; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] および Sauerら [Sauer B および Henderson N, Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85: 5166-70; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]) ; (c) 組換え細胞宿主において機能的であるプロモーターに作動可能に連結されたCreコード配列を含むポリヌクレオチドを、細胞宿主のゲノムに導入すること (このプロモーターは必要に応じて誘導性であり、そして当該ポリヌクレオチドは、ランダム挿入事象または相同組換え事象のいずれかによって細胞宿主のゲノム中に挿入される) (例えば、Guらに記載される通り [Gu Hら, Science (1994) 265: 103-6; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]) のいずれかにより、所望の時間でもたらされ得る。

10

20

30

40

【0476】

Cre-loxP系を用いるベクターおよび方法は、例えば、Zouら (1994); Minamisawa Sら, J Biol Chem (1999) 274: 10066-70; Chenら, J Biol Chem (1998) 273: 1252-6; Chenら, Development (1998) 125: 1943-9; (これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される) によって記載される。

【0477】

本発明の好ましい実施形態では、Creは、上記戦略(c)によって細胞宿主のゲノムに導入され、ここで当該プロモーターは心筋細胞選択性であり、そして (loxPを両側として; 「fl ox化した (fl oxed)」) マウス RUP41ゲノム配列の心筋細胞選択性の破壊を生じる。いくつかの実施形態では、当該心筋細胞選択性のプロモーターは、ミオシン軽鎖2 (m1c-2v) の心室特異的イソ型のものである [Minamisawa Sら, J Biol Chem (1999) 274: 10066-70; Chenら, J Biol Chem (1998) 273: 1252-6; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。内因性 m1c-2v 遺伝子座に Cre リコンビナーゼコード配列の挿入を含むトランスジェニックマウス (「m1e-2v cre ノックインマウス」) が記載されている [Chenら, Development (1998) 125: 1943-9; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。選択された遺伝子を fl ox 化する (fl oxing) 方法は、当業者の範囲内である [例えば、Chenら, Development (1998) 125: 1943-9 を参照のこと]。

【0478】

いくつかの実施形態では、本発明は、RUP41遺伝子の心筋細胞特異的ノックアウトを含むマウスを作製する方法であって、fl ox化した RUP41遺伝子と m1c-2cre 対立遺伝子 (前出) を交雑する工程を包含する、方法を特徴とする。

【0479】

RUP41遺伝子の心筋細胞選択性のノックアウトを含むマウスを作製する他の方法は、当業者に周知である; 例えば、以下を参照のこと: Kuhn R および Torres R M, Methods Mol Biol (2002) 180: 175-204; Sauer B, Methods (1998) 14: 381-92; Gutstein DEら, Circulation Research (2001) 88: 333; Minamisin

50

o Tら, Circulation Research (2001) 88: 587; および Bex Aら, J Urol (2002) 168: 2641 - 2644; これらの各々の開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される。

【0480】

(ラット)

類似または代替 [例えれば、以下を参照のこと : Zanら, Nature Biotechnology (2003) 21: 645 - 51 ; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] の方法が、RUP41 遺伝子の心筋細胞ノックアウトを含むラットを作製するために使用され得る。

【0481】

(ブタ)

類似または代替の方法が RUP41 遺伝子の心筋細胞選択的ノックアウトを含むブタを作製するために使用され得る [例えれば以下を参照のこと : Laiら, Science (2002) 295: 1089 - 1092 ; この開示内容は、本明細書によってその全体が参考として援用される] 。

【0482】

本出願を通して、種々の刊行物、特許、および公開特許出願を引用する。本出願で参照したこれらの刊行物、特許、および公開特許出願の開示内容は、本明細書によってその全体が本開示に参考として援用される。当業者の範囲内である、開示発明の改変および拡張は、上記開示および続く請求の範囲内に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0483】

【図1】例示のためであって限定ではないが、図1は、「標的レセプター」に対する候補化合物の一次スクリーンからの結果を示し、ここでこのレセプターは、内因性の構成的活性型Gs共役型GPCRのGs 融合タンパク質である。「化合物A」の結果は、ウェルA2に提供される。「化合物B」の結果は、ウェルG9に提供される。

【図2】A。マイクロアレイ分析を慣用の高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いてヒト組織サンプルで行った。このアレイは、RUP41の遺伝子発現レベルをモニタリングするプローブを含む。ヒストグラムは、プロファイリングした組織の各々におけるRUP41の二連測定の相対的発現レベル（平均差異）および標準誤差を示す。各組織は、そのそれぞれの棒線の上の縦書きの文言で表される。このヒストグラムプロットを調べると、ヒト脳および心臓においてRUP41が発現していることを示す。B。ヒト複組織ドットプロットは、成人および胎児の心臓組織におけるRUP41 mRNAの高レベル発現を実証する。RUP41 mRNA発現はまた、種々の局所脳組織において検出可能である。C。ヒト複組織ノーザンプロットは、心臓および脳におけるRUP41 mRNAの高レベル発現を実証する。

【図3】インサイチュハイブリダイゼーションは、成体ラット心臓におけるRUP41の広範な心筋発現を実証する。アンチセンスRUP41放射性標識プローブは、心臓の全室においてRUP41を検出する。アンチセンスコントロール (GAPDH) および心房特異的（心房ナトリウム利尿因子、ANF）プローブをさらなる切片で使用し、心臓切片のプローブ標識の特異性を実証した。

【図4】A. RT-PCRは、無血清条件下で24時間維持した新生児ラット心室筋細胞 (NRVM) におけるRUP41転写物の発現を実証する。RUP41転写物レベルは、フェニレフリン (PE) または新生児ウシ血清 (NCS) を培地に添加して24時間後に劇的に低下し、そしてこれは、肥大表現型に相關する。G3PDH PCR産物は、PCR反応のために使用される鋳型が等しいレベルであること、およびゲルローディングのコンシステムシーを実証する。B. ノーザンプロットは、肥大因子（フェニレフリン (PE) ）、ホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸 (PMA) 、プロスタグランジンF2 (PGF2) 、および新生児ウシ血清 (NCS) を含む）で24時間処理した後のNRVMにおけるRUP41 mRNA発現のレベルの減少を実証する。心房性ナトリウム利尿

10

20

30

40

50

因子(ANF)(これは、心筋細胞肥大の遺伝子マーカーである)は、全ての肥大刺激に応答してアップレギュレートされる。28S rRNAのメチレンブルー染色は、RNAの完全性および等しいローディングを実証する。

【図5】上。RUP41 mRNAは、圧負荷誘発性心肥大のインビボマウスモデルにおいてダウンレギュレートされる。7日間、横大動脈狭窄(transverse aortic constriction)に罹患したマウス(TAC)または偽手術マウス(偽)の左心室から単離した総RNAに対して、ノーザンプロット分析を実施した。ANF発現の増大は、TAC心臓における真の肥大応答の形成を実証する。28S rRNAのメチレンブルー染色は、RNAの完全性および等しいローディングを実証する。下。RUP41シグナルをデンシティメトリーで分析し、28S rRNAシグナルに対して標準化した。¹⁰*6つの偽サンプルおよび6つのTACサンプルのANOVA統計学的解析は、 $P < 0.00005$ でRUP41 mRNAの有意な減少を実証した。

【図6】ノーザンプロットは、RUP41 mRNAレベルが6時間、低酸素に罹患したNRVMから単離した総RNAにおいて減少することを実証する。RUP41 mRNAレベルは、低酸素後の24時間の再酸素化の後(H6/R24)に、コントロール(酸素正常状態)レベルに戻る。c-fos発現の増大(低酸素(Hypoxia)-6)は、低酸素状態に対する筋細胞ストレス応答を実証する。28S rRNAのメチレンブルー染色は、RNAの完全性および等しいローディングを実証する。

【図7】A。ヒト心臓から単離した総RNAに対して、RT-PCRを実施した。RUP41転写物レベルは、正常心機能(正常)を有する患者に比較して、鬱血性心不全(CHF)を有する患者由来のRNAで減少している。ヒトGAPDHプライマーを、鑄型濃度およびローディングコンシンテンシーについての内部コントロールとして各PCR反応に添加した。B。²⁰*ANOVA統計学的分析は、 $p < 0.05$ で正常に対してCHF患者においてRUP41転写物の有意な減少を実証する。心筋梗塞(MI)を有する患者におけるRUP41転写物レベルは、正常心臓と差異がない。

【図8】上。COS-7細胞を、pCMV-HARUP41(HA-RUP41)またはpCMV-HAバックボーン(CMV)、および構成的活性型Gs共役型甲状腺刺激ホルモンレセプター(pCMV-TSHR-A623I)で共トランスクレクトした。³⁰[HARUP41は、血球凝集素(HA)タグ化RUP41に相当する。]さらに、CRE-ルシフェラーゼレポーター構築物を共トランスクレクトし、百日咳毒素(PTX)の存在または不在下でcAMP活性化経路の活性を決定した。CART-TSHRおよびHARUP41を共発現する細胞におけるルシフェラーゼレポーター活性は、CART-TSHRおよびpCMV-HAコントロールを共発現する細胞における活性より低かった。このことは、RUP41がGiに結合していることを示唆する。PTX処理したRUP41によるcAMP減少の阻害は、このレセプターのGi結合を確証する。下。COS-7細胞を、百日咳毒素(PTX)の存在または不在下でpCMV-HA(CMV)またはpCMV-HARUP41(RUP41)構築物でトランスクレクトした。フォルスコリン(1uM)刺激によるcAMPレベルの増大は、RUP41の発現によって阻害された。PTX処理したRUP41によるcAMP減少の阻害は、このレセプターのGi結合を確証する。

【図9】A。NRVMを、一細胞当たりplaques形成単位(PFU)でのウイルス価により規定された種々の感染多重度のRUP41をコードする組換えアデノウイルス(AdRUP41)で処理した。アデノウイルス感染の24時間後、総RNAを単離し、ノーザンプロット分析を使用して、ウイルス発現RUP41のレベルを決定した。50PFU/細胞で、RUP41発現が検出可能であったが、高レベルの発現は、100PFU/細胞で示された。B。⁴⁰100PFU/細胞のAdRUP41で48時間感染したNRVMは、無血清培地中で細胞生存の増大を実証した。NRVMを、テキサスレッド結合体化ファロイジンおよびヘキスト33342で共染色した。

【図10】オリゴヌクレオソームDNAフラグメント化(oligonucleosomal DNA fragmentation)(aka ladder化(aka ladder

10

20

30

40

50

ing) の分析は、低酸素(8時間)後の再酸素化(24時間)が、100PFU/細胞でコントロール(AdGFP)アデノウイルスに感染したNRVM(H8/N24)においてアポトーシスの増大を刺激することを実証する。しかし、配列番号3のヒトRUP41ポリペプチドのアデノウイルス媒介過剰発現(100PFU/細胞)は、血清枯渇(normal)および低酸素後再酸素化(H8/N24)により誘発されるDNAフラグメント化のレベルを減少させる。

【図1】

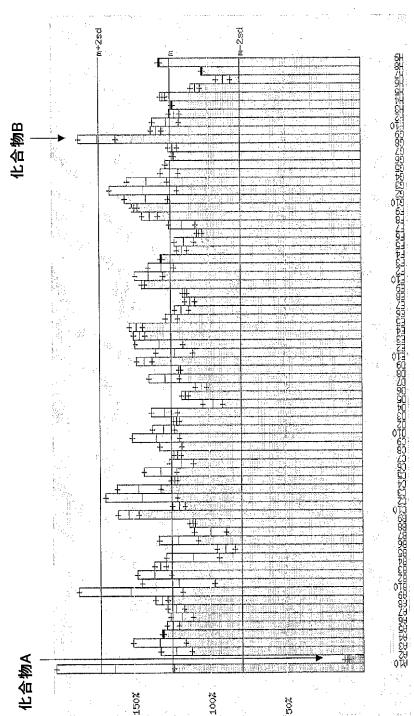
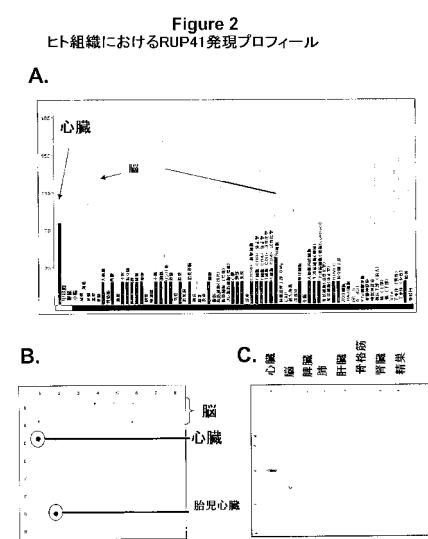


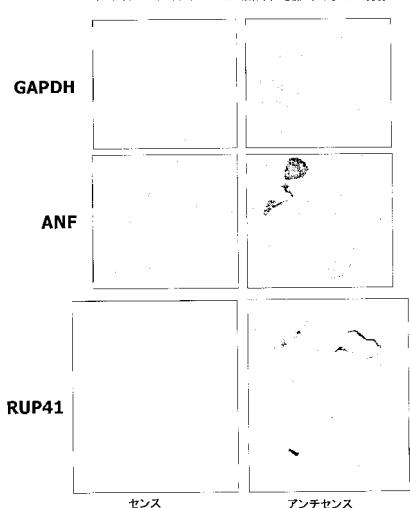
Figure 1

【図2】



【図3】

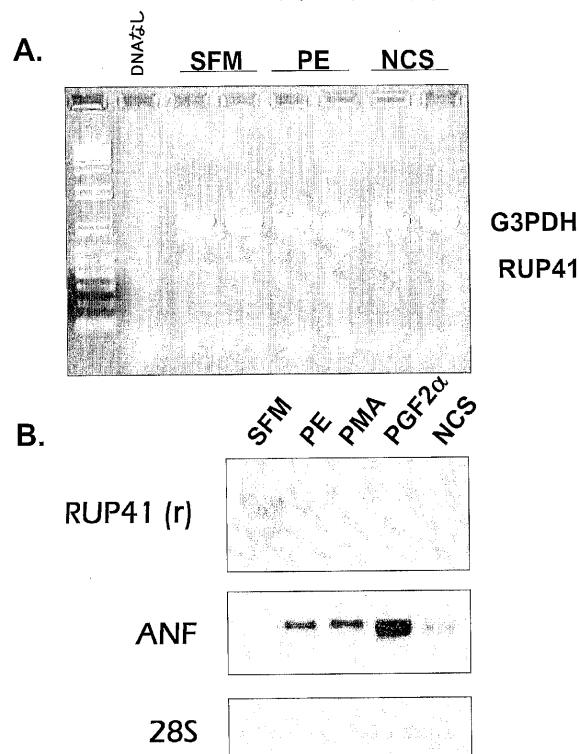
Figure 3.
インサイデュハイブリダイゼーション: 成体ラット心臓におけるRUP41発現



【 図 4 】

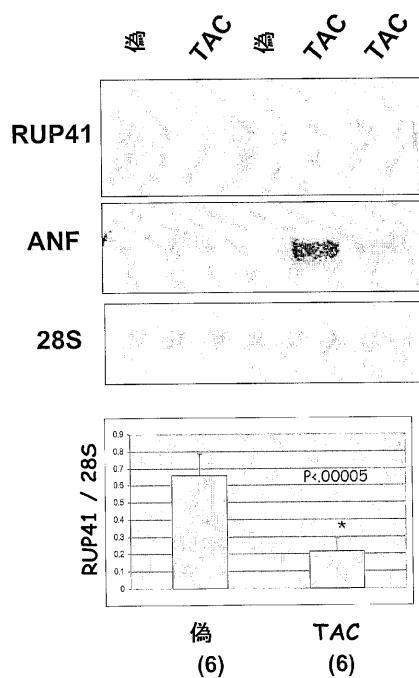
Figure 4. 肥大新生児ラット心室筋細胞における

RUP41のダウンレギュレーション



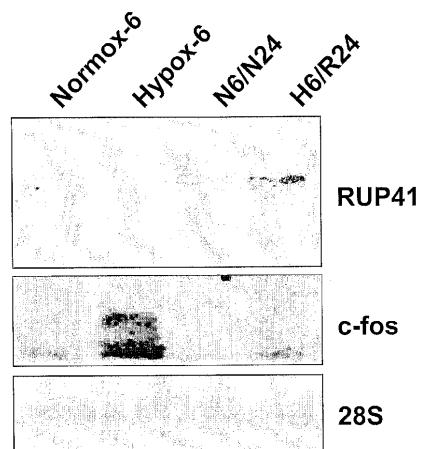
【図5】

Figure 5
圧負荷肥大に罹患したマウス心臓における
RUP41のダウンレギュレーション



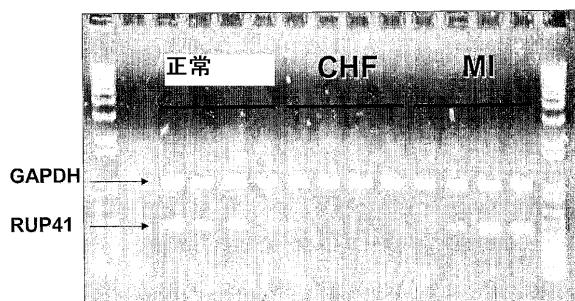
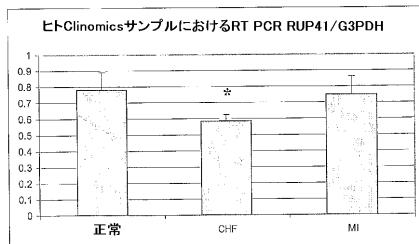
【 四 6 】

Figure 6. 低酸素に罹患したNRVMにおけるRUP41のダウンレギュレーション

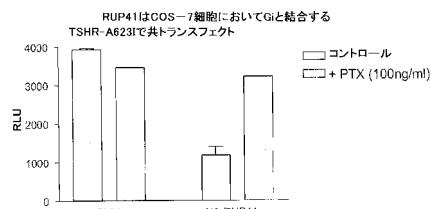


【図7】

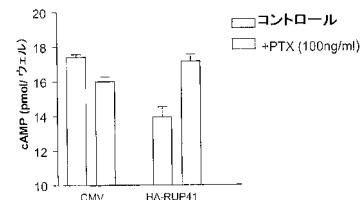
Figure 7.
うつ血性心不全を有するヒトにおけるRUP41のダウンレギュレーション

A.**B.**

【図8】

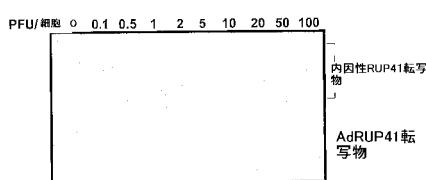
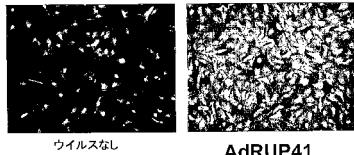
Figure 8

1 μM フォルスコリンにより刺激



【図9】

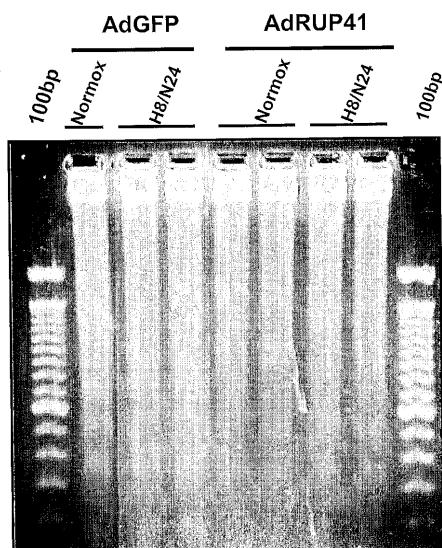
Figure 9
RUP41のアデノウイルス媒介過剰発現は
NRVMの生存を促進する

A.**B.**

【図10】

Figure 10

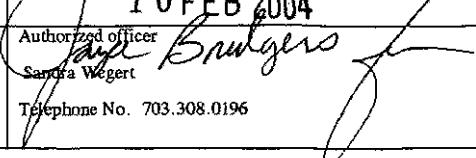
RUP41の過剰発現は低酸素／再酸素化誘発性アポトーシスからNRVMを救出する



【配列表】

2005534319000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/23296
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07K 14/00; C07H 21/04; G01N 33/53; C12Q 1/16; A01K 67/00 US CL : 530/350; 536/23.5; 435/7.1, 35; 436/501; 800/8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350; 536/23.5; 435/7.1, 35; 436/501; 800/8		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OKAZAKI et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. Nature. 05 December 2002, Vol. 420, No. 6915, pages 563-573, whole document.	1-13, 21-26, 35-54
A	Database NCBI on STN, AN AAB63815, GATTUNG, S. "The sequence of H. sapiens BAC clone CTB-20D2". [Putative G protein-coupled receptor [Homo sapiens]. 04 February 2000, NCBI protein database, pages 1-2, whole document.	1-13, 21-26, 35-49
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<input type="checkbox"/> Date of the actual completion of the international search 08 December 2003 (08.12.2003)		<input type="checkbox"/> Date of mailing of the international search report 10 FEB 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer  Sandra Wegert Telephone No. 703.308.0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/23296

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim Nos.: 14-20, 27-34, 55-60 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/23296

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Medline, Biosis, USPAT, EPO, Derwent. Search Terms: "RUP41", AAB63815, AC002381, His/Him receptor, congestive heart failure, cardiac hypertrophy volume hypoxia apoptosis, pressure-overload, allele* variant, SAPIENS, human, mus, mouse, combinations. STIC search SEQ ID NO: 2, 3 and 5. Inventors, PALM, EAST: Adams, J.W., Connolly, D.T.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
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 N 9/14	
C 1 2 N 9/14	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アダムス , ジョン ダブリュー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 9 , サン デイエゴ , ラモント ストリート 3
9 6 7 ナンバー 1

(72)発明者 コンノリー , ダニエル ティー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 8 , カールスバッド , サップファイアー ドライ
ブ 1 5 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA11 BA63 CA02 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
GA13 HA08
4B050 CC03 DD11 LL01
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ61 QQ62 QQ70 QQ89 QR72
QR77 QS28 QS36 QS39 QX07
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA44
4C084 AA17 ZA362 ZA372 ZA432 ZA542 ZB212 ZB222 ZC022 ZC192 ZC202
4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA40 DA50 DA89 EA23 FA74