(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4143118号
(P4143118)
(45)発行日　平成20年9月3日(2008.9.3)　(24)登録日　平成20年6月20日(2008.6.20)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| A61K 45/00 | (2006.01) | A61K | 45/00 | |
| A01K 67/027 | (2006.01) | A01K | 67/027 | |
| A61K 39/395 | (2006.01) | A61K | 39/395 | D |
| A61K 48/00 | (2006.01) | A61K | 48/00 | |
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | A |

請求項の数 2　(全 90 頁)

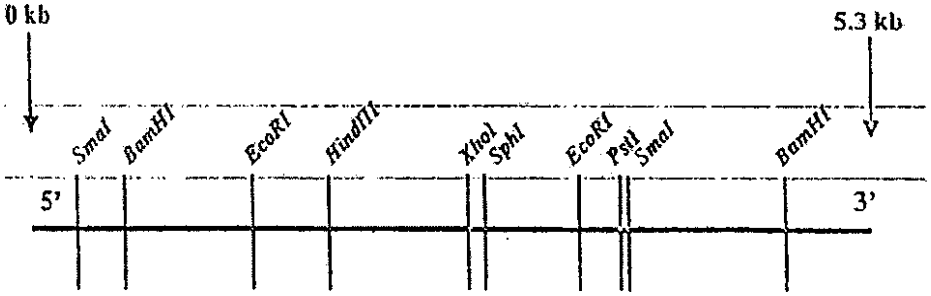
(21)出願番号　特願平6-509948
(86)(22)出願日　平成5年2月23日(1993.2.23)
(65)公表番号　特表平7-506380
(43)公表日　平成7年7月13日(1995.7.13)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/001642
(87)国際公開番号　WO1994/018959
(87)国際公開日　平成6年9月1日(1994.9.1)
審査請求日　平成12年2月23日(2000.2.23)
審判番号　不服2005-13703(P2005-13703/J1)
審判請求日　平成17年7月19日(2005.7.19)

(73)特許権者　505270980
ブリガム・アンド・ウイミンズ・ホスピタル・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　０２１１５　マサチューセッツ州、ボストン、フランシス・ストリート　７５番
(73)特許権者　505166351
エヌピーエス　ファーマシューティカルズ　インコーポレイテッド
ＮＰＳ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国０７９２１ニュージャージー州　ベッドミンスター、サード・フロアー、ヒルズ・ドライブ５５０番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カルシウム受容体活性化分子およびその関連物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ウシ上皮小体に由来し、アフリカツメガエル卵母細胞上で発現させたときにカルシウムレセプターとして機能することができる蛋白質をコードし、かつ以下の制限地図：




を有するｃＤＮＡ。
【請求項２】
受託番号ＡＴＣＣ７５４１６として寄託されているプラスミドpSPORT1に含まれるｃＤＮＡ挿入物の核酸配列を有する、請求項１記載のｃＤＮＡ。
【発明の詳細な説明】
発明の関連分野
この発明は、細胞上で細胞外のカルシウムイオンに類似する方法で作用し得る新規なカルシウム様（calcimimetic）分子の設計、開発、組成物および利用、細胞上で細胞外カルシ

ウムイオンの活性を妨害するカルシウム拮抗分子（calcilytic）、およびそれらの製造方法および同定に関する。
この発明はまた、無機－イオン受容体に関するもの、とりわけ、カルシウム受容体、そのような受容体をコード化する核酸、細胞、そのような核酸を含む組織および動物、受容体に対する抗体、受容体を利用するアッセイおよび上記のすべてに関する方法を含む、上記無機－イオン受容体にかかわる新規な関連物に関する。
発明の背景
以下の記載は本発明に関する開示の要約である。ここに記載した開示のいずれも、本発明の先行技術であることを認めるものではなく、また具体的または言外に引用された刊行物は本発明の先行文献であることを認めるものではない。
体内のある種の細胞は化学的信号に応答するばかりでなく、細胞外カルシウムイオン（$Ca^{2+}$）のようなイオンに対しても応答する。細胞外$Ca^{2+}$濃度（以下、［$Ca^{2+}$］という）における変化はこれらの細胞の機能的応答を変化させる。このような特定の細胞の１種は上皮小体ホルモン（ＰＴＨ）を分泌する上皮小体細胞である。ＰＴＨは、血中および細胞外液中の$Ca^{2+}$恒常性を制御する重要な内分泌因子である。
ＰＴＨは、骨および腎臓細胞に作用して、血中の$Ca^{2+}$濃度を増大させる。［$Ca^{2+}$］の増大は、ついで、ＰＴＨ分泌を抑制する負のフィードバック信号として働く。［$Ca^{2+}$］およびＰＴＨ分泌の相互関係は体内の$Ca^{2+}$恒常性を維持する重要な機構をなしている。細胞外$Ca^{2+}$は上皮小体細胞に直接作用し、ＰＴＨ分泌を制御する。［$Ca^{2+}$］中の変化を感知する上皮小体細胞表面蛋白質の存在が示唆されていた。この蛋白質は細胞外$Ca^{2+}$のための受容体（「$Ca^{2+}$受容体」）であり、［$Ca^{2+}$］の変化を感知し、機能的細胞応答を開始させるものと考えられる。例えば、細胞外$Ca^{2+}$受容体および細胞外$Ca^{2+}$の制御における、細胞外$Ca^{2+}$および細胞機能の役割についてはネメスら、１１セル・カルシウム３１９、１９９０に概説されている；小胞周縁および上皮小体細胞中の$Ca^{2+}$受容体の役割は、ネメスら、１１セル・カルシウム３２３、１９９０中で討論されている。骨の破骨細胞上の$Ca^{2+}$受容体の役割はザイジ、１０バイオサイエンス・リポート４９３、１９９０中で討論されている。
体内の他の細胞、具体的には、骨中の破骨細胞、腎臓中の糸球体近接および近位小管細胞、外皮のケラチノサイト、甲状腺の小胞周縁細胞、腸細胞、胎盤中の栄養膜細胞は、［$Ca^{2+}$］の変化を感知する能力を有している。細胞表面$Ca^{2+}$受容体はこれらの細胞上にも存在し、［$Ca^{2+}$］の変化に対する応答を開始または可能にする能力をこれらの細胞にも与えている。
上皮小体細胞、破骨細胞、小胞周縁細胞（Ｃ－細胞）、ケラチノサイト、糸球体近接細胞および栄養膜細胞において、［$Ca^{2+}$］の増大は細胞内遊離$Ca^{2+}$濃度（「$[Ca^{2+}]_i$」）の増大を生ぜしめる。この増大は、細胞外$Ca^{2+}$の流入によってか、または細胞内小管からの$Ca^{2+}$の移動によって生じ得る。$[Ca^{2+}]_i$の変化は、fura－２またはindo－１のような蛍光定量指示剤を用いて、容易に観測または定量される（モルキュラー・プローブス、ユージーン、ＯＲ）。$[Ca^{2+}]_i$の測定は、$Ca^{2+}$受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして働く分子の能力を評価するための測定法を提供する。
上皮小体細胞において、細胞外$Ca^{2+}$の濃度の増大は、$[Ca^{2+}]_i$の急速なかつ一時的な増大を生ぜしめ、つぎに、低いがなお持続的な$[Ca^{2+}]_i$の増大が続く。$[Ca^{2+}]_i$の一時的な増大は細胞内$Ca^{2+}$の移動から誘導されるが、一方、低い持続的な増大は細胞外$Ca^{2+}$の流入によってもたらされる。細胞内$Ca^{2+}$の移動の後、イノシトール－１，４，５－三リン酸（$IP_3$）およびジアシルグリセロールの生成が増大し、この２個の生化学的指示剤は種々の他の細胞中の細胞内$Ca^{2+}$の受容体－依存的移動に関連している。
$Ca^{2+}$に加えて、種々の他の２価および３価のカチオン、例えば、$Mg^{2+}$、$Sr^{2+}$、$Ba^{2+}$、$La^{2+}$および$Gd^{2+}$もまた、上皮小体細胞中の細胞内$Ca^{2+}$の移動を生ぜしめる。$Mg^{2+}$および$La^{2+}$もまた$IP_3$の生成を増大させる；すべてのこれらの無機化学的カチオンはＰＴＨの分泌を抑制する。上皮小体細胞上の仮定的$Ca^{2+}$受容体は、従って相手を選ばない。なぜなら、種々の細胞外の２価または３価のカチオンを感知するからである。

インビトロの細胞外$Ca^{2+}$に似た種々の化合物の性質が、ネメスら、（スペルミンおよびスペルミジン）「健常および疾患におけるカルシウム－結合蛋白質」、１９８７年、アカデミック・プレス、インコーポレーテッド、３３－３５頁；ブラウンら、（例えば、ネオマイシン）１２８「エンドクリノロジー」、３０４７、１９９１年；チャンら、（ジルチアゼムおよびその誘導体、ＴＡ－３０９０）、５ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ、５８１、１９９０年；およびザイジら、（ベラパミル）１６７バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション、８０７、１９９０年で検討されている。

ブラウンら、６ジャーナル・ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ、１１、１９９１年は、上皮小体細胞に対する$Ca^{2+}$イオンの効果に関する現在の理論を検討しており、下記のような、受容体様機構および受容体－非依存的機構の両方によって、結果を説明し得ると提案している：

多価カチオン（例えば、２価および３価のカチオン）は上皮小体機能に種々の作用、例えば、上皮小体ホルモン（ＰＴＨ）分泌およびｃＡＭＰ蓄積の阻害、イノシトールリン酸の蓄積の刺激および細胞質ゾル（サイトゾル）の（cytosolic）カルシウム濃度の上昇など、を及ぼす。これらの作用は「受容体様」機構によって伝達されると考えられる。２価および３価のカチオンによるアゴニスト－刺激ｃＡＭＰ蓄積の阻害は、例えば、百日咳トキシンとプレインキュベーションの後は阻止される。すなわち、推定的多価カチオン受容体は、阻害的グアニンヌクレオチド制御（Ｇ）蛋白質、$G_i$によってアデニル酸シクラーゼの阻害につながるものと考えられる。

本発明者らは、最近、多価カチオン抗生物質、ネオマイシン、が上皮小体機能の数種の性質において、２価および３価のカチオンと似た作用をすることを知った。これらの作用がこの試剤に特異的であるのか、または多価カチオンのさらに普遍化した作用を示すのかを知るために、塩基性の非常に高いペプチド、ポリアルギニンおよびポリリジンおよびプロタミンの分散雄牛上皮小体細胞中で同じパラメーターに対する作用を試験した。結果は、上皮小体細胞が、種々のポリカチオンおよび多価カチオンに、もしかすると同様の生化学的経路を経て応答することを示している。これらの結果を、最近主張されている、他の系でのポリカチオンによるＧ蛋白質の「受容体－非依存的」調節に関連して検討している。

＊　＊　＊

$Ca^{2+}$受容体は他のＧ蛋白質－結合受容体［例えば、糖蛋白質］に類似するものと見なされていたが、他の細胞型についての最近の研究では、ポリカチオンが他のまたは追加的機構によって細胞の機能を調整し得る可能性が出てきた。乳房細胞において、例えば、マストパラン、ハチ毒からのペプチド、４８／８０、合成ポリカチオンおよびポリリジンを含む、種々の両親媒性カチオンは、百日咳毒－感作機構によって分泌を増強され、Ｇ－蛋白質とのかかわりを示唆している。標準的な細胞表面受容体にこれらの様々な試剤を伝達するものはない。さらに、同じこれらの化合物が、溶液中または人工的なリン脂質小胞中で直接、精製Ｇ－蛋白質を活性化することが知られている。これらの知見に基づいて、両親媒性カチオンはＧ－蛋白質を活性化し、ついで、乳房細胞分泌を「受容体－非依存的」機構によって活性化すると提案されている。

ポリカチオンは、また酸性リン脂質と強く相互反応することが示されている。種々の長さの鎖状ポリリジン（２０－１０００個のアミノ酸）は人工的なリン脂質小胞と０．５ｎＭ～１．５μＭの範囲の解離定数で結合している。結合親和性は直接ポリリジン鎖の長さに関係し、１０００個のアミノ酸のポリマーは$K_d$０．５ｎＭであり、それより短いポリマーはより高い$K_d$値を有し、リジンは有意な程度に相互作用をしない。活性と鎖長の相関関係は上皮小体機能に対するポリリジン$_{10,200}$、ポリリジン$_{3800}$、およびリジンの効果について観察される相関関係に類似している。

ポリカチオンの生化学的膜への結合はそれらの生化学的作用をいくつか生じさせることができる。ある種の型の細胞中に、ポリカチオンを含む種々の細孔形成剤によって誘発された血漿膜の透過可能性が、ホスファチジルセリン様構造とのそれらの相互作用によって伝達されると主張されている。さらに、両親媒性カチオンによる精製Ｇ－蛋白質の「受容体

－非依存的」活性化は、これらの蛋白質がリン脂質小胞に組み込まれたとき強化される。カルシウムイオンはまた、ミリモル濃度の範囲で膜構造中に注目すべき変化を生じさせる。ある種の場合に、カルシウムは、膜脂質とポリカチオンの相互作用と拮抗、または増強のいずれもなし得る。これらの考察は、上皮小体細胞上の多価のカチオンおよびポリカチオンの両方の作用が、標準的な細胞表面Ｇ－蛋白質－結合受容体を必要としない受容体－非依存的機構を含む可能性を提起するものである。しかしながら、このまたは他の型の細胞による$Ca^{2+}$感作についての分子的原理を解明するにはさらなる研究が要求されている［引用文献省略］。

ショーバックおよびチャン（６（補追１）ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ、１９９１年、Ｓ１３５）およびラッケら、（６（補追１）ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ、１９９１年、Ｓ１１８）は$Ca^{2+}$受容体または$Ca^{2+}$センサーが上皮小体細胞中に存在することを示す言うべき実験を開示している。このような細胞から分離されたメッセンジャーＲＮＡは、卵母細胞中に発現され得、卵母細胞に$Ca^{2+}$受容体蛋白質の存在によって説明され得る表現型を与えさせ得る。

発明の概要

本発明者らは、今回、$Ca^{2+}$受容体蛋白質が、体内の$Ca^{2+}$代謝に関与するある特殊化した細胞を、細胞外$Ca^{2+}$の濃度の変化を感知させ、応答させ得ることを示した。これらの受容体はある一般的な特徴を有しながら、選択的に種々の薬理学的試剤によって影響され得る。下記に詳細に説明するように、ある種の分子が上皮小体細胞、破骨細胞およびＣ－細胞の$Ca^{2+}$受容体に選択的作用をもつことが確認された。

$Ca^{2+}$受容体は、細胞外$Ca^{2+}$の作用に、類似する（「カルシウム様物質（calciumimetics）」）か、または拮抗する（「カルシウム拮抗物質（calcilytics）」）新規な種類の分子のための別個の分子標的を構成する。この受容体は細胞表面に存在し、細胞外$Ca^{2+}$に対して低い親和性を有する（みかけの$K_d$は、一般に約０．５ｍＭより大である）。この受容体は、クーパー、ブルームおよびロス、バイオロジカル・ベイシス・オブ・ニューロファーマコロジー、第４章によって定義された、遊離また結合エフェクター機構を含み得る。すなわち、この受容体は、細胞内$Ca^{2+}$受容体、例えば、カルモデュリンおよびトロポニン類とは異なる。カルシウム様物質とは、例えば、$Ca^{2+}$受容体に選択的に作用し、上皮小体細胞または破骨細胞の機能を直接的または間接的に抑制し、Ｃ－細胞の機能を刺激するものである。本発明のカルシウム様物質およびカルシウム拮抗物質は、上皮小体亢進症、骨粗しょう症および他の$Ca^{2+}$関連疾患の新しい治療を可能にするものである。一つの態様において、この治療は、［$Ca^{2+}$］の変化を感知し、応答するこれら３種および他の種類の細胞のそれぞれの$Ca^{2+}$受容体を標的にするものである。

本発明は、上皮小体細胞中の$Ca^{2+}$受容体蛋白質を最初に示したものであり、Ｃ－細胞および破骨細胞などの他の細胞中の$Ca^{2+}$受容体とを薬理学的に最初に差別化したものである。本発明はまた、これらの$Ca^{2+}$受容体に効果を有する分子を、同定可能にし、$Ca^{2+}$に活性である有効なカルシウム様物質またはカルシウム拮抗物質の発見、開発、設計、修飾および／または構築における主導的分子として用い得る方法を開示する最初のものである。このカルシウム様物質およびカルシウム拮抗物質は、例えば、ホルモン、酵素または成長因子などのポリペプチド、１種またはそれ以上の$Ca^{2+}$受容体に活性であることによって制御されまたは影響される、それらの出現および／または放出などの１種またはそれ以上の成分の正常でない濃度を特徴とする種々の疾病状態の処置に有効である。さらに、種々の型の細胞における種々の$Ca^{2+}$受容体の同定および種々の主導的分子に対する特定受容体に対する特定の応答は、当該$Ca^{2+}$受容体における作用によって、影響される特定の疾患の処置に活性な特定分子の設計および構築を可能にするものである。例えば上皮小体ホルモン分泌の異常度は、他の$Ca^{2+}$制御ホルモンなどの分泌の程度に影響を与えることなく、この特定分子によって影響され得る。

この主導的分子の同定は、活性分子の発見のための効率の高いスクリーニング法、および有効な薬剤候補を設計するための組織的なデータベースを、先行技術が欠いていたため妨げられていた。これらの障害は上皮小体細胞$Ca^{2+}$受容体および機能的関連受容体をクロ

ーニングすることによって、また、今や、このようにクローニングされたＣａ$^{2+}$受容体および機能的関連受容体を活性化するある主導的分子の構造的特徴を組織的に試験することによって取り除かれた。Ｃａ$^{2+}$受容体のクローニングはまた、天然生成物または分子ライブラリーおよび合成分子の高効率スクリーニングに適当な形質転換セルラインの開発を可能にする。これは、下記に論じる構造的－活性研究とともに、新規なカルシウム様物質およびカルシウム拮抗物質を開発するのに必要な技術を提供するものである。

本発明はこのような操作を可能にするものである。牡牛上皮小体細胞カルシウム受容体ｃＤＮＡがクローン化され、ＡＴＣＣに、受託番号ＡＴＣＣ７５４１６として寄託されている。このクローンを用いて、他の組織および同種類における無機－イオン受容体が容易に得られる。例えば、ひと上皮小体細胞Ｃａ$^{2+}$受容体ｃＤＮＡは、アフリカツメガエル（Xenopus）卵母細胞における核酸ライブラリーをスクリーニングすることによってまたは機能的発現についてクリーニングすることによってクローン化され得、またＣａ$^{2+}$受容体に活性における活性に必要な有機分子の構造的特徴は選択された天然生成物または他の分子ライブラリーの試験およびその後の構造的活性試験によって決定される。

すなわち、第一の態様は、本発明は細胞中の［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の増大を生じさせることによって、細胞外Ｃａ$^{2+}$の活性に類似するか、または細胞外Ｃａ$^{2+}$によって誘発される［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の増大を妨害するかのいずれかである分子を含む医薬的組成物を特徴とする。分子は５μｍより小さいか、それに等しいＥＤ$_{50}$を有し、プロタミンではない。

「類似する」とは、分子が、細胞外Ｃａ$^{2+}$応答可能細胞に対して、細胞外Ｃａ$^{2+}$の１種またはそれ以上の特定の作用を有することをいう。この述語は、細胞外Ｃａ$^{2+}$の生物学的機能のすべてが類似していることを要求するものではなく、このような機能の少なくとも１種が類似していればよい。さらに、分子が細胞外Ｃａ$^{2+}$受容体が結合しているＣａ$^{2+}$受容体の同じ部位に結合する必要もない（例えば、下記の実施例２０中の新規化合物ＮＰＳ４６７およびその作用参照）。「妨害する」とは、Ｃａ$^{2+}$のこのような作用の１種が分子によって減じるか、または妨げられることをいう。ＥＤ$_{50}$は下記の試験法によって測定され、その際、類似作用が測定され、最大類似効果の半分だけ類似している分子の濃度がＥＤ$_{50}$である。逆に、カルシウム拮抗物質のＩＣ$_{50}$は最大活性の半分だけ妨害する量である。好ましくは、この試験は［Ｃａ$^{2+}$］$_i$増大を測定し、下記の方法によって、Ｃａ$^{2+}$受容体に特異的であること、すなわち、それらの均等物であることを確認するものである。

好ましい具体例において、ここに記載の生物検定法は、細胞中の［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の増大が一時的であり、１分より短い時間持続し、［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の増大が急速であり、３０秒以内に発生し；分子がまた、（ａ）［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の持続的な増大（３０秒より長く）を生じさせ、（ｂ）イノシトール-１,４,５－三リン酸および／またはジアシルグリセロール濃度の増大を、例えば、６０秒内に、生じさせ、（ｃ）ドーパミン－またはイソプレテレノール－刺激サイクリックＡＭＰ形成を阻害する。さらに、［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の一時的な増大は、１０分間、１０ｍＭフッ化ナトリウムで細胞を前処理することによって阻止されるか、または一時的な増大は、プロテインキナーゼＣ、例えばホルボル・ミリスタート・アセタート（ＰＭＡ）、メゼレインまたは（－）インドラクタムＶなどの活性化剤で簡単な前処理（１０分間より短い）によって減少させることができる。

上皮小体細胞において、上記の試験法のすべてにおいて、活性である分子は、特に本発明において有効である。それらの分子の作用が当該細胞のＣａ$^{2+}$受容体に対して特異的であるからでる。これは、特に上記のＰＭＡ前処理については真実である。

さらに、好ましい具体例において、細胞が上皮小体細胞であり、分子が細胞からの上皮小体ホルモン分泌を阻害するものである；他の好ましい具体例は、遠位小管腎臓細胞、厚いヘレンわなの上行肢および／または集合管の細胞、表皮のケラチノサイト、甲状腺（Ｃ－細胞）中の小胞周縁細胞、腸管細胞、胎盤中の栄養膜細胞、血小板、血管平滑筋細胞、心臓心房細胞、ガストリンおよびグルカゴン分泌細胞、腎臓糸球体細胞および乳房細胞からのｍＲＮＡで注入されたアフリカツメガエル卵母細胞中のＣｌ$^-$コンダクタンスの増大を誘発する分子を含む。

別の好ましい具体例において、分子が細胞内Ｃａ$^{2+}$の移動を生じさせ、［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の増

大を起こさせる；細胞がＣ－細胞または破骨細胞であり、分子はインビボでの骨吸収を阻害する；細胞が破骨細胞であり、分子がインビトロで骨吸収を阻害する；または細胞がＣ－細胞であり、インビトロまたはインビボでのカルシトニン分泌を刺激する；最も好ましくは、分子が、$Ca^{2+}$受容体の５μＭ以下、さらに好ましくは１μＭでの$EC_{50}$または$IC_{50}$が１００ｎモル、１０ｎモルまたは１ｎモル以上である。このような低い$EC_{50}$または$IC_{50}$は、治療または診断のためにインビボまたはインビトロで用いられる分子がより低い濃度であることを可能にするから有利である。このような低い$EC_{50}$および$IC_{50}$の分子の発見は同じく強力かつ効果的な分子の設計および合成を可能にする。

「カルシウム様」分子とは、細胞外$Ca^{2+}$の１種またはそれ以上の活性を有し、好ましくは、$Ca^{2+}$受容体における$Ca^{2+}$の活性に類似していることをいう。例えば、上皮小体細胞に関して用いられる場合は、上皮小体細胞で試験したとき、インビトロで、当業者に周知の技術によって測定された下記の１種またはそれ以上、好ましくは全ての特徴を有している分子である：

１．分子が、１μＭの$La^{3+}$または$Gd^{3+}$による阻害に対して無反応性である$[Ca^{2+}]_i$において急速（ピークまでの時間＜５秒）かつ一時的な増大を生じさせる。$[Ca^{2+}]_i$の増大は細胞外$Ca^{2+}$の不存在下で持続するが、（細胞外$Ca^{2+}$の不存在下）イオノマイシンでの前処理によって阻止される；

２．分子は細胞外$Ca^{2+}$の最大値以下の（submaximal）濃度によって誘発される$[Ca^{2+}]_i$を増大を促進する。

３．細胞外$Ca^{2+}$によって生じる$[Ca^{2+}]_i$はジヒトロピリジンにより阻害されない；

４．分子によって生じる$[Ca^{2+}]_i$の増大は１０分間、フッ化ナトリウム１０μＭでの前処理によって阻止される；

５．分子によって生じる$[Ca^{2+}]_i$の一時的な増大は、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）の活性化剤、例えばホルボル・ミリスタート・アセタート（ＰＭＡ）、メゼレインまたは（－）インドラクタムＶなどでの前処理によって減少させることができる。

プロテイン・キナーゼＣ活性化剤の総体的効果は、最大応答に影響を与えることなく、分子の濃度－応答曲線を右にずらすことである；

６．分子は、イノシトール－１，４，５－三リン酸および／またはジアシルグリセロールの生成の急速な（＜５秒）増大を生ぜしめる；

７．分子は、ドーパミン－またはイソプロテレノール－刺激サイクリックＡＭＰ形成を阻害する；

８．分子は、ＰＴＨ分泌を阻害する；

９．百日咳トキシン（100ng/ml、＞４時間）での前処理は、サイクリックＡＭＰ形成における分子の阻害効果を妨害するが、$[Ca^{2+}]_i$、イノシトール－１，４，５－三リン酸またはジアシルグリセロールの増大およびＰＴＨ分泌の減少に影響を与えない；

１０．分子は、例えば雄牛またはひと上皮小体細胞からのポリ（Ａ）$^+$に富むｍＲＮＡで注入されたアフリカツメガエル卵母細胞中の$Cl^-$コンダクタンスの増大で検出されたように、$[Ca^{2+}]_i$の増大を誘発するが、水またはラット脳または肝臓ｍＲＮＡで注入されたアフリカツメガエル卵母細胞では影響を与えない；

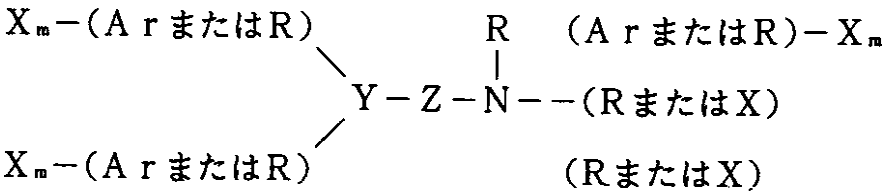
１１．同様に、上皮小体細胞からのクローン化受容体を用いて、受容体をコード化する特定のｃＤＮＡまたはｍＲＮＡ分子または合成センスＲＮＡ（ｃＲＮＡ）で導入されたアフリカツメガエル卵母細胞の応答を誘発する。

「カルシウム拮抗」分子とは、好ましくは、$Ca^{2+}$受容体に拮抗剤として作用することによって、細胞外$Ca^{2+}$－感作細胞の細胞外$Ca^{2+}$の１種またはそれ以上の活性を妨害することを意味する。例えば、上皮小体細胞に関して用いる場合、インビトロで上皮小体細胞を試験した場合、分子は当業者に周知の技術で測定された下記の特徴の１種またはそれ以上、好ましくはすべてを有する：

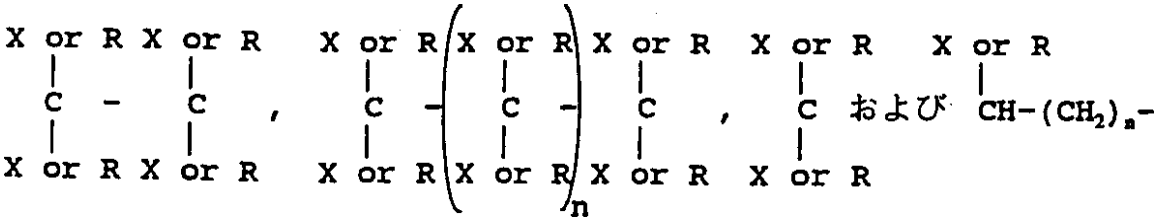
１．分子は、部分的または完全のいずれかで、増大した細胞外$Ca^{2+}$濃度の能力を下記のものを妨げる：

ａ）$[Ca^{2+}]$の増大、

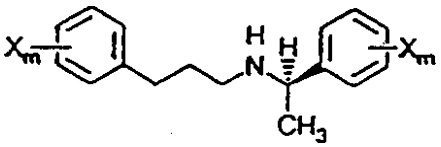
ｂ）細胞内$Ｃａ^{2+}$の移動、
ｃ）イノシトール－１，４，５－三リン酸の生成の増大、
ｄ）ドーパミン－またはイソプロテレノール－刺激サイクリックＡＭＰ形成の減少、
ｅ）ＰＴＨ分泌の阻害；
２．低$［Ｃａ^{2+}］_{i}$で、すなわち、０．５ｍＭで、分子、それ自体は$［Ｃａ^{2+}］_{i}$を変化させない；
３．分子は、細胞外$Ｃａ^{2+}$またはカルシウム拮抗化合物によって誘発される、雄牛またはひと上皮小体細胞からのポリ（Ａ）$^{+}$－ｍＲＮＡで導入されたアフリカツメガエル卵母細胞中の$Ｃｌ^{-}$コンダクタンスの増大を妨げるが、水またはラット脳または肝臓ｍＲＮＡで導入されたアフリカツメガエル卵母細胞では妨げない；
４．同様に、上皮小体細胞からのクローン化受容体を用いて、$Ｃａ^{2+}$受容体をコード化する特定のｃＤＮＡまたはｍＲＮＡ分子で導入されたアフリカツメガエル卵母細胞の応答を妨げる。
他の型の細胞の$Ｃａ^{2+}$受容体における有効なカルシウム様物質およびカルシウム拮抗物質の平行的定義は、下記の実施例から明白である。
$Ｃａ^{2+}$受容体はある種の無機ポリカチオンおよびポリカチオン有機分子を感知し、応答し得る。例えば、上皮小体細胞は、これらの有機ポリカチオンの添加と細胞外$Ｃａ^{2+}$濃度の増大を区別することができない。おそらく、これらの有機分子が$Ｃａ^{2+}$受容体に細胞外$Ｃａ^{2+}$のように作用するからである。本発明のカルシウム様物質は、$Ｃａ^{2+}$受容体の特別良好なアゴニストであり、選択された細胞の機能、例えば、上皮小体細胞からのＰＴＨの分泌を変化させる薬剤として用いることができる。$Ｃａ^{2+}$とは異なり、これらの分子の多くは、すべてではないが、１種またはそれ以上の$Ｃａ^{2+}$受容体に作用し、すなわち、具体的に１種の$Ｃａ^{2+}$受容体を標的とする能力を有する。
これらの分子は、例えば上皮小体亢進症、骨粗しょう症、パジット病、高血圧、腎臓病、皮膚病、心臓血管系疾患、内分泌系疾患、水分代謝の異常および癌など、$［Ｃａ^{2+}］_{i}$および$Ｃａ^{2+}$が役割を担う種々の疾患の処置に有効なさらに新規な治療の開発のための主導的構造を有する。
カルシウム様物質およびカルシウム拮抗物質は、患者に投与することによって、患者の細胞外遊離$Ｃａ^{2+}$の濃度を制御し、上述の群から選択される細胞に対する細胞外$Ｃａ^{2+}$効果に似せるのに有効であるような医薬組成物として処方され得る。本発明前に、$Ｃａ^{2+}$受容体の操作または制御における異常によって生じる疾患または正常な$Ｃａ^{2+}$受容体を有するが当該$Ｃａ^{2+}$受容体を活性化または不活性化することによって処置され得ない動物の疾患の処置に有効である、$Ｃａ^{2+}$受容体に作用するこのような分子は知られていなかった。
さらに、他の好ましい具体例において、上皮小体細胞、骨の破骨細胞、糸球体近接腎臓細胞、近位小管腎臓細胞、遠位小管腎臓細胞、厚いヘレンわなの上行肢および／または集合管の細胞、表皮のケラチノサイト、甲状腺（Ｃ－細胞）中の小胞周縁細胞、腸管細胞、胎盤中の栄養膜細胞、血小板、血管平滑筋細胞、心臓心房細胞、ガストリンおよびグルカゴン分泌細胞、腎臓糸球体細胞および乳房細胞からなる群から選ばれる、すべてではないが、１種またはそれ以上の細胞に、５μＭ以下の$ＥＤ_{50}$を有する。
本発明で特に有用である分子の作用の明確化は、特定のインビトロまたはインビボの治療および診断および別のカルシウム様物質またはカルシウム拮抗物質の発見を可能にする。
好ましい具体例において、この分子は、生理学的ｐＨが陽性に荷電しており、分枝状または環状ポリアミン、陽性荷電ポリアミノ酸およびアリールアルキルアミンからなる群から選ばれる。例えば、分枝状ポリアミンは、式：$Ｈ_{2}Ｎ－（ＣＨ_{2}）_{j}－（ＮＲ_{i}－（ＣＨ_{2}）_{j}）_{k}－ＮＨ_{2}$（式中、ｋは１～１０の整数であり、各ｊは、同一または異なって、２～１０の整数であり、各$Ｒ_{i}$は、同一または異なって、水素および$－（ＣＨ_{2}）_{j}－ＮＨ_{2}$からなる群から選ばれ、ただし、ｊは上記の意味であり、少なくとも１個の$Ｒ_{i}$は水素でない）を有する。
別の具体例において、分子は、式



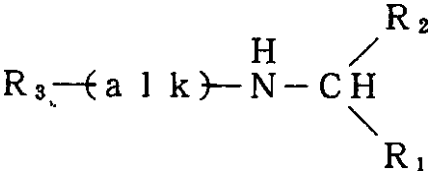
〔式中、Ｘはそれぞれ独立して、Ｈ、$CH_3$、$CH_3O$、$CH_3CH_2O$、Ｂｒ、Ｃｌ、Ｆ、$CF_3$、$CHF_2$、$CH_2F$、$CF_3O$、$CH_3S$、ＯＨ、$CH_2OH$、$CONH_2$、ＣＮ、$NO_2$および$CH_3CH_2$からなる群から選択され；Ａｒは疎水性物質であり；Ｒはそれぞれ独立して水素、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、インデニル、インダニル、ジヒドロインドリル、チオジヒドロインドリル、２－、３－または４－ピペリジ（ニ）ルからなる群から選択され；ＹはＣＨ、窒素および不飽和炭素からなる群から選択され；Ｚは酸素、窒素、硫黄、



（式中、ｎはそれぞれ独立して１から４まで、およびｍはそれぞれ独立して０から５までである）
からなる群から選択される〕
で示される。最も好ましくは、分子は、カルシウム様またはカルシウム拮抗物質のいずれかである。
好ましい具体例において、疎水性物質は、フェニル、２－、３－または４－ピリジル、１－または２－ナフチル、１－または２－キノリニル、２－または３－インドリル、ベンジルおよびフェノキシからなる群から選択される；分子は、Ｒ－ジフェニルプロピル－α－フェネチルアミン誘導体、および分子が、式：



（Ｘは、好ましくは、それぞれ独立してＣｌ、Ｆ、$CF_3$、$CH_3$および$CH_3O$からなる群から選択される）
である。
本発明の好ましい態様において、式：



〔式中、ａｌｋは、１から６個の炭素原子からなる直鎖または分枝鎖アルキレンであり；$R_1$は、１から３個の炭素原子からなる低級アルキルまたは１から７個のハロゲン原子で置換された１から３個の炭素原子からなる低級ハロアルキルであり；$R_2$および$R_3$は、独立して炭素環状アリールまたはシクロアルキル基から選択され、単環または二環のいずれかであり、所望により、独立して、１から３個の炭素原子からなる低級アルキル、１から７個のハロゲン原子で置換された１から３個の炭素原子からなる低級ハロアルキル、１から３個の炭素原子からなる低級アルコキシ、ハロゲン、ニトロ、アミノ、アルキルアミノ、アミド、１から３個の炭素原子からなる低級アルキルアミド、シアノ、ヒドロキシ、２から４個の炭素原子からなるアシル、１から３個の炭素原子からなる低級ヒドロキシアル

キルまたは１から３個の炭素原子からなる低級チオアルキルから選択される、１から５個の置換基で置換されていてもよい５－または６－員環である〕
で示される新規フェニル－α－フェネチルアミン同族体および誘導体を提供する。好ましい炭素環状アリール基は、１個または２個の環をもち、少なくともそのうちの１つが芳香族特性をもち、フェニルのような炭素環状アリール基およびナフチルのような２環式炭素環状アリール基を含む。上記の式から明らかなように、そこに含まれる化合物は、ラセミ体混合物としておよび個々の立体異性体として存在し得る。特に好ましいのはＲ－フェニルプロピル－α－フェネチルアミン誘導体であり、それは血清中イオン化カルシウム低下の促進活性を示すと信じられている。
好ましい化合物はａｌｋがｎ－プロピレンであるものを含む。$R_1$がメチルである化合物もまた好ましい。$R_2$および$R_3$が所望により置換されていてもよいフェニルである化合物もまた好ましい。
特に好ましい化合物は、$R_2$がモノ置換フェニル、さらに好ましくはメタ－置換フェニルであるものを含む。特に好ましい$R_3$基は、非置換または一置換、好ましくはオルト－置換フェニルを含む。$R_2$の好ましい置換基は、ハロゲン、ハロアルキル、好ましくはトリハロメチルおよびアルコキシ、好ましくはメトキシを含む。$R_3$の好ましい置換基はハロゲン、より好ましくは塩素を含む。
２番目に関連のある態様において、本発明は、１種またはそれ以上の細胞または血液中または血漿中または細胞外体液中の正常でない［$Ca^{2+}$］または［$Ca^{2+}$］$_i$により特徴付けられる疾患または症状である患者を処置するための方法を特徴とする。この方法は、患者に治療的有効量の、細胞内の［$Ca^{2+}$］$_i$の上昇により生起される細胞外$Ca^{2+}$の活性に類似するか、または細胞外$Ca^{2+}$により誘導される［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を妨害するのいずれかである１種またはそれ以上の分子を投与する工程を含む。
「正常でない」とは、患者が一般の集団と比較して異なった$Ca^{2+}$代謝産物をもち、それは血中または細胞外体液中の１種またはそれ以上の蛋白質（例えばホルモン類）、または細胞外および／または細胞内$Ca^{2+}$の濃度に影響を及ぼす他の分子により影響を受けている。すなわち、本疾患は、上皮小体機能亢進症、骨粗鬆症およびミネラル関連疾患等（例えば、“ハリソンズ・プリンシパルズ・オブ・インターナル・メディシン”のような標準的医学書に記載）を含む。このような疾患は、本発明において、１個またはそれ以上の$Ca^{2+}$の効果に類似するまたは妨害し、それによって、直接または間接的に患者の体内の蛋白質または他の分子の濃度に影響を与える分子により処置される。
「治療的有効量」とは、患者の疾患または症状の１種またはそれ以上の症状をある程度まで軽減する量を意味する。さらに、「治療的有効量」とは、疾患または状態に関連するまたは原因となる生理学的または生化学的パラメーターを、部分的または完全に正常に戻す量を意味する。一般に、分子の約１nmolから１μmolの間の量であり、その$EC_{50}$および患者の年令、体重および疾患に依存する。
好ましい具体例において、分子は５μＭより小さいか、それに等しい$EC_{50}$を有し、プロタミンではなく；最も好ましくは、$Ca^{2+}$受容体にカルシウム様またはカルシウム拮抗物質として相互作用する。最も好ましくは、分子は上記の１つから選択される。
他の好ましい具体例において、患者は、１個またはそれ以上の成分の異常な濃度を特徴とする疾患に罹患し、その濃度は１個またはそれ以上の$Ca^{2+}$受容体の活性により制御されまたは影響を受け、分子は上皮小体細胞、骨中の破骨細胞、腎臓中の糸球体近接細胞、腎臓中の近位小管細胞、遠位小管腎臓細胞、厚いヘレンわなの上行肢および／または集合管の細胞、表皮のケラチノサイト、甲状腺（Ｃ－細胞）中の小胞周縁細胞、腸管細胞、胎盤中の栄養膜細胞、血小板、血管平滑筋細胞、心臓心房細胞、ガストリンおよびグルカゴン分泌細胞、腎臓糸球体細胞および乳房細胞からなる群から選択された細胞の$Ca^{2+}$受容体に活性である。
更に他の好ましい具体例において、分子は、患者の血漿中の上皮小体ホルモンの濃度を、例えば正常の個人で見られる濃度までか、または血漿$Ca^{2+}$の減少の原因となるのに充分な程度まで減少させ；この分子は患者に治療的に適当な効果をもつのに十分な程度で提供

される。
第３の態様において、本発明は、患者の１個またはそれ以上のＣａ$^{2+}$受容体の数および／または位置（および／または機能的完全性）の同定、およびその疾患または症状としての指数数および／または位置（および／または機能的完全性）と健常者で観察されるものとの比較による患者の疾患または病気の診断の方法を特徴とする。
好ましい具体例において、本方法は、Ｃａ$^{2+}$受容体に対する抗体をＣａ$^{2+}$受容体の数および／または位置および／または機能的完全性を測定するのに使用する免疫測定法であり、または測定法は、Ｃａ$^{2+}$受容体に結合する標識カルシウム様またはカルシウム拮抗分子の提供を含み；診断される疾患は癌、例えば上皮小体異所性癌、または骨の破骨細胞中の数が上記の正常レベルであることまたは骨の破骨細胞での活性の程度の増大を特徴とする症状である。
第４の態様において、本発明は、治療的分子として有用な分子を同定するための方法を特徴とする。本方法は、細胞内で細胞外Ｃａ$^{2+}$の活性に類似した能力をもつか、または細胞外Ｃａ$^{2+}$により誘導される［Ｃａ$^{2+}$］$_{i}$の増加を妨害する能力のいずれかに潜在的に有効な分子のスクリーニング、および分子が５μＭより小さいかそれに等しいＥＣ$_{50}$またはＩＣ$_{50}$を有するか否かの測定を含む。
他の態様において、本発明は組み換えＣａ$^{2+}$受容体、組み換えＣａ$^{2+}$受容体を含む細胞、Ｃａ$^{2+}$受容体をコード化する精製核酸、生物学的活性および分子ＮＰＳ０１９の使用、ＮＰＳ４５９、ＮＰＳ４６７、ＮＰＳ５５１およびＮＰＳ５６８（Ｆｉｇ.３６参照）を材料とする新規化合物または組成物および、例えば組み換えＣａ$^{2+}$受容体の使用による、最初のＣａ$^{2+}$受容体であるが２番目ではない受容体でＣａ$^{2+}$の１個またはそれ以上の活性に類似または妨害する分子を同定することによる有用なカルシウム様またはカルシウム拮抗分子の同定方法を特徴とする。
他の態様において、腎臓からの組み換えＣａ$^{2+}$受容体を含む細胞が、ひとに腎毒性を生ぜしめるカルシウム受容体における活性について抗生物質類（例えば、アミノグリコシド抗生物質類）をスクリーニングする試験法として採用される。
「組み換え体」とは、組み換えＤＮＡ技術により製造される、天然に存在するＣａ$^{2+}$受容体からその位置、純度または構造のいずれかにより区別されるような任意のＣａ$^{2+}$受容体を含むという意味である。一般に、このような受容体は通常天然に観察されるのと異なった量で細胞に存在する。
「精製」とは、抗体または核酸が天然に存在する抗体または核酸と区別され、天然に見い出される抗体または核酸から分離され、例えばベクター系において、組み換えＣａ$^{2+}$受容体発現に使用されることを意味する。好ましくは、抗体または核酸は標準技術により均質調製物として提供される。
このようなクローン化受容体は、所望の細胞中で発現され得、構造決定のために単離され結晶化され得る。このような構造は、Ｃａ$^{2+}$受容体に結合できる本発明の有用な分子の設計を可能にする。さらに、このような受容体の同等物が、他の細胞、ｃＤＮＡまたはゲノム性ライブラリーのクローンのために、最初のクローンをプローブとして使用してクローン化され得る。
クローン化受容体のための抗体は単離でき、本発明の治療剤として、またはＣａ$^{2+}$－関連疾病または症状の診断のためのＣａ$^{2+}$受容体の数および／または位置および／または機能的完全性を測定するための診断用手段として使用できる。このような抗体はカルシウム様またはカルシウム拮抗物質として静脈内投与することによりまたイン・ビボで使用できる。
すなわち、一般に、本発明は、上皮小体細胞、骨中の破骨細胞、腎臓中の糸球体近接細胞、腎臓中の近位小管細胞、遠位小管細胞、ヘンレのループにおける厚上昇肢および／または回収管、表皮のケラチノサイト、甲状腺の小胞周縁細胞（Ｃ－細胞）、腸細胞、胎盤中の栄養膜細胞、血小板、血管平滑筋、心臓心房細胞、ガストリンおよびグルカゴン分泌細胞、腎臓脈管膜細胞および乳房細胞からなる群から選択された、全てではないが１個またはそれ以上の細胞のＣａ$^{2+}$受容体において選択的アゴニストまたはアンタゴニストのいず

れかとして作用することができるカルシウム様またはカルシウム拮抗物質を特徴とする。このような組成物は、医薬組成物を提供するために当分野の技術者に公知の任意の薬理学的に許容可能な担体を含み得る。

本発明は、また、疾病状体の治療法として、標準技術、例えばアンチセンスおよび関連技術（例えば、リボザイム類）による患者のＣａ$^{2+}$受容体の数の調整を特徴とする。

本発明は、以下に明らかにするように、カルシウム様物質及び／又はカルシウム拮抗物質を検出する検出法を用いてCa$^{2+}$レセプターの活性に影響を及ぼす分子を確認する方法を提供する。さらに検出法又は抗体又は以下に記載される他の技術の使用により転写又は翻訳レベルでCa$^{2+}$レセプターの発現を減少又は増加するのに効果があると見られる分子を治療用途用に定義できる。

先の抄約は一般にカルシウムレセプターに関する好ましい実施態様に大きく関連した。さらにその見地では、本発明は新規超科のポリペプチド受容体／センサー分子に関する。本明細書に開示され、正規に寄託されたｃＤＮＡクローン、ＢｏＰＣａＲ１は本超科のメンバーである受容体／センサーをコード化することを記載した最初のそのようなクローンを示す。本発明の目的のために、本超科に属する受容体／センサーを無機イオン受容体と称する。

新規超科の無機イオン受容体は、類似のアミノ酸配列により、構造により及び／又は作用により互いに関係する種々のそのような分子を含む。全体に、これらも又、本分野で一般に知られた全ての受容体／センサーからの本超科の受容体の顕著なメンバーに帰する。本超科の受容体のメンバーは、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム又は水素イオン等の無機カチオンのレベルの変化を検知し、又、応答し、そしてそのようなイオンを感知して、細胞作用の変化を引き出しうるそれらの驚くべき能力により本質的に機能的に区別される。そのような変化は、既知Ｇ－蛋白結合受容体に現れるような第二メッセンジャーレベルの変化又はイオン膜内外イオン流量の変化を含みうる。本超科のメンバーは、又、無機アニオン、例えばリン酸又は塩化物イオンを感知するものもある。そのような全ての受容体は本明細書に記載された本発明の範囲内にある。さらに、超科の無機イオン受容体に属する受容体／センサーの全ての分離された天然に生じた又は合成したリガンドは本発明の範囲内にある。別の局面で、本発明は無機イオン受容体の何らかのそのような天然又は合成リガンドの治療用途を特徴とする。

超科の無機イオン受容体に属する受容体がリガンド結合以外の刺激により活性化されうることは本発明の次の局面である。例えば本超科の受容体の幾つかのメンバーは、物理的因子、例えばそのような受容体を発現する細胞の膜に作用するストレッチ因子により活性化する。そのような全ての受容体は本発明の範囲内にある。

無機イオン受容体は、好ましい受容体を関連する上記したような方法に用いることができる。ヒト組織型を含む種々の組織型に発現した組換え受容体は、当業者に既知の方法で医薬発見をスクリーンする（高効率スクリーンを含む）のに用いることができる。イオン様分子及びイオン拮抗分子は容易に確認できる。方法は受容体の個々の作用に適応できる。例えばカルシウム活性塩化物流は、カルシウムチャンネルを形成する、又は細胞内カルシウムを中性化する無機イオン受容体と利用しうる。リガンドゲートイオンチャンネルは当分野で知られている。二次メッセンジャー系に結合する無機イオン受容体は、サイクリックＡＭＰ及びイノシトールリン酸の測定を含む上記したような検定を可能にする。容易に検定可能な試薬に結合した組換え受容体を有する細胞は、又、文献に記載されるようにメラニン細胞中の色素懸濁液に対する受容体のＧ－蛋白カップリングに用いうる。従って、本発明は無機イオン受容体様分子又は拮抗分子、並びに上で詳細に記載した様分子及び拮抗分子から好ましく選択されたものを含む、そのような様分子及び拮抗分子自体である試薬を発見する方法を十分可能にする。同様に本発明は好ましい実施態様に関連した、上記のような無機イオン受容体関連疾病又は状態の診断及び処置を含む。例えば無機イオン受容体の上昇したレベルに関係した疾病は、そのような上昇したレベルの検定に基づいて診断できる。治療分子は関連した自生イオンの活性をミミックする、又は関連する自生イオンの効力又は能力を修飾する試薬をスクリーニングすることにより確認できる。組織特異

発現及び発現レベルは、評価などできる。
従って、本発明の本局面では、新規超科の分離された無機イオン受容体が提供され、又、その独特な断片も提供される。好ましくは、分離された受容体はヒト受容体であり、最も好ましくは分離された受容体は、上皮小体、血管、腎臓、表皮小体、甲状腺、破骨細胞、腸、乳房、栄養膜、血小板、ガストリン分泌腺、心臓及び脳並びにこれらの独特の断片からなる群から選択された組織又は細胞中に発現したカルシウム受容体である。さらに本発明は、望ましい活性を有する先の無機イオン受容体のポリペプチド断細を特徴づける。例えば、断片は正に結合部位或はミミック、アゴニスト又は拮抗物質に結合する部位を含む。他の有用な断片は受容体の外側の蛋白、膜拡張（spanning）蛋白又は細胞内蛋白のみを有するものを含む。さらに、これらの断片は以下にさらに詳細に記載されるように、他の受容体の断片とキメラ受容体を形成するのに有用である。本発明は、又、分離された受容体のムテイン又は同族体又は他の誘導体を特徴づける。従って、本発明は自然に生じる蛋白だけでなくその誘導体をも含む。
本発明は、又、先の無機イオン受容体並びにその断片及び誘導体をコード化するヌクレオチド配列を特徴づける。そのようなヌクレオチド配列は種々の方法を経て得られ、そして本発明の開示は当業者がそのような受容体をコード化するｃＤＮＡ又は遺伝クローンを得ることを可能にする。例えばハイブリダイゼーションプローブは、ＢｏＰＣａＲ１のヌクレオチド配列を基に作りうる。何らかのゲノムライブラリィ又はｃＤＮＡライブラリィがそのようなプローブによって低い厳格さでスクリーンされると、超科の他のメンバーをコード化するハイブリダイゼーションプローブが得られる。さらに、クローン又は分離無機イオン受容体に結合する抗体を容易に調製できる。そのような抗体は、又、当業者によって既知の発現クローニング技術により本発明の他の受容体を分離するのに用いうる。標的遺伝子移動（walking）も、超科の無機イオン受容体のメンバーを確認しクローンするのに適用しうる。さらに、クローンは上記したように発現クローニング方法により得られうる。これらの方法は、問題の無機イオン受容体の個々の作用に適応できる。例えば、カルシウム活性塩化物流もカルシウムチャンネルを形成するか又は細胞内カルシウムを可動性にする無機イオン受容体のクローニングに適用しうる。上記したようにリガンドゲートイオンチャンネルは当分野で既知である。例えば、セロトニンゲートイオンチャンネルはこの方法でクローンされて来た。しかしながら、本発明の受容体は、それらのアミノ酸配列で、及びそれらが無機イオン、例えばカルシウム、マグネシウム、水素イオン、リン酸イオン等を感知することで他の既知のリガンドゲートイオンチャンネルと全く異なる。
この方法で得られた各クローン受容体が、新規なそのようなＤＮＡ又はそれ自体が無機イオン受容体をコード化する依然として付加的なクローンを確認するのに用いられる抗体プローブを提供することも当業者により評価されよう。さらに、上で概略述べたような受容体の一以上の配列を得ると、情報が超科の他のメンバーをコード化する依然付加的なクローンを得るのに有用である局在配列保存に関連することが可能であることが評価されるであろう。そのような保存配列は、又、ＢｏＰＣａＲ１の全体構造の分析が細胞外ドメイン、膜内外ドメイン及び細胞内ドメインを便利に含むので、それから誘導されうる。
従って、分離された核酸クローン化無機イオン受容体及びその特異な断片が提供される。好ましい受容体は上記した群から選択された組織及び細胞で発現されるカルシウム受容体である。より好ましくは、核酸がヒト無機イオン受容体又はその特異断片をコード化する。本発明は、さらに前述の無機イオン受容体の発現を調節する内因性調整要素を提供し、又、これらの調整要素の活性を作動し（agonizing）又は拮抗することが可能である試薬も確認しうる。
本発明は、さらに本発明の核酸を発現する組換え細胞を提供する。そのような細胞では、核酸はそのゲノム調整要素の調節下にありうるか又は外因性プロモーターを含む外因性調整要素下にありうる。「外因性」とは、それは無機イオン受容体のコード配列にインビボで転写的に通常結合しないプロモーターを意味する。
前述の無機イオン受容体に対する精製抗体並びにそのような受容体のアロステリック部位及びそのような受容体のイデイオタイプに対する抗体が提供される。

毒素に結合した試薬を結合する無機イオン受容体も提供される。そのような試薬は抗体であり得、例えば免疫毒素である。そのような免疫毒素は、例えばインビトロ又はインビボで無機イオン受容体を発現する細胞を死滅するのに用いうる。
さらに本発明は、無機イオン受容体又はその特異断片をコード化するトランスジーンを含むトランスジェニック非ヒト動物を提供する。そのようなトランスジーンは無機イオン受容体の発現に影響したり又は変化させるのに、或は例えば同種組換えにより無機イオン受容体の発現を不活性化するのに有用でありうる。他のトランスジーンは、アンチセンス又は天然無機イオン受容体遺伝子の発現を変化させることができる蛋白をコード化するものを含む、そのような哺乳動物中に提供しうる。そのような変化は上調節（up-regulation）、下調節（down-regulation）又は完全不活性化でありうる。
従って、無機イオン受容体の発現に影響を与える目的で、細胞を細胞成分に結合する試薬と接触させることを含む方法を提供する。そのような試薬は、プロモーター、プロモーター上で作用する他の調整試薬、受容体に結合する能力を有する試薬及び受容体又はその特異断片をコード化する核酸に結合しうる。
本発明の他の特徴及び利点は、その好ましい実施態様の以下の記載から及び請求の範囲から明らかであろう。
好ましい実施態様の記載
図面をまず簡単に説明する。
図面
図１は本発明において有用な代表分子を描く。
図２は、キン－２－又はフラ－２－を与えたウシ上皮小体細胞の細胞外$Ca^{2+}$により誘導される［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を示すグラフ表現である。開始［$Ca^{2+}$］は０．５mM（$CaCl_2$使用）で、矢印の各々で０．５mM増加で増加した。
図３は、ウシ上皮体細胞での［$Ca^{2+}$］$_i$の移動を示すグラフ表現である。開始［$Ca^{2+}$］は０．５mMで、示されるようにＥＧＴＡの添加により＜１μＭまで減少した。(a)細胞外$Mg^{2+}$（８mM、最終）は細胞外$Ca^{2+}$の不存在で［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を惹起する。（b）イノマイシン（１μＭ）による前処理は$Mg^{2+}$への反応をブロックする。（c）５μＭ分子１７９９（ミトコンドリア脱共役剤）による前処理は、$Mg^{2+}$への反応に効果がない。
図４は、［$Ca^{2+}$］$_i$の定常状態増加への低濃度の$Gd^{3+}$の選択的阻止効果、及び高濃度の$Gd^{3+}$がウシ上皮小体細胞において［$Ca^{2+}$］$_i$の一時的増加を惹起することを示すグラフ表現である。上部パネル：コントロール。細胞外$Ca^{2+}$の開始濃度は０．５mMで、矢じり形の各々で０．５mM増加した。中央パネル：$Gd^{3+}$（５μＭ）は定常状態でブロックするが、細胞外$Ca^{2+}$により惹起される［$Ca^{2+}$］$_i$の一時間増加をブロックしない。下部パネル：$Gd^{3+}$（５０μＭ）は［$Ca^{2+}$］$_i$の一時的増加を惹起し、細胞外$Ca^{2+}$への一時的及び持続反応を終わらせる。中央及び下部パネルにおいて、ちょうど十分なＥＧＴＡを加えて選択的に$Gd^{3+}$をキレートした。$Ca^{2+}$流入のブロックを除き［$Ca^{2+}$］$_i$は急速に上昇する。
図５は、［$Ca^{2+}$］$_i$、$IP_3$形成及びＰＴＨ分泌へのＰＭＡの効果は細胞外$Ca^{2+}$の濃度を増すことにより阻止されることを示すグラフ表現である。各変数について、細胞外$Ca^{2+}$についての濃度一反応曲線で右へのシフトがある。又、濃度一反応曲線が［$Ca^{2+}$］が直線状に増加するとＳ字状に変化することにも注意されたい。
図６は、ウシ上皮小体細胞においてスペルミンにより惹起される［$Ca^{2+}$］$_i$の増加が［$Ca^{2+}$］を増すことにより徐々に弱まることを示すグラフ表現である。スペルミン（２００μＭ）は矢じり形で示される時間に添加した。本及び以下の図面において、図形に付されている数字は、nMでの［$Ca^{2+}$］$_i$である。
図７は、スペルミンがウシ上皮小体細胞の細胞内$Ca^{2+}$を移動することを示すグラフ表現である。示されるように（左図形）、スペルミン（２００μＭ）の添加前にＥＧＴＡを加えて［$Ca^{2+}$］を＜１μＭに減じた。イオノマイシン（１μＭ）による前処理はスペルミンへの反応をブロックする（右図形）。
図８Ａ及びＢは、スペルミンが細胞外$Ca^{2+}$と同様に［$Ca^{2+}$］$_i$を増加しウシ上皮小体細

胞でのＰＴＨ分泌を阻害することを示すグラフ表現である。スペルミン用量－濃度反応曲線についてのデータ点は２つの実験の平均である。
図９は、細胞外$Ca^{2+}$への反応に対する、及び上皮小細胞のＡＴＰγＳへの反応に対するＰＭＡの対照的に示す効果を示すグラフ表現である。左パネル：サイクリックＡＭＰ形成の細胞外$Ca^{2+}$－誘発阻止についての濃度－反応曲線はＰＭＡ（１００nM）により右にシフトする。中央パネル：ＰＭＡは、ＡＴＰγＳの$[Ca^{2+}]_i$を増加する能力に影響を及ぼさない。ＡＴＰγＳに対する濃度－反応曲線が、対数濃度の関数として、細胞外二価カチオンと対照的に古典的Ｓ字状動きを示すことにも注意されたい。
図１０は、細胞外$Mg^{2+}$により引き出されるヒト上皮小体細胞の細胞内$Ca^{2+}$の移動を示すグラフ表現である。細胞はアデノーマから得て、０.５mM細胞外$Ca^{2+}$を含む緩衝液中に入れた。（a）細胞外$Mg^{2+}$（１０mM、最終）により惹起される$[Ca^{2+}]_i$の一時的及び維持続増加は、持続増加がニモジピン（１μＭ）により影響されないが$La^{3+}$（１μＭ）により減少し、$La^{3+}$を低濃度のＥＧＴＡにより選択的にキレート化すると速やかに元にもどることを示す。（b）$La^{3+}$（１μＭ）は、維持続増加をブロックするが細胞外$Mg^{2+}$により惹起される$[Ca^{2+}]_i$の一時的増加をブロックしない。（c）細胞外$Mg^{2+}$により惹起されるサイトゾル$Ca^{2+}$一過性は細胞外$Ca^{2+}$の不存在で持続する。
図１１は、ウシ上皮小体細胞中、ネオマイシン又はプロタミンにより引き出される細胞内$Ca^{2+}$の移動を示すグラフ表現である。全ての図形で、開始$[Ca^{2+}]$及び$[Mg^{2+}]$はそれぞれ０.５及び１mMであった。図形（a）及び（b）において、$Ca^{2+}$及び$Mg^{2+}$濃度は、それぞれ０.５及び１mMから２及び８mMに増加した。他の図形において、（c）ないし（i）は、ネオマイシンＢ（３０μＭ）又はプロタミン（１ug／ml）を示すように加えた。$La^{3+}$（１μＭ）、ＥＧＴＡ（１mM）又はイオマイシン（１００nM）を示すように加えた。各図形は、少なくとも３つの異なる細胞調製品を用いる５又はそれ以上の試験で見られるパターンの代表である。バー＝１分。
図１２は、ウシ上皮小体細胞においてネオマイシンＢが一過性をブロックするが細胞外$Ca^{2+}$により惹起される$[Ca^{2+}]_i$の定常状態増加をブロックしないことを示すグラフ表現である。左コントロール：$[Ca^{2+}]$は開始が０.５mMでネオマイシンＢ（３０μＭ）の添加前に各用いた矢じり形で０.５mM増加にて増した。右：ネオマイシンＢ（３０μＭ）を$[Ca^{2+}]$前に加えた。バー＝１分。
図１３は、ウシ上皮小体細胞においてネオマイシンＢ又はプロタミンが$[Ca^{2+}]_i$の増加を誘引する濃度でＰＴＨ分泌を阻害することを示すグラフ表現である。細胞は示される濃度の有機ポリカチオンと３０分間インキュベートした。中空の印：コントロールは０.５（円）又は２mM（ひし形）の細胞外$Ca^{2+}$の存在でＰＴＨ分泌に反応する。$[Ca^{2+}]_i$の値はひし形印である。ウシ細胞をプロタミンによる実験に用い、ヒト（アデノーマ）上皮小体細胞をネオマイシンＢによる実験に用いた。各点は３回の実験の平均±ＳＥＭである。
図１４は、ウシ上皮小体細胞においてスペルミンにより惹起されるサイトゾル$Ca^{2+}$一過性へのＰＭＡの選択的阻害効果を示すグラフ表現である。開始$[Ca^{2+}]$は０.５mMであった；スペルミン（２００μＭ）又はＡＴＰ（５０μＭ）は示されるように加えた。バー＝１分。
図１５は、ウシ上皮小体細胞においてＰＭＡが$[Ca^{2+}]_i$の細胞外$Ca^{2+}$－及びネオマイシンＢ－誘発増加についての濃度－反応曲線を右にシフトすることを示すグラフ表現である。細胞は、$[Ca^{2+}]$増加前、又は示されるようにネオマイシンＢを添加する前に１分間ＰＭＡで前処理した。各点は３ないし５回実験の平均±ＳＥＭである。
図１６は、ＰＭＡがＰＴＨ分泌の細胞外$Ca^{2+}$－及びスペルミン－誘発阻害についての濃度－反応曲線を右にシフトすることを示すグラフ表現である。細胞は、１００nM ＰＭＡの存在下（黒ぬり円）又は不存在下（中空円）に３０分間示された$[Ca^{2+}]$及びスペルミンとインキュベートした。各点は、３回の実験の平均±ＳＥＭである。
図１７は、ウシ上皮小体細胞においてプロタミンがイノシトールリン酸エステルの形成を増幅することを示すグラフ表現である。上皮小体細胞は４uCi／ml $^3$Ｈ－myo－イノシト

ールを含む培養培地中、一液インキュベートし、洗浄し、示される濃度のプロタミンと３７℃でインキュベートした。３０秒後、$CHCl_3$：MeOH：HClの添加により反応を停止させ、$IP_1$（円）及び$IP_3$（三角形）をアニオン交換クロマトグラフィにより分離した。

図１８は、ウシ上皮小体細胞においてＰＭＡが細胞外$Ca^{2+}$又はスペルミンにより引き出される$IP_1$の形成を減ずることを示すグラフ表現である。$^3$Ｈ－myo－イノシトール－標識細胞は、反応を停止し、アニオン交換クロマトグラフィにより$IP_1$を分離する前に、３０秒間示された［$Ca^{2+}$］又はスペルミンに暴露した。ハッチ（hatched）カラム：細胞は［$Ca^{2+}$］増加又はスペルミン添加前、５分間ＰＭＡ（１００nM）で前処理した。各値は、それぞれ３回実施した２つの実験の平均である。

図１９は、ヒト（アデノーマ）上皮小体細胞でのネオマイシンＢにより惹起される［$Ca^{2+}$］$_i$の一時的及び持続増加を示すグラフ表現である。［$Ca^{2+}$］は０．５mMであった。（ａ）ネオマイシンＢ（１０μM）により惹起される［$Ca^{2+}$］$_i$の持続増加は$La^{3+}$により減じた。（ｂ）ネオマイシンＢにより引き出される［$Ca^{2+}$］$_i$の一時的増加は$La^{3+}$により影響されなかった。（ｃ）［$Ca^{2+}$］$_i$の一時的増加は細胞外$Ca^{2+}$の不存在で持続した。

図２０は、ネオマイシンＢが$Ca^{2+}$レセプターを発現するアフリカツメガエル卵母細胞で振動増幅$Cl^-$電流を誘引することを示すグラフ表現である。卵母細胞から上部図形、ヒト（増殖性）上皮小体細胞ポリ（Ａ）$^+$－ｍＲＮＡ注射後３日。卵母細胞から下部図形、水注射。ネオマイシンＢは５つの水注射卵母細胞で反応を惹起せず、カルバコールは示されるように反応を惹起した。両図形で、保有電位は－７６mVであった。

図２１は、ネオマイシンＢがＣ－細胞で基本又は誘引増加に影響しないことを示すグラフ表現である。コントロール、左図形：フラ－２－を与えたｒＭＴＣ６－２３細胞は、［$Ca^{2+}$］を３mMに増加する前に、１mM$Ca^{2+}$を含む緩衝液にまず浸漬した。右図形：５mMネオマイシンＢによる前処理。

図２２は、細胞外$Ca^{2+}$がラット破骨細胞で［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を誘引することを示すグラフ表現である。インド－１を与え、示された［$Ca^{2+}$］を含む緩衝液で示された時間（バー）過融解した単一ラット破骨細胞でのミクロ蛍光定量。正常緩衝液は、バーの間で過融解し、１mM $Ca^{2+}$を含有した。

図２３は、スペルミン又はネオマイシンＢがラット破骨細胞で［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を誘引しないことを示すグラフ表現である。インド－１－を与えた破骨細胞は示された濃度のスペルミン又はネオマイシンＢ（中空バー）のみで又は２０mM $Ca^{2+}$と共に（黒ぬりバー）過融解した。

図２４は、ウシ上皮小体細胞での［$Ca^{2+}$］$_i$へのアルギオトキシン（図でアルギオピンとして示す、構造も図１に示す）６５９及びアルギオトキシン６３６の特異的効果を示すグラフ表現である。開始［$Ca^{2+}$］は０．５mMで、示されたところで（右図形）１．５mMに増加した。示されたところでアルギオトキシン６５９（３μM）又はアルギオトキシン６３６（４００μM）を加えた。

図２５は、細胞外$Mg^{2+}$又は$Gd^{3+}$がウシ上皮小体細胞ポリ（Ａ）$^+$－ｍＲＮＡを注射したアフリカツメガエル卵母細胞での$Cl^-$電流を振動増幅することを示すグラフ表現である。図形（ａ）において、細胞外$Ca^{2+}$の濃度は＜１μMで、図形（ｂ）では０．７mMであった。図形（ｃ）は、物質Ｋとの過融解は反応を誘引するけれども、細胞外$Mg^{2+}$は、物質Ｋレセプターに対し、ｍＲＮＡだけを注射した卵母細胞で反応を惹起しないことを示す。保有電位は－７０ないし－８０mVであった。

図２６は、細胞外$Ca^{2+}$が、ヒト（増殖性）上皮小体組織ポリ（Ａ）$^+$－ｍＲＮＡを注射したアフリカツメガエル卵母細胞での$Cl^-$コンダクタンスの振動増幅を惹起することを示すグラフ表現である。卵母細胞は、５０ngポリ（Ａ）$^+$－ｍＲＮＡの注射後３日に細胞外$Ca^{2+}$に対する反応性を試験した。保有電位は－８０mVであった。

図２７は、ブドムンキアミンにより惹起されたウシ上皮小体細胞での細胞内$Ca^{2+}$の移動を示すグラフ表現である。ブドムンキアミン（３００μM、構造も示す）を示したところに加えた。

図２８は、上皮小体細胞の細胞内$Ca^{2+}$を移動する能力が立体特異性であることを示すグラフ表現である。フラー２を与えたウシ上皮小体細胞は、示された濃度の各分子の添加前に、０．５mM細胞外$Ca^{2+}$を含む緩衝液にまず懸濁させた。

図２９は、破骨細胞の［$Ca^{2+}$］$_i$への$La^{3+}$の影響を示すグラフ表現である。インド－１を与えた単一ラット破骨細胞からの代表図形を示す。低濃度で、$La^{3+}$は、細胞外$Ca^{2+}$により惹起された［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を部分的にブロックする。

図３０ＡおよびＢは、ラット破骨細胞での細胞外$Mn^{2+}$により惹起された細胞内$Ca^{2+}$の移動を示すグラフ表現である。細胞外$Mn^{2+}$は、細胞外$Ca^{2+}$の不存在で持続する（図３０Ｂ）［$Ca^{2+}$］$_i$の濃度依存増加を誘引する（図３０Ａ）。

図３１Ａ及び３１Ｂは、ＮＰＳ４４９（図３８参照）と名付けられた分子により惹起されたラット破骨細胞での［$Ca^{2+}$］$_i$の移動を示すグラフ表現である。インド－１を与えた分離ラット破骨細胞は、１mM細胞外$CaCl_2$の存在（図３１Ａ）又は不存在（図３１Ｂ）で、示された濃度のＮＰＳ４４９と過融解した。

図３２は、ＮＰＳ０１９（図１参照）により誘引されたＣ－細胞での細胞内$Ca^{2+}$の移動を示すグラフ表現である。rＭＴＣ６－２３細胞はフラー２を与え、０．５mM［$Ca^{2+}$］を含む緩衝液に浸漬した。示されたところで、ＮＰＳ０１９を１０μMの最終濃度まで加えた。代表的図形は、ＮＰＳ０１９により惹起された［$Ca^{2+}$］$_i$の一時的増加が$La^{3+}$による阻害に抵抗性であり（中央図形）、細胞外$Ca^{2+}$の不存在で持続する（右図形）ことを示す。

図３３は、ＮＰＳ４５６（図３６）がウシ上皮小体細胞ポリ（Ａ）$^+$－ｍＲＮＡを注射していたアフリカツメガエル卵母細胞での$Cl^-$流の振動増幅を誘引することを示すグラフ表現である。

図３４は、細胞外$Ca^{2+}$が、ヒト破骨細胞ｍＲＮＡを注射していたアフリカツメガエル卵母細胞での$Cl^-$流の振動増幅を誘引することを示すグラフ表現である。卵母細胞は、５０ngの全ポリ（Ａ）$^+$ｍＲＮＡの注射後、３日に細胞外$Ca^{2+}$の反応性を試験した。

図３５は、上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターが２．５－３．５kbの大きさの範囲でｍＲＮＡにより暗号化されることを示すグラフ表現である。ウシ上皮小体細胞ポリ（Ａ）$^+$－ｍＲＮＡは変性グリセロール公配でサイズ分画し、１０分画にプールした。各分画を別々にアフリカツメガエル卵母細胞に注射した（５０ng／分画）。３日後、卵母細胞は、$Cl^-$電流の振動増幅による細胞外$Ca^{2+}$への応答能力について試験した。

図３６は、本発明の有用な分子を見出すために製造されスクリーンされた分子の族を示す、ジフェニルプロピル－α－フェネチルアミンから誘導された分子の化学構造を示す。

図３７は、ＮＰＳ０２１がウシ上皮小体細胞での［$Ca^{2+}$］$_i$への細胞外$Ca^{2+}$の効果をブロックするカルシウム拮抗化合物であることを示すグラフ表現である。細胞は、０．５mM $CaCl_2$を含む緩衝液に浸漬し、示されるところで［$Ca^{2+}$］を最終２mMまで増加した（左図形）。ＮＰＳ０２１（２００μM）の添加は［$Ca^{2+}$］に変化を起こさなかったが、細胞外$Ca^{2+}$により惹起された［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を阻止した（右図形）。

図３８は、ＮＰＳ［Ｒ,Ｓ］－４６７に対するインビボ$Ca^{2+}$反応を示すグラフである。

図３９は、ＮＰＳ［Ｒ,Ｓ］－４６７に対するインビボＰＴＨ反応を示すグラフである。

図４０は、２５mg／kgＮＰＳ［Ｒ,Ｓ］－４６７に対するインビボ$Ca^{2+}$反応を示すグラフである。

図４１は、ＮＰＳ４６７の異なる鏡像体に対する牡牛上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］$_i$のインビボ反応を示すグラフである。

図４２は、ＮＰＳ４６７の異なる鏡像体に対するラットにおける血清$Ca^{2+}$のインビボ反応を示すグラフである。

図４３ａは、図３６に記載されたフェンジリン又はフェンジリン類似体又は誘導体の製造のための反応式を描く。図４３ｂは、ＮＰＳ４６７の合成のための反応式を描く。

図４４は、ＮＰＳ４６７が、経口投与すると、血清イオン化カルシウムを低下することを示す用量反応曲線を描く。

図４５は、受託番号ＡＴＣＣ７５４１６としてＡＴＣＣに寄託されたＢｏＰＣａＲ　１を

含有するプラスミドの制限地図である。
図４６は、ＢｏＰＣａＲ　１の制限地図である。
図４７は、配列されたＢｏＰＣａＲ　１の２．２Ｋｂフラグメントに対応する（約９０％の正確度）ヌクレオチド配列である。
カルシウム様及びカルシウム拮抗分子
本発明に有用なカルシウム様及びカルシウム拮抗分子は一般的に上記される。これらの分子は、$Ca^{2+}$レセプターでの$Ca^{2+}$の活性を模倣し又は拮抗する分子を明らかにするスクリーニング方法を用い容易に確認できる。そのような方法の例を、以下に提供する。これらの例は本発明を限定するものではなく、単に当業者により容易に用いられ、又は適用される方法を示すものである。
一般にカルシウム様及びカルシウム拮抗分子は、以下に記載されたもの（導出分子と呼ばれる）にならって修飾される分子をスクリーニングすることにより確認される。以下に見ることができるように、種々の$Ca^{2+}$レセプターに有用な幾つかの特異的カルシウム様物質及びカルシウム拮抗物質がある。誘導分子は標準的方法により容易に計画され、当業者に知られた多くのプロトコールの一つで試験する。多くの分子を、本発明に最も有用なものを確定するために容易にスクリーンしうる。
他の系で$Ca^{2+}$の作用を模倣し又は拮抗する有機カチオン分子は$Ca^{2+}$レセプターへの活性についての必要な構造を含む。他の有用な分子の理論的設計は、カルシウム様又はカルシウム拮抗であることが知られた分子の研究及びその既知分子の構造を修飾することを含む。例えばポリアミンは、スペルミンが幾つかのインビトロ系で$Ca^{2+}$の活用を模倣するので、潜在的にカルシウム様である。結果は、スペルミンが実際細胞外二及び三価カチオンにより惹起されたものを連想させる［$Ca^{2+}$］及びＰＴＨ分泌に変化を起こすことを示す（以下参照）。逆に、$Ga^{3+}$は$Gd^{3+}$のウシ上皮小体カルシウム受容体における作用と拮抗する。以下に概略述べる実験は、従って、スペルミンにより得られたこの現象学が細胞外$Ca^{2+}$により用いられる同じ機構を含むことを示すことを目ざしている。これを行うため、$Ca^{2+}$レセプターの活性化を特徴づける種々の生理的及び生化学的パラメーターへのスペルミンの影響を評価した。同様の効果を有するこれらの分子は、本発明に有効であり、スペルミンと同様の構造を有する分子を選択又は製造することによって発現できる。一度、他の有用な分子が発見されると、本選択方法は容易に繰り返すことができる。
明瞭さのゆえに、以下に上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターに活性であるか、又は［$Ca^{2+}$］の変化に対する細胞応答のアゴニスト又は拮抗体として作用する有用な分子を確認するための特別な一連のスクリーニングプロトコールを提供する。同等の検定を、他の$Ca^{2+}$レセプター、または他の無機イオン受容体に活性な、またはそうでないにせよ［$Ca^{2+}$］または他のイオンにより調節される細胞機能を模倣し又は拮抗する、分子について用いることができる。これらの検定は、本発明のカルシウム状分子を含む分子を見出すのに有用である方法の例となる。同等の方法は、細胞外$Ca^{2+}$を含むいおんの作用に最も拮抗する分子をスクリーニングすることによりカルシウム拮抗分子を見出すのに用いることができる。インビトロ検定を、標準的技術によりこれらのカルシウム様物質及びカルシウム拮抗物質の選択性、可飽和性（saturability）及び可逆性を特徴づけるのに用いることができる。
スクリーニング方法
一般にフラー２を与えた上皮小体細胞は０．５ｍＭ $CaCl_2$を含む緩衝液にまず懸濁する。試験物質をキュベットに少量（５－１５μｌ）加え、蛍光シグナルの如何なる変化にも注意する。試験物質の濃度の累積増加を、いくらかの予め定めた濃度に達するか、又は蛍光の変化が見られるまで、キュベット中で行う。蛍光の変化が見られなければ、分子は不活性と考えられ、さらに試験は行わない。例えばポリアミン型分子による最初の研究では、分子は５又は１０ｍＭの高い濃度で試験した。より有効な分子が今や知られているので（以下参照）、天井濃度を低くする。例えば、新しい分子は５００μＭまでの濃度又はそれ以下で試験する。この濃度で蛍光に変化が認められなければ、その分子は不活性と考えることができる。
［$Ca^{2+}$］に増加を生ずる分子は付加的試験に付す。カルシウム様分子としてその考察に

重要な分子の二つの本質的特徴は、細胞内$Ca^{2+}$の移動とＰＫＣアクチベーターへの感受性である。ＰＭＡ－感性方法で細胞内$Ca^{2+}$の移動を起こしている分子がカルシウム様分子であること、そしてＰＴＨ分泌を阻害することを常に見出した。必要なら、付加的試験を、この考えを強固にするために実施した。典型的には、カルシウム様又はカルシウム拮抗活性（上記参照）についての全ての種々の試験は行わない。むしろ、分子がＰＭＡ－感性方法で細胞内$Ca^{2+}$の移動を起こしたならば、それはヒト上皮小体細胞でのスクリーニングに昇格する。例えば［$Ca^{2+}$］$_i$の測定は、$EC_{50}$を決定するために、又、一次又は二次上皮小体亢進に対し外科手術を受けている患者から得たヒト上皮小体細胞でのＰＴＨ分泌を阻止する分子の能力を測定するために行う。$EC_{50}$又は$IC_{50}$が低ければ低いほど、カルシウム様物質又はカルシウム拮抗物質としての分子はより有効である。

フラー２による［$Ca^{2+}$］の測定は、活性について新しい有機分子をスクリーニングする非常に速やかな方法を提供する。単一の午後に、１０－１５分子を試験し、それらの細胞内$Ca^{2+}$を移動する（又はしない）能力を評価することができる。ＰＭＡによる減少に対する［$Ca^{2+}$］$_i$の観察された如何なる増加の感受性も評価できる。さらに、単一細胞調製品は［$Ca^{2+}$］$_i$、サイクリックＡＭＰレベル、ＩＰ及びＰＴＨ分泌についてデータを提供できる。典型的な方法は、細胞にフラー２を与え、次いで細胞懸濁液を二つにけることである。ほとんどの細胞は［$Ca^{2+}$］$_i$を測定するのに用いられ、残りは分子とインキュベートしてサイクリックＡＭＰ及びＰＴＨ分泌に関するそれらの影響を評価する。サイクリックＡＭＰ及びＰＴＨについての放射免疫検定の感受性の理由で、両変数は、０．３ml細胞懸濁液（約500,000細胞）を含む単一インキュベーション管で測定できる。イノシトールリン酸エステルの測定は、スクリーニングの時間つぶしの局面である。しかしながら、塩化物（どちらかといえばギ酸塩）で溶出されるイオン交換カラムは、（約３０時間を要する）回転減圧蒸発を必要としないので、$IP_3$形式をスクリーニングする非常に迅速な方法を提供する。この方法は単一の午後にほぼ１００試料の手続きを可能にする。［$Ca^{2+}$］$_i$、サイクリックＡＭＰ、$IP_3$及びＰＴＨの測定により評価されるように興味を起こさせるこれらの分子は、次いで種々のイノシトールリン酸エステルの形成を試験し、ＨＰＬＣによりそれらの異性形を評価することによる、より厳格な分析に付す。

これらのプロトコールで検出される興味ある分子は、次いで例えばラットＭＴＣ６－２３細胞系を用い例えばカルシトニン－分泌Ｃ－細胞での［$Ca^{2+}$］へのそれらの影響を試験することにより、特異性を評価する。

以下は、これらのスクリーニング方法に有用な方法の例示である。種々の試験カルシウム様又はカルシウム拮抗分子についての典型的結果の例を図２－３４に与える。

上皮小体細胞調製

上皮小体腺を、地元の畜殺場で新たに屠殺した仔ウシ（１２－１５週令）から得て、（mM）：NaCl、１２６；KCl、４；$MgCl_2$、１；Na－ＨＥＰＥＳ、２０；pH７．４；グルコース、５．６及び可変量の$CaCl_2$、例えば１．２５mMを含む氷冷上皮小体細胞緩衝液（ＰＣＢ）中で実験室に移した。一次又は、尿毒症上皮小体亢進（ＨＰＴ）のため上皮小体組織の外科手術除去を受けている患者から得たヒト上皮小体腺をウシ組織と同様に処理した。腺は過剰の脂肪と結合組織を取り除き、次いで鋭利なはさみで２－３mmの適当なさいころに刻んだ。次いで分離した細胞をパーコル緩衝液中で遠心分離により精製した。得られる上皮小体細胞調製品は相対比顕微鏡及びスーダンブラックＢ染色により評価される限り実質的に赤血球、脂肪細胞及び毛細管組織が無かった。分離し、精製した上皮小体細胞は5ないし２０細胞を含む小さな固りとして存在した。トリパンブルー又はエチジウムブロミドの除外により示されるように、細胞生存度は通常通り９５％であった。

細胞はこの時点で実験目的に用いることができるが、生理的反応（ＰＴＨ分泌の抑制可能性及び［$Ca^{2+}$］$_i$の休止レベル）は、細胞を一液培養後、より良好である。一次培養も、イノシトールリン酸エステル代謝の測定を含む研究に必要なように、細胞は同位体平衡に近い同位元素により標識化できる（以下参照）。パーコル公配による精製後、細胞を５０ug／mlストレプトマイシン、１００Ｕ／mlペニシリン、5ug／mlゲンタマイシンを補足したハムＦ１２－ダルベッコ修飾イーグルス培地（ＧＩＢＣＯ）とＩＴＳ$^+$の１：１混合物

で数回洗浄した。ＩＴＳ$^{+}$はインスリン、トランスフェリン、セレン及びウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）－リノレン酸を含むプレミックス溶液（コラボラティブ・リサーチ、ベッドフォード、ＭＡ）である。次いで細胞をプラスチックフラスコ（７５又は１５０cm$^{2}$；ファルコン）に移し、５％$CO_2$の湿った雰囲気中３７℃でインキュベートした。血清は、その存在が細胞をプラスチックに付着させ、増殖、脱分化を受けさせるので、一夜培養に加えない。上の条件下で培養した細胞は傾斜することによりフラスコから容易に除去され、新たに調製した細胞と同じ生存度を示す。

サイトゾル$Ca^{2+}$の測定

精製上皮小体細胞を１μＭフラー２－アセトキシメチルエステルを含む１．２５mM $CaCl_2$－２％ＢＳＡ－ＰＣＢに再び懸濁し、３７℃で２０分間インキュベートした。次いで細胞をペレット化し、エステルを欠いた同じ緩衝液に再び懸濁し、さらに１５分間３７℃でインキュベートした。続いて細胞を０．５mM $CaCl_2$及び０．５％ＢＳＡを含むＰＣＢで２回洗浄し、室温（約２０℃）で保持した。使用直前に、細胞を予め温めた０．５mM $CaCl_2$－ＰＣＢで５倍に希釈し、０．１％の最終ＢＳＡ濃度を得た。蛍光記録に用いたキュベット中の細胞の濃度は、$1-2\times10^{6}$／mlであった。

インディケーターを与えた細胞の蛍光を、それぞれ３４０及び５１０nmの励起及び放射波長を用いる、サーモスタットキュベットホルダー及び磁気撹拌器を備えた分光蛍光計（バイオメディカル・インストルメンティション・グループ、ユニバーシティー・オブ・ペンシルバニア、フィラデルフィア、ＰＡ）で、３７℃にて測定した。本蛍光はサイトゾル$Ca^{2+}$のレベルを示す。蛍光シグナルは、最大蛍光（Ｆmax）を得るためジギトニン（５０ug／ml、最終）を、最小蛍光（Ｆmin）を得るためＥＧＴＡ（１０mM、pH８．３、最終）を、そして２２４nMの解離定数を用い較正した。色素の漏れは温度に依存し、キュベット中細胞を加温後、初めの２分以内に最も起きる。色素漏れはその後きわめてわずかしか増加しない。色素漏れの較正を正すために、細胞をキュベットに置き、３７℃で２－３分間撹拌した。次いで細胞懸濁液を取り、細胞をペレット化し、上清をきれいなキュベットにもどした。次いで上清を上記のようにジギトニン及びＥＧＴＡで処理し、色素漏れの評価として得た。それは、典型的には全$Ca^{2+}$依存蛍光シグナルの１０－１５％である。本評価は明白なＦminから引いた。

ＰＴＨ分泌の測定

ほとんどの実験で、フラー２を与えた細胞をＰＴＨ分泌の研究に用いた。フラー２を与えている上皮小体細胞は、細胞外$Ca^{2+}$に対するそれらの分泌反応を変更しない。細胞を０．５mM $CaCl_2$及び０．１％ＢＳＡを含むＰＣＢに懸濁した。インキュベーションは、小量の$CaCl_2$及び／又は有機ポリカチオンを存在させ、又はさせることなく、０．３mlの細胞懸濁液を含むプラスチック試験管（ファルコン２０５８）中で実施した。３７℃で種々の時間（典型的には３０分）インキュベーション後、試験管を氷上に置き、細胞を２℃でペレット化した。上清の試料を酢酸でpH４．５とし、－７０℃で保存した。このプロトコールはウシ及びヒト両上皮小体細胞に用いた。

ウシ細胞について、試料上清中のＰＴＨの量は、１／45,000の最終希釈で、ＧＷ－１抗体又はその等価を用いる均一放射免疫検定により測定した。$^{125}$Ｉ－ＰＴＨ（６５－８４：インクスター、スティルウォーター、ＭＮ）をトレーサーとして用い、分画をデキストラン－活性炭により分離した。試料及びデータ減少の計数は、パッカード・コブラ５００５ガンマ・カウンターで実施した。

ヒト細胞については、ＧＷ－１抗体がヒトＰＴＨをほとんど認識しないので、無傷の及びＮ末端ヒトＰＴＨを認識する、商業的に入手しうる放射免疫検定キット（ＩＮＳ－ＰＴＨ；ニッコールス・インスティテュート、ロス・アンゼルス、ＣＡ）を用いた。

サイクリックＡＭＰの測定

細胞を、ＰＴＨ分泌研究用に上記のようにインキュベートし、インキュベーションの終わりに０．１５mlの試料を採り、０．８５mlの熱（７０℃）湯に移し、この温度で５－１０分間加熱した。次いで試験管を数回、凍結、解凍し、細胞残骸を遠心分離により沈降させた。上清の部分をアセチル化し、サイクリックＡＭＰ濃度を放射免疫検定により測定した。

イノシトールリン酸エステル形成の測定
上皮小体細胞を４μＣｉ／ml$^3$Ｈ－myo－イノシトールと２０－２４時間インキュベートすることにより膜リン脂質を標識化した。次いで細胞を洗浄し、０.５mM $CaCl_2$及び０.１％ＢＳＡを含むＰＣＢに再び懸濁した。インキュベーションは、種々の濃度の有機ポリカチオンの不存在又は存在で、異なる時間、ミクロフューグ管で行った。反応は１mlクロロホルム／メタノール／１２Ｎ ＨＣｌ（２００：１００：１；v/v/v）の添加により停止した。次いでフィチン酸水解物（２００μｌ；２５μgリン酸エステル／試験管）水を加えた。試験管を遠心分離し、６００μｌの水性相を１０ml水に希釈した。
イノシトールリン酸エステルを、ＡＧ１－Ｘ８を塩化物又はギ酸塩形で用いるイオン交換クロマトグラフィにより分離した。$IP_3$レベルのみを測定する場合、塩化物形を用い、一方、ギ酸塩形は主なイノシトールリン酸エステル（$IP_3$、$IP_2$及び$IP_1$）を解明するのに用いた。$IP_3$だけの測定には、希釈試料を塩化物－形カラムに適用し、カラムを１０ml３０mM ＨＣｌで、次いで6ml ９０mM ＨＣｌで洗浄し、$IP_3$を3ml ５００mM ＨＣｌで溶出した。最終溶出物を希釈し、計数した。全ての主要イノシトールリン酸エステルの測定には、希釈試料をギ酸塩－形カラムに適用し、ギ酸塩緩衝液の濃度を増すことにより、$IP_1$、$IP_2$及び$IP_3$を次々に溶出した。ギ酸塩形カラムからの溶出試料は、回転減圧蒸発し、残渣をカクテルにとり、計数した。
$IP_3$の同異形はＨＰＬＣにより評価した。反応は１ml０.４５Ｍ過塩素酸の添加により停止させ、氷上で１０分間保った。次いで遠心分離し、上清を$NaHCO_3$でｐＨ７－８に調整した。次いで抽出物をパーティシルＳＡＸアニオン交換カラムに適用し、ギ酸アンモニウムの直線公配によって溶出した。次いで種々の分画をダウエックスにより脱塩し、パッカード・トリカーブ1500ＬＳＣで液体シンチレーションカウンターにかける前に回転減圧蒸発に付した。
全てのイノシトールリン酸エステル分離法について有機ポリカチオンが分離により妨害されるかどうかを測定するために信ずべき標準を用いる適当なコントロールを使用した。もしそうである場合は、イノシトールリン酸エステル分離前に試料をカチオン交換樹脂で処理して、害を及ぼす分子を除去した。
Ｃ－細胞中のサイトゾル$Ca^{2+}$の測定
アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ＡＴＣＣNo.１６０７）から得たラット骨髄甲状腺癌（rＭＴＣ６－２３）から誘導した腫瘍Ｃ－細胞を、ダルベッコ修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ）プラス１５％ウマ血清中、抗体の不存在で単層として培養した。［$Ca^{2+}$］$_i$の測定用に、細胞を０.０２％ＥＤＴＡ／０.０５％トリプシンにより収集し、１.２５mM $CaCl_2$及び０.５％ＢＳＡを含むＰＣＢで２回洗浄し、上皮小体細胞に上記したようにフラー２を与えた。［$Ca^{2+}$］$_i$の測定は、上記したように色素漏れに対する適当な訂正により行った。
ラット破骨細胞での［$Ca^{2+}$］$_i$の測定
破骨細胞は、無菌条件を用いる、１－２日令のスプラギュードゥリィラットから得た。ラットの子供は首をはねて犠牲にし、後足を取り除き、大腿部は軟組織を速やかに除き、予め加温したＦ－１２／ＤＭＥＭ培地（ＤＭＥＭは１０％ウシ胎仔血清及び抗生物質（ペニシリン－ストレプトマイシン－ゲンタマイシン；１００Ｕ／ml－１００ug／ml－１００ug／ml）を含む）に置いた。二匹の子供からの骨は縦にカットし、1ml培養培地に置いた。骨細胞は、プラスチックピペットによる骨断片のおだやかな粉砕により得、培養培地で希釈した。骨断片を沈殿させて、等しい部分（約1ml）の培地を、２５mmガラスカバーグラスを有する６ウェル培養プレートに移した。細胞を、湿った５％ $CO_2$－空気雰囲気で１時間、３７℃で澄ませる。次いでカバーグラスを新しい培体で３回洗浄して非付着細胞を除去した。破骨細胞中の［$Ca^{2+}$］$_i$の測定は、非付着細胞を除去して６－８時間内に実施した。
カバーグラスに付着した細胞は、血清を欠き、代わりに０.５％ ＢＳＡを含むＦ－１２／ＤＭＥＭ中、５μＭインド－１アセトキシメチルエステル／０.０１％プルロニックＦ２８との３７℃、３０分間インキュベーションによりインド－１を与えた。続いてカバーグ

ラスを、微量蛍光定量法を装備したニコン・ダイアホト倒立顕微鏡の台上に設置した過融解室に移す前に、洗浄し、エステルを欠いたＦ－１２／ＤＭＥＭ中、３７℃でさらに１５分間インキュベートした。破骨細胞は、それらの大きな形状及び多重核の存在から容易に確認した。（３４０nmでの励起により発した）細胞は、試験物質を存在させ又はさせることなく、１ml／分で緩衝液（典型的には０．１％ＢＳＡ及び１mM $Ca^{2+}$を含むＰＣＢ）と過融解した。３４０nmでの励起により発した蛍光は、顕微鏡のビデオポートを経て４４０nm二色鏡に送り、４９５及び４０５nmでの蛍光強度を光電子倍増管により収集した。光電子倍増管からの産生を増幅し、デジタル化し８０３８６ＰＣに記憶する。蛍光強度の比は$[Ca^{2+}]_i$を評価するのに用いた。

卵母細胞発現

付加的研究において、ウシ又はヒト上皮小体細胞からのｍＲＮＡを注射したアフリカツメガエル卵母細胞をスクリーニングプロトコールに用い、$Cl^-$コンダクタンスを$[Ca^{2+}]_i$の増加をモニターする間接手段として測定した。以下はネオマイシンの効果を試験する実施例である。

卵母細胞は、ヒト上皮小体組織（二次ＨＰＴの例からの上皮小体腺）からのポリ（Ａ）$^+$－強化ｍＲＮＡを注射した。３日後、卵母細胞を、ネオマイシンに対するそれらの反応について試験した。ネオマイシンＢは薬物フリー生理食塩水との過融解を止めた$Cl^-$コンダクタンスの振動増幅を誘引した（図２０参照）。ネオマイシンＢに対する反応は１００μＭと１０mMの間の濃度で観察した。ネオマイシンＢにより誘引された反応が上皮小体ｍＲＮＡの注射による偶発であったことを確かめるため、水注射卵母細胞中、電流についてネオマイシンＢの効果を測定した。試験した５つの卵母細胞の各々でネオマイシンＢ（１０mM）は電流に何らの変化も生じなかった。約４０％の卵母細胞が、カルバコールに反応することが知られており、効果は内因性ムスカリンレセプターにより伝達された。試験した５つの卵母細胞中、１つはカルバコールに対する反応で内への電流を示し、これは図２０の下部図形に示される。即ち、$[Ca^{2+}]_i$及び$Cl^-$コンダクタンスの増加に結合したムスカリンレセプターを発現する細胞中、ネオマイシンＢは、反応を誘引しない。このことは、ネオマイシンＢに対する反応が上皮小体細胞ｍＲＮＡにより暗号化された特異的蛋白の発現に依存することを示す。無傷の細胞では、ネオマイシンＢは$Ca^{2+}$レセプターに直接作用し、上皮小体細胞機能を変えることを非常に強く示唆する。

最も重要な分子からの薬物設計

幾つかの有機分子は、本明細書に示されるように、$Ca^{2+}$レセプターで作用することにより細胞外$Ca^{2+}$の作用を模倣又は拮抗する。しかしながら、試験した分子は、薬物候補として必ずしも適当でないが、それらは、仮説の基礎となる$Ca^{2+}$レセプターに基づく治療が正しいことを示すのに役立つ。これらの分子は、それらが$Ca^{2+}$レセプターに作用させることができ、従って本発明に有用な分子を選択しうる構造的特徴を決定するのに用いることができる。

そのような一つの分析方法の例は以下の通りである。本例は、以下の実施例で詳細に述べるが、本明細書で議論された最も重要な分子から本発明の有用な分子を設計するのに用いることができる理論的根拠を示すためにここで用いる。当業者は、実施例で明らかにされた分析段階を、又、最も望ましいカルシウム様物質又はカルシウム拮抗物質が明らかにされるまで、同様の分析を他の最も重要な分子に行うことができることを認識するであろう。

他の例も以下に提供する。存在するデータをまとめると、有用な最も重要な分子は、好ましくは１又はそれ以上の位置に置換される、そして所望により分枝状または直鎖状の置換又は非置換アルキル基を有しうる芳香基を有することであろうことを示す。加えて、望ましい$Ca^{2+}$レセプターに対するより高い親和性を確実にする正しい立体特異性の分子を選択することが重要である。従ってこれらのデータは当業者に以下に多く記載されるように本発明の最高の望ましい分子を見出すために誘導されうる適当な最も重要な分子を教示する。

構造的に異なるけれども、試験される分子は研究されうる一般的特徴を有しうる。本実施

例において、実効正電荷と細胞内$Ca^{2+}$を移動する可能性との相関を試験した。プロタミン（＋２１；$EC_{50}$＝４０nM）は、上皮小体細胞での［$Ca^{2+}$］$_i$の移動を起こすのに、スペルミン（＋４；$EC_{50}$＝１５０μM）よりも有効であったネオマイシンＢ（＋６；$EC_{50}$＝２０μMヒト上皮小体細胞中、及び４０μMウシ上皮小体細胞中）よりもさらに有効であった。これらの結果は、正電荷のみが可能性を決定するのかどうか、又は$Ca^{2+}$レセプター上の活性に寄与する他の構造的特徴があるのかどうかという疑問を生ずる。このことは、最初にそれが$Ca^{2+}$レセプターが有効且つ特異的な治療用分子を目標にできるという観点に大きく影響するということを決定するのが重要である。従って、ネオマイシンＢ及びスペルミンに関連する種々の他の有機ポリカチオンは分子の実効正電荷と細胞内$Ca^{2+}$を移動するその可能性との間の関係を決定する研究ができる。

研究した最初の系列の分子はアミノグリコシドであつた。その分子はウシ上皮小体細胞で研究し、それらの細胞内$Ca^{2+}$の移動についての$EC_{50}$を測定した。アミノグリコシドについては、サイトゾル$Ca^{2+}$過渡電流を惹起する能力の位置順は、ネオマイシンＢ（$EC_{50}$＝２０又は４０μM）＞ゲンタマイシン（１５０μM）＞ベカナマイシン（２００μM）＞ストレプトマイシン（６００μM）であった。カナマイシンとリンコマイシンは、５００μMの濃度で試験したとき、効果がなかった。これらのアミノグリコシドのpH７.３での実効正電荷は、ネオマイシンＢ（＋６）＞ゲンタマイシン（＋５）＝ベカマイシン（＋５）＞カナマイシン（平均＋４.５）＞ストレプトマイシン（＋３）＞リンコマイシン（＋１）である。次いでアミノグリコシド系列内で、実効正電荷間にある関係があるがこれは絶対的ではなく、ストレプトマイシンよりも有効であると予想されたカナマイシンは活性がない。

様々なポリアミンをテストすることにより、実効陽性電荷と有効性（potency）の間の付加的かつより著しい矛盾が明らかになった。これらポリアミンの構造的分類を試みた：（１）直鎖状、（２）分枝状、および（３）環状。テストしたポリアミンの構造を図１に与える。直鎖状ポリアミンの中では、スペルミン（＋４；$EC_{50}$＝１５０μM）はペンタエチレンヘキサミン（＋６；$EC_{50}$＝５００μM）およびテトラエチレンペンタミン（＋５；$EC_{50}$＝２.５μM）よりも、たとえ後者の分子の方がより大きい実効陽性電荷を有しているとしても、強力である。

我々は、様々な数の二級および一級アミノ基を持ち、従って実効陽性電荷が変化する幾つかの分枝状ポリアミンを合成した。これら２分子、ＮＰＳ３８１およびＮＰＳ３８２でウシ上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］$_i$の効果を試験した。ＮＰＳ３８２（＋８；$EC_{50}$＝５０μM）は、たとえそれが２つのより少ない陽性電荷を含有するとしても、ＮＰＳ３８１（＋１０；$EC_{50}$＝１００μM）の約２倍の有効性であった。

陽性電荷と有効性の間の同様の矛盾が環状ポリアミンでの実験において表された。例えば、ヘキササイクレン（＋６；$EC_{50}$＝２０μM）は、ＮＰＳ３８３（＋８；$EC_{50}$＝１５０μM）よりも強力であった。これらのポリアミンで得られた結果は、陽性電荷が有効性に貢献する単独の因子ではないことを示している。

更なる研究により、上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターの活性を分け与える分子の構造的特徴に洞察が与えられた。構造的に重要な特徴の１つに、（陽性電荷を帯びる）窒素間の分子間距離がある。それ故に、スペルミンはトリエチレンテトラミン（$EC_{50}$＝８mM）の５０倍も強力にウシ上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］$_i$の増加を引き起こすが、両分子は＋４の実効陽性電荷を帯びている。これら２つのポリアミン間の構造上の相違は、窒素を引き離しているメチレンの数だけであり：スペルミンでは、それは３－４－３であるのに対して、トリエチレンテトラミンでは、２－２－２である。この窒素間の間隔をあける外観上の少しの変化は、有効性に対して深い関係を持ち、分子内の窒素のコンホーメーション関係が重大であることを示唆している。これを支持するのは、ヘキササイクレンおよびペンタエチレンヘキサミンで得られた結果である。前者の分子は、単に後者の環状類似体であり、全窒素間に同数のメチレンを含有しているが、環構造の存在は、有効性を２５倍に増加する。これらの結果は、それ自体の陽性電荷が$Ca^{2+}$レセプターにおける有機分子の活性を決定する重大な因子ではないことを示している。

他の一連の実験より、$Ca^{2+}$レセプターの活性決定における芳香族基の重要性が明らかにする。その結果は、クモ、アルギオープ・ロバータ（Argiope lobata）の毒から単離された２種のアリルアルキルアミンで得られた。これらの分子、アルギオトキシン（algiotoxin）６３６およびアルギオトキシン６５９は、異なる芳香族基に結合した同一のポリカチオン部分を有する（図２４）。アルギオトキシン６５９は、１００ないし３００μMの濃度でテストした時に、ウシ上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］$_i$の瞬間の増加を引き起こした。反対に、アルギオトキシン６３６は、同様の濃度でテストしても、効果無しであった（図２４）。これらの２種のアリルアルキルアミン間の構造上の相違は、分子の芳香族部分のみであり：アルギオトキシン６５９は、４－ヒドロキシインドール部分を含んでいるのに対し、アルギオトキシン６３６は、２,４－ジヒドロキシフェニル基を含んでいる。これら２種のアリルアルキルアミンの実効陽性電荷は、同じであり（＋４）、そのため、これらの異なる有効性は、異なる芳香族基から生じるに違いない。このことは、実効陽性電荷のみが、有効性を決定するのではないことを示している。しかしながら、これらを見い出したことにより実際に重要となるのは、芳香族基が$Ca^{2+}$レセプターを活性化する分子の能力に非常に貢献するという発見である。

アガトキシン４８９（ＮＰＳ０１７）およびアルガトキシン５０５（ＮＰＳ０１５）のいずれも上皮小体細胞における細胞間$Ca^{2+}$の流動化を引き起こし、それぞれ$EC_{50}$、６と２２μMを有している。これらの分子の構造上の相違は、インドール部分のヒドロキシ基のみである（図１）。このことは、分子の芳香族領域上の置換が有効性に影響を与え得ることを示している。これは、研究に付しているリード分子が、芳香族部分が置換されているような分子を含んでいるであろうことを示している。

ここに記載したリード分子とは系統的に異なる構造的特徴は、（１）実効陽性電荷、（２）窒素を引き離しているメチレン数、および（３）例えば、メチレン間隔および実効陽性電荷における変化を伴う、および伴わないポリアミンの環状のものを含んでいる。加えて、構造および芳香族基の位置における系統的変化を、例えば、スズメバチおよびクモの毒から単離された様々なアリルアルキルアミンにおいて、試験することが出来；商業的に入手可能な芳香族部分をアルギオトキシンポリアミン部分と結合させることにより、合成分子を調製することが出来る。アルギオトキシンポリアミン部分は、カルボン酸を含有しているいずれかの芳香族部分と容易に結合することが出来る。従って、フェニル酢酸および安息香酸のヒドロキシおよびメトキシ誘導体、同じくヒドロキシインドール酢酸系を系統的にスクリーニングするのは簡単である。ヘテロ芳香族機能性を有する類似体を調製し、活性を評価することも出来る。

該分子間の有効性および効力の比較により、一定の陽性電荷で、芳香族基の最適な構造および位置が明らかになるであろう。

有効性を増加すると思われるポリアミンモティーフでの構造的多様性の１つは、直鎖状親分子の環状のものが存在することである。バドムンチアミンＡ（BudmunchiamineＡ）は、植物アルビジア・アマラ（Albizia arama）から単離されたものであり、スペルミンの環状誘導体である（図１）。バドムンチアミンＡをウシ上皮小体細胞に加えると、細胞外$Ca^{2+}$の不在に固執し、ＰＭＡでの前処理により鈍化した［$Ca^{2+}$］$_i$の迅速かつ瞬間の増加を引き起こした。従って、それは、恐らく、$Ca^{2+}$レセプターに作用することにより、上皮小体細胞における細胞間$Ca^{2+}$の流動化を引き起こす。それは殆ど、スペルミン（$EC_{50}$約２００μM）と等しい効力をもっているが、スペルミンよりも１つ低い陽性電荷（＋３）を帯びている。

バドムンチアミンＡより得られた結果は、構造活性研究の予言力および天然物をテストすることにより得られる新規構造情報を表すものである。それ故に、構造情報に基づき合理的に選択される天然物のスクリーニングは、容易に行われ、例えば、分子を、ナプララート（Napralert）などの適切なデータベースを用いる非常に確立された化学分類的原則に基づき、選択することが出来る。例えば、ピセコロビウムなどのアルビジアに関連するパピリオノイド豆果（papilionoid legumes）から誘導される大環状ポリアミンアルカノイドおよび他の植物から誘導される分子をスクリーニングすることが出来る。

図３６は、本発明に対して有用な分子を決定するためにスクリーニングされる一連の分子の第二例を与えるものである。これらの分子は、一般にフェンジリンから誘導されるものであり、テストして、それらのそれぞれのＥＣ$_{50}$を測定した。更に、関連分子、ＮＰＳ４４７およびＮＰＳ４４８などをテストすることにより、分子構造の立体特異的効果を明らかにする。テストしてデータが得られた殆どの活性化合物は、新規化合物であり、ＮＰＳ４６７およびＮＰＳ５６８と呼称し、５μM以下のＥＣ$_{50}$値を持つ。当業者はこの一連の分子を精密に調べることにより、本発明においてテストされ得る他の適切な誘導体を測定することが出来る。

これらの例は、本発明において有用な一般的設定およびスクリーニング方法を示しており、付加的化合物および天然物ライブラリーを当該技術に望ましくスクリーニングし、本発明の他の有用なリード分子または新規分子を決定することが出来る。

上記のように、カルシウム様物質として有用な分子の例は、分枝状または環状ポリアミン、陽性に荷電したポリアミノ酸、およびアリルアルキルアミンを含んでいる。加えて、他の陽性に荷電した有機分子は、天然に生じる分子およびそれらの類似体を含んでおり、有用なカルシウム様物質である。これらの天然に生じる分子およびそれらの類似体は、好ましくは陽性電荷対質量比率（positive charge-to-mass ratio）を有しており、ここに例示した分子に対するこれらの比率と相関している。（例としては、海洋哺乳類、節足動物毒、陸生植物および細菌類や菌類から得られる発酵ブロスから単離された物質がある。）カルシウム様物質として有用な天然に生じる分子および類似体の好ましい１群では、陽性電荷：分子量（ダルトンで）の比率、約１：４０から１：２００、好ましくは約１：４０から１：１００で有することが予期される。該分子の更に詳しい実施例は以下に与える。

ポリアミン

本発明におけるカルシウム様物質として有用なポリアミンは、分枝状または環状のいずれかであり得る。分枝状または環状ポリアミンは、潜在的にそれらの直鎖状類似体よりも高いカルシウム様活性を有している。即ち、分枝状または環状ポリアミンは、生理学的ｐＨで同様の効果的電荷を持つそれらの対応する線状ポリアミンよりも低いＥＣ$_{50}$を持つ傾向がある（表１参照）。

表１

| 分子 | 実効(＋)電荷 | $EC_{50}$(μM) |
|---|---|---|
| ネオマイシン | ＋６ | ２０または４０ |
| ヘキササイクレン | ＋６ | ２０ |
| ＮＰＳ３８２ | ＋８ | ５０ |
| ＮＰＳ３８１ | ＋１０ | １００ |
| ＮＰＳ３８３ | ＋８ | １５０ |
| ゲンタマイシン | ＋５ | １５０ |
| スペルミン | ＋４ | １５０ |
| ベカナマイシン | ＋５ | ２００ |
| アルギオトキシン－６５９ | ＋４ | ３００ |
| ペンタエチレンヘキサミン（ＰＥＨＡ） | ＋６ | ５００ |
| ストレプトマイシン | ＋３ | ６００ |
| スペルミジン | ＋３ | ２０００ |
| テトラエチレンペンタミン（ＴＥＰＡ） | ＋５ | ２５００ |
| １，１２－ジアミノドデカン（ＤＡＤＤ） | ＋２ | ３０００ |
| トリエチレントラミン（ＴＥＴＡ） | ＋４ | ８０００ |

本明細書で使用した“分枝状ポリアミン”とは、短いアルキル橋架け、またはアミノ結合（amino linkages）により一緒に連結したアルキル基から成り、また鎖が枝分かれする点を有している鎖状分子のことである。これらの“分枝点”は、炭素原子または窒素原子のいずれか、好ましくは窒素原子の所に位置することが出来る。窒素原子分枝点は、代表的には三級アミンであるが、四級であることもある。分枝状ポリアミンは、１ないし２０の分枝点、好ましくは１ないし１０の分枝点を有することもある。

一般に、分枝状ポリアミンにおけるアルキル橋架けおよびアルキル分枝は、長さ１から５０の炭素原子であり、好ましくは２から６の炭素原子である。アルキル分枝は、１つまたはそれ以上のヘテロ原子（窒素、酸素または硫黄）によ中断されるか、またはフルオロ、クロロ、ブロモまたはヨードを含むハロ；ヒドロキシ；ニトロ；アシロキシ（Ｒ’ＣＯＯ－）、アシルアミド（Ｒ’ＣＯＮＨ－）、またはアルコキシ（－ＯＲ’）で、式中Ｒ’は１から４の炭素原子を含有し得るものなどの官能基で置換されることもある。アルキル分枝は、アミノまたはグアニドなどの生理学的ｐＨで陽性に荷電される基で置換される場合もある。これらの官能置換基は、分子の活性、配達（delivery）、または生物学的利用能を増加する溶解度等の生理特性を与えたり変化したりすることもある。

分枝状ポリアミンは、３つまたはそれ以上の鎖および分枝末端点を有することもある。これらの末端点は、メチル基またはアミノ基であり、好ましくはアミノ基であり得る。

好ましい分子の１群は、式：

$H_2N-(CH_2)_j-(NR_i-(CH_2)_j)_k-NH_2$

（式中、ｋは１から１０の整数であり、ｊはそれぞれ同じかまたは異なり、２から２０の整数であり、$R_i$はそれぞれ同じかまたは異なり、水素と$-(CH_2)_j-NH_2$でｊは上記

で定義したものから成る群から選択され、少なくとも一つの$R_i$は水素ではない）
を有する分枝ポリアミンの群である。
本発明の特に好ましい分枝状ポリアミンは、分子$N^1,N^1,N^5,N^{10},N^{14},N^{14}$－ヘキサキス－（３－アミノプロピル）スペルミンおよび$N^1,N^1,N^5,N^{14},N^{14}$－テトラキス－（３－アミノプロピル）スペルミンで、それぞれ、図１におけるＮＰＳ３８１およびＮＰＳ３８２のことである。
本明細書で使用した“環状ポリアミン”とは、２つまたはそれ以上のヘテロ原子（窒素、酸素または硫黄）を含有する複素環で、その内、少なくとも２つは窒素原子であるもののことである。複素環は、一般に周囲に約６から約２０原子、好ましくは、周囲に約１０から約１８原子である。窒素ヘテロ原子は、２ないし１０の炭素原子で隔てられている。複素環は、窒素部位でアミノアルキルまたはアミノアリル基（$NH_2R$－）で置換されることもあり、式中Ｒは、アミノアリルまたは２ないし６炭素原子の低級アルキルである。
本発明の特に好ましい環状ポリアミンは、図１にヘキササイクレン（１,４,７,１０,１３,１６－ヘキサアザ－シクロオクタデカンおよびＮＰＳ３８３として示している。

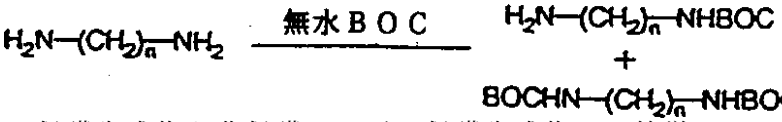
ポリアミノ酸

本発明において有用なポリアミノ酸は、生理学的ｐＨで２つまたはそれ以上の陽性に荷電したアミノ酸残基を含有しても良い。これらの陽性に荷電したアミノ酸は、ヒスチジン、リジンおよびアルギニンを含んでいる。これらのポリペプチドは、長さにして２から８００アミノ酸の範囲内で変化する場合があり、より好ましくは長さにして２０から３００アミノ酸である。これらのポリペプチドは、アミノ酸残基の単一の繰り返しから成りことがあり、天然タンパク質または酵素の変種を有することもある。
ポリアミノ酸から成るアミノ酸残基は、２０の天然アミノ酸または他の代替し得る基のいくつかである場合がある。代替し得る基は、例えば、本発明の組成物は標識として作用し得る分子またはイオンを含んで誘導された要素もまた含み得る。広範な種類の標識部分を用いることができ、放射性同位元素、発色団および蛍光標識が含まれる。特に、放射性同位元素標識はインビボで容易に検出され得る。放射性同位元素はポルフィリン系におけるカチオンとしての配位によって結合され得る。有用なカチオンはテクネチウムおよびインジウムである。この組成物には、陽性荷電分子が標識に結合、または標識と対合され得る。

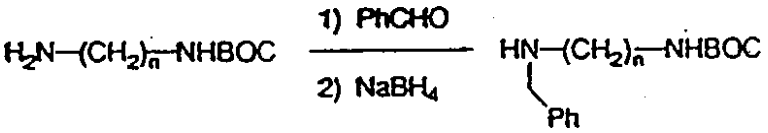
合成方法

ポリアミンの合成および修飾戦略には、機能化された分子を作成するために選択的に除去され得る様々なアミン保護基（フタルイミド、ＢＯＣ、ＣＢＺ、ベンジルおよびニトリル）の使用を伴う。包含される合成方法は、アルギオピン６３６と６５９およびクモ毒から誘導された他のアリルアルキルアミンを作成するのに使用された方法に合わせる。
２－４メチレンの鎖伸長は、対応するＮ－（ブロモアルキル）フタルイミドでのアルキル化により典型的に行った。ブロモアルキルフタルイミドに対するアミンの１：１.２混合物をセライト上の５０％ＫＦの存在下、アセトニトリル中で還流した。鎖伸長もまた、得られたアミンのアクリロニトリルまたはエチルアクリレートでのアルキル化により行った。反応の進行は、ＴＬＣとジクロロメタン、メタノール、およびイソプロピルアミンの組み合わせを用いるシリカゲルで精製された中間体により追跡した。最終産物をカチオン交換（ＨＥＭＡ－ＳＢ）およびＲＰ－ＨＰＬＣ（ヴィダックＣ－１８）により精製した。純度と構造確認は、$H^1$－および$^{13}C$－ＮＭＲと高分解能マススペクトロメトリー（ＥＩ、ＣＩおよび／またはＦＡＢ）で行った。
ＢＯＣ保護基を触媒量のジメチルアミノピリジンの存在下、ジクロロメタン中でアミン（１°または２°）をジ－tert－ブチルジカーボネートで処理して付加した。ベンジル保護基は、２種の方法：（１）１°アミンとベンズアルデヒドとの縮合、続いて水素化ホウ素ナトリウム反応、または（２）ＫＦの存在下、２°アミンのベンジルブロミドでのアルキル化のうち１方法を適用した。アミド結合および環化はアミン（１°または２°）と得られた酸のＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルとの反応により典型的に行った。これは（環化の場合）、希釈条件下で、“アミノ酸”をジシクロヘキシルカルボジイミドで処理

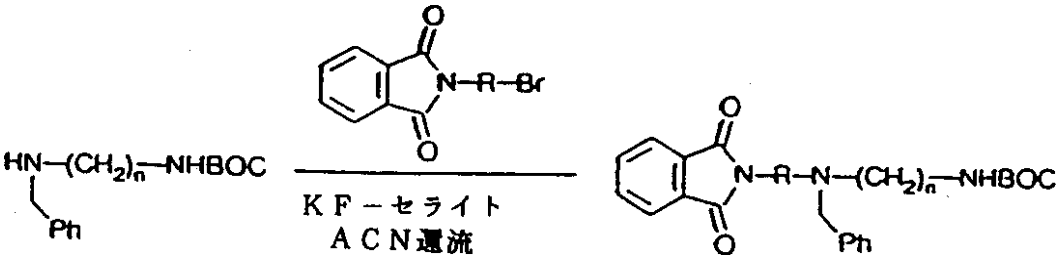
して直接的に行った。
フタルイミド機能性の脱保護は、メタノールを還流しながら、ヒドラジンで還元することにより行った。ＢＯＣ機能性の脱保護は、無水ＴＦＡ中で行った。ベンジル、ニトリル、およびＣＢＺ保護機能性の脱保護は、５５psi水素下で、炭素中水酸化パラジウムの触媒量の存在下、氷酢酸中で還元することにより行った。ニトリル機能性を（ベンジルおよびＣＢＺ基の存在下）水素下で、スポンジ状ラネー・ニッケルの存在下で選択的に還元した。
詳細には、分枝状ポリアミンは、代表的には式$NH_2-(CH_2)_n-NH_2$の簡単なジアミノアルカン、またはスペルミイミドまたはスペルミンなどの簡単なポリアミンから調製される。２つの（末端の）一級アミンの１つをＢＯＣ（ｔ－ブチロキシカルボニル）、フタルイミド、ベンジル、２－エチルニトリル（アミンおよびアクリロニトリルのミカエル縮合製造生成物（Michael condensation production product））またはアミドなどの保護基で保護または“マスク”する。典型的な反応はジ－ｔ－ブチル－ジカルボネート（無水ＢＯＣ）での処理によるＢＯＣ保護基の付加である：



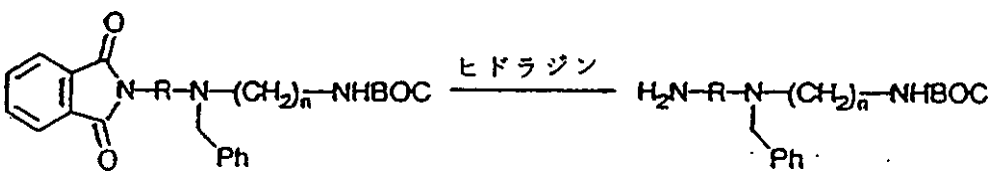

一保護生成物を非保護および二保護生成物から簡単なクロマトグラフ的または蒸留技術により分離する。
その後、一保護生成物において残っている遊離のアミンをアルキル化剤（またはアシル化剤）で選択的にアルキル化（またはアシル化）する。確実に一アルキル化（mono－alkylation）するために、遊離のアミンをベンズアルデヒドとの縮合、続いて水素化ホウ素ナトリウム還元により部分的に保護して、Ｎ－ベンジル誘導体を形成する：




その後、Ｎ－ベンジル誘導体をアルキル化剤と反応させる。典型的なアルキル化剤は、Ｎ－（ブロモアルキル）フタルイミドであり、それは以下のように反応する：



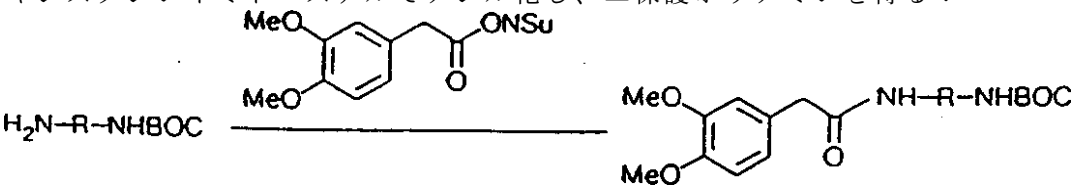

例えば、Ｎ－（ブロモブチル）フタルイミドを用いて、４メチレン単位で鎖を伸長または枝分かれさせる。代替法として、アクリルニトリルとの反応、続いてシアノ基の還元は、３メチレンおよびアミノ基により鎖を伸長するであろう。
生じた鎖伸長分子の保護基をその後、選択的に切断して、新しい遊離のアミンを得ることが出来る。例えば、トリフルオロ酢酸を使用して、ＢＯＣ基を除去し；触媒的水素化を用いてニトリル機能性を還元し、ベンジル基を除去し；ヒドラジンを用いて以下のようにフタルイミド基を以下のように除去する：




新しい遊離アミンは、更に上記のようにアルキル化（またはアシル化）されて、ポリアミンの長さを増加することもある。この工程を所望の鎖の長さおよび分枝の数が得られるま

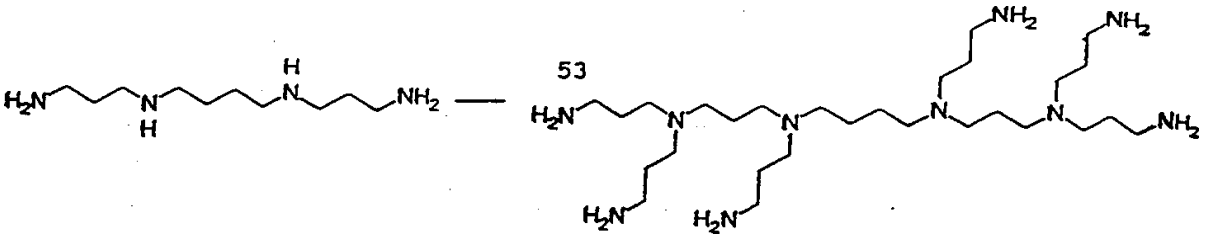
で繰り返す。最終段階で、生成物を脱保護し、結果として所望のポリアミンを生じる。しかしながら、脱保護前に更なる修飾が保護末端で以下の方法によりもたらされる場合があり：

例えば、ＢＯＣ脱保護前に、ポリアミンを３,４－ジメトキシフェニル酢酸のＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルでアシル化し、二保護ポリアミンを得る：




これは、最終的にアリルポリアミンを得ることになる。ＢＯＣ基をその後選択的にトリフルオロ酢酸で除去して、上記のように伸長され得る他のアミノ末端にさらすことが出来る。

ある種の分枝状ポリアミンは、上記で形成したポリアミンにおける遊離の一級および二級アミンを同時にアルキル化またはアシル化することにより得られることもある。例えば、スペルミンを過剰のアクリロニトリルで処理し、続いて触媒的還元すると、以下を得る：




環状ポリアミンをヘキササイクレン（アルドリッチ・ケミカル）などの出発物質で始めて、上記のように調製する場合がある。

本発明の領域内のポリアミノ酸は、当業者に知られている組換え技術により作成しても良く、または当業者に知られている標準的な固相法を用いて合成することもある。固相合成は、ペプチドのカルボキシ末端からα－アミノ保護アミノ酸を用いて、開始される。ＢＯＣ保護基は、他の保護基が安定であるとしても、すべてのアミノ基に対して用いることが出来る。例えば、ＢＯＣ－ｌｙｓ－ＯＨを、エステル化してクロロメチル化ポリスチレン樹脂支持体にすることが出来る。ポリスチレン樹脂支持体は、好ましくはスチレンの共重合体であり、ポリスチレン重合体を完全にある種の有機溶媒に溶解させる架橋剤として約０.５ないし２％ジビニルベンゼンを有している。スチュワート等、固相ペプチド合成（１９６９年）、Ｗ.Ｈ.フリーマン・カンパニー、サンフランシスコ；およびメリフィールド、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー（１９６３年）、８５巻、２１４９－２１５４頁、参照。ペプチド合成のこれらおよび他の方法は、Ｕ.Ｓ.特許第３,８６２,９２５号；第３,８４２,０６７号、第３,９７２,８５９号；および第４,１０５,６０２号にも例示されている。

ポリペプチド合成は、マニュアル技術を用いるか、または例えば、アプライド・バイオシステム・４０３Ａ・ペプチド・シンセサイザー（フォスター・シィー、カリフォルニア）またはバイオサーチ・ＳＡＭＩＩオートマティック・ペプチド・シンセサイザー（バイオサーチ・インコーポレイテッド、サン・ラファエル、カリフォルニア）を用いて自動的に行うこともあり、製造会社により提供された使用マニュアルにおいて与えられた使用説明に従う。

本発明のアリルアルキルアミンは、知られている技術で単離された天然物であり、またはジャシーズ等、テトラヘドロン・レター（１９８８年）、２９巻、６２２３－６２２６頁、およびネイソン等、テトラヘドロン・レター（１９８９年）、３０巻、２３３７－２３４０頁に記載のように合成される。

フェンジリン（または図３６に示したフェンジリン類似体）調製のための１つの一般的なプロトコールは、以下の通りである。磁気撹拌棒とゴム隔膜を備えた１０ml丸底フラスコ内で、２mlエタノール中１.０ミリモル３,３’－ビスフェニルプロピルアミン（または一

級アルキルアミン）を１．１ミリモルのフェノールと１．０ミリモルのアセトフェノン（または置換アセトフェノン）で処理した。これに、２．０ミリモル$MgSO_4$と１．０ミリモル$NaCNBH_3$を加えた。これを窒素雰囲気下、室温（約２０℃）で２４時間撹拌した。反応物を５０mlエーテルに注ぎ込み、１ＮＮａＯＨで３回、ブリンで１回洗浄した。エーテル層を無水$K_2CO_3$で乾燥し、真空下で還元した。生成物をその後、カラムクロマトグラフィーまたは$CH_2Cl_2$－メタノール－イソプロピルアミン（典型的には、塩化メチレン中３％メタノールおよび０．１％イソプロピルアミン）の結合したオシリカ固定相を組み込んだＨＰＬＣにより生成した。

フェンジリンまたはフェンジリン類似体（図３６に表したようなもの）を調製するのに好ましい方法は、チタン（ＩＶ）イソプロポキシドを使用するものであり、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー、５５巻、２５５２頁（１９９０年）に記載の方法を一部修飾したものである。ＮＰＳ５４４の合成には、チタンテトラクロリド（テトラヘドロン・レター、３１巻、５５４７頁（１９９０年）に記載の方法）をチタン（ＩＶ）イソプロポキシドの代わりに使用した。反応スキームを図４３ａに表した。図４３ａにおいて、Ｒ、Ｒ’およびＲ”は、炭化水素基を表している。一実施態様に従うと、４mlバイアル中で、アミン（1）１ミリモル（代表的には、一級アミン）とケトンまたはアルデヒド（2）（一般には、アセトフェノン）１ミリモルを混合し、その後、１．２５ミリモルのチタン（ＩＶ）イソプロポキシド（3）で処理し、時折撹拌しながら、室温で３０分間置いておく。代替法として、二級アミンを（1）の代わりに用いることもある。注意：幾つかの反応は、重い沈殿または固体を生じるであろうが、（それらの融点まで）加温／加熱して反応の過程にわたり数回撹拌／混合させる。反応混合物を１ミリモルのシアノ水素化ホウ素ナトリウム（4）を含有する1mlエタノールで処理し、生じた混合物をその後、室温で時折撹拌しながら約１６時間置いておく。その後、約５００μの水を加えて、反応を止める。反応混合物をその後、総容量約４mlまで、エチルエーテルで希釈し、その後遠心分離する。上部の有機相を除去し、ロートベーパー（rotovapor）で還元する。生じた生成物（6）を、ＨＰＬＣ（ジクロロメタン：メタノール：イソプロピルアミンでシリカを用いる順相、またはアセトニトリルまたはメタノールと共に０．１％ＴＦＡでＣ－１８を用いる逆相）により精製する前に、シリカの短いカラムのクロマトグラフィー（または代わりとしてシリカの分取ＴＬＣを用いることによる）で、ジクロロメタン：メタノール：イソプロピルアミン（典型的には、９５：５：０．１）の組み合わせを用いて、部分的に精製する。

適切または望まれるならば、実施例２１に記載のような方法を用いてキラル分割を行っても良い。

処方および投与

本明細書に示したように、本発明の分子は：細胞外$Ca^{2+}$の１つまたはそれ以上の効果を模倣または拮抗し；（ｂ）細胞外遊離$Ca^{2+}$レベルに個々に影響を与え；（ｃ）上皮小体機能亢進症、エステロプロシスおよび高血圧などの疾患を治療するために用いられ得る。一般に、無機－イオン受容体に関連する疾患または症状が今回検討、診断および／または有利になるように処置され得る。これらの分子は、一般に上皮小体細胞に作用することが示されているのに対し、これらは、また、骨溶骨細胞、傍糸球体の腎臓細胞、近位小管腎臓細胞、遠位小管腎臓細胞、厚いヘレンわなの上行肢および／または集合管の細胞、表皮のケラチノサイト、甲状腺（Ｃ－細胞）中の小胞周縁細胞、腸管細胞、胎盤中の栄養膜細胞、血小板、血管平滑筋細胞、心臓心房細胞、ガストリンおよびグルカゴン分泌細胞、腎臓糸球体細胞および乳房細胞を含む他の細胞での$Ca^{2+}$レセプターを調節することもある。

これらの分子は、典型的にヒト患者の治療に用いられるであろうが、他の霊長類、豚、畜牛および飼鳥類などの農場動物、馬、犬およびネコなどのスポーツ動物などの他の定温動物種において同様のまたは同一の疾患の治療に使用することも可能である。

治療的および／または診断的施用において、本発明の分子は、全身および局所または集中投与を含む様々な投与方法で処方され得る。技術および処方は、一般に、レミントン’ズ

・フアーマシューティカル・サイエンシィズ、マック・パブリッシング・カンパニー、イーストン、ペンシルバニアに見い出され得る。
全身投与には、経口投与が好ましい。代替法として、例えば、筋肉内、静脈内、腹膜内、および皮下注射を用いることもある。注射では、本発明の分子を液体溶液状、好ましくは、ハンク溶液またはリンガー溶液などの生理学的に融和性の緩衝液中で処方される。加えて、該分子を固形で処方し、使用する前に直ちに再溶解または懸濁させることもある。凍結乾燥形も含まれる。
経粘膜的または経皮的方法により、全身投与しても良く、または該分子を経口的に投与することも出来る。経粘膜的または経皮的投与のためには、浸透させる可き障壁に適切な浸透剤を処方に用いる。このような浸透剤は、一般に当業者には知られており、例えば、経粘膜的投与のための胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。加えて、洗剤を用いて浸透を容易にすることもある。経粘膜的投与は、例えば鼻に散布するもの、または坐薬であることもある。経口投与のためには、該分子をカプセル、錠剤、および強壮剤など、適宜の経口投与形で処方される。
局所投与のためには、本発明の分子を、一般に当業者には知られているものとして軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームで処方される。
以下の実施例に示したように、本発明の様々な化合物の投与されるべき量は、標準的手法により決定することが出来る。一般に、処置される動物のkgに対し約１および５０mg／kgの間である。

$Ca^{2+}$レセプター

天然物スクリーニングは、伝統的には多様な治療的分子の開発に対し、手掛かりとなる構造を与えてきた。しかしながら、$Ca^{2+}$レセプターでの活性に対する天然物ライブラリーまたは他の分子ライブラリーの高処理量スクリーニング（high-througput screening）は、以前可能ではなかった。これを可能にするには、$Ca^{2+}$レセプターｃＤＮＡをクローン化し、その後、高処理量スクリーニングに安定なトランスフェクションした細胞系を作るのが最善である。レセプターの構造を用いて、付加的に配位子結合部位の分子の結合構造の洞察を得ることが出来、このような情報を使用して、上記で論議したように合理的薬剤デザイン計画を拡大することが出来る。限定された構造活性研究および選択された天然物分子の試験は、合理的天然物スクリーニングおよび薬剤デザインを導くに必要な最初の構造データベースを与えるものであろう。
遺伝子の上科（superfamily）の発見は、すべての無機－イオン受容体に関連して同じ利益をもたらすものである。下記の検討は時としてカルシウム受容体をクローニングする方法論にのみ言及するものであるが、この方法論が一般に、すべての無機－イオン受容体のクローニングに適用されるものであることが当業者に理解されるであろう。
これらの組換え受容体は、初めて、カルシウム様分子およびカルシウム拮抗分子を含む、－様分子および－拮抗分子のスクリーニングを可能にするものである。例えば、受容体と試験法を結合することによって。これは、特に、ひと受容体を用いてスクリーニングし、治療的に有用な化合物を識別するのに役立つ。
ウシおよびヒト上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターｃＤＮＡは、ツメガエル（Xenopus）卵母細胞における機能発現によりクローン化することが出来る。内生の$Ca^{2+}$活性化$Cl^{-}$チャンネルを通る電流を測定することにより、ツメガエル卵母細胞における細胞間$Ca^{2+}$の増加を間接的に追跡することが可能である。このシグナル形質導入経路により与えられた応答の増幅は、ｍＲＮＡにより暗号化されるレセプタータンパク質の検出を非常に低レベルで可能にする。このことは、レセプター特異性ｃＤＮＡクローンの検出を、高親和性配位子、特異的抗血清またはタンパク質もしくは核酸配列情報の必要がなくても可能にするものである。該方法の実施例は以下である。
成体の雌ゼノプス・ラエビス（Xenopus laevis）はゼノプスＩ（アン・アーバー、ＭＩ）から得られ、常法に従い維持された。卵巣の丸い突出部を低体温法的に麻酔したヒキガエルから摘出した。卵母細胞の房を修飾バース塩水（ＭＢＳ）に移した。個々の卵母細胞を２mg／mlコラゲナーゼ（シグマ、１Ａ型）を含有するＭＢＳ中で２１℃で２時間インキュ

ベートすることによって得、Ｖ－ＶＩ段階の卵母細胞を注入するために選択した。
ガラスキャピラリー管（直径１㎜）を引っ張って細い先端にし、手で折って、先端の直径を約１５μMにする。ｍＲＮＡの小滴（ジエチルピロカーボネート（ＤＥＰＣ）－処理水中１ng／nl）をパラフィルムに置き、キャピラリー管で吸い上げた。その後、そのキャピラリー管をピコスプリッツァー（picospritzer）（ＷＰＩ・インストルメンツ）につなげ、空気－パルスした（air-pulsed）小滴の容量を調節してｍＲＮＡ５０ng（典型的には５０nl）を出した。ナイロンストッキングを当てて底を固定した３５㎜培養皿を用いて、ｍＲＮＡを動物極に注入する間中、卵母細胞を動かないようにした。注入した卵母細胞をＭＢＳ、１００ug／mlペニシリンおよび１００U／mlストレプトマイシンを含有する３５㎜培養皿に置き、１８℃で３日間インキュベートした。
インキュベートに続いて、卵母細胞を１００μlプラスチックチャンバーに置き、流速０.５ml／分で蠕動ポンプを用いてＭＢＳに注いだ。試験分子または非有機ポリカチオンを、別の緩衝液に管を迅速に移すことにより加えた。記録し、電流を通す電極を、１－３モームの抵抗で引っ張られ、３ＭＫＣｌで満たされた薄壁キャピラリー管から組み立てた。卵母細胞に（動物極において）顕微鏡観察下で両方の電極を突き刺し、保持電位（－７０ないし－８０mV）に合わせ、保持電位を維持するために通した電流を測定するために用いられるアクソン・インストルメンツ・アキソクランプ２Ａ電圧－クランプ増幅器につなげた。電流は、直接ストリップ・チャート記録機に記録した。
ｍＲＮＡ調製のために、子牛または二次ＨＰＴ患者から上皮小体を外科的に除去して組織を得た。精製した細胞を調製する必要は無い；腺全体をツメガエル卵母細胞における$Ca^{2+}$レセプターの発現を支配するｍＲＮＡを調製するのに用いた。細胞のＲＮＡ全体を均一化した腺を酸グアニジニウムチオシアネート／フェノール抽出することにより調製した。オリゴ－ｄＴセルロースクロマトグラフィーを用いて、標準方法によりポリ（Ａ）$^{+}$ｍＲＮＡを選択した。ｍＲＮＡの画分の大きさを揃えるために、グリセロール勾配の遠心分離を使用した。ｍＲＮＡを２０mM水酸化メチル水銀で変性させ、ベックマンＴＬＳ５５管内で調製した直線１５－３０％グリセロール勾配上に乗せた（濃度１mg／mlで５０－１００ug）。続いて、３４,０００rpmで１６時間遠心分離にかけ、０.３ml勾配画分を集めて、５mMベーターメルカプトエタノールを含有する等容量の水で希釈した。ｍＲＮＡをその後、２回のメタノール沈澱により回収した。所望ならば、ｍＲＮＡ（ポリ（Ａ）$^{+}$５０－１００ug）を１.２％アガロース／６.０M尿素分離ゲルで、ＲＮＡサイズマーカーの範囲に沿って分離することもある。続いて、エチジウムブロマイド染色によりｍＲＮＡを視覚化し、ＲＮＡを約１－２kbサイズ段階で含有するゲル切片を削り取った。ｍＲＮＡをＲＮＡイド結合細胞間質（RNAid binding matrix）（供給者の標準的なプロトコールに従う；ストラタジーン・インコーポレイテッド）を用いてアガロースゲル切片から回収し、回収したｍＲＮＡ画分はＤＥＰＣ処理水中に溶出した。
回収したｍＲＮＡ量をＵＶ吸収測定により計った。グリセリン勾配の各画分内に含まれるｍＲＮＡのサイズ範囲は、各試料の少量（０.５ug）を用いるホルムアルデヒド／アガロースゲル電気泳動により測定された。ｍＲＮＡのインテグリティー（integrity）をイン・ビトロで各試料を翻訳することにより評価した。網状赤血球溶解物（商業的に入手出来るキット；ＢＲＬ）を用いて各ｍＲＮＡ画分の０.０５－０.５ugを翻訳した。生じた$^{35}$Ｓ－標識タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。無傷のｍＲＮＡは、完全なサイズ範囲のタンパク質合成を支配することが出来、個々のｍＲＮＡ画分のサイズにおおよそ対応していた。
ｃＤＮＡライブラリーをガブラーとホフマンの技術を改良したものに従い、ベクターλＺＡＰＩＩにおいて構築した。卵母細胞アッセーにおいて最適な応答を与える画分由来のＲＮＡを出発物質として用いた。第一鎖ｃＤＮＡ合成は、オリゴ－ｄＴ／NotＩプライマー－リンカーで活性化（primed）された。第二鎖合成は、ＲＮアーゼＨ／ＤＮＡポリメラーゼＩ自己プライミング法（self-priming method）により行った。二本鎖ｃＤＮＡをＴ４ＤＮＡポリメラーゼおよびＴ４リガーゼでｃＤＮＡに連結したEcoＲＩアダプター平滑末端で鈍化（blunted）した。リンカーを切断するNotＩ消化に続いて、ｃＤＮＡの全長を

セファクリル５００ＨＡの排除（exclusion）クロマトグラフィーによりサイズ選択した。第一鎖ｃＤＮＡをα－$^{32}$Ｐ－ｄＡＴＰで放射性標識し、合成および回収段階の全てを続いて放射活性を組み込んで追跡した。大きさで分類したカラムから回収したｃＤＮＡの全長をEcoＲＩ／NotＩ消化されたλＺＡＰＩＩ手に連結（legate）した。連結混合物（ligation mix）を商業的に入手可能な高効率パッケージング抽出物（high efficiency packaging extract）（ストラタジーン・インコーポレイテッド）で試験パッケージ（package）し、適切な宿主株（ＸＬ１－ブルー）に置いた。組換ファージの割合は、ライブラリーがＩＰＴＧとＸ－ｇａｌ上に置かれている場合、青色プラークに対する白色プラークの比率で測定した。

挿入物サイズの平均を無作為に選択した１０個のクローンから測定した。ファージＤＮＡ“ミニープレップス（mini-preps）”をEcoＲＩとNotＩで消化して挿入物を放出させ、アガロースゲル電気泳動によりサイズを測定した。ライブラリーは、＞９０％組織ファージから成っており、挿入物のサイズは、１．５から４．２kbの範囲であった。組換連結（recombinant ligation）を大規模にパッケージし、８００,０００個の一次クローンを産した。パッケージング混合物を滴定し、１５cmプレート当たり５０,０００プラークで覆った。５０,０００クローンの各プールをＳＭ緩衝液中で溶出し、個々に保存した。

クローンプールのそれぞれのプレート溶解物の保存品を小規模のファージＤＮＡ調製に用いた。ファージ粒子をポリエチレングリコール沈澱により濃縮し、ファージＤＮＡをプロテナーゼＫ消化、続いてフェノール：クロロホルム抽出により精製した。ＤＮＡの２０ミクログラムをNotＩで消化し、鋳型としてイン・ビトロでのセンス鎖ＲＮＡの転写に用いた。イン・ビトロ転写は標準プロトコールに従い、総反応容量５０μｌ中Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼおよび５’キャップ類似体$m^7$ＧｐｐｐＧを利用する。ＤＮアーゼＩ／プロテナーゼＫ消化およびフェノール／クロロホルム抽出に続き、ＲＮＡをエタノール沈澱により濃縮して、卵母細胞注入に用いた。

卵母細胞に、それぞれ５０,０００の独立クローンからなる１６ライブラリーサブプール由来の合成ｍＲＮＡ（ｃＲＮＡ）れぞれを注入した。３～４日間インキュベーションした後、卵母細胞の$Ca^{2+}$依存性Ｃｌ－電流の誘導に対する１０mMのネオマイシンの能力を評価した。６と名付けたプールは、陽性信号を示し、従って機能的カルシウム受容体をコード化するｃＤＮＡクローンを含む。プール６の複合性を減少、すなわちこのプール中に含まれるカルシウム受容体クローンの精製を行うために、プール６ファージをプレート当たり～２０,０００プラークで再び平板培養し、１２プレートを回収した。ＤＮＡはそれぞれのこれらのサブプールから製造され、ｃＲＮＡが合成された。再び卵母細胞にｃＲＮＡを注入し、３～４日後、$Ca^{2+}$依存性Ｃｌ－電流の誘導に対する１０mMのネオマイシンの能力を評価した。サブプール６－３は陽性でこのプールは、プール当たり約５,０００クローンに複合性を減少する、さらなる一連の平板培養の対象とした。プールは再びｃＲＮＡの製造および卵母細胞中への注入により測定した。サブプール６－３．４は陽性であった。プール６－３．４の陽性クローンのさらなる精製を促進するために、このプールからのファージＤＮＡをヘルパーファージ、ExAssist（Stratagene）で重感染させることによりプラスミドＤＮＡとして救済した。救済したプラスミドの細菌株DH5alphaF’への形質転換により、アンピシリンプレート上で形質転換細菌コロニーが得られた。これらはそれぞれ９００クローンのプールとして回収した。プラスミドＤＮＡを次にそれぞれのサブプールから製造し、通常の方法でｃＲＮＡ合成および評価をした。サブプール６－３．４．４が陽性であった。プラスミドサブプール６－３．４．４を含む細菌をそれぞれ～５０クローンのサブプールで連続して平板培養した。この方法の繰返しにより機能的カルシウム受容体をコード化する単一クローンが得られることが期待される。

別の検定法は卵母細胞中のカルシウム受容体の発現を検出するのに用い得る。例えば、卵母細胞に$^{45}Ca^{++}$を付加し、ついでカルシウム様分子で処理し得る。分子間貯留からの$^{45}Ca^{++}$の移動は、容易に測定し得る$^{45}Ca^{++}$流出の総量増加をもたらす。蛍光$Ca^{++}$指示剤もまた卵母細胞中に導入し得る。この場合、カルシウム受容体を発現する卵母細胞は、カルシウム様分子で活性化されて増強された蛍光色を示す。これらの試験法は、上記例中

に記載されたカルシウム誘導Ｃｌ⁻電流についての電気生理学的試験法の代わりに、クローニングカルシウム受容体を用いる。さらに、クローニング工程において用いられたカルシウム様分子配位子は上記のようにネオマイシンである必要はなく、その代わりに、例えば、Ｇｄ⁺⁺、Ｃａ⁺⁺、Ｍｇ⁺⁺または他のカルシウム様分子化合物であればよい。

最初の実験は、水またはウシ上皮小体由来ポリ（Ａ）⁺－に富むｍＲＮＡ（５０ng）を注入されたアフリカツメガエル卵母細胞を使用した。３日後、卵母細胞の、細胞外２または３価カチオン濃度の増加に応答する細胞内$Ca^{2+}$増加の能力を評価した。卵母細胞に記録および通電用電極棒を刺し、$[Ca^{2+}]_i$を間接的に内因性$Ca^{2+}$－活性化Ｃｌ⁻チャンネルを通る電流を測定することにより評価した。ウシ（またはひと、Ｆｉｇ.２６）上皮小体由来のポリ（Ａ）⁺－に富むｍＲＮＡを注入された卵母細胞中では、細胞外$Ca^{2+}$の濃度が０.７から３、５または１０mMへの増加が、次に高い基底コンダクタンスの付近で振動するＣｌ⁻電流の急速および一時的増加を生じさせた。細胞外$Mg^{2+}$の１から１０mMへの濃度の増加は、同様にＣｌ⁻電流の振動的増加を引き起こした。Ｃｌ⁻電流の細胞外$Mg^{2+}$に対する応答は細胞外$Ca^{2+}$濃度が＜１μMに減少した場合に持続した（Ｆｉｇ.２５）。

一時的な３価カチオン$Gd^{3+}$（６００μM）はまたＣｌ⁻電流の振動的増加を生じさせた（Ｆｉｇ.２５）。振動性であり、細胞外$Ca^{2+}$の見かけ上不存在下で持続するＣｌ⁻電流のこのような増加は、卵母細胞に他の$Ca^{2+}$－流動受容体の発現され、適当な配位子で促進されることが認められた（例えばサブスタンスＫ、Ｆｉｇ.２５）。これらの例中、Ｃｌ⁻電流の増加は細胞内$Ca^{2+}$の流動化を反映する。これらの最初の研究は同様に細胞外多価カチオンが、細胞内$Ca^{2+}$を、上皮小体細胞ｍＲＮＡ－注入卵母細胞中で流動させることを示す。

水を注入された卵母細胞は、細胞外$Ca^{2+}$（１０mM）または$Mg^{2+}$（２０または３０mM）にさらした場合Ｃｌ⁻電流の変化は示さなかった。一連の実験の中で、卵母細胞はサブスタンスＫ受容体をコード化するｍＲＮＡを注入された。これらの卵母細胞中、細胞外$Mg^{2+}$（２０mM）は電流を引き起こさないが、細胞はサブスタンスＫの添加に活発に応答した（Ｆｉｇ.２５）。これらの実験は、卵母細胞の細胞外$Ca^{2+}$または$Mg^{2+}$に対する内因性の感受性がないことを示唆する。

同様の実験をひと上皮小体（第２期ＨＰＴ由来の過形成組織）から製造したポリ（Ａ）⁺－に富むｍＲＮＡを注入した卵母細胞を用いても行った。これらの卵母細胞では、細胞外$Ca^{2+}$濃度の増加は振動しているＣｌ⁻電流の可逆的増加を生じさせた（Ｆｉｇ.２６）。３００μＭ$La^{3+}$の添加も同様にＣｌ⁻電流の振動的増加の原因となった。細胞外$Mg^{2+}$の１から１０mMへの増加が、細胞外$Ca^{2+}$不存在下で持続するＣｌ⁻電流の増加を引き起こした。付加実験は、細胞外$Ca^{2+}$に対する反応が濃度依存性であることを示唆する。したがって、３個のｍＲＮＡ－注入卵母細胞中、Ｃｌ⁻電流は最大１１１±２nAまで３mMの、および２３３±１０１nAまで１０mMの細胞外$Ca^{2+}$で増加した。

アフリカツメガエル卵母細胞で得られた結果は、通常非反応性細胞中で、細胞外$Ca^{2+}$の感受性を与えることができる蛋白質をコード化する、上皮小体細胞中のｍＲＮＡ（類）の存在を証明する。さらに、細胞外$Mg^{2+}$の、細胞外$Ca^{2+}$不存在下でＣｌ⁻電流の振動性増加を引き起こす能力は、Ｃｌ⁻電流が、細胞外$Ca^{2+}$の流入よりむしろ細胞内$Ca^{2+}$の流動に依存することを証明する。$La^{3+}$で得られた結果も同様に、発現蛋白質が、細胞内$Ca^{2+}$の流動に関連していることを示す。まとめると、これらのデータは発現蛋白質はチャンネルというよりもむしろ細胞表面受容体として働く。これらの研究は、上皮小体細胞上の$Ca^{2+}$受容体蛋白質に存在の注目せずにはいられない証拠を提供し、$Ca^{2+}$受容体ｃＤＮＡの分子クローニングを成し遂げるためアフリカツメガエル卵母細胞系を使用することの可能性を示す。

他の一連の研究で、水酸化水銀メチルで変成させた上皮小体細胞のｍＲＮＡは、グリセロール勾配による遠心分離ででサイズ分画した。画分を回収した。それぞれの群をアフリカツメガエルの卵母細胞系に注入し、３日間のインキュベーションの後、卵母細胞を$Ca^{2+}$受容体の発現に対して評価した。画分４－６を注入された卵母細胞が、細胞外$Ca^{2+}$に反

応したＣｌ⁻電流の最大で最も調和した増加を示した。これらの結果は、Ｃａ$^{2+}$受容体がサイズ２．５－３．５kbのｍＲＮＡによりコード化されていることを示す。これは、形質転換ベクターｃＤＮＡライブラリーから合成されたＲＮＡの直接発現を用いた方法が、可能性があることを示唆する。この種のサイズ分画実験が行われ、異なった３種の分画実験でそれぞれ同様の結果が得られた。

前記の実験で得られ、特徴付けられたｍＲＮＡ画分は卵母細胞に注入することにより測定できる。それぞれのｍＲＮＡ画分で、１０－２０個の卵母細胞に５０ngのＲＮＡが、濃度１ng／nl水溶液として注入される。注入された卵母細胞は１８℃に４８－７２時間維持され、その後Ｃｌ⁻電流測定を用いたＣａ$^{2+}$受容体の発現を測定する。注入した卵母細胞のそれぞれの群で、受容体発現に対する陽性の数、および測定したＣａ$^{2+}$－依存性Ｃｌ⁻電流の大きさを測定する。陰性対象として、卵母細胞にラット肝臓ポリ（Ａ）$^{+}$－に富むｍＲＮＡ、酵母ＲＮＡまたは水を注入する。

２．５－３．５kbの範囲のｍＲＮＡは受容体をコード化することが予想される。大きいサイズのｍＲＮＡは、卵母細胞への注入に先立つ上皮小体ｍＲＮＡのハイブリッド除去を基本にしたクローニング研究に必要であり得る。この方法の成功は完全な長さのｃＤＮＡクローンの産生に依存しない。もし受容体発現がｍＲＮＡの単一サイズの画分で得られない場合、卵母細胞にサイズ混合画分を注入し、機能的受容体を上昇させる組み合わせを決定する。もし、多重サブユニットが機能的受容体の形成のために必要であることが明らかになった場合、ハイブリッド除去発現クローニング法が使用される。この研究で、クローンは、特異的ｍＲＮＡ種を全ｍＲＮＡ集団から枯渇させるその能力を基本にして選択される。単一サブユニットをコード化するクローンは、活性多重サブユニット複合体形成の阻止能力により同定する。徹底的なスクリーニングにより、必要なサブユニットの全てをコード化するクローンの同定が可能になる。

この研究は、機能的受容体複合体を形成するために必要な個々のサブユニットをコード化するクローンの単離を可能にする。クローンのプール由来の合成ＲＮＡは、アフリカツメガエル卵母細胞にＣａ$^{2+}$受容体の発現を誘導する能力により、基本ｍＲＮＡ画分の測定に使用したのと同様の技術で評価する。本来、それぞれ１００，０００個の初期クローンを表す１０個のプールが試験される。陽性反応を示すクローンのプールは低い（一般的に４～１０倍）配合性でふるい分け、再び陽性プールを小分けし、ふるい分ける。ライブラリー細分画におけるこの方法は、個々の陽性クローンが同定されるまで続ける。卵母細胞発現測定の陰性対象として、アンチセンス転写物が、陽性反応を誘導するこれらの鋳型ＤＮＡのＴ７転写により産生される。アンチセンス転写物は標準受容体を発現できず、合成ＲＮＡの注入により発生する任意の非特異的陽性信号を制御する。他の重大なことは、卵母細胞中の合成ＲＮＡが、未確認の機構により時々「有毒」に翻訳され得るという事実である。この可能性を制御するために、陰性反応を与える合成ＲＮＡを、上皮小体細胞ｍＲＮＡと共に種々の希釈で共注入し、それらがＣａ$^{2+}$受容体の発現の非特異的妨害をするかどうか測定する。

Ｃａ$^{2+}$受容体をコード化する個々のクローンが同定された場合、挿入ｃＤＮＡはλベクターから切除され、合成ＲＮＡの大きいスケールでの合成に使用される。この単一ＲＮＡ種の卵母細胞注入は、発現受容体の特徴の厳密な測定を可能にする。

もしＣａ$^{2+}$受容体をコード化するｍＲＮＡのサイズが直接転写によるクローニングおよび発現に大きすぎる場合、またはたとえ多重サブユニットが含まれても、スクリーニングしたクローンのプールはハイブリッド除去技術が使用される。ｃＤＮＡ挿入ＤＮＡは、サイズ選択上皮小体細胞ｃＤＮＡライブラリーからのクローンのプールから製造される。このＤＮＡは上皮小体細胞ｍＲＮＡへ、ＤＮＡ／ＲＮＡ２重体の形成が可能な条件下でハイブリダイズされる。非アニール化、ハイブリッド除去ＲＮＡは回収され、卵母細胞注入へ使用される。ハイブリッド除去またはハイブリッド挿入のための別の方法は別におよび当分野の技術者に既知の方法を使用し得る。Ｃａ$^{2+}$受容体ｍＲＮＡを示す配列を含むクローンのプール由来のＤＮＡはこの全上皮小体細胞ｍＲＮＡ集団由来のｍＲＮＡから除去され、この受容体の発現は卵母細胞注入により減少しまたはなくなる。細分画の方法は、クロー

ンのプールの複合性の減少により生じ、それぞれの工程で、全上皮小体ｍＲＮＡ集団からＣａ$^{2+}$受容体コード化ｍＲＮＡを除去したクローン化ＤＮＡを測定する。ハイブリッド除去測定の間の内部制御の使用は、ハイブリッド除去ＲＮＡは無傷であり卵母細胞への形質転換に用いられることを確実とする。

ひと上皮小体細胞はアデニレートサイクラーゼに結合したベーターアドレナリン様受容体を発現する。この受容体は卵母細胞中で発現でき、そこでそれは内因性アデニレートサイクラーゼのアゴニストー誘導活性化を担う。Ｃａ$^{2+}$受容体クローンのハイブリッド除去スクリーニングの間、ハイブリッド除去ｍＲＮＡを注入された卵母細胞はイソプロテレノールー誘導アデニレートサイクラーゼ活性化として測定される。この測定における陽性反応は、Ｃａ$^{2+}$受容体反応の任意の観察される阻害が特異的であり、全ｍＲＮＡ集団の一般的な阻害によるものではないという示唆に役立つ。

ハイブリッド除去スクリーニング法により、完全蛋白質コード化領域を含まないクローンの単離ができる。このスクリーニング法により単離された陽性クローンは、蛋白質コード化能力を測定するために順番に配列する。ひと上皮小体ＲＮＡのノーザンブロット分析は、特異的クローンに対応する完全ｍＲＮＡのサイズの測定を可能にする。もし陽性クローンが完全な長さと思われない場合、クローン化ｃＤＮＡは、完全ｃＤＮＡのための上皮小体ｃＤＮＡライブラリーをふるい分けるハイブリダイゼーションプローブとして使用する。

種々の細胞系で、内因性機能性受容体のための連結外因性発現受容体が可能である。これらの細胞系の多く（例えばＮＩＨ－３Ｔ３、ＨｅＬａ、ＮＧ１１５、ＣＨＯ、ＨＥＫ、２９３およびＣＯＳ７）が内因性Ｃａ$^{2+}$受容体を欠いていることを確認するために試験できる。外部のＣａ$^{2+}$への反応を欠いたこれらの系は、クローン化Ｃａ$^{2+}$受容体を発現する安定した形質導入細胞の確立に使用できる。

これらの安定なトランスフェクタントの製造は、Ｃａ$^{2+}$受容体ｃＤＮＡのコード配列が多重クローニング部位内にクローン化されているｐＭＳＧなどの真核発現ベクターで適当な細胞系をトランスフェクションすることによって達成される。これらの発現ベクターは、様々な哺乳類細胞中で高レベルなｃＤＮＡの転写を駆動するマウス乳腫瘍ウイルスプロモーター（ＭＭＴＶ）などのプロモーター領域を含有する。さらに、これらのベクターは目的のｃＤＮＡを安定に発現させる細胞を選択するための遺伝子をも含有する。ｐＭＳＧ中の選択可能な標識（マーカー）は、トランスフェクションされていない細胞を殺すために培養に加えられる代謝阻害因子に対する耐性を付与するキサンチン-グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（ＸＧＰＲＴ）という酵素をコード化している。通常は、高処理量スクリーニング検定法で使用されるＣａ$^{2+}$受容体発現細胞系を生産するための至適条件を決定するべく、様々な発現ベクターと選択法を評価する。

プラスミドＤＮＡで真核細胞系をトランスフェクションするための最も効果的な方法は与えられた細胞型によって異なる。Ｃａ$^{2+}$受容体発現構築物を適当な技術、即ちＣａ$^{2+}$リン酸沈殿法、ＤＥＡＥ-デキストラン・トランスフェクション法、リポフェクションもしくはエレクトロポレーションで培養細胞に導入する。

トランスフェクションされたＤＮＡを安定に取り込んでいる細胞を上述の選択培地に対するそれらの耐性によって同定し、耐性コロニーの拡張によってクローン細胞系を生産する。これらの細胞系によるＣａ$^{2+}$受容体のｃＤＮＡ発現は溶液ハイブリッド形成とノーザンブロット分析によって評価する。受容体タンパク質の機能的な発現は、細胞内Ｃａ$^{2+}$の流動化を外部から添加するＣａ$^{2+}$受容体作用薬に対する応答として測定することによって決定する。

Ｃａ$^{2+}$受容体のクローニングは、この新規受容体の構造的研究と機能的研究の両方を可能にする。組換え生産された受容体を構造的研究のために結晶化することもできる。この受容体を発現させる安定にトランスフェクションされた細胞系を天然の産物や他の化合物ライブラリーの高処理量スクリーニングに用いることができる。必須の効力と特異性を有する分子を（放射線や蛍光的に）標識することができる。このような標識分子を置換するという試験分子／抽出物の能力は、スクリーニングのための高処理量検定法の基礎を為す。

卵母細胞内で無機イオン受容体をクローニングするもう１つの方法は次の通りである。カエル卵母細胞の単離、デフォリキュレーション（defolliculation）および注入の一般的な手法について以下に記述する。簡単に述べると、０.１７％トリカインに浸けることによってXenopus laevisカエルを麻酔し、卵巣の葉（lobe）を摘出し、小片に破砕する。カルシウムを含有しない緩衝液中室温で９０分間卵巣組織をインキュベートした後、Ｌ-型毛細管を用いて個々のＶ-ＶＩ期卵母細胞を単離する。次に、分離した卵母細胞［通常１実験あたり２００～３００］をコラーゲナーゼ溶液［Sigma,ＩＩ型；２ｍｇ／ｍｌ］中でさらに９０分間インキュベートした後、微細ピンセットで小胞状層を除去することができる。デフォリキュレーションされた卵母細胞をカエルリンゲル［ＮＤ９６］中１７℃で終夜インキュベーションし、変性卵母細胞を除去する［通常は全体の＜２～３％］。次に、生き残った卵母細胞に$H_2O$ ５０ｎｌ［対照］またはポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡ［１５～５０ｎｇ／卵母細胞；$H_2O$ ５０ｎｌ中］を注入した後、１７℃で２～４日間インキュベートする。（カエルリンゲル［ＮＤ９６］は次の成分を含有する（ｍＭ）：ＮａＣｌ（９６）、ＫＣｌ（２）、$CaCl_2$（０.５）、$MgCl_2$（０.５）、ＨＥＰＥＳ（５）、ピルビン酸（２.５）。）

グアニジニウムチオシアネートで組織［腎臓、破骨細胞など］から全ＲＮＡを抽出し、ＣｓＣｌクッションで分離する。次に、オリゴ（ｄＴ）セルロースクロマトグラフィー［このカラムに２回通す］によってポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡを単離する。アガロースゲル電気泳動によってポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡの完全性を評価する。細胞外Ｇｄ$^{3+}$にさらした時にＣａ$^{2+}$依存性Ｃｌ$^-$チャンネル活性を生じさせるという２０～５０ｎｇのポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡの能力を［即ち、Ｃａ$^{2+}$受容体活性の証拠として］評価する。次の段階は、Ｃａ$^{2+}$受容体活性を発現させるｍＲＮＡの位置を小さいサイズ範囲（～１ｋｂ）に特定することである。このために、ショ糖勾配によって約１００μｇのポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡを分離し、その勾配から４０個のサイズ分画を集める。別法として、調製用連続フローアガロースゲル電気泳動［Hediger,M.A.：Anal.Biochem.159:280-86(1986)］によって約２００～３００μｇのポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡを分画し、７０～９０個の分画を集めることができる。これらのプールから得られるポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡ［０.２～０.５ｎｇ／卵母細胞］分画の分画のプール［３～５分画／プール］をX.laevis卵母細胞に注入し、Ｃａ$^{2+}$受容体活性を生じさせるというこれらプールの能力について評価する。最高のＣａ$^{2+}$受容体活性を与えるプールから得られる個々の分画を卵母細胞に注入して、卵母細胞内でＣａ$^{2+}$受容体を最高に発現させるこのポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡプール内の分画を明確にする。

スーパースクリプト・プラスミド（SuperScript Plasmid）系［ｐＳＰＯＲＴ１；ＢＲＬ］を用いて、このポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡプールから指向性ｃＤＮＡライブラリーを構築する。スーパースクリプト、ＭｕＭＬＶ-ＲＴ、逆転写物［これらの多くはコード領域の全長であろう］を用いてｃＤＮＡを作成する。ｃＤＮＡをゲル電気泳動によってサイズ分画し、［ポリ（Ａ）$^+$ＲＮＡサイズ範囲に基づく］適当なｃＤＮＡサイズ領域をジェネクリーン（GENECLEAN）ＩＩ［Ｂｉｏ １０１］を用いて抽出する。次に、サイズ選択されたこのｃＤＮＡを、３’末端のＮｏｔＩプライマーと５’末端のＳａｌＩ用アダプターを用いてｐＳＰＯＲＴ１プラスミドベクター中に指向的に連結する。得られたプラスミドをエレクトロポレーションによってエレクトロマックス（ELECTROMAX）ＤＨ１８Ｂ細胞［ＢＲＬ］に導入する。形質転換された細菌をニトロセルロースフィルター上で生育させ［５００～８００コロニー／フィルター］、原フィルターを４℃［短時間］もしくは－７０℃［長期間］で保存する。複製フィルターを生育させ、そのフィルターからプラスミドＤＮＡを単離し、制限切断によって直線化した後、インビトロ転写［Ｃａｐ類縁体存在下でのＴ７プロモーター］によるセンスｃＲＮＡ合成の鋳型として使用する。ｃＲＮＡのプールを卵母細胞に個別に注入し、それを、Ｃｌ$^-$流のＧｄ$^{3+}$誘発性［１～１００μＭ］活性化の発現について検定する。卵母細胞内でＣａ$^{2+}$受容体活性を発現させるクローンを同定するには標準的な姉妹選択法を使用する。

Ｃａ$^{2+}$受容体ｃＤＮＡの制限地図を作成し、適当な制限断片をｐＳＰＯＲＴ１中にサブクローニングする。標準的な方法［シークエナーゼ・ポリメラーゼ（Sequenase Polymerase

）２$^{R}$,ＵＳＢ］を用いて、サブクローン化したｃＤＮＡを双方向的に配列決定する。サブクローン内もしくはサブクローン間の領域を配列決定する必要がある場合や、圧縮された配列領域もしくは不明瞭な配列領域を解析する必要がある場合には、配列決定用プライマー（１８マー)を使用する。Ｃａ$^{2+}$受容体タンパク質のコード領域は、好ましくはコザック（Kozak）共通配列と相同な開始部位を有する最長の読み取り枠から決定する。ハイドロパシーと他のタンパク質アルゴリズムを用いてＣａ$^{2+}$受容体タンパク質に関するトポロジーを作成する。そのｃＤＮＡのヌクレオチド配列、そのＣａ$^{2+}$受容体タンパク質のアミノ酸配列およびそのタンパク質トポロジーを、データベース中に存在する他のＣａ$^{2+}$受容体ならびに他の既知のｃＤＮＡおよびタンパク質のそれと比較する。相同な領域はカチオンの結合または調節に関与するドメインを表すかもしれない。

無機イオン受容体核酸を単離するための現在好ましい方法はハイブリッド形成スクリーニングに基づいている。

ＢｏＰＣａＲ１から誘導される領域特異的なプライマーまたはプローブを用いることによって、ＤＮＡ合成とＰＣＲ増幅を始動させると共に、既知の方法（Innisら,PCR Protocols,Academic Press,カリフォルニア州サンディエゴ（1990））で無機イオン受容体ファミリーの構成要素をコードするクローン化ＤＮＡを含有するコロニーを同定することができる。

無機イオン受容体をコード化する核酸から誘導されるプライマーを使用する場合、高い厳密度条件、５０～６０℃でのアニーリングを使用することによって、そのプライマーに対して約７６％以上相同な配列が増幅されるであろうことを当業者は認識するであろう。より低い厳密度条件、３５～３７℃でのアニーリングを使用することによって、そのプライマーに対して約４０～５０％以上相同な配列が増幅されるであろう。

無機イオン受容体から誘導されたＤＮＡプローブをコロニー／プラークハイブリッド形成に使用する場合、高い厳密度条件、５０～６５℃、５×ＳＳＰＣ、５０％ホルムアミドでのハイブリッド形成、５０～６５℃、０.５×ＳＳＰＣでの洗浄を使用することによって、そのプローブに対して約９０％以上相同な領域を有する配列を得ることができ、より低い厳密度条件、３５～３７℃、５×ＳＳＰＣ、４０～４５％ホルムアミドでのハイブリッド形成、４２℃、ＳＳＰＣでの洗浄を使用することによって、そのプローブと３５～４５％以上相同な領域を有する配列が得られるであろうことを当業者は認識するであろう。

無機イオン受容体ファミリーの構成要素をコード化するゲノムＤＮＡの供給源としてはいずれの組織を使用してもよい。しかしＲＮＡの場合、最も好ましい供給源は所望の無機イオン受容体ファミリー構成要素の発現レベルが上昇している組織である。本発明では、そのような組織供給源からの発現を同定するために、卵母細胞注入と２電極全卵母細胞電圧クランピング（two-electrode whole oocyte voltage clamping）を使用した。しかし本明細書に記載の配列を使用することによって、今では、無機イオン受容体配列をノーザンブロットや原位置ハイブリッド形成法でのプローブにしてそのような細胞を同定することが可能であるから、このファミリーの最初の構成要素をクローン化するために使用した手法の必要性はなくなり、また、無機イオン受容体の発現レベルが上昇している組織からＲＮＡを得る必要もなくなった。

さらに本発明は、無機イオン受容体ファミリーの構成要素を発現させる細胞または組織を同定する方法をも提供する。例えばＢｏＰＣａＲ１のＤＮＡ配列、その断片もしくは無機イオン受容体タンパク質ファミリーの他の構成要素をコード化するＤＮＡ配列からなるプローブをプローブもしくは増幅プライマーとして使用することにより、そのプローブもしくはプライマーに相同なメッセージを発現させる細胞を検出することができる。当業者であれば、現在利用できる核酸増幅技術や核酸検出技術を、無機イオン受容体ファミリーの構成要素をコード化する配列に基づくプローブもしくはプライマーを使用するように適合させることは容易にできる。

他の受容体を発現させる適当な細胞もしくは組織が与えられれば、上皮小体細胞カルシウム受容体について上述した方法と類似の方法でこれらの受容体をクローン化することができる。例えばヒト破骨細胞腫組織から得られるｍＲＮＡは破骨細胞カルシウム受容体をコ

ード化している（図３４）。したがって、ヒト破骨細胞受容体のクローンを単離するには、破骨細胞腫組織から上述のようにｍＲＮＡを単離し、ｃＤＮＡライブラリーを調製し、サブプールを検定／分画するだけでよい。さらに、薬物スクリーニングに好ましい受容体はヒト起源のものである。ある種の受容体をコード化するクローンを用いることによって、当業者にはよく知られている交差ハイブリッド形成で対応するヒトｃＤＮＡクローンを得ることができる。加えて、上皮小体細胞や他の細胞の受容体のクローンは、他の細胞中の類似する無機イオン検知タンパク質をコード化する遺伝子の単離と、それらタンパク質の発現を可能にする。これは様々な方法によって達成される。$Ca^{2+}$受容体ｃＤＮＡをハイブリッド形成プローブとして使用するヒトゲノムＤＮＡのサザンブロット分析は、そのゲノム内にコード化されている関連配列の数の指標を与え、様々な厳密度におけるハイブリッド形成はそれら関連配列間のダイバージェンス（分岐）の程度の指標を与えるであろう。これは関連する受容体タンパク質をコード化する遺伝子の潜在的な数に関する情報を提供するであろう。$Ca^{2+}$受容体ｃＤＮＡをプローブとするノーザンブロット分析は、同じ転写物もしくは関連する転写物が様々な組織の中に存在するかどうかを決定するであろう。上皮小体細胞$Ca^{2+}$受容体に相同な関連する転写物が検出される場合、適当なｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするか、またはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術によって、これらのｍＲＮＡのクローンを得ることは比較的簡単な問題である。

標的遺伝子歩行（ＴＧＷ）は標準的なポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）の変法であり、これは配列がわかっている短い部分に隣接する未知のＤＮＡ配列の増幅を可能にする。Parkerら,Nucl.Acids Res.,19:3055（1991）。２つの既知のプライマー部位の間のＤＮＡ配列を増幅する従来のＰＣＲ技術とは異なり、ＴＧＷは１つのそのような部位に隣接するＤＮＡを増幅することができる。したがってＴＧＷは、既知の配列の上流もしくは下流にある配列を単離するための従来のクローニング法とライブラリースクリーニング法の代替法として機能することができる。この手法を用いることによって、配列情報の量が限られている出発ＤＮＡ鋳型から遺伝子を単離することができる。

第１に、１つの「標的プライマー」と異なる「歩行プライマー」とを用いていくつかの標準的ＰＣＲ反応を平行して行う。標的プライマーは目的のＤＮＡ分子上の既知の配列に対して正確に相補的な配列特異的プライマーであり、未知の隣接配列に向かっている。歩行プライマーは標的プライマー近くのＤＮＡに対して相補的でない非特異的配列である。歩行プライマーは標的プライマー配列とは無関係ないずれのオリゴヌクレオチドであってもよい。第１シリーズのＰＣＲでは、標的プライマーがハイブリッド形成している鎖に隣接し、かつ、相補的なＤＮＡ鎖に対して、歩行プライマーがアニールする場合にのみ産物が生産される。目的のＰＣＲ産物は好ましくは５キロ塩基のサイズ範囲内である。増幅産物はＤＮＡ鋳型に対して歩行プライマー内に６０％程度の誤対合ヌクレオチドを伴って生産される。完全は塩基対は歩行プライマーの３’の最初の２ヌクレオチドについてのみ要求されるが、それ以外では部分的な相同性が許容される。アニーリング温度は、アガロースゲル電気泳動で同定されるＰＣＲ産物の数を決定する上で重要な変数である。

第２に、「内部検出プライマー」を用いてオリゴマー伸長検定を行う。このプライマーは、先の２つのプライマー間にあって標的プライマーに隣接する既知の配列を表す。内部検出プライマーを$^{32}$Ｐ-ガンマ-ＡＴＰでキナーゼ処理した後、第１ＰＣＲから得られるＤＮＡを鋳型とする１回のＰＣＲサイクルで使用する。この伸長は標的プライマーに隣接する第１ＰＣＲ中の産物を同定する。これらの新しい産物をアガロースゲル電気泳動とオートラジオグラフィーによって同定する。内部検出プライマーにハイブリッド形成しない産物はいずれも、プライマーの部分集合によって生産される非連続的な増幅産物を表す。

最後に、オリゴマー伸長検定法で同定されたバンドをゲルから切り出し、標的プライマーとそのバンドを最初に生産した歩行プライマーとを用いる標準的なＰＣＲによって再増幅する。次に、この新しいＰＣＲバンドを直接的に配列決定することにより、わかっていなかった配列情報を得る。

反対方向に情報を拡張するためには、標的および内部検出プライマーから補集合を作成し、上記操作においてそれらの順番を反対にする。

ハイブリッド形成スクリーニングおよびクローニングを行う際には、次の点を考慮すべきである。遺伝子コードには縮重が存在するので、ほとんど全てのアミノ酸（トリプトファンとメチオニンを除く）について複数のコドンが存在する。さらに、特定のコドンの使用頻度はヒトと比較するとヒト以外では異なる。コドン縮重とヒトが好むコドンを考慮に入れて、オリゴヌクレオチドを合成する。さらに、考え得るコドンの様々な置換を伴うオリゴヌクレオチドをも合成する。膨大な数を避けるため、コードの縮重がもたらす考え得る配列のすべてを合成する必要はない。むしろ、最も発現頻度の高いコドンの部分集合を選択する。

このようにして得られる新規受容体クローンを、卵母細胞もしくはトランスフェクションされた細胞系における発現によって機能的に評価することができる。そうすれば細胞特異的な無機イオン受容体を発現させるトランスフェクションされた細胞系は、例えば破骨細胞や傍糸球体細胞などのイオン検知機構に対して特異的に作用する分子の高処理量スクリーニングの手法を提供することができる。

別法として、カルシウム受容体を真核細胞中での発現によってクローン化することができる。例えば上皮小体ｍＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを調製し、それをｐＣＤＮＡ１などの真核発現ベクター中にクローン化することができる。このライブラリーから得られるサブプールをＣＯＳ７やＨＥＫ２９３細胞などの真核細胞中にトランスフェクションすれば、コード化されているｃＤＮＡ配列の比較的高レベルな一時的発現を得ることができる。機能カルシウム受容体クローンでトランスフェクションされた細胞は、カルシウム、ネオマイシンまたは他のカルシウム様化合物によって活性化され得るカルシウム受容体を発現させるであろう。［$Ca^{2+}$］$_i$のための蛍光測定用指示薬を最初に細胞に充填すれば、カルシウム受容体の活性化が蛍光の増大をもたらす。このように、真核細胞中にトランスフェクションされた時に蛍光のカルシウムまたはカルシウム様特異的増大を誘発するというそれらの能力によって、カルシウム受容体を含有するライブラリーサブプールを同定する。この蛍光は蛍光計か、もしくは蛍光活性化細胞選別機（ＦＡＣＳ）を用いて検出することができる。

また、本明細者らは、Ｇ蛋白質結合受容体を発現するＣＯＳ７細胞を検出するための「カルシウム捕捉検定」を開発した。この検定においては、ＣＯＳ７細胞単層をウシ上皮小体細胞ｃＤＮＡライブラリー（例えば、ｐＣＤＮＡ１において調製したライブラリーからのサブフラクションまたはプール）由来のｃＤＮＡクローンでトランスフェクションし、$Ca^{2+}$受容体のアゴニストによる処理に応答して放射活性$^{45}Ca^{++}$を捕捉するそれらの能力を検定する。この単層にエマルジョン・オートラジオグラフィーを行ない、$^{45}Ca^{++}$を捕捉した細胞を暗視野顕微鏡下での写真上の穀粒状房の存在によって同定する。次いで、陽性信号を与えるライブラリープールを、この信号を与える単一のｃＤＮＡが同定されるまで続けて小分割する。

カルシウム受容体は、細胞内信号に結合するリガンドに結合するためにいわゆる「Ｇ」蛋白質を利用する一群の受容体に機能的に関連しているようである。このような「Ｇ－結合」受容体は、受容体活性化された「Ｇｓ」蛋白質によるアデニルシクラーゼの刺激によって細胞内環状ＡＭＰの増加を誘導することができるか、またはその他では受容体活性化された「Ｇｉ」蛋白質によるアデニルシクラーゼの阻害によって環状ＡＭＰの減少を誘導することができる。他の受容体活性化されたＧ蛋白質はイノシトール三リン酸レベルの変化を導き、細胞内貯蔵からの$Ca^{++}$の放出の結果を与える。この後者の機序は、カルシウム受容体に特によく当てはまる。既知のＧ結合受容体の全ては構造的に関連しており、７つの保存性のトランスメンブランドメインを有している。このような受容体の多数が、先にクローン化された受容体に対する配列相同性に基づいてクローン化されている。１つの特に有用なアプローチは、保存性トランスメンブランドメイン暗号領域に相同な同義プライマーを用いること、およびポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を用いてこれらの配列をコードしているＤＮＡ領域を増幅することである。即ち、このようなオリゴヌクレオチドプライマーを、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡないし選択した組織から単離したＲＮＡと混合し、ＰＣＲを行なう。一部の実験法では、選択した組織から新規なＧ－結合受容体配列を特

異的に増幅することが必要になることがあるが、これはこれらが既知のＧ－結合受容体と必ずしも同一ではないためである。このことは、当業者にはよく理解されていることである［例えば、Buck,L.およびAxel,R.（1991）Cell, 65:175-187］。
また、カルシウム受容体を上記のようなＰＣＲ法によってクローン化することができる。カルシウム受容体をコードしている配列をＰＣＲ増幅するのに用いることができる同義オリゴヌクレオチドプライマー対の２つの例を以下に挙げる。第１の対は、それぞれトランスメンブランドメインIIおよびVIIをコードしている配列においてＧ－結合受容体の大部分が示す交差相同性に基づいている。第２のプライマー対は、カルシトニン、セクレチン、ＰＴＨおよびＧＬＰ受容体を含むＧ－結合受容体のより分岐したサブグループが示す交差相同性に基づいている。この対は、トランスメンブランドメインIIIおよびVIIをコードしている保存性配列に対応している。これら２つのプライマー対の一方または両方を上皮小体細胞または破骨細胞組織に由来するｃＤＮＡと混合したときには、例えば、ＰＣＲ増幅によって約５００～８００塩基対の増幅されたＤＮＡが生成する結果になる。これらのＤＮＡを単離し、カルシウム受容体配列の存在について分析することができる。例えば、それぞれの増幅された配列を完全長ｃＤＮＡクローンを単離するためのプローブとして用いることができ、次いでこのクローンを上に示した１またはそれ以上の検定で評価して無機イオン受容体がコードされているか否かを決定することができる。

プライマー対１：

```
5' GACTACTTCCTGGTGAACCTGGC 3'
   A   T    T  T C C   C

------------------------------

5' TCAAIGAGCCIGTAGATGATGGGGTT 3'
    T C   AGG A  A AC CA  A
                  GC
```

プライマー対２：

```
5' AACTACTICTGGITGCTGGTGGAGGGCCTCTA 3'
               C        A  GG G
               T

-------------------------------------

5' GAAGCAGTAIATAATGGCAACAAAAAAGCCCTGGAA 3'
     A        G CA     G    GA
                       C     T
```

別の方法においては、無機イオン受容体を、受容体に対して生成させたモノクローナル抗体の使用によってクローン化することができる。モノクローナル抗体は、特定蛋白質の免疫親和性精製のための強力な手段を与える。精製したときには、限定されたアミノ酸配列のデータを所望の蛋白質から得ることができ、これを用いて完全ｃＤＮＡ配列のクローンをスクリーニングするためのオリゴヌクレオチド配列プローブを設計することができる。
カルシウム受容体が関係する例を説明する。ハイブリドーマを調製するために、全ウシ上皮小体細胞を免疫原として用いる。精製して分散した細胞を得、生存または固定細胞調製物を確立された方法に従って適当なマウス株の腹腔内に注射する。免疫計画およびハイブリドーマの調製については通常のプロトコールに従う。２工程スクリーニング法を用いて$Ca^{2+}$受容体を認識するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを同定する。最初のスクリーニングは、上皮小体細胞表面抗原を認識するモノクローナルを同定する。次いで、免疫組織化学的方法を用いて、上皮小体細胞の表面に結合するマウス抗体の存在につ

いてハイブリドーマ上清をスクリーニングする。このスクリーニングは、上皮小体組織の固定切片を用いて、または１次培養の分散細胞を用いて行なうことができる。この検定のための方法は文献において十分に確立されている。

このスクリーニングは種々の細胞表面決定基に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定し、$Ca^{2+}$受容体に特異的なモノクローナルはこれらの小さなサブセットだけを含有することが予測されるであろう。この$Ca^{2+}$受容体に結合するモノクローナル抗体を同定するために、最初のスクリーニングで陽性と試験されたハイブリドーマ上清を、$Ca^{2+}$受容体アゴニストに対する培養上皮小体細胞の反応をブロックするそれらの能力について検定する。この受容体の細胞外ドメインに結合する抗体の一部は、リガンド結合を阻害もしくは活性化するか、またはそれ以外では受容体活性化に干渉もしくはそれに影響を及ぼすことが予測される。

両方のスクリーニングで陽性のモノクローナル抗体を、ウエスタンブロット、免疫沈殿および免疫組織化学によって特徴付ける。これにより、認識される抗原の大きさおよびその組織分布の決定が可能になる。次いで、適当なモノクローナル抗体を、常法に従い、免疫親和性クロマトグラフィーによって$Ca^{2+}$受容体蛋白質を精製するために用いる。限定アミノ酸配列決定を可能にする十分量の蛋白質が得られる。次いで、ペプチド配列情報に基づいて同義オリゴヌクレオチドプローブを設計する。次いで、これらのプローブを用いて、$Ca^{2+}$受容体の完全長クローンについて上皮小体細胞ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする。得られたクローンを、ＤＮＡ配列決定ならびに卵母細胞系および培養哺乳動物セルラインにおける機能的な発現によって特徴付ける。

また、これら抗体を用いて発現ライブラリー（例えば、λgt１１またはその等価物中のｃＤＮＡライブラリー）をスクリーニングして、抗原として反応性の蛋白質を発現するクローンを決定することができる。次いで、このようなクローンを配列決定して、これらが$Ca^{2+}$受容体でありうる蛋白質をコードしているか否かを決定することができる。

さらに、モノクローナル抗体の代わりにカルシウム受容体をクローン化および分析するためにファージ・ディスプレイ（表示）・ライブラリーを用いうることは当業者の理解するところであろう。これらのライブラリーにおいては、抗体の可変領域またはランダムペプチドをファージ発現ベクター中にショットガンクローン化し、抗体領域またはペプチドがファージ粒子の表面に表示されるようにする。カルシウム受容体に特異性高く結合しうる抗体領域またはペプチドを表示するファージは、これらの受容体を表示する細胞（例えば、上皮小体細胞、Ｃ細胞、破骨細胞など）に結合するであろう。このようなファージ１００万のうちの１００を、これら細胞に結合しうるファージ（カルシウム受容体に結合するファージを含む）を優先的に選択する細胞種に対して選別することができる。このようにして、ライブラリーの複雑さを大きく減少させることができる。この方法の繰返し反復によって、使用する細胞種に結合するファージのプールが得られることになる。次いで、モノクローナル抗体について上記したスクリーニングを用いてカルシウム受容体結合抗体またはペプチド領域を表示するファージを単離することができ、そしてこれらのファージを用いて構造の同定およびクローニングの目的でカルシウム受容体を単離することができる。このようなファージ・ディスプレイ・ライブラリーを調製するためのキットは市販品から入手可能である［例えば、StratacyteまたはCambridge Antibody Technology Limited］。また、このようなカルシウム受容体結合の性質を持つ組換えファージを、カルシウム受容体の種々の分析においてモノクローナル抗体の代わりに用いることができる。さらに、このようなファージを高効率の結合－競合スクリーニングにおいて用いて、カルシウム受容体のところで作用するヒト治療薬の開発のための構造的指標として役立ちうる、カルシウム受容体に機能的に結合しうる有機化合物を同定することができる。

別の方法においては、放射リガンドのその受容体への親和性架橋を用いて文献［Pilch & Czech, 1 Receptor Biochem.Methodol. 161, 1984］に記載のように受容体蛋白質を単離することができる。放射リガンドの共有結合は非特異的な結合を除くための徹底的な洗浄を可能にする。例えば、約１００nMまたはそれ以下の$EC_{50}$で細胞内$Ca^{2+}$を移動させるアルギニンとチロシンのランダムコポリマー（Ｍｗ＝２２Ｋ；arg tyr比＝４：１）など

の高親和性分子を$^{125}$Ｉでヨウ素化し、架橋する。比較的サイズが小さいのでプロタミン類が架橋の研究に好ましく、文献［Dottavio-Martin & Ravel, 87 Analyt.Biochem. 562, 1978］に記載のように還元的にアルキル化することができる。

未ラベルのポリカチオンならびに二および三価カチオンの存在下で架橋することによって、非特異的なラベル化を最少に維持する。これら分子が高濃度のときに、ラベルと細胞表面の非特異的な相互作用が減少するであろう。

本発明は、無機イオン受容体をコードしている単離した核酸配列および単離した受容体それ自体を提供する。また、本発明は上述の独特のフラグメントを提供する。［単離した］なる用語は次のような核酸配列を意味する：（i）例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によってインビトロで増幅された核酸；（ii）例えば、化学合成によって合成された核酸；（iii）クローニングによって組換え調製された核酸；または（iv）切断とゲル分離によって精製された核酸。ポリペプチドまたはアミノ酸配列を記述する際に用いるときの「単離した」なる用語は、本発明の単離した核酸配列を用いて発現系から得たポリペプチド、ならびに例えば化学合成法によって合成したポリペプチド、および天然の生物学的材料から分離し、続いて通常の蛋白質分析法を用いて実質的に精製したポリペプチドを意味する。

また、本発明の範囲内に含まれるのは、無機イオン受容体の独特のフラグメントである。この「独特のフラグメント」なる用語は、本発明の日の時点で既知の配列に対応するところがないことが見い出された受容体の部分を意味する。これらのポリペプチドフラグメントは、本発明の時点で既知の蛋白質データベースを同一ペプチドについてスキャニングすることによって、独特であると容易に同定することができる。受容体ＤＮＡのクローン化した部分配列の発現による受容体フラグメントの創製に加えて、無傷蛋白質からフラグメントを直接創製することができる。蛋白質を蛋白質加水分解酵素（トリプシン、キモトリプシンまたはペプシンを含むが、これらに限定されない）によって特異的に切断する。これら酵素のそれぞれは、それが攻撃するペプチド結合のタイプに特異的である。トリプシンは、カルボニル基が塩基性アミノ酸（通常はアルギニンまたはリジン）に由来するペプチド結合の加水分解を触媒する。ペプシンとキモトリプシンは、芳香族アミノ酸（具体的にはトリプトファン、チロシンおよびファニルアラニン）に由来するペプチド結合の加水分解を触媒する。別組の切断されたポリペプチドフラグメントが、蛋白質加水分解酵素に感受性である部位での切断を妨げることによって創製される。例えば、穏やかな塩基性溶液中でのリジンのε－アミノ基とエチルトリフルオロチオアセテートの反応によって、隣接ペプチド結合がもはやトリプシンによる加水分解に感受性ではないブロックされたアミノ酸残基が生成する［Goldbergerら, Biochem., 1:401（1962）］。従って、このようなポリペプチドをトリプシンで処理すると、アルギニル残基のところでのみ切断される。また、ポリペプチドを修飾して、蛋白質加水分解酵素によって触媒される加水分解に感受性であるペプチド結合を創製することができる。例えば、システイン残基をβ－ハロエチルアミンでアルキル化すると、トリプシンで加水分解されるペプチド結合が生成する［Lindley, Nature, 178:647（1956）］。さらに、特定残基のところでポリペプチド鎖を切断する化学試薬を用いることができる［Witcop, Adv.Protein Chem. 16:221（1961）］。例えば、臭化シアンはメチオニン残基のところでポリペプチドを切断する［Gross & Witkip, J.Am.Chem.Soc. 83:1510（1961）］。従って、無機イオン受容体（例えば、ヒトカルシウム受容体またはそのフラグメントなど）を修飾化試薬、蛋白質加水分解酵素および／または化学試薬の種々の組合せによって処理することにより、大きさの異なる多数の別個の重複したペプチドが創製される。これらのペプチドフラグメントを、クロマトグラフィー法によってこのような消化物から単離および精製することができる。

別法によれば、適当な固相合成法を用いてフラグメントを合成することができる［StewardおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis, Freemantle, San Fransisco, CA（1968）］。

これらフラグメントを、抗体などの調製の際のイオン結合試薬として検定において用いることができる。また、これらフラグメントを所望の生物学的活性を有するように選択する

ことができる。例えば、このフラグメントは、本明細書中に記載したように、正にその結合部位またはアゴニストもしくはアンタゴニスト（例えば、カルシウムの）に結合する部位を含むことができる。このようなフラグメントは、このフラグメントに対する特異的な結合を検出するための常法を用いて当業者により容易に同定される。例えば、カルシウム受容体の場合、組換えＤＮＡ法を用いて組換え受容体をコードしている遺伝子フラグメントから被験フラグメントを発現させることができる。次いで、このフラグメントを適当な結合条件下でカルシウムまたは他の化学物質と接触させて、カルシウムがこのフラグメントに結合するか否かを決定する。これらのフラグメントは、カルシウムのアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング検定、ならびに、血清または他の体組織からカルシウムを除去するのに有用という治療効果のスクリーニング検定において有用である。

他の有用なフラグメントには、受容体の外側部分、膜－スパニング部分または細胞内部分だけを有するフラグメントが含まれる。これらの部分は、受容体のアミノ酸配列を既知受容体の配列と比較することによって、または他の常法によって容易に同定される。これらのフラグメントは他の受容体のフラグメントとのキメラ受容体を形成させるのに有用であり、これにより受容体を欠く細胞を、該細胞内で所望の機能を発揮する細胞内部分、およびイオンまたは本明細書中に記載したアゴニストもしくはアンタゴニストの存在に対する該細胞の反応を引き起こす細胞外部分を伴って生成させることができる。適切に構成されたときのこれらキメラ受容体遺伝子は、受容体の機能不全が関係する種々の疾患、または受容体機能の変調が患者に所望の効果を与える種々の疾患のための有用な遺伝療法である。さらに、細胞外部分とその天然リガンド（例えば、カルシウム）または本発明のアゴニストおよび／またはアンタゴニストの相互作用によって活性化され、そして比色、放射、発光、分光または蛍光検定によって容易に検出しうる所望の酵素過程に細胞内ドメインが関係するように、キメラ受容体を構築することができる。このようなキメラ受容体を発現する細胞は、本発明の新規なアゴニストおよび／またはアンタゴニストの発見のための容易なスクリーニングの基礎となる。

本発明は、本明細書に記載している単離されたレセプターの突然変異体又は同族体及び他の誘導体をも提供する。従って、本発明は天然に存在するタンパク質だけでなく、そのような誘導体をも包含する。これらの誘導体は本明細書に記載する所望のレセプター活性を有しており、一般に本明細書に記載の方法によって同定される。このようなタンパク質及びそれをコードする遺伝子の例を挙げるが、これらの例は本発明を限定するものでなく、このような遺伝子及びタンパク質に関連し得る変異を説明するのみである。一般には、その遺伝子は天然レセプターのアミノ酸配列を有しているが、産生されるレセプタータンパク質のレセプター活性に顕著な影響を与えない１つ又はそれ以上のアミノ酸部位で変動させることができる。従って、例えばカルシウムレセプタータンパク質の非保存領域（即ち、レセプター活性に必須でない領域）ではアミノ酸は欠失、付加又は置換されていてもよい。より保存されている領域はレセプター活性に必要であるが、その領域のアミノ酸はより保存的に置換されていてもよい。例えば、この配列内の１つ又はそれ以上のアミノ酸残基は機能的な等価物として働く類似の極性を有する別のアミノ酸と置き換えることができる。この配列内のアミノ酸との置換物は、そのアミノ酸が属しているクラス内の別のアミノ酸から選択すればよい。非極性（疎水性）アミノ酸にはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンがある。極性中性アミノ酸にはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンがある。正に帯電した（塩基性）アミノ酸にはアルギニン、リジン及びヒスチジンがある。負に帯電した（酸性）アミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸がある。

当業者ならば、インビトロ突然変異誘発法又は欠失分析によって、タンパク質の保存及び非保存領域を決定するために標準的な手法を使用でき、またこのような誘導体はすべて以下に記載するものと等価であることは理解されよう。

本発明の範囲内にはさらに、レセプタータンパク質、又は翻訳中もしくは翻訳後に別個に修飾されるそれらのユニークな断片又は誘導体、例えばリン酸化、グリコシル化、架橋結

合、アシル化、タンパク質分解的開裂、抗体分子、膜分子もしくは他のリガンドへの結合といった修飾が施されているものが包含され得る［Fergusonら，1988，Ann.Rev.Biochem. 57:285-320］。

さらに、本発明の組換え核酸配列を操作することにより、レセプター配列のプロセッシング又は発現を改変することができる。例えば、コード化配列は充分に特性化された方法によってプロモーター配列及び／又はリボゾーム結合部位と結合させ、それにより発現及びバイオアベイラビリティーを向上させることができが、このことのみに限定されるものでない。

また、ある組換えコード化配列はインビトロ又はインビボにて突然変異させることにより、コード化領域内に変異を与え、及び／又は新たな制限エンドヌクレアーゼ部位を生成させ又は先に存在していた制限部位を破壊するといった、さらなるインビトロ修飾を行うことができる。当業者に知られている突然変異のための手法にはインビトロ部位特異的突然変異［Hutchinsonら，1978，J.Biol.Chem. 253:6551］、ＴＡＢ$^{R}$リンカー［ファルマシア］の使用、ＰＣＲ指向型突然変異などがあるが、これらに限定されない。

さらに、コドンが同一のアミノ酸をコードしつつ、選択する発現系にとって好ましいコドンとなるように、コドンを改変することができる。

本発明はさらに、無機イオンレセプターをコードする核酸のユニークな断片をも提供する。「ユニークな断片」なる用語は、本発明の発明日当時に知られている配列の中には同一の対応物が見いだされない核酸の部分を意味する。これらの断片は、発明日当時に存在する対応物を検出するための核酸データベースの分析によって容易に同定することができる。ユニークな断片はクローニング手法及び検定にて特に有用である。

本発明はさらに、毒素部分にコンジュゲートでき、又は組換え融合タンパク質として毒素部分と共に発現され得る抗体及び／又はその断片などのレセプター結合剤をも提供する。この毒素部分は、結合剤と対応標的細胞表面レセプターとの相互作用によりその標的細胞と結合し、そしてその細胞に侵入する。かかる結合剤、抗体及び／又は断片がコンジュゲートされる毒素部分はタンパク質であることができ、例えばアメリカヤマゴボウ（pokeweed）抗－ウイルスタンパク質、リチン（ricin）、ゲロニン、アブリン、ジフテリア外毒素又はシュードモナス外毒素などである。この毒素部分は、コバルト－６０などの高エネルギー放出放射性核種であってもよい。毒素部分の化学構造はいかなる意味においても本発明の範囲の限定を意図するものでない。当業者ならば、広範な種類の可能性ある部分を結合剤と結合することができるのは理解されよう。例えば、”Conjugate Vaccines”，Contributions to Microbiology and Immunology，J.M.Cruse及びR.E.Lewis，Jr（編），Carger Press，ニューヨーク，（1989）を参照のこと。また、先に列挙したものなどの多くの毒素部分は製薬的に許容し得ることも理解されよう。

結合剤と他の部分（例えば細菌毒素）とのコンジュゲート化は、それら２つの分子がそれぞれの活性を保持する限り、両分子を結合できるあらゆる化学反応によって行うことができる。この結合には例えば、共有結合、アフィニティー結合、挿入（インターカレーション）、配位結合及び錯形成反応などの多くの化学的メカニズムが包含される。しかし、好ましい結合は共有結合である。共有結合は、存在する側鎖の直接縮合、又は外部架橋分子の取り込みのいずれかによって行うことができる。抗体などのタンパク質分子を別の分子とカップリングするには多くの二価又は多価結合剤が有用である。例えば、代表的なカップリング剤には、チオエステル類、カルボジイミド類、スクシンイミドエステル類、ジイソシアネート類、グルタルアルデヒド類、ジアゾベンゼン類及びヘキサメチレンジアミン類などの有機化合物が包含され得る。この列挙は、当業者に知られている種々のクラスのカップリング剤を網羅的に表すことを意図しておらず、より普通のカップリング剤を単に例示するものである［次ぎを参照のこと：Killen及びLindstrom 1984，「毒素－アセチルコリンレセプターコンジュゲート体による実験的自己免疫重症筋無力症を引き起こすリンパ球の特異的な死滅（Specific Killing of lymphocytes that cause experimental Autoimmune Myasthenia Gravis by toxin-acetylcholine receptor conjugates）」，Jour.Immun.133:1335-2549;Jansen,F.K., H.E.Blythman, D.Carriere, P.Casella, O.Gros, P.Gr

os, J.C.Laurent, F.Paolucci, B.Pau, P.Poncelet, G.Richer, H.Vidal, 及びG.A.Voisin, 1982；「免疫毒素：高い特異性及び強力な細胞毒性が組み合わされた雑種分子（Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity）」Immunological Reviews 62:185-216;及びVitettaら, 前掲］。

組換えＤＮＡ手法を使用することで、本発明は、無機イオンレセプターを発現するよう操作されている哺乳動物標的細胞などの標的細胞を提供する。例えば、上記の方法によってクローンされるこのようなレセプターの遺伝子をレセプターを天然にて発現する細胞に挿入すれば、その結果、組換え遺伝子を非常に高いレベルで発現させることができる。

本発明はまた、レセプターの生理的役割を研究するための実験モデル系を提供する。このモデル系では、無機イオンレセプター、その断片もしくは誘導体をその系に供給し、又は系内でそれらを産生させればよい。このようなモデル系は、レセプターの過剰又は枯渇の効果又は細胞機能を研究するために使用できるであろう。この実験モデル系を使用すれば、細胞もしくは組織培養物、全動物、又は全動物もしくは組織培養系内の個々の細胞もしくは組織における効果、又は特定の時間間隔（胚形成など）にわたるそれらの効果を研究することができる。好ましい態様は、クローン化レセプター又はその一部が絡む検定、例えば特に高流量薬物スクリーニング検定（high through-put drug screening assays）に有用なものである。

本発明のさらなる態様では、組換え遺伝子を使用することにより、相同組換えによって内生遺伝子を不活化し、それにより無機イオンレセプター欠損細胞、組織又は動物を作成することができる。例えば、組換え遺伝子は、受容細胞、組織又は動物のゲノムに挿入した場合にレセプターの転写を不活化する挿入突然変異（例えば、ｎｅｏ遺伝子）を含有するよう操作することができるが、これに限定されない。このような構築物は、トランスフェクション、形質導入（トランスダクション）、注入などの手法によって胚性幹細胞などの細胞に導入することができる。無傷のレセプター配列を欠く幹細胞により、このレセプターが欠失しているトランスジェニック動物を作成することができる。

「トランスジェニック動物」は、細胞に人工的に挿入されたＤＮＡであってその細胞から生育する動物のゲノムの一部となるＤＮＡ、を含有する細胞を有している動物である。好ましいトランスジェニック動物は霊長類動物、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌ及びネコである。トランスジェニックＤＮＡはヒトの無機イオンレセプターをコードすることができる。本発明のさらなる態様では、レセプターの発現を減少させるに有効な量のアンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡを提供することによって、動物における天然の発現を減少させることができる。

本発明に関連するトランスジェニック動物を創製するには種々の方法を利用することができる。ＤＮＡは雄及び雌の前核が融合する前に受精卵の前核に注入するか、又は細胞分割の開始後に胚性細胞の核（例えば、２細胞胚の核）に注入することができる［Brinsterら, Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.,82:4438-4442（1985）］。胚は、本発明の無機イオンレセプターヌクレオチド配列を担持するよう改変したウイルス、特にレトロウイルスによって感染させることができる。

胚の内部細胞塊（inner cell mass）から誘導し培養物中にて安定化した多能性幹細胞は本発明のヌクレオチド配列を含有するよう培養物中にて操作することができる。このような細胞からトランスジェニック動物は作成できるが、それは借腹（foster mother）中に移植した胚盤胞に移植し、臨月期に至らしめることによって行う。

トランスジェニック実験に適している動物は、Charles River［ウィルミントン, MA］、Taconic［ジャーマンタウン, NY］、Harlan Sprague Dawley［インディアナポリス, IN］などの標準的な商業供給元から入手することができる。

ネズミの胚を操作しＤＮＡを接合体の前核にマイクロインジェクションする操作は当業者に周知である［Hoganら, 前掲］。魚類、両生類の卵、及び鳥類のためのマイクロインジェクション手法はHoudebine及びChourrout, Experientia, 47: 897-905（1991）に詳述されている。ＤＮＡを動物組織に導入するための他の手法は米国特許第４，９４５，０５０号（Sandforsdら, 1990年6月30日）に記載されている。

単なる実施例であるが、トランスジェニックマウスを作成するため、雌性マウスに過剰排卵を誘発させた。雌性動物を雄性動物ともに一緒に置き、交尾した雌性動物を$CO_2$窒息又は頚部脱臼によって殺し、切除した輸卵管から胚を回収する。周りの卵丘細胞を除去する。次いで、前核胚を洗浄し、注入の時まで保存する。無作為な周期の成人雌性マウスを精管切除した雄性動物とつがわせる。受容雌性マウスをドナーの雌性マウスと同じ時に交尾させる。次いで、胚を外科的に移す。

トランスジェニックラットを作成するための手法はこのマウスの手法と同様である。Hammerら，cell，63:1099-1112（1990）。

胚性幹細胞（ＥＳ）細胞を培養し、次いでＥＳ細胞にエレクトロポレーション、リン酸カルシウム／ＤＮＡ沈降及び直接注入などの方法によりＤＮＡを導入することによってトランスジェニック動物を創製する方法は、当業者に周知である。例えば、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells，A Practical Approach，E.J.Robertson,編，IRL Press（1987）を参照のこと。

無作為遺伝子組込みの場合は、本発明の配列（群）を含有するクローンを耐性をコードする遺伝子と共に同時トランスフェクトする。あるいは、ネオマイシン耐性をコードする遺伝子を本発明の配列（群）に物理的に結合させる。所望のクローンをトランスフェクションし単離することは、当業者に周知の幾つかの方法のいずれによっても行われる［E.J.Robertson，前掲］。

ＥＳ細胞に導入するＤＮＡ分子はまた、相同組換え工程によって染色体に組込むことができる。Capecchi，Science 244:1288-1292（1989）。組換え事象（即ち、neo耐性）の陽性選択及び二元陽性－陰性選択（即ち、neo耐性及びガンシクロバー（gancyclovir）耐性）のための方法、及びそれ以後のＰＣＲによる所望のクローンの同定はCapecchi，前掲及びJoynerら，Nature 338:153-156（1989）に記載されており、これらの教示は本明細書に包含される。操作の最終段階は標的されたＥＳ細胞を胚盤胞に注入し、その胚盤胞を偽妊娠雌性動物に移入する。得られたキメラ動物を交配し、その子孫をサザーンブロッティングによって分析し、トランスジーン（transgene）を担持する個体を同定する。

非ネズミ哺乳動物及び他の動物を産するための手法は別に議論されている。Houdebine及びChourrout，前掲；Purselら，Science 244:1281-1288（1989）；及びSimmsら，Bio/Technology，6:179-183（1988）。

使用

初期上皮小体機能亢進症（ＨＰＴ）は高カルシウム血症および循環ＰＴＨのレベルの増加により特徴付けられる。ＨＰＴの主要な欠陥のうちの一つの上皮小体細胞の、細胞外$Ca^{2+}$による負のフィードバック制御に対する感受性の減少であると思われる。したがって、初期ＨＰＴ患者由来の組織では、細胞外$Ca^{2+}$に対する「定点」が右にずれ、そのため通常より高い細胞外$Ca^{2+}$濃度がＰＴＨ分泌を抑制するために必要である。さらに、初期ＨＰＴでは、細胞外$Ca^{2+}$濃度がたとえ高くても、ＰＴＨ分泌抑制はしばしば部分的のみである。第２期（尿毒症の）ＨＰＴでは、たとえ$Ca^{2+}$が抑制するＰＴＨ分泌が通常の割合であっても、細胞外$Ca^{2+}$に対する定点が同様に上昇していることが観察される。ＰＴＨ分泌の変化は、$[Ca^{2+}]_i$の変化に平行である；細胞外$Ca^{2+}$－誘導$[Ca^{2+}]_i$増加の定点は右にずれ、このような増加の度合は減少する。さらに、モノクローナル抗体による組織の染色は、$Ca^{2+}$受容対が腺腫様および過形成上皮小体細胞で減少していることを表す。

$Ca^{2+}$受容体は薬理学的介入のための不連続の分子本体を構成する。細胞外$Ca^{2+}$の作用が類似または反対である分子は、初期および第２期ＨＰＴ両方の長期管理に有益である。このような分子は、高カルシウム血症状態単独では成し遂げ得ないＰＴＨ分泌抑制に必要な付加刺激を提供する。細胞外$Ca^{2+}$より大きい効果のこのような分子は、腺腫様組織で特に厄介であるＰＴＨ分泌の明白な非抑制可能因子を征服し得る。別にまたは付加的に、このような分子は、ウシおよびひと腺腫症上皮小体組織で長期の高カルシウム血症がpreproＰＴＨｍＲＮＡのレベルの抑制を示すように、ＰＴＨの合成を抑制し得る。長期高カルシウム血症はまた上皮小体細胞のイン・ビトロでの増殖をまた抑制し、したがってカルシ

ウム様物質は、第２期ＨＰＴで特徴的な上皮小体細胞過形成の制限にもまた効果的であり得る。
他の体細胞は、直接細胞外$Ca^{2+}$濃度の物理的変化に反応できる。甲状腺内小胞周辺細胞（Ｃ－細胞）からのカルシトニン分泌は、細胞外$Ca^{2+}$の濃度の変化により調節される。腎臓傍糸球体細胞からのレニン分泌は、ＰＴＨ分泌のように、細胞外$Ca^{2+}$の濃度の増加により抑制される。細胞$Ca^{2+}$は、これらの細胞の細胞内$Ca^{2+}$流動を生じさせる。他の腎臓細胞は下記のようにカルシウムに反応する：$Ca^{2+}$上昇は、近位小管細胞による１，２５（ＯＨ）$_2$ビタミンＤの形成を阻害し、遠位小管細胞におけるカルシウム－結合蛋白質の産生を刺激し、$Ca^{2+}$および$Mg^{2+}$の小管の再吸収および髄質のヘレンわなの太い上行肢（ＭＴＡＬ）細胞に対するバソプレシンの作用を阻害し、皮質の集合管細胞におけるバソプレシン作用を減少させ、腎の糸球体の血管の平滑筋細胞に影響を及ぼす。カルシウムは腸管小球細胞、乳房細胞および皮膚細胞の分化を促進する。それはまた、心臓心房からの心房性カルシウム排泄増加性ペプチド分泌を阻害し、血小板におけるｃＡＭＰ蓄積を減少させ、ガストリンおよびグルカゴン分泌を変化させ、血管平滑筋細胞に作用し、血管作動性因子の細胞分泌を調節する。単離破骨細胞は細胞内$Ca^{2+}$流動からある程度生じた$[Ca^{2+}]_i$の増加に対応する細胞外$Ca^{2+}$の濃度を増加させる反応をする。破骨細胞での$[Ca^{2+}]_i$の増加は、上皮小体細胞におけるＰＴＨ分泌と類似の機能的反応（骨吸収）の阻害に関連する。骨－形成骨芽細胞からのアルカリホスファターゼの放出は直接カルシウムによって刺激される。したがって、$Ca^{2+}$は、その細胞内信号としての偏在的役割に加えて、ある特異的細胞の反応を制御する細胞外信号としてまた機能するという示唆をする充分な徴候がある。本発明の分子は、これらの細胞での崩壊した$Ca^{2+}$反応に関連する疾病の処置に使用できる。
上皮小体細胞および他の細胞の$Ca^{2+}$受容体のクローニングは、直接評価すべき他の細胞中の相同蛋白質の存在を可能にする。構造的に相同な$Ca^{2+}$受容体蛋白質の群は、このように得ることができる。このような受容体は、これらの細胞がどのようにこれらの細胞が細胞外$Ca^{2+}$を検出するかの理解を可能にし、本明細書に述べたＨＰＴ、骨粗鬆症および高血圧の処置に有効な治療の活性部位としての機構の評価および他の骨および鉱物関連疾患の新規療法を可能にする。
他の使用は上記した。例えば、組み換え$Ca^{2+}$受容体蛋白質は療法に使用され、標準法、例えばこの蛋白質をコード化する核酸の形質導入により導入される。さらに、このような蛋白質は本発明のカルシウム様分子の測定に有用である。
下記の実施例は、範囲を限定することなく本発明を説明する。
実施例
本明細書に記載の研究で、種々の有機分子が上皮小体細胞において細胞内$Ca^{2+}$を流動させることおよびＰＴＨ分泌を抑制することが分かった。これらの分子は構造的には多様であるが、多くが生理学的ｐＨで正味の陽電荷をもつ。有機化合物のカチオン性の性質は有用な役割を担うが、活性決定における唯一の因子ではない。
実施例１：ウシ上皮小体細胞におけるカルシウム様分子のスクリーニング
分離したウシ上皮小体細胞をパーコール勾配で精製し、一晩血清非存在培地で培養した。細胞を連続してｆｕｒａ－２と共に導入し、遊離細胞内$Ca^{2+}$濃度を蛍光的に測定した。$[Ca^{2+}]_i$の変化は$Ca^{2+}$受容体に活性な分子のふるい分けに使用した。カルシウム様とみなすため、分子は細胞外$Ca^{2+}$の増加による通常の効果を示し、$Ca^{2+}$受容体の活性化により誘因されることが必要であった。
１）分子は、$[Ca^{2+}]_i$の増加を誘発しなければならない；$[Ca^{2+}]_i$の増加は細胞外$Ca^{2+}$の不存在下で継続し得、および／または分子は細胞外$Ca^{2+}$によって誘発された$[Ca^{2+}]_i$の増加を強め得る。
２）分子は、百日咳毒素により阻止されるイソプロテレノール－刺激されたサイクリックＡＭＰ形成減少を生じさせなければならない；
３）分子は濃度と同等の範囲で、$[Ca^{2+}]_i$増加を生じさせるＰＴＨ分泌を阻害しなければならない；および

４）［Ｃａ$^{2+}$］$_i$およびＰＴＨ分泌における増加についての分子の濃度反応曲線はフォルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）のようなＰＫＣ活性化剤で右に移動しなければならない。
分子のいくつかの構造的に異なる群を試験した：ポリアミン類、アミノグリコシド抗生物質、プロタミンおよびリジンまたはアルギニンポリマー類。これらの分子の構造は図１に描く。図１に含まれるものは、その分子の正味の陽電荷、ウシ上皮小体細胞の細胞内Ｃａ$^{2+}$流動の誘導に対するＥＣ$_{50}$である。
一般に、分子の正味の陽電荷が大きければ大きいほど、その細胞内Ｃａ$^{2+}$流動を生じさせる有効性は高い。しかしながら、この見かけの規則に対するいくつかの著しい例外が、下記のように発見された。
図から見られるように、スペルミン、ネオマイシンＢおよびプロタミンはｆｕｒａ－２－導入ウシ上皮小体細胞において［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の急速で一時的な増加を誘導する（Ｆｉｇ.６、７、１１）。しかしながら、それらは、ひと上皮小体細胞ではなるが（Ｆｉｇ.１９）、ウシ上皮小体細胞では充分な［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の定常増加を生じさせない（Ｆｉｇ.６、１１）。この点で、それらは、ウシ細胞における細胞外Ｍｇ$^{2+}$により誘導され、細胞外Ｃａ$^{2+}$の流入を伴わない細胞内Ｃａ$^{2+}$の流動化を生じさせる細胞質ゾルのＣａ$^{2+}$反応に似ている（Ｆｉｇ.１１ｂ）。スペルミン、ネオマイシンＢまたはプロタミンにより誘導された［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の一時的な増加は、低濃度（１μＭ）のＬａ$^{3+}$またはＧｄ$^{3+}$で阻止されない（Ｆｉｇ.１１ｆ、ｇ）。多価カチオン分子により誘導された細胞質ゾルのＣａ$^{2+}$過渡現象は細胞外Ｃａ$^{2+}$の不存在下で持続したが、Ｃａ$^{2+}$の細胞蓄積がイノマイシンによる前処理で枯渇した場合阻止された（Ｆｉｇ.７；１１ｈ、ｉ）。これらのすべての分子は、したがって上皮小体細胞で細胞内Ｃａ$^{2+}$流動を生じさせる。
多価分子は細胞内Ｃａ$^{2+}$の、細胞外Ｃａ$^{2+}$により使用されるのと同じプールを流動化することを加えて示唆した。したがって、細胞外Ｃａ$^{2+}$の濃度の増加は、スペルミンにより誘導された［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の一時的な増加を進歩的に阻害する（Ｆｉｇ.６）。逆に、スペルミンまたはネオマイシンＢの最大に有効な濃度は（Ｆｉｇ.２）過渡現象を阻止するが、細胞外Ｃａ$^{2+}$により誘導された［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の定常増加ではない。
重要には、スペルミン、ネオマイシンＢおよびプロタミンはＰＴＨ分泌を細胞外Ｃａ$^{2+}$と同程度阻害した。これらの分泌における阻害効果は、細胞内Ｃａ$^{2+}$の流動化を生じさせる濃度で得られた（Ｆｉｇ.８、１３）。これらの発見は、細胞外Ｃａ$^{2+}$によるＰＴＨ分泌の抑制に寄与した機構の理解に関連する。種々の無機多価カチオンがすべて分泌を阻害するため、細胞外Ｃａ$^{2+}$のみが依然として持続した、［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の定常増加を生じさせ、このような［Ｃａ$^{2+}$］$_i$の増加は分泌の制御に重大に含まれることはできない。細胞外Ｃａ$^{2+}$流入よりむしろ細胞内Ｃａ$^{2+}$の流動が、ＰＴＨ分泌抑制に関連する本質的な機構である。これは分子がＰＴＨに影響がある場合、影響される充分な機構を定義するため、重要である；分子刺激選択的細胞外Ｃａ$^{2+}$流入は、ＰＴＨ分泌抑制には比較的効果がない。比較して、単にＣａ$^{2+}$流動を生じさせる分子は、ＰＴＨ分泌抑制において細胞外Ｃａ$^{2+}$と全く同程度に有効である。
細胞外Ｃａ$^{2+}$により誘導される細胞内Ｃａ$^{2+}$流動化のように、多価カチオン分子により誘導されるものはＰＭＡにより抑制された。スペルミンで誘導される細胞質ゾルＣａ$^{2+}$過渡現象のＰＭＡによる優先的阻害効果を示す代用的な実験は、Ｆｉｇ.１４に示す。ＡＴＰにより誘導された細胞質ゾルＣａ$^{2+}$過渡現象は、ＡＴＰのほとんど最大濃度を使用した場合でさえ、効果がなかった。多価カチオンにより誘導された細胞質ゾルＣａ$^{2+}$過渡現象におけるＰＭＡの効果はその細胞外Ｃａ$^{2+}$に対する反応への影響と平行であった；両方の場合、濃度反応曲線が右へ移動した（Ｆｉｇ.１５）。ＰＭＡの［Ｃａ$^{2+}$］$_i$における抑制的効果は、高濃度の有機多価カチオンで征服された分泌における効力を高める効果に付随した（Ｆｉｇ.１６）。
多価カチオン分子により誘導された細胞内Ｃａ$^{2+}$の流動は、イノシトールリン酸の形成の増加と関連があった。例えば、プロタミンはＩＰ$_1$レベルの増加に付随したＩＰ$_3$の形成の急速（３０秒以内）増加を生じさせた。これらの両方の効果は、細胞外プロタミンの濃度

に依存した（Ｆｉｇ.１７）。さらに、ＰＭＡによる前処理は、多価カチオン分子により誘導されるイノシトールリン酸の形成を鈍らせた。スペルミンで得られた代表的な結果はＦｉｇ.１８に示す。

スペルミン、ネオマイシンＢおよびプロタミンは、イソプロテレノール－誘導サイクリックＡＭＰ増加を抑制した。分子細胞外$Ca^{2+}$のサイクリックＡＭＰ形成に対する阻害効果のように、多価カチオン分子により誘導されるそれは、百日咳毒素との前処理により阻止された（表２）。

表　２

| | サイクリックＡＭＰ(制御%) | |
|---|---|---|
| | 対照 | ＋ＰＴｘ |
| 0.5mM$Ca^{2+}$ | １００ | １０６±８ |
| 2.0mM$Ca^{2+}$ | １９±４ | ９４±２ |
| 0.5mM$Ca^{2+}$＋２００μMスペルミン | ２３±５ | ９３±６ |
| 0.5mM$Ca^{2+}$＋３０μMネオマイシンＢ | ２８±７ | ８７±６ |
| 0.5mM$Ca^{2+}$＋２μg／mlプロタミン | ２０±７ | ８９±９ |

百日咳毒素(ＰＴｘ)は、細胞外$Ca^{2+}$およびサイクリックＡＭＰ形成における多価カチオンの阻害効果を阻止する。ウシ上皮小体細胞は、１６時間１００ng／mlの百日咳毒素存在下または非存在下で培養した。細胞を次に洗浄し、１５分間、指示量の細胞外$Ca^{2+}$または多価カチオン分子存在下または非存在下で１０μMのイソプロテレノールと共にインキュベーションした。全サイクリックＡＭＰ(細胞＋上清)はＲＩＡにより測定し、結果は0.5mM$Ca^{2+}$(１１２±１７pmol／$10^6$細胞)で得られたレベルの割合で示す。それぞれの値は３回の実験の平均±ＳＥＭである。

ひと上皮小体細胞では、細胞外$Mg^{2+}$が、持続する、定常［$Ca^{2+}$］$_i$増加を急速一過性増加に加えて誘導した（Ｆｉｇ.１０）。ウシ上皮小体細胞が細胞外$Ca^{2+}$に反応するように、ひと上皮小体細胞における$Mg^{2+}$誘導［$Ca^{2+}$］$_i$定常増加は、電圧非感受性チャンネルを経由した$Ca^{2+}$の流入による結果である（Ｆｉｇ.１０ａ）。このひと上皮小体細胞での［$Ca^{2+}$］$_i$定常増加における$Mg^{2+}$の効果は、腺腫様および過形成組織の両方で見られた。

ネオマイシンＢおよびスペルミンで、腺腫様組織から調製したひと上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］$_i$の効果を試験した。ネオマイシンＢにおける代表的な結果はＦｉｇ.１９に示す。ネオマイシンＢは、ひと上皮小体細胞で［$Ca^{2+}$］$_i$の過渡現象だけでなく、加えて定常増加を生じさせた（Ｆｉｇ.１９ａ）。したがって、ひと細胞では、細胞外$Ca^{2+}$、$Mg^{2+}$またはネオマイシンＢにより誘導される［$Ca^{2+}$］$_i$の変化の様子は非常に類似である。

ネオマイシンＢにより誘導される細胞質ゾル$Ca^{2+}$過渡現象は、$La^{3+}$（１μＭ）の存在下および細胞外$Ca^{2+}$の非存在下で持続した。ネオマイシンＢは、したがって、ひと上皮小体細胞における細胞内$Ca^{2+}$流動を生じさせる。ネオマイシンＢは細胞内$Ca^{2+}$の流動を生じさせる濃度でひと上皮小体細胞のＰＴＨ分泌を阻害した（Ｆｉｇ.１３）。しかし

ながら、ひとおよびウシ上皮小体細胞のネオマイシンＢに対する反応においてある違いが存在した。細胞内$Ca^{2+}$流動に対するネオマイシンＢの$EC_{50}$は、ウシ上皮小体細胞では４０μMおよびひとのでは２０μMであり（Ｆｉｇ.１３および１５参照）、一方スペルミンの有効性はひとおよびウシ上皮小体細胞で類似であった（$EC_{50}$＝１５０μM）。したがって、ウシ細胞では分子の活性化試験のふるい分け研究に使用できるが、ひと上皮小体を用いた追跡研究を行うことが重要である。

Ｃ－細胞における多価カチオン分子の効果を評価するために、ラット脊髄の甲状腺腫瘍（γＭＴＣ６－２３細胞）由来の腫瘍性細胞を使用した。スペルミン（１０mM）およびネオマイシンＢ（５mM）の両方とも、これらの細胞で基底$[Ca^{2+}]_i$に効果はなかった。両方の分子のいずれも、細胞外$Ca^{2+}$の連続添加における反応に効果はなかった。ネオマイシンＢの効果を欠いたことを報告する代表的な結果をＦｉｇ.２１に示す。ネオマイシンＢ（１mM）またはスペルミン（１または５mM）は、破骨細胞で$[Ca^{2+}]_i$のいかなる増加の誘導に失敗した（Ｆｉｇ.２３）。記録が示すように、細胞外$Ca^{2+}$の連続した濃度の増加にある効果があるように見えるが、これは一貫した発見ではない。他の２番目の細胞で、スペルミン（５μM）は再び基底$[Ca^{2+}]_i$に影響がなく、細胞外$Ca^{2+}$誘導$[Ca^{2+}]_i$増加の僅かな阻害（約１５％）を生じさせた。３番目の細胞で、ネオマイシンＢは基底$[Ca^{2+}]_i$に影響がなく、細胞外$Ca^{2+}$誘導$[Ca^{2+}]_i$増加に影響はなかった。これらの研究から発展した相対的な状況は、スペルミンおよびネオマイシンＢが、破骨細胞の細胞質ゾル$Ca^{2+}$のレベルの基底または刺激レベルにおいて効果がないことである。Ｃ－細胞または破骨細胞に対する多価カチオンの$Ca^{2+}$－感受性機構の影響の欠損は、上皮小体細胞$Ca^{2+}$受容体に特異的に働く、あるいは$[Ca^{2+}]_i$に対する上皮小体の正常な反応の１個またはそれ以上の機能を変える新規先駆物質の発見または設計の能力を証明する。

種々の他の分子のスクリーニングは下記に詳述し、結果を表１に要約する。

実施例２

ポリアミンのスクリーニング

直鎖ポリアミン（スペルミン、スペルミジン、ＴＥＴＡ、ＴＥＰＡおよびＰＥＨＡ）および２つのそれらの誘導体（ＮＰＳ３８１およびＮＰＳ３８２）を実施例１と同様にスクリーニングする。これらの分子はすべてウシ上皮小体細胞中の細胞間$Ca^{2+}$を可動化させることが判明した。それらの効力のオーダーは以下の通りであり、そのネット正電荷を括弧内に示す。

表３

| 分子 | $EC_{50}$ (μM) |
|---|---|
| NPS 382 (+8) | 50 |
| NPS 381(+10) | 100 |
| スペルミン (+4) | 150 |
| PEHA (+6) | 500 |
| スペルミジン (+3) | 2000 |
| TEPA (+5) | 2500 |
| TETA (+4) | 8000 |

プトレッシン（＋２）およびカダベリン（＋２）は２mMで不活性である。

別の直鎖ポリアミン、ＤＡＤＤは他のポリアミンとやや異なる挙動を示し、実施例７に記載する。

実施例３

２つの環式ポリアミン、ヘキササイクレンおよびＮＰＳ３８３を実施例１と同様にスクリーニングする。ヘキササイクレン（＋６、$EC_{50}$＝２０μM）はＮＰＳ３８３（＋８、$EC_{50}$＝１５０μM）よりも７倍より有効である。この正反対の結果は、$Ca^{2+}$レセプター

活性の構造的特徴としてのネット正電荷のみに基づくようである。

実施例４

アミノグリコシド抗生物質スクリーニング

６つの抗生物質を実施例１と同様にスクリーニングする。細胞間$Ca^{2}$＋の可動化につき得られた$EC_{50}$（効力のランクオーダー）は以下のとおりである。

表４

| 抗生物質 | | $EC_{50}$ （μM） |
|---|---|---|
| ネオマイシン | （＋６） | １０ |
| ゲンタマイシン | （＋５） | １５０ |
| ベカナマイシン | （＋５） | ２００ |
| ストレプトマイシン | （＋３） | ６００ |

カナマイシン（＋４．５）およびリンコマイシン（＋１）は濃度５００μＭで有効ではなかった。アミノグリコシド系内では、ネット正電荷と効力の間で相関関係がある。しかし、ネオマイシンは正電荷が等しいかまたはより大きな種々のポリアミン（ＮＰＳ３８１、ＮＰＳ３８２、ＮＰＳ３８３、ＰＥＨＡ）よりも著しくより有効である。この型のアミドグリコシド抗体は、腎臓中のカルシウム受容体との相互作用に関連し得る腎毒性を有するから、このようなスクリーニングは、新規なアミドグリコシド抗体の開発における毒性についてのスクリーニングに用い得る。

実施例５

ペプチドおよびポリアミノ酸のスクリーニング

プロタミンおよびペプチド長さを変化させたリシンまたはアルギニンのポリマーを、実施例１と同様にスクリーニングして、それらの細胞間$Ca^{2}$＋可動化能力を調べた。細胞間$Ca^{2}$＋の可動化につき得られた$EC_{50}$（効力のランクオーダー）は以下のとおりである。

表５

| ペプチド(MW／KD) | $EC_{50}$ （mM） |
|---|---|
| polyArg （１００） | 4 |
| polyArg （４０） | １５ |
| polyLys （２７） | ３０ |
| protamine （4.8） | ７５ |
| polyArgTyr(２２) | ２００ |
| polyLys （１４） | １０００ |
| polyLys （3.8） | ３０００ |

これらポリマーのネット正電荷はMwの増加につれて増加した。すなわち、ポリアミノ酸のこの系列のうち、アミノグリコシドについては、ネット正電荷と効力の間に直接的な相関関係がある。プロタミンはネット正電荷＋２１を有する実質的にPolyArgである。

実施例６

アリルアルキルアミンのスクリーニング

毒液およびクモから得られたアリルアルキルアミン毒物の部類から選択された分子を実施例１のようにスクリーニングする。

フィルアントトキシン-４３３（＋３）は濃度５００μＭで有効ではない。これは、以下に記載のアルギオトキシンと類似の構造である。

アルギオトキシン-６３６（４００μＭ）は［$Ca^{2}$＋］iの増加を惹起しないが、細胞間$Ca^{2}$＋のその後の添加に対するサイトソル$Ca^{2}$＋応答には有効である。これは、$Ca^{2}$＋レセプターを活性化する分子すべてに共通の特徴でり、種々の細胞間２価カチオンについて見

られる。これに関し、実施例７で詳細に考察する。
アルギオトキシン-６３６に対し、アルギオトキシン-６５９は［$Ca^{2+}$］iの増加を惹起し、$EC_{50}$３００μMを示す。アルギオトキシン-６５９はジヒドロキシフェニル基よりもむしろヒドロキシル化インドールを有する点で、アルギオトキシン-６３６と相異する。これは、これは、２つのこれら分子の唯一の構造上の相異である。すなわち、効力の相異は芳香族基の特性において存在し、正電荷を担持するポリアミン鎖においてではない。

実施例７

$Ca^{2+}$通路遮断剤のスクリーニング

$Ca^{2+}$通路遮断剤、すなわち細胞外$Ca^{2+}$の電圧感受性$Ca^{2+}$通路を介する流入を遮断する、これらの分子を実施例１のようにスクリーニングする。３つの構造的分類の$Ca^{2+}$通路遮断剤が存在する（１）ジヒドロピリジン（２）フェニルアルキルアミン（３）ベンゾチアジピン。
テストしたジヒドロピリジン（ニフェジピン、ニトレンジピン、ＢＡＹ Ｋ８６４４および（－）２０２-７９１および（＋）２０２-７９１）は、１μMでテストした場合に細胞外$Ca^{2+}$によって誘発される［$Ca^{2+}$］iの増加または基本的な［$Ca^{2+}$］iに対する効果を、全く示さない。従来の研究が示すように、上皮小体細胞は電圧感受性$Ca^{2+}$通路を欠いているが、$Ca^{2+}$レセプターによって規制される電圧非感受性$Ca^{2+}$通路を有している。
調べたフェニルアルキルアミンは、ベラパミル、D-６００（ベラパミルのメトキシ誘導体）、ＴＭＢ-８、およびＴＭＢ-８の同族体、ＮＰＳ３８４である。最初の３つの分子を濃度１００μMでテストする。フェニルアルキルアミン調べた他の分子とは異なる挙動を示す。これらは、低能度の細胞外$Ca^{2+}$（０.５mM）含有緩衝剤中に浸した細胞に添加しても［$Ca^{2+}$］iの変化を全く示さない。しかし、ベラパミル、D-６００およびＴＭＢ-８は、細胞外２価カチオンによって惹起された細胞間$Ca^{2+}$の可動化を可能にさせ、またこれらは付加的に細胞外$Ca^{2+}$の流入を遮断する。中間的なレベルの細胞外$Ca^{2+}$（１～１.５mM）では、これら分子は誘発はわずかであるが、細胞間$Ca^{2+}$の可動化から生じる［$Ca^{2+}$］iの増加は強力である。
フェニルアルキルアミンはネオマイシンのような有機ポリカチオンとは異なった作用を示す。データの示唆するところによれば、ベラパミル、D-６００およびＴＭＢ-８は$Ca^{2+}$レセプターにおいて部分的なアゴニストであるか、またはアロリスティクな活性化剤であった。これは、調べた他の分子が完全なアゴニストであることと対照的であった。
分子ＮＰＳ３８４（濃度３００μM）は［$Ca^{2+}$］iの増加を誘発しないが、細胞外$Ca^{2+}$の流入を遮断する。高濃度でのテストは細胞間$Ca^{2+}$の移動を引き起こす当該分子の能力を示す。
流入を遮断するこれら分子の能力は興味深いが、意外ではなく、一方、細胞間$Ca^{2+}$可動化から生じる重要な［$Ca^{2+}$］iの一時的な増加を誘発することが、これら分子の能力である。上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］iの測定による相当な数の実験の示すように、一時的な［$Ca^{2+}$］iの増加は、ほぼ不変的に細胞間$Ca^{2+}$の移動に起因し、そのため$Ca^{2+}$レセプターの活性化を示す。
調べたベンゾチアジピン、ジルチアゼムは全ての点でベラパミルに類似し、またD-６００もまた１００μMで有効である。
注意すべきは、フェニルアルキルアミンを除き、前記でテストした活性分子はすべて［$Ca^{2+}$］iの増加を誘発し、これは、最大有効濃度の細胞外$Ca^{2+}$により誘発されるものと同様に、最大である。これは、かかる分子が細胞外２価カチオンと同様な効力を有することを示す。またこれは、部分的なアゴニストとしてのみ作用するようであるフェニルアルキルアミンの活性と対照的である。
フェニルアルキルアミンのうち、興味深い構造-活性関係を示すものがある。ＴＭＢ-８およびＮＰＳ３８４のような分子の異なる効力は重要である。ＴＭＢ-８は［$Ca^{2+}$］iの一時的な増加を１００μMで可能にし、一方ＮＰＳ３８４は３００μMでもさえもかかる増加させないが、これら分子は同じネット正電荷を担持する。以下に、ネット正電荷とは無

関係なある種の他の構造的特徴がより大きな効力をＴＭＢ-８に付与することを説明する。

実施例８

ヒト上皮小体細胞に対する分子スクリーニング

スペルミンおよびネオマイシンを、外科手術により取り出した上皮小体から得え実施例１のように調製したヒト上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］iの効果について、テストする。ヒト上皮小体細胞において、スペルミンは、濃度３００μＭでテストすると［$Ca^{2+}$］iのわずかな増加のみを引き起こすことが判明した。

他方、ネオマイシンは、濃度２０μＭでテストするとヒト上皮小体細胞において［$Ca^{2+}$］iの大きな増加を誘発する。ネオマイシンにより惹起された応答の最大は、最大有効濃度の細胞外$Ca^{2+}$により誘発されるものと同様である。

実施例９

アフリカツメガエル卵母細胞（Xenopus Oocytes）についての分子スクリーニング

卵母細胞は、ヒト上皮小体細胞からのｍＲＮＡを注入すると、$Ca^{2+}$レセプターを発現させ、また種々の細胞外無機２または３価カチオンに応答する細胞間$Ca^{2+}$を移動させる。このスクリーニングを用いると、$Ca^{2+}$レセプターに対する直接的な作用をテストすることができる。$Ca^{2+}$レセプターを発現させる卵母細胞は、また以下のようにスクリーニングすると、無傷の上皮小体細胞についての数種の分子活性に応答する。ヘキササイクレンは濃度１３５μＭで細胞間$Ca^{2+}$の移動を引き起こす。ネオマイシン（１００μＭ）およびＮＰＳ３８２（５ｍＭ）も有効である。これは、かなり強制的な形跡であり、かかる分子が$Ca^{2+}$レセプターまたはその機能と緊密に関係する数種の他のタンパクに対し作用することを示す。

たとえば、本発明者らは$^{45}Ca^{2+}$移動の測定によって卵母細胞の$Ca^{2+}$レセプターの発現を検知することができる。これらの実験において、卵母細胞は、ウシ上皮小体ｍＲＮＡまたは水を注入し、７２時間後、血清または１０ネオマイシンへさらす。刺激前に、卵母細胞に$^{45}Ca^{2+}$を注入する。２０分間の血清による刺激は、細胞間［$Ca^{2+}$］i放出をもたらし、これは、緩衝剤による疑似抗原投与に比し４５％の増加を示す。２０分間のネオマイシン１０ｍＭの抗原投与は、［$Ca^{2+}$］i放出の７６％の増加をもたらす。当該分析は$Ca^{2+}$レセプターのクローニングの使用に十分に感受性を示し、$Ca^{2+}$活性化Ｃｌ電流の電気生理学的測定よりも非常に大きな利点を有する。

別の実験では、ヒト破骨細細胞腫組織を、骨生死鑑定組織から得た。卵母細胞にこの細胞から単離したｍＲＮＡを注入し、$Ca^{2+}$３０ｍＭを抗原投与する。対照は応答しない一方、破骨細細胞腫組織ｍＲＮＡを注入した１２の卵母細胞のうち８は明白に応答する（図３４）。これらの実験によれば、破骨細胞の細胞外$Ca^{2+}$に対する$Ca^{2+}$応答は、事実遺伝学的にコード付けされる。またこの結果によれば、破骨細胞$Ca^{2+}$レセプターはアフリカツメガエル卵母細胞における発現によってクローニングすることができる。

実施例１０

ラット破骨細胞に対する分子スクリーニング

細胞外$Ca^{2+}$に対する上皮小体細胞および破骨細胞の種々の感受性の示唆するところによれば、それらの$Ca^{2+}$レセプターは異なっている。上皮小体細胞は０．５～３ｍＭの間の濃度の細胞外$Ca^{2+}$に応答するが、破骨細胞外は細胞外$Ca^{2+}$のレベルが５ｍＭを越えたときにのみ応答する。このかなり高い$Ca^{2+}$濃度は、それにも拘わらず破骨細胞に対し生理学的である。なぜなら、それらが破骨細胞に吸収されるからであり、局部的な細胞外$Ca^{2+}$濃度は３０ｍＭもの高レベルに達しうる。

ラット破骨細胞を用いる分子スクリーニングは以下のようになされる。破骨細胞を新生児ラットの長い骨から得る。［$Ca^{2+}$］iを単一の細胞においてフルオロメトリック・インジケーター・インド-１を用い測定する。スペルミン、スペルミジン、ネオマイシンおよびベラパミルをテストしたが、これらは、破骨細胞において大きな［$Ca^{2+}$］i増加を引き起こさない（わずか応答は検知される）。

濃度１ｍＭでは、スペルミジンはわずかな［$Ca^{2+}$］i増加を引き起こす（細胞外$Ca^{2+}$の

最大濃度で惹起される約１０％の増加）。ネオマイシン（１０mM）またはスペルミン（１０または２０mM）はラット破骨細胞において［$Ca^{2+}$］i増加を引き起こさない。ネオマイシン（１０mM）は、２５mMの細胞外$Ca^{2+}$のその後の添加により惹起された［$Ca^{2+}$］i濃度の増加を遮断しない。一方、スペルミン（２０mM）での予備処理は細胞外$Ca^{2+}$に対する応答を弱めた。ベラパミル（１００μM）は検知可能な［$Ca^{2+}$］i増加を引き起こさないが、細胞外$Ca^{2+}$に対する応答を遮断する。

破骨細胞と上皮小体細胞の間の比較は、後者に対するかかる分子の活性が破骨細胞において比較的有効ではないことが示される。これは、他の$Ca^{2+}$感知細胞に存在するこれらの受容体型に影響を及ぼすことなく特異的$Ca^{2+}$受容体を標的する医薬が容易に開発されることを示す。同様に、二又はそれ以上のそのような$Ca^{2+}$受容体で有用な医薬も開発しうる。

破骨細胞カルシウム受容体でのカルシウム様及びカルシウム拮抗作用のスクリーニング

破骨細胞カルシウム受容体で活性を有する化合物は、上記したように単一ラット破骨細胞中の［$Ca^{2+}$］iを測定することにより発見できる。改良検定は化合物の緩和－ないし－高レベルを全て可能にする。本新規方法はウサギ破骨細胞の使用に基づき、高い収量（動物当り$10^5$）と純度（９５％の細胞が破骨細胞である）で得ることができる。ウサギ破骨細胞調製物は細胞の固体群上で実施されるべき［$Ca^{2+}$］iの測定を可能にする。記録された蛍光信号が平均固体群反応であるので、細胞内変異性は最少化され、又、検定の精密度は大きく増大する。これは、交替により多くの化合物が活性をスクリーンされるようにする。

ウサギ破骨細胞は６日令ウサギから調製する。動物は摘心により犠牲にし、長骨を取出し、破骨細胞培地（ＯＣ培地：５％ウシ胎仔血清及びペニシリン／ストレプトマイシンを含むアルファ－最小基本培地）内に入れる。骨は外科用メスで切片にカットし、５０mlコニカル遠心管内の２mlのＯＣ培地中に入れる。骨切片を骨粒子の細かい均一懸濁液が得られるまで、はさみで細分化する。次いで懸濁液を２５mlのＯＣ培地で希釈し、調製物を３０秒間ゆるやかにかきまぜる（「うず巻く」）。骨粒子は上清を除き５０ml遠心管に加えた後２分間放置する。骨粒子を上記したようにＯＣ培地に再び懸濁し、かきまぜ、沈降させて取得する。２つの取得物からの上清を合わせて遠心し、得られる細胞ペレットをパーコルに再び懸濁する。次いで懸濁液を遠心し、メニスカスの丁度下の白色粘性バンドを除き、ＯＣ培地で洗浄する。パーコル遠心段階により純度で有意な改良となり、破骨細胞は以下に記載される方法の一つによって細胞の固体群中の［$Ca^{2+}$］iを測定するのに適当な、高密度で塗布されるようになる。要すれば、調製物の純度は改良できる。この場合、細胞は一夜、培養し、次いで$Ca^{2+}$及び$Mg^{2+}$フリーの緩衝液でリンスする。次いで細胞単層を、０.０２％ＥＤＴＡ及び０.００１％プロナーゼを含む$Ca^{2+}$及び$Mg^{2+}$フリーの緩衝液中に５分間浸漬する。次いでこの緩衝液を除き、ＯＣ培地と置き換え、細胞を１ないし２時間回復（recover）させ、その後で細胞に蛍光分析指示薬を与え、以下に記載するように［$Ca^{2+}$］iを測定する。

一実施態様では、本技術により蛍光顕微鏡を用い破骨細胞の固体群中の［$Ca^{2+}$］iの測定を可能にする。精製破骨細胞を２５㎜のガラスカバースリップに付着させ、次いでインド－１を与える。カバースリップを過融解室内に保管し、蛍光顕微鏡の段上に置く。低倍率対物レンズ（×４）の使用により１０ないし１５破骨細胞を含む視野が視覚化される。一つの変形では、視野中の各細胞の蛍光は同時に記録でき、又、後の分析用に別個に記憶できる。各細胞の［$Ca^{2+}$］iの電荷を決定でき、視野内の全細胞の平均反応を計算できる。他の変形では、細胞の全視野からの蛍光を記録し、直ちに処理（process）できる。別の変形では、最終データは顕微鏡視野に存在する細胞からの平均反応の形である。このために、細胞内変異性は最小化され、検定の精密度は大きく増加する。この方法は、破骨細胞カルシウム受容体の活性をスクリーンするのに週当り１０－２０化合物が可能である。

より好ましい実施態様では、本技術により、慣用の蛍光分析器を用い破骨細胞の固体群中の［$Ca^{2+}$］iの測定が可能である。精製破骨細胞は、直方形ガラスカバースリップに付着できる。一変形では、標準石英キュベット（１$cm^2$）を用い、ガラスカバースリップは２

×１．３５cmである。他の変形では、ミクロキュベットを用い（０．５$cm^2$）、ガラスカバースリップは１×０．７５cmである。別の例では細胞は、フラ－２又は［$Ca^{2+}$］i測定用の他の適当な蛍光指示薬を与える。指示薬付与細胞の細胞の蛍光は、ウシ上皮小体について上記したと同様に記録する。この方法は蛍光顕微鏡よりも高い処理能力を可能にし、破骨細胞カルシウム受容体の活性を評価するのに週当り２０－５０化合物が可能である。
最も好ましい態様では、技術は９６ウエルプレート中、破骨細胞の［$Ca^{2+}$］iを測定するのに使用できる。精製破骨細胞を高密度で９６ウエルプレートの各ウエルに入れ、次いで適当な蛍光指示薬を与える。各ウエルの蛍光を蛍光光度プレートリーダーを用い記録する。この方法は、ロボット工学を用い完全に自動化になる可能性を有し、週当り５０ないし１００化合物をスクリーンできる高処理能力スクリーニングを可能にするであろう。

他の$Ca^2$＋レセプターの実施例

以下の実験は、まさに分子リガンドのレセプター・サブタイプが存在するように、薬剤によって区別的に影響を受けうる$Ca^2$＋レセプターのサブタイプが存在することを証明する。上皮小体細胞$Ca^2$＋レセプターは細胞外$Ca^2$＋約１．５mMのレベルで感受性を示す一方、破骨細胞上の$Ca^2$＋レセプターは約１０mMのレベルに応答する（図２２）。上皮小体細胞$Ca^2$＋レセプターを活性化するネオマイシンまたはスペルミンは、Ｃ細胞または破骨細胞上の$Ca^2$＋レセプターに影響を与えない（図２１および２３）。これらのデータは、$Ca^2$＋レセプターの薬学的に区別可能なサブタイプ存在についてのはじめての証拠を構成し、またこれらのデータは特異的なタイプの$Ca^2$＋レセプターに対し選択的に作用する薬剤の設計および開発に使用することができる。事実、リード分子のテストはかかる細胞特異的効果を照明する。たとえば、ＮＰＳ４４９は、破骨細胞において［$Ca^2$＋］iの増加を惹起するが、破骨細胞において［$Ca^2$＋］iに対する効果はない。逆に、ＮＰＳ４４７は、上皮小体細胞$Ca^2$＋レセプターを活性化するが、１０倍もの高濃度でのみ破骨細胞$Ca^2$＋レセプターを活性化するのに有効である。最後に、アガトキシン４８９は、Ｃ細胞$Ca^2$＋レセプターの活性化には非常に有効とはいえないが（$EC_{50}$＝１５０μＭ）、上皮小体細胞$Ca^2$＋レセプターの活性化剤として非常に有効である（$EC_{50}$＝３μＭ）。現在開発中のリード分子は、イン・ビボにおいて$Ca^2$＋感受性細胞の特異的なタイプの活性に選択的に影響を与える。
特異性が劣る薬剤は、必然的に治療的には望ましくない。すなわち、破骨細胞活性の抑制およびカルシトニン分泌のの刺激は、骨再吸収の抑制のための２つの異なる方法である。これら両細胞の$Ca^2$＋レセプターを標的とする薬剤は、オステオポローシスに非常に有効である。ＰＴＨはまた骨代謝の規制を包含するため、上皮小体細胞$Ca^2$＋レセプターに作用する薬剤は、またオステオポローシスの治療および／または予防に有用である。
数種のテスト分子の結果を以下に示す。表６では、カルシウム様物質分子の比較テストを示す。ウシ上皮小体細胞およびＣ細胞（rＭＴ６-２３細胞）にフラ-２を充填し、ラット破骨細胞にはインド-１を充填したもので、表示した細胞間$Ca^2$＋の移動のための分子の効力は、累積濃度-応答曲線の作成により決定する。

表６

| 化合物 | $EC_{50}(\mu M)$ 上皮小体 | 破骨細胞 | Ｃ細胞 |
|---|---|---|---|
| ＮＰＳ R-568 | 0.60 | ２００ | ＞３００ |
| ＮＰＳ S-568 | ３０ | － | － |
| ＮＰＳ R-467 | 2 | ＞１００ | － |
| ＮＰＳ S-467 | ＞３０ | － | － |
| ＮＰＳ 017 | 6 | 不活性 | １５０ |
| ＮＰＳ 447 | 9 | １５０ | － |
| ＮＰＳ 456* | １５ | ２００ | ＞１００ |
| ＮＰＳ 015 | ２２ | － | 不活性 |
| ＮＰＳ 109 | ４０ | ＞３００ | 5 |
| ＮＰＳ 449 | 不活性 | １５０ | － |
| ＮＰＳ 468* | ３０ | ２５０ | － |
| スペルミン | １５０ | 不活性 | 不活性 |
| ネオマイシン | ４０ | 不活性 | 不活性 |

注)＊:ラセミ混合物

不活性;濃度１～５mMにて細胞質ゾル$Ca^{2}$＋の増加を全く引き起こさないものと定義。

実施例１１

上皮小体$Ca^{2}$＋レセプターのリード分子

ポリアミンおよびアリルアルキルアミンを用いる構造活性の研究は、ＮＰＳ４５６に構造的類似の分子のテストにつながる。ＮＰＳ４５６は上皮小体細胞$Ca^{2}$＋レセプターの有効なアクチベータである。この分子は、ただ１つののみの正電荷を有するが多数のポリベーシック分子よりもより有効であるので、特徴的である。短時間（２分間）の、ＰＭＡによる予備処理はＮＰＳ４５６の濃度応答曲線を右手に移行させる。これは、ＮＰＳ４５６が細胞外$Ca^{2}$＋により使用されるのと同じメカニズムを介し作用することを示す。ＮＰＳ４５６は、上皮小体細胞$Ca^{2}$＋レセプター発現するアフリカツメガエル卵母細胞における細胞間$Ca^{2}$＋の移動を誘発し、これは、当該$Ca^{2}$＋レセプターに対する直接的な作用を証明する（図３３）。加えてＮＰＳ４５６キラル炭素を含むため、２つの異性体形が存在する。両異性体を合成し、活性を調べた。R-異性体、ＮＰＳ４４７は、S-異性体、ＮＰＳ４４８よりも１２倍より有効である（図２８）。これは、$Ca^{2}$＋レセプターが有機分子を立体特異的な方法で認識できる第１の証明である。

ＮＰＳ４４７は、構造的に単純な分子であるとともに上皮小体細胞$Ca^{2}$＋レセプターに対し選択的で有効な作用を示すため、このリード分子に関する構造活性の研究は単純である。これらの研究の目的は、そこから最終の開発候補を選択可能な種々の特性を有する関連分子の配列を形成することである。この努力はすでに活性および効力に貢献するＮＰＳ４

４７の構造領域のいくつかを開示する。たとえば、新規な化合物ＮＰＳ４５９は小型（分子量＜２４０）であるがほぼペアレント分子と同等な効力を有するＮＰＳ４４７の類似体である。一方、幾つかの他の類似体は比較的不活性である。この類似体プロジェクトから最も興味ある分子はイン・ビボ中に入れてＰＴＨ分泌および血清$Ca^{2}$＋レベルに対する効果をテストする（実施例１５,１６,１７,１８,２３参照）。

新規化合物ＮＰＳ４６７はＮＰＳ４４７よりもやや小型の分子であるが、前者は、上皮小体細胞における［$Ca^{2+}$］$_{i}$の増加を引き起こす点で、後者よりも約３倍より有効である。ＮＰＳ４５６と同様に、ＮＰＳ４６７はラセミ混合物である。ＮＰＳ４６７のその鏡像体への分割がラセミ混合物よりもより大きな効力の異性体を提供する（実施例１６参照）。さらに、ＮＰＳ４４７、ＮＰＳ４６７およびＮＰＳ５６８に関連する分子についての構造活性の研究は、それらのラセミ形の分子よりもより有効である純粋な異性体の製造が期待される。

ＮＰＳ４５６を用い得られた結果（図３３）が示すように、それは濃度１００μＭで$Cl^{-}$電流の振幅増加を誘発する。ＮＰＳ４５６は上皮小体細胞$Ca^{2}$＋レセプターを発現するアフリカツメガエル卵母細胞に対する最も有効な分子アクチベータである。ネオマイシンおよびＮＰＳ４５６を用いるこの発現システムで得た結果は、これらの分子が$Ca^{2}$＋レセプターに対し直接作用することを、証明する。

実施例１２

破骨細胞$Ca^{2}$＋レセプターリード分子

破骨細胞に対する細胞外$Ca^{2}$＋の作用メカニズムを解明すべく用いた方策は上皮小体細胞の有効性を証明するのと同じである。第１実験はフルオリメトリック・インジケータ・インド-１を充填した単一のラット破骨細胞において［$Ca^{2}$＋］iに対する$La^{3}$＋の作用を調べる。前記のごとく、$La^{3}$＋のように３価カチオンは一時的で$Ca^{2}$＋流入を遮断する。低マイクロモル濃度のＬａ３＋は部分的に［$Ca^{2}$＋］iについての細胞外$Ca^{2}$＋誘発増加を抑制する（図２９）。［$Ca^{2}$＋］iについてのＬａ３＋抗増加の証明は、細胞間$Ca^{2}$＋の移動の証拠を提供する。上皮小体細胞において得られたものと類似の実験の結果は、同様なメカニズムを細胞外$Ca^{2}$＋により用い、両細胞タイプにおいて［$Ca^{2}$＋］iを規制することを、示唆する。

別の系列の実験は、細胞外$Ca^{2}$＋の不存在下に永続的な（図３０Ｂ）細胞外Ｍｎ２＋が［$Ca^{2}$＋］iについての一時的な増加（図３０（ａ）参照）を誘発することを、示す。これらの結果は、細胞間$Ca^{2}$＋の移動を示唆するものと同様である。Ｍｎ２＋は、ある種の細胞内に侵入できるが、破骨細胞におけるかかる挙動とは似ていない。なぜなら、Ｍｎ２＋はインド-１蛍光を停止させるからである。すなわち、Ｍｎ２＋が細胞間に侵入すると、減少、すなわち蛍光の増加は観察されない。

種々の２価または３価のカチオンの使用により得られた結果は、全て、細胞間$Ca^{2}$＋の移動および細胞外$Ca^{2}$＋の電圧感受性通路を介する流入とつながる破骨細胞の表面上の$Ca^{2}$＋レセプターの存在と一致する。結果は、$Ca^{2}$＋レセプタータンパクをコード付けするヒト破骨細胞における遺伝物質の証拠を示す（以下参照）。細胞間$Ca^{2}$＋の移動を起因とする［$Ca^{2}$＋］i一時的な増加は、イン・ビトロにおいて破骨細胞の骨吸収を抑制するのに充分である。すなわち、上皮小体細胞を用いる場合のように、$Ca^{2}$＋レセプターの活性化は破骨細胞の活性を抑制する可変的な手段のようである。

ＮＰＳ４４９は現時点このレセプターのカルシウム様薬剤のリード分子である。これは、小さな分子（Ｍｗ＜４２５）で、細胞間$Ca^{2}$＋をラット破骨細胞において$EC_{50}$２００μＭで移動させる（図３１Ａおよび３１Ｂ）。ＮＰＳ４４９の効力は比較的小さく、単純な構造でただ１つの正電荷を有し、所望の薬理学および動的薬理学特性を有するようである。

ＮＰＳ４４９をイン・ビトロにおいて骨吸収を抑止するその能力について実験する。これは、捜査電子顕微鏡を用い、ウシ皮質骨の剥片のピット形成についての生物形態分析により行う。ラット破骨細胞を２４時間、骨剥片中にて、種々の濃度のＮＰＳ４４９の存在または不存在下にインキュベートする。ＮＰＳ４４９$IC_{50}$１０μＭで骨吸収の濃度依存抑

制を引き起こす。この新規なサイトにおいて作用する分子は破骨細胞の骨吸収を抑制できるというはじめての証明が、予期せぬ結果として得る。ＮＰＳ４４９のより有効な類似体を合成化学を用いて得、本明細書に記載の方法でテスト、分析する。

実施例１３

Ｃ細胞$Ca^{2}$＋レセプター・リード分子

Ｃ細胞$Ca^{2}$＋レセプターの活性化は、破骨細胞に作用して骨吸収を抑制するカルシトニンの分泌を刺激する。選択的にＣ細胞に影響を与えるカルシウム様薬剤オステオポロシスの治療に有用である。

細胞間$Ca^{2}$＋の移動を$Ca^{2}$＋レセプター活性の機能指数として用いる。Ｃ細胞のスクリーニング作業は、Ｃ細胞表現型を発現する培養セルラインの利用により促進することができる（たとえば、ラット延髄乾酪癌細胞、ｒＭＴＣ　６-２３細胞）。３つのアルキルアミン分子は初期の実験で選択される。天然のものは２つ（アガトキシン４８９およびアガトキシン５０５）あり、他のもの（ＮＰＳ０１９）は合成類似体である。アガトキシン５０５は、$IC_{50}$＝３μＭで［$Ca^{2}$＋］ｉについての$Ca^{2}$＋誘発増加を抑制することが判明した。抑制作用は、かかる細胞中に存在するＬタイプ電圧感受性$Ca^{2}$＋通路の遮断に起因する。これに対し、アガトキシン４８９は、ｒＭＴＣ細胞における細胞間$Ca^{2}$＋を移動させることが、判明した（$EC_{50}$＝１５０μＭ）。これは、Ｃ細胞$Ca^{2}$＋レセプターを活性化することが判明した、初めて開示される有機分子である。合成類似体、ＮＰＳ019は、ｙより有効で、細胞間$Ca^{2}$＋を移動させる（$EC_{50}$＝５μＭ）（図３２）。ＮＰＳ０１９とアガトキシン４８９の間の構造的な相異がヒドロキシ基を有すか否かであるのみであることは、重要である。これは、$Ca^{2}$＋レセプターの非常に有効で選択的なアクチベータを開発できることを支持している。

ＮＰＳ０１９は小さな分子（Ｍｗ＜５００）であり、これは、Ｃ細胞$Ca^{2}$＋レセプターのカルシウム様物質の開発用のリード分子であり、イン・ビトロでカルシオニンを刺激するその能力をテストすることができる。その後、イン・ビボのテストはカルシオニン分泌を刺激し骨吸収を抑制するこの分子の能力を決定する。これらイン・ビボの研究はラットで行う。これらの研究で得られた結果は、予期せぬことで、これは、新規なレセプターに作用する小さな有機分子がカルシオニン分泌を刺激し骨吸収を抑制することを示すはじめての証拠を提供する。

実施例１４

ＮＰＳ０２１の上皮小体細胞に対するカルシウム拮抗活性

カルシウム拮抗であると思われる化合物について、細胞外$Ca^{2}$＋感受性細胞に対する細胞外$Ca^{2}$＋の作用またはカルシウム拮抗化合物の作用を遮断せねばならない。カルシウム拮抗化合物の具体例はＮＰＳ０２１で、その構造を図１に示す。フラ-２を充填したウシ上皮小体細胞において、細胞外$Ca^{2}$＋により惹起されるＮＰＳ０２１は［$Ca^{2}$＋］ｉの増加を遮断する。この応答遮断のためのＮＰＳ０２１の$IC_{50}$は約２００μＭであって、濃度約５００μＭで、細胞外$Ca^{2}$＋により惹起された［$Ca^{2}$＋］ｉの増加は停止する。重要には、ＮＰＳ021は、低［$Ca^{2}$＋］（０.５ｍＭ、図３７）でテストすると、それ自体いずれの変化も引き起こさない。

$Gd^{3+}$もまた、クローンされた$Ca^{2+}$受容体を発現するアフリカツメガエル（Xenopus）卵母細胞に対してカルシウム拮抗的である：$Gd^{3+}$それ自体は$Gd^{3+}$によって活性化される$Cl^{-}$電流に影響を及ぼさない。カルシウム様分子は、しかし$Gd^{3+}$で前処理すると、$Gd^{3+}$を遮断する。

実施例１５

ＮＰＳ４６７の血清イオン化カルシウムの低下

イン・ビトロにおいてウシ上皮小体細胞$Ca^{2}$＋レセプターを活性化することが証明された化合物を、イン・ビボにおいて低カルシウム血症活性をテストした。雄性スプラーグ・ドウーリイ・ラット（２００ｇ）を、対照としてテスト物質または担体を与える前に、１週間、低カルシウムの餌を与え続けた。血液を、ＮＰＳ４６７の腹控内投与ののち３時間後に尾静脈から採取した。全血液または血清中のイオン化$Ca^{2}$＋を、チバ-コーニング６３

４アナライザーを用い、当該装置に付属の説明書に従い、測定する。血清全カルシウム、アルブミンおよびホスフェートを常法で測定する。
ＮＰＳ４６７は、血清または全血液$Ca^{2+}$の用量依存減少をもたらす（図３８）。この時点での血液$Ca^{2+}$の減少は、血液全カルシウムレベルの比例的な減少当該平行関係にある。調べた用量のいずれにおいても、血清アルブミンまたはホスフェートレベルの変化は全くなかった。予備的な研究では、血中$Ca^{2+}$低下有効用量でのＮＰＳ４６７は、ＰＴＨの循環レベルでの用量依存減少をもたらす（図３９）。ＮＰＳ４６７の低カルシウム血症効果は、３時間以内に最大となり、２４時間後に対照レベルに戻る（図４０）。
ＮＰＳ４６７（実施例１６参照）もまた、正常、カルシウム強化餌で維持したラットにおいて血清イオン化$Ca^{2+}$の低下に有効である。ＮＰＳ４６７（１０mg／kg腹控内）の単一用量は、イオン化$Ca^{2+}$の血清レベルの急速な減少をもたらす。かかるレベルは、１時間で最大となり（対照レベルから２２％の減少）、６時間までこのレベル付近に抑制される。

実施例１６

ＮＰＳ４６７の立体特異的方法による血清イオン化カルシウムの低下

ＮＰＳ４６７はラセミ混合物である。その２つの鏡像体へのＮＰＳ４６７の分割は、キラルカラムでの分割により行った。Ｒ－異性体は、Ｓ－異性体よりも約１００倍も有効であり、上皮小体細胞の［$Ca^{2+}$］i増加を誘発する当該鏡像体の能力によって評価されるように（図４１）、イン・ビトロにおいてウシ上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターを活性化する。同様に、新規化合物ＮＰＳ５６８のその鏡像体への類似の分割は、Ｒ－異性体は、Ｓ－異性体よりも約４０倍有効であり、細胞間$Ca^{2+}$の移動をウシ上皮小体細胞においてもたらす（前記表６参照）。
ＮＰＳ４６７異性体を実施例１５のように血清$Ca^{2+}$に対する効果につき試験した。ＮＰＳ　４６７のＲ－異性体はイン・ビボにおける血清$Ca^{2+}$の低下に関しＳ－異性体よりも有効であることが証明されたＥＥ異性体またはＮＰＳ４６７はイン・ビトロの結果と一致する（図４２、各化合物は濃度３mg／体重１kgでテストする）。

実施例１７

ＮＰＳ４６７の２次上皮小体こう進症のビボ・モデルにおける血清イオン化カルシウムの低下

広範に受け入れられ使用されている、慢性腎不全から生じた２次上皮小体こう進疾の動物モデルは、５／６腎切除のラットである。かかる手術を施した動物は、まず低カルシウム血症にさせて血清$Ca^{2+}$レベルを維持すると、上皮小体の代償性の過形成および循環ＰＴＨのレベル向上が生じる。雄性スプラーグ・ドウーリイ・ラット（２５０g）を５／６腎切除し、２週間回復させる。この時点で、標準的なカルシウム血症である（血清ＰＴＨの上昇レベルによる）。ＮＰＳ　Ｒ－４６７の投与は（１０mg／kg腹控内）、２次上皮小体こう進疾の動物モデルにおいて血清イオン化$Ca^{2+}$レベルの対照の８３％への、急速な（２時間以内）低下をもたらす。これは、以下のことを示唆する:この種の化合物は２次上皮小体こう進疾および増殖性上皮小体を有する患者においてＰＴＨ分泌を有効に抑制する。

実施例１８

ＮＰＳ４６７の上皮小体切除動物における血清イオン化カルシウム濃度の非低下

低カルシウム血症応答を引き起こすようにＮＰＳ４６７が作用する一次標的組織を決定するため、ラットにおける上皮小体を外科的に取り出す。上皮小体全体を切除した動物を低カルシウム血症にさせ、カルシウム餌に大きく依存させて、血清$Ca^{2+}$ホメホスタシス状態に維持する。上皮小体削除動物は、６時間の絶食後、０．９２mMレベルの血清イオン化$Ca^{2+}$を有し、これは０．７６mMに徐々に低下する。ＮＰＳ　Ｒ－４６７の単一用量の投与（１０mg／kgi．p．）はいずれの変化も、血清イオン化$Ca^{2+}$レベルにおいて、６時間の期間にわたり与えなかった。これらの結果は、無傷の上皮小体がＮＰＳ　Ｒ－４６７の低カルシウム血症効果に必要であることを証明する。データは付加的にＮＰＳ　Ｒ－４６７はインビボにおいて上皮小体を標的にすることができることを証明する。結果は以

下の見解に一致する:ＮＰＳ　Ｒ－４６７はインビボにおいて上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターに対し作用してＰＨＰの分泌を抑制し、これによりイオン化$Ca^{2+}$の血清レベルを低下させる。

実施例１９

ＮＰＳ４６７のヒト上皮小体における細胞間カルシウムの増加

解離上皮小体細胞を、一次上皮小体こう進疾を有する患者から外科手術で得た上皮小体アデノーマから調製する。細胞に、フラ-２を充填し、［$Ca^{2+}$］ｉを前記よう測定した。ＮＰＳ　Ｒ－４６７およびＮＰＳ　Ｒ－５６８の両者は［$Ca^{2+}$］ｉの濃度依存増加をもたらす。ＮＰＳ　Ｒ－４６７およびＮＰＳ　Ｒ－５６８の$EC_{50}$は各々２０および３μＭである。これら両者の化合物は病理学的ヒト組織において［$Ca^{2+}$］ｉを増加させることができ、一次上皮小体こう進疾の患者においてＰＴＨおよび$Ca^{2+}$の血清レベルを減少させるようである。

実施例２０

上皮小体細胞カルシウムレセプターにおけるＮＰＳ４６７の作用メカニズム

解離ウシ上皮小体作用を用いて、レセプターレベルにおけるＮＰＳ４６７の作用メカニズムをさらに調べた。０．５ｍＭ細胞外$Ca^{2+}$の存在下に、ＮＰＳ　Ｒ－４６７は急速で一次的な［$Ca^{2+}$］ｉの増加をもたらす。この増加は１μＭのＬａ３＋の存在下に維持され、ＰＭＡでの予備処理で部分的に抑制される（１００ｎＭ×２分）。すべてのこれらの結果は$Ca^{2+}$レセプターに対するＮＰＳ　Ｒ－４６７の作用と一致する。しかし、ＮＰＳ　Ｒ－４６７に対する細胞ゾル$Ca^{2+}$の応答は、上皮小体細胞が$Ca^{2+}$非含有緩衝剤中に懸濁すれば停止する。これは、ＮＰＳ　Ｒ－４６７がそれ自体では細胞間$Ca^{2+}$の可動化を引き起こせないことを示唆する。これは、部分的な$Ca^{2+}$結合部位の支配がＮＰＳ　Ｒ－４６７が応答を惹起させるのに必要であることを示唆する。この仮説をテストするため、上皮小体細胞を$Ca^{2+}$非含有緩衝剤に懸濁し、亜最大濃度のネオマイシンにさらす。ネオマイシンは以下の理由により用いる:これは、ほぼすべての点において、上皮小体細胞およびアフリカツメガエル卵母細胞（上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターを発現）に対する細胞外$Ca^{2+}$の効果に類似するからである。ネオマイシン１０μＭの添加はそれ自体では、これらの条件下に［$Ca^{2+}$］ｉの増加を引き起こさない。しかし、ＮＰＳ　Ｒ－４６７（３０μＭ）のその後の添加は［$Ca^{2+}$］ｉの一次的な増加を惹起するが、これは、細胞外$Ca^{2+}$が存在しないため、細胞間$Ca^{2+}$の可動化から生じなければならない。$Ca^{2+}$非含有緩衝剤に浸した細胞は３０μＭＮＰＳ　Ｒ－４６７にさらすと、［$Ca^{2+}$］ｉの増加はない。ＮＰＳ　Ｒ－４６７の濃度は細胞外$Ca^{2+}$０．５ｍＭが存在すれば［$Ca^{2+}$］ｉの増加に最大限有効である。しかし、ネオマイシン１０μＭのその後の添加は一次的な［$Ca^{2+}$］ｉの増加を誘発する。恐らく、ネオマイシンは同じ部位に細胞外$Ca^{2+}$として結合し、そのため機能的に置換される。亜最大濃度（これ自体応答を引き起こさない）を用い、部分的な$Ca^{2+}$結合部位の支配を達成し、ＮＰＳ　Ｒ－４６７による$Ca^{2+}$レセプターの活性化を可能にする。

ＮＰＳ　Ｒ－４６７の作用メカニズムを付加的に定義する付加的な研究を行う。細胞を一旦再度カルシウム非含有緩衝剤に懸濁して、いずれか観察された［$Ca^{2+}$］ｉの増加が細胞間$Ca^{2+}$の可動化に起因することを保証する。これらの実験では、しかし、ネオマイシンの最大有効濃度１００μＭを用いた。細胞外$Ca^{2+}$の不存在下に、１００μＭのネオマイシンは急速で一次的な［$Ca^{2+}$］ｉの増加を誘発する。３０μＭＮＰＳ　Ｒ－４６７のその後の添加は［$Ca^{2+}$］ｉの増加を引き起こさない。逆の実験では、３０μＭＮＰＳ　Ｒ－４６７を１００μＭネオマイシンの前に添加する。予想どおり、ＮＰＳ　Ｒ－４６７はいずれの［$Ca^{2+}$］ｉの増加を引き起こさない。しかし、それは、１００μＭネオマイシンのその後の添加により誘発された［$Ca^{2+}$］ｉの増加に影響を与えない。ＮＰＳ　Ｒ－４６７の最大有効濃度で得られたこれらの結果は、これら２つの化合物が同じ部位において作用しないことを示唆する。むしろ、その結果は、２つの別々の$Ca^{2+}$レセプター上の部位、すなわち細胞外$Ca^{2+}$およびネオマイシンが結合するものおよびＮＰＳ　Ｒ－４６７および構造関連化合物（ＮＰＳ　Ｒ－５６８など）を仮定すれば、充分に説明する。

前者の部位に結合するリガンドは$Ca^{2+}$レセプターの完全な活性化をもたらすことができる一方、後者の部位に結合するリガンドは細胞外$Ca^{2+}$結合性部位がある程度ではあるが限定されない程度に支配される場合のみ生じるかそして／または機能的に適当なものとできる。細胞外$Ca^{2+}$結合性部位に結合するリガンドは、予めふさいだＮＰＳ　Ｒ－４６７の結合部位にさらすことができる。ＮＰＳ　Ｒ－４６７結合部位は細胞外$Ca^{2+}$結合性部位において結合するリガンドに応答してレセプター活性化を増大させるアロステリック部位のようである。

データは上皮小体細胞$Ca^{2+}$レセプターが少なくとも２つの明確な部位において有機リガンドを有することを証明する。一方の部位は生理学的なリガンド、細胞外$Ca^{2+}$、およびある種の有機ポリカチオン、たとえばネオマイシンが結合する。この部位の結合は完全な$Ca^{2+}$レセプターの活性化、［$Ca^{2+}$］iの増加およびＰＴＨ分泌の抑制をもたらす。ＮＰＳ　Ｒ－４６７およびＮＰＳ　Ｒ－５６８は、予め認識していない$Ca^{2+}$レセプター上の結合部位を規定する。この部位への結合は細胞外$Ca^{2+}$結合性部位が部分的に支配される場合にのみ生じるかそして／または$Ca^{2+}$レセプターの完全な活性をもたらす。いずれかの部位において作用するリガンドはインビボにおいて血清$Ca^{2+}$レベルを抑制するのに有効である。

上皮小体カルシウム受容体のアロステリックな部位

ＮＰＳ　Ｒ－４６７およびＮＰＳ　Ｒ－５６８のようなウシ上皮小体細胞カルシウム受容体を活性化するカルシウム様化合物は、細胞外$Ca^{2+}$の不存在下で、細胞内$Ca^{2+}$の移動の原因とはならない。むしろ、それらは細胞外$Ca^{2+}$による$Ca^{2+}$受容体の感受性を増加し、従って、細胞外$Ca^{2+}$についての濃度反応曲線の左へのシフトの原因となる。このために、それらは細胞外$Ca^{2+}$が働くのと同じ受容体上の部位に働くことはありそうにない。対比して、有機および無機ポリカチオン類は細胞外$Ca^{2+}$の不存在下、細胞内の$Ca^{2+}$の移動の原因となり、従って、多分細胞外$Ca^{2+}$と同じ部位で働く。ＮＰＳ　Ｒ－５６８のような化合物は、アロステリックな方法で働き、その活性はある細胞外$Ca^{2+}$の最小濃度に依存するのであろう。これは、受容体の細胞外$Ca^{2+}$－結合部位の部分的な占拠がＮＰＳ　Ｒ－５６８のような化合物が有効であるために必要であることを示唆する。このモデルは実施例２０に記載の観察と矛盾がない。

上皮小体細胞$Ca^{2+}$受容体におけるＮＰＳ　Ｒ－５６８の活性の機構の他の詳述は、しかしながら、放射能標識（例えば$^{3}H$を使用して）ＮＰＳ　Ｒ－５６８の特異的結合を評価することにより更に正確に調査されている。上皮小体細胞$Ca^{2+}$受容体上のＮＰＳ　Ｒ－５６８活性を説明できるいくつかの分子的機構がある。一つの機構において（モデル１）、ＮＰＳ　Ｒ－５６８は、占拠されている場合、受容体を機能的に活性化するのに充分でない場所で$Ca^{2+}$受容体と結合できる。活性化は、細胞外$Ca^{2+}$－結合部位（複数もある）のあるレベルの占有が成し遂げられた場合のみ起こる。別の機構において（モデル２）、細胞外$Ca^{2+}$－結合部位の占拠は、ＮＰＳ　Ｒ－５６８のような化合物のための潜在的結合部位を暴露し得る。この潜在的部位のＮＰＳ　Ｒ－５６８による占拠は、次に細胞外$Ca^{2+}$部位の親和性および／または結合の効果を増加させる。いずれの機構もＮＰＳ　Ｒ－５６８のような化合物による$Ca^{2+}$受容体のアロステリックな活性化の形態を含む。これらのみがＮＰＳ　Ｒ－５６８のような化合物の上皮小体細胞上$Ca^{2+}$受容体における効果を説明することが可能な機構ではない。作用の他の機構が下記の結合研究により示唆され得る。

ＮＰＳ　Ｒ－５６８のような化合物の上皮小体細胞$Ca^{2+}$受容体における働きの機構を更に研究するために、$^{3}H$－ＮＰＳ　Ｒ－５６８を用いた研究を行うことができる。もとのままの上皮小体細胞または上皮小体細胞から調製した膜への$^{3}H$－ＮＰＳ　Ｒ－５６８の特異的結合は最初に当分野で既知の技術により研究される。次いで、結合の動態パラメーターを細胞外$Ca^{2+}$濃度の関数として測定する。特に、データのスキャッチャード分析は結合部位の数および$^{3}H$－ＮＰＳ　Ｒ－５６８に対する受容体部位の見かけの親和性を明らかにするであろう。次いで、これらのパラメーターを測定に使用する緩衝液中の細胞外$Ca^{2+}$のレベルの変化の関数として求める。もし機構１が正しければ、次に細胞外$Ca^{2+}$

不存在下で特異的結合が著しいレベルでおこるであろう。細胞外$Ca^{2+}$のレベルの関数としての結合の動態パラメーターの大きな変化は機構２を支持するであろう。上記の他の実施例で述べられている種々の他の無機および有機ポリカチオン類が、細胞外$Ca^{2+}$と同様の$^{3}H$－ＮＰＳ　Ｒ－５６８の結合パラメーターの変化の原因になることが予期される。これは、これらのポリカチオンがＮＰＳ　Ｒ－５６８のような化合物が結合する部位と異なった細胞外$Ca^{2+}$－結合部位に働くという見解を支持する。

実施例２１

ＮＰＳ４６７の製造

２５０mlの丸底フラスコ中で、３’－メトキシ・アセトフェノン１０.0g（１００ミリモル）および３－フェニル－プロピルアミン１３.5g（１００ミリモル）を混合し、チタン（IV）イソプロポキシド１２５ミリモル（３５.5g）で処理する。反応混合物を３０分間、室温にて窒素雰囲気下で攪はんする。その後、エタノール１００ml中ナトリウム・シアノボロヒドリド6.3g（１００ミリモル）を２分間にわたり滴下する。反応を室温にて窒素下に、１６時間攪はんする。その後、反応混合物をエチルエーテル１.5リットルおよび水０.５リットルを含む２リットルの分離用ろうとへ移す。相を平衡状態にさせ、エーテル相を取り出す。残りの水相をエーテル１リットルづつ４回処理して完全に抽出する。洗液を合し、無水炭酸カリウム上で乾燥し、透明で薄こはく色の油を得る。

この物質のＴＬＣ分析（シリカ上、クロロホルム－メタノール－イソプロピルアミン＝１００:5:1を使用）は、$R_f$０.６５の生成物および、$R_f$０.９９（３’－メトキシ・アセトフェノン）および$R_f$０.０（３－フェニルプロピルアミン）の痕跡の２つの出発物質を示す。

反応混合物を、シリカ（４８×4.6cm）を用いて、クロロホルム－メタノール－イソプロピルアミン（９９:1:０.１～９０:１０:０.１）の傾斜溶出を用いてクロマトグラフィにかけ、精製したＮＰＳ４６７（１３.６６g）を得る。この物質を０.１％ジエチルアミン含有ヘキサン－イソプロパノール（９９:１）に溶解して、濃度５０mg／mlの溶液を得る。キラル分解を、この溶液４ml（２００mg、分離達成へ最大）のクロマトグラフィにより、キラルセル（ChiralCel）ＯＤ（２５×２cm）を用いて、ヘキサン中０.７％イソプロピルアミンおよび０.０７％ジエチルアミンを用い、１００ml／分にて、２６０nmの光学密度をモニターしながら行う。これらの条件下では（物質１００mgの注入）、先の溶出異性体（ＮＰＳ４６７Ｒ）は－２６分でカラムから現れはじめ、後の溶出異性体（ＮＰＳ４６７Ｓ）は－３４分で現れはじめる。ベースライン分解はこれらの条件で達成される。各光学異性体（遊離塩基）を対応する塩酸塩へ、遊離塩基3gをエタノール１００ml中へ溶解し１０モル当量のＨCl含有水１００mlで処理して、変換させる。この溶液の凍結乾燥により白色の固体を得る。

ＮＰＳ５６８

ＮＰＳ５６８はウシおよびひと上皮小体細胞中の$[Ca^{2+}]_i$の増加のより有効な原因となるＮＰＳ４６７の構造的類似体である。ＮＰＳ４６７のように、ＮＰＳ５６８の効果は立体特異的であり、より有効なエナンチオマーはＲ－異性体である（表６、前掲参照）。ＮＰＳ　Ｒ－５６８は現在上皮小体$Ca^{2+}$受容体に選択的活性のあるリードカルシウム様化合物である。それは例え大きな有効性と一緒であっても、上記の実施例で述べたＮＰＳ　Ｒ－４６７と同様に行動する。従って、ＮＰＳ　Ｒ－５６８はウシ上皮小体細胞における$[Ca^{2+}]_i$の増加を立体特異的方法（表６参照、前掲）で誘発する。ＮＰＳ　Ｒ－５６８は細胞外$Ca^{2+}$の不存在下で$[Ca^{2+}]_i$の増加の誘発をしないが、細胞外$Ca^{2+}$に対しての反応を強める。ＮＰＳ　Ｒ－５６８は細胞外$Ca^{2+}$についての濃度反応曲線を左にシフトさせる。

ラットへのＮＰＳ　Ｒ－５６８の経口投与は、血清$Ca^{2+}$の濃度を容量依存的に減少させる原因となる（$ED_{50}$＝７mg／kg）。ＮＰＳ　Ｒ－５６８の経口投与により誘発された低カルシウム反応は開始時は迅速であり、血清ＰＴＨのレベルの減少と平行である。ＮＰＳ　Ｒ－５６８により誘発された低カルシウム反応は前もっての完全な腎摘出によってのみ最小限に影響するだけである。しかしながら、ＮＰＳ　Ｒ－５６８は上皮小体摘出ラット

の低カルシウム反応の誘導は起こさない。ＮＰＳ　Ｒ－５６８は、従って、イン・ビボ上皮小体細胞$Ca^{2+}$受容体を選択的な標的にし、ＰＴＨ分泌阻害の原因となる。血清ＰＴＨレベルの減少およびその結果である低カルシウム症は上皮小体亢進症の場合における望ましい治療上の効果である。ＮＰＳ　Ｒ－５６８の合成を下記に示す。

実施例２２

ＮＰＳ５６８の製造

ＮＰＳ５６８を、実施例２１記載の方法で製造する。ただし、３－フェニルプロピルアミンに代えて、当量の３－（２－クロロフェニル）プロピルアミンを用いる。３’－メトキシ・アセトフェノン、３－（２－クロロフェニル）プロピルアミンおよびチタン（IV）イソプロポキシドの混合物を５時間攪はんし、次いで$NaCNBH_3$／ＥｔＯＨで処理すると、著しく高い収率をもたらすことが判明した（９８％）。

実施例２３

経口投与の場合のＮＰＳ４６７が血清イオン化カルシウムを低下

ラット（雄、スプラーグ・ドウリー、２５０～３００g）は、標準ラット食餌で、実験前に一夜絶食させる。ＮＰＳ４６７をトウモロコシ油に懸濁し、栄養補給ニードルを用いて、一回経口用量として投与する。３時間後、血液試料を尾静脈から採取し、イオン化$Ca^{2+}$レベルを測定する。図４４は、経口投与した場合のイオン化$Ca^{2+}$の血清レベルについての用量依存減少を引き起こすＮＰＳ４６７を示す。

実施例２４

ＢＯＰＣＡＲ１クローニング法１

アフリカツメガエル（ゼノプス・リーヴィス（Xenopus laevis））卵母細胞をウシ上皮小体カルシウム受容体コード化ｃＤＮＡを同定するために使用した。これらの技術は本明細書には簡潔にしか記載していないが、この完全な詳細な方法は、このセクションに先行する技術を記載したセクションにあり、この技術は他の細胞型$Ca^{2+}$－受容体の更なる形をクローンするのに使用し得る。ポリ（$A^+$）－に富むＲＮＡは、最初にウシ上皮小体からグアニジウムチオシアネートを用いた抽出、ＣｓＣｌを通した遠心およびオリゴ（ｄＴ）セルロースクロマトグラフィーにより調製した。得られたポリ（$A^+$）－に富むＲＮＡの卵母細胞への注入（２５－５０ng／卵母細胞）は、本明細書で述べたように$Ca^{2+}$および３価カチオン（１－１００μM）$Gd^{3+}$の細胞外の濃度の上昇に対する感受性をもたらし、２種のカチオンがカルシウム活性化塩素電流を誘発する。このような電流は、水を注入した対照の卵では誘発されなかった。アフリカツメガエルは採取された卵母細胞が：（ｉ）高レベルの成熟（即ちステージＶ、VI）；（ii）Ａ２３１８７のような$Ca^{2+}$イオノフォアにより活性化される$Cl^-$電流の高活性；（iii）ウシ上皮小体から単離された全ポリ（$A^+$）ＲＮＡの２５ng／卵母細胞を注入された場合、$Gd^{3+}$－誘導$Cl^-$電流の高レベルな機能的発現を示すことを基本にして選択する。ｍＲＮＡは次に予備の連続流アガロースゲル電気泳動（ヘディガー　エム・エー、アナリティカル・バイオケミストリー、１５９：２８０－２８６（１９８６））を使用してサイズ分画をし、$Ca^{2+}$－受容体をコードする転写物中にポリ（$A^+$）－ＲＮＡに更に富む分画を得る。活性のピーク、例えばこれらの分画由来のｍＲＮＡを注入された卵母細胞は、４－５.５ｋｂのサイズの範囲が得られる$Gd^{3+}$－活性化$Cl^-$電流の発現の増強を示す。このＲＮＡは、完全な長さの転写物中に豊富なプラスミドｐＳＰＯＲＴ１中のサイズ－選択、指向性ｃＤＮＡライブラリーの製造に使用された。次いで、センス相補的ＲＮＡ（ｃＤＮＡ）を、このライブラリー由来の別々の３５０－５００のクローンから集めたＤＮＡ挿入物から合成し、卵母細胞に注入する。$Gd^{3+}$－活性化$Cl^-$電流は３５０コロニーを含む単一フィルター由来のＲＮＡの注入後観察された。クローンの系列的減少プールからのｃＲＮＡの製造および注入は、ｃＲＮＡの卵母細胞への注入後、非常に促進された$Ca^{2+}$－受容体活性を示す５.３ｋｂのｃＤＮＡ挿入物を有する単一クローン（ＢｏＰＣａＲ　１）を分離するに至った。ＢｏＰＣａＲ　１ｃＲＮＡを含むプラスミド（プラスミド、図４５；制限地図、図４６；および部分的ヌクレオチド配列、図４７参照）はＡＴＣＣに受託番号ＡＴＣＣ７５４１６で寄託されている。

ＢｏＰＣａＲ　１ｃＤＮＡはアフリカツメガエル卵母細胞におけるネオマイシン誘発Ｃｌ$^-$チャンネル活性を示すことが知られているサイズ－分画されたＲＮＡのサイズの範囲からはずれている。これは異なったイソ形態または多重遺伝子が他の多くのＣａ$^{2+}$受容体遺伝子群を隠している可能性と矛盾しない。

いくつかの薬理学的および生化学的基準が、真正なウシ上皮小体Ｃａ$^{2+}$－受容体をコード化しているクローンの同定に使用された。水－注入卵母細胞ではない、このクローン化受容体を発現する卵母細胞は細胞外Ｃａ$^{2+}$（１．５－５ｍＭ）またはＧｄ$^{3+}$（２０－６００μＭ）の増加に、ポリ（Ａ$^+$）－注入卵母細胞で観察されるものの数倍大きいＣｌ$^-$の増加（少なくとも１．８ミクロアンペア）を伴って反応した。これらの反応は、ＢｏＰＣａＲ　１ｃＤＮＡから調製したｃＲＮＡを卵に注射した後一（１）から四（４）日にわたって著しく増加する。更に、この反応を誘発する２種のカチオンの濃度の範囲は、上皮小体細胞上におけるＣａ$^{2+}$の効果が非常に似ていることが知られており、Ｃａ$^{2+}$およびＧｄ$^{3+}$によって生じさせられるＣｌ$^-$電流の変化と実質的に同一の卵母細胞におけるＣｌ$^-$電流の変化を生じさせ、これらはこの抗生物質がインビトロ上皮小体機能を調節するのと同じ濃度範囲にわたって生じる、ネオマイシンの、ウシ上皮小体細胞インビトロ上に作用することがすでに示されている濃度の範囲（２０－１００μＭ）と非常に似ている。最後に、クローンから製造されたイン・ビトロのＲＮＡの翻訳物はポリアクリルアミドゲル上では分子量約１００ｋｄの単一タンパク質となり、この合成はイヌ膵臓ミクロソームの添加により、見かけ上の分子量の１０－１５％の増加を付随して促進された。後者は、クローン化受容体は必須の膜タンパク質受容体と予期される膜と強力に相互作用し、天然の形においてグリコシル化されていることを示す。レクチンコンカナバリンＡの研究は、Ｃａ$^{2+}$受容体が糖タンパク質に似ていることを示す。従って、卵母細胞に高レベルで発現されるクローン化受容体の薬理学的特性および今日まで行われている生化学的研究は、そのウシ上皮小体Ｃａ$^{2+}$動態（卵母細胞中のＣａ$^{2+}$活性化Ｃｌ$^-$電流の変化により例示してあるような）の本質と全く矛盾しない。

診断における使用

ＮＰＳ　Ｒ－５６８または他のカルシウム受容体で活性な化合物は診断用の手段として使用できる。特にこのような化合物の薬理学的製剤は診断用の手段として有用である。一つの例として、ＮＰＳ　Ｒ－５６８のような上皮小体カルシウム様化合物を含む薬理学的製剤は精神的抑鬱の症状を示す高カルシウム血症の患者に経口または他の投与経路で投与できる。もしこれらの症状が、上皮小体亢進症などの潜在的高上皮小体状態から生じた場合、ＮＰＳ　Ｒ－５６８または同様に働く化合物の投与はこれらの症状の緩和をするであろう。もし症状が緩和されない場合、精神抑制は上皮小体亢進症以外のある病理学的状態によるものである。従って、上皮小体細胞カルシウム様化合物は精神的抑鬱の区別化診断に使用できる。

上皮小体亢進症および他の疾病に一般的な症状および兆候はまた上記の方法を使用して区別的に診断ができる。このような共通の兆候および症状は、高血圧、筋肉虚弱および一般的な不快感を含むが、これに限定されない。上皮小体細胞Ｃａ$^{2+}$受容体カルシウム様化合物での処置後のこれらの症状の緩和は、問題が潜在的上皮小体亢進症からもたらされることを示すものである。

他の例として、Ｃ－細胞Ｃａ$^{2+}$受容体においてアンタゴニスト（カルシウム拮抗的）として働く化合物は、骨髄の甲状腺癌の診断に上記と同様に投与できる。この場合、Ｃ－細胞Ｃａ$^{2+}$受容体カルシウム拮抗化合物の投与は、放射免疫測定により容易に測定できるカルシトニンの血清レベルを低下させるであろう。骨髄の甲状腺癌に関連する下痢のようなある症状は、それらがカルシウム拮抗化合物の投与後、緩和または減少するか否かを観察し診断し得る。

３番目の例として、糸球体近接細胞Ｃａ$^{2+}$受容体においてカルシウム拮抗的に働く化合物は高血圧の相違診断に使用できる。この場合、糸球体近接細胞Ｃａ$^{2+}$受容体カルシウム様化合物の投与は上記のように投与される。もし高血圧が別の病理学的状態よりむしろ大部分または完全にレニンのレベルの増加によるものである場合、正常レベルまでの血圧の低

下が起こる。
他の例として、破骨細胞Ｃａ$^{2+}$受容体に特異的にカルシウム様に働く化合物は骨粗鬆症を形成する高－または低－レベルのターンオーバーの区別化診断に使用できる。この場合、このような化合物は好適な薬理学的調合剤で投与でき、血清アルカリホスファターゼ、オステオカルシン（osteocalcin）、ピリジノリンおよび／またはデオキシピリジノリン架橋および／または骨吸収および／または形成の他の予報的マーカーのレベルを当分野で既知の方法により測定する。これらの一つまたはそれ以上のパラメーターの非常な減少は高ターンオーバー骨粗相症を予言し、一方僅かな減少または減少がないことは低－ターンオーバー骨粗鬆症を予言する。このような情報は好適な処置に必要である。抗吸収剤は低－ターンオーバー骨粗鬆症には好適な単独治療ではない。
これらの例は完全ではないが、特異的Ｃａ$^{2+}$受容体が薬理学的製剤を対象とし、身体的機能および／または化学的成分についてのこのような製剤の観察された効果は診断に用い得ることの説明として役立つ。一般に、上記の種々の細胞のＣａ$^{2+}$受容体で働くカルシウム様およびカルシウム拮抗化合物は個々の細胞型に関連する種々の疾病の診断に使用できる。これらの疾病は骨および鉱物関連疾患（コエら、ディスオーダーズ・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・メタボリズム、ラベン出版、１９９０に記載）、腎臓病、内分泌疾患、癌、心臓血管系疾患および妊娠に関連する疾患を含むが、これに限定されない。このような分子が治療的に有効なひとの疾病または疾患は下記の通りである：（１）カルシウム様物質は異常皮膚細胞増殖を減少させることにより乾癬を改善することが予期される。（２）Ｃａ$^{2++}$がＭＴＡＬおよび皮質回収細胞上のバソプレッシン効果を阻害するため、カルシウム様物質は、不適当なバソプレッシン（ＡＤＨ）分泌症候群のようなバソプレッシン過剰状態における水分保持を減少する事が予期される。逆に、ＡＤＨ欠乏状態において使用されるカルシウム受容体アンタゴニストは、部分的中央糖尿病インシピディス内のように存在する任意のＡＤＨの活性を強化することが予期される。（３）カルシウム様物質は（ａ）レニン分泌を抑制する、（ｂ）ＰＴＨｒＰ（ＰＴＨ－関連ペプチド）のような血管平滑筋に対する血管拡張薬の製造を刺激することにより、高血圧の処置に使用し得る。（４）カルシウム様物質は血小板凝集能を増加することが予期され、それは血小板数が少ない場合、有用である。逆に、カルシウム拮抗物質は、それらが高凝集能である場合血小板機能を阻害する。（５）カルシウムは結腸および乳房細胞の分化を促進する。カルシウム様物質は結腸または乳癌の危険性を減少する。（６）カルシウムはＭＴＡＬにおいて尿カルシウム排泄を促進する。カルシウム様物質は高カルシウム血症疾患の治療において有用な低カルシウム活性をもつことが予期される。カルシウム様物質の破骨細胞における阻害効果および低カルシウムペプチドカルシトニン分泌の刺激により高カルシウム血症およびその症状の治療に有用であることが予期される。カルシウム様物質はまたカルシウム受容体を活性化することにより低カルシウム症状を改善する。逆に、カルシウム拮抗物質は尿カルシウム排泄を減少させることが予期され、腎臓結石の処置に有用である。加えて、カルシウムは近位尿細管における１,２５－ジヒドロキシビタミンＤの合成を抑制し、このビタミンＤ代謝物はしばしば腎臓結石患者で過剰蓄積され、高カルシウム尿症の一因となる。１,２５－ジヒドロキシビタミンＤ形成のカルシウム様物質による抑制は腎臓カルシウム結石疾患の処置に有用であることが予期される。（７）内因性アミン類はカルシウム様または細胞溶解性活性により尿毒症患者の症状を再現することができる。カルシウム様および／またはカルシウム拮抗剤はこれらの症状を改善することが予期される。（８）アミノグリコシド系抗生物質のある腎臓毒性はこれらの薬と腎臓カルシウム受容体の相互作用が媒介し得る。カルシウム受容体をもって、クラスの薬を設計した場合の最小の腎臓毒性のスクリーニングを容易に行うことが可能となることが予期される。加えて、腎臓カルシウム受容体アンタゴニストは、この機構に関連する場合、この腎臓毒性の予防または処置となる。（９）カルシウム関連疾患の遺伝的因子のいくつか、例えば骨粗鬆症、腎臓結石および高血圧は、受容体の一定の形の遺伝的問題に関係があることが予期されている。これらは現在研究されており、受容体－に基づく試薬を用いた遺伝子スクリーニング／試験が行われ得る。ひと疾患、家族特有の低カルシウム尿症様高カルシウム血症はカルシウ

ム受容体欠陥のせいであり得る。最終的な原発性上皮小体亢進症との診断的分離は受容体－に基づく技術を使用して行うことができる。（１０）カルシウム受容体は胎盤に存在し、胎盤機能の疾患に影響を与え、成長している胎児に栄養を輸送していることが予想される。

他の具体例は以下の請求の範囲に含まれる。

配列表

（１）一般的情報：

（ｉ）特許出願人：ネメス、エドワード・エフ

（ii）発明の名称：カルシウム受容体活性化分子およびその関連物

（iii）配列の数：１

（iv）連絡先：

（Ａ）名宛人：ウルフ・グリーンフィールド・アンド・サックス・ピー・シー

（Ｂ）通り：６００アトランティック・アベニュー

（Ｃ）市：ボストン

（Ｄ）州：マサチューセッツ州

（Ｅ）国：アメリカ合衆国

（Ｆ）ＺＩＰ：０２２１０－２２０４

（ｖ）コンピューター解読書式：

（Ａ）媒体型：５.２５インチ、ディスケット

（Ｂ）コンピューター：ＩＢＭコンパティブル

（Ｃ）オペレーティング・システム：ＭＳ：ＤＯＳ Version３.３

（Ｄ）ソフトウエア：WordPerfect５.１

(vi）本出願のデータ：

（Ａ）出願番号：入手不可

（Ｂ）出願日：現出願

（Ｃ）分類：入手不可

(viii）弁理士／代理人情報：

（Ａ）氏名：ゲイツ、エドワード・アール

（Ｂ）登録番号：３１,６１６

（Ｃ）参照／整理番号：Ｂ０８０１／７０１２

(ix）電話連絡先情報：

（Ａ）電話番号：（６１７）７２０－３５００

（Ｂ）ファックス番号：（６１７）７２０－２４４１

（Ｃ）テレックス：ＥＺＥＫＩＥＬ

（２）配列番号１の情報：

（ｉ）配列の特徴

（Ａ）長さ：２１４８塩基対

（Ｂ）型：核酸

（Ｃ）鎖の数：二本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(ii）配列の種類：ｃＤＮＡ to ｍＲＮＡ

(iii）ハイポセティカル：Ｎｏ

(iv）アンチセンス：Ｎｏ

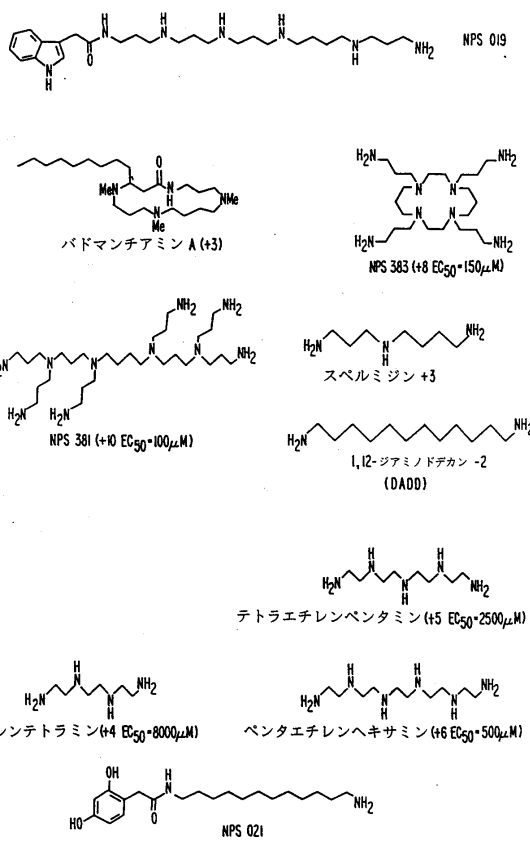
(xi）配列：配列番号１：

```
CCACGCGTCC GCGGAAAAAA AAAAAAAGTT CCCCACTCTA    40
GTACAGAGAA GGTTGGCAGA GTCGTAAGCC CCCAACCTCT    80
TAAACTTCTC TGCATCTCCA AGGAGAAGGA GGGAAGAGGG   120
GTTCTTTCCG ACCTGAGGAG CTGGATCTGG GGTCCGAGAA   160
CCCCAAGGTA GCACCGGAAA GAACAGCACA GGAGGCGAGA   200
GCGTGCGGTG GCCGGTKGGC GGGAGAACCA GACCCGACKY   240
CGCGGTCCTC GGYGCTGCCG GGKYCCSGGG ACTCAGCTCA   280
GCACGACTGG GAAGCCGAAA GTACTACACA CGGTCTCTGC   320
ATGATGTGAC TTCTGAAGAC TCAAGAGCCA CCCACTTCAC   360
TAGTCTGCAA TGGAGAAGGC AGAAATGGAA AGTCAAACCC   400
CACGGTTCCA TTCTATTAAT TCTGTAGACA TGTGCCCCCA   440
CTGCAGGGAG TGAGTCGCAC CAAGGGGGAA AGTCCTCAGG   480
GGCCCCCAGA CCACCAGCGC TTGAGTCCCT CTTCCTGGAG   520
AGAAAGCAGA ACTATGGCAC TTTATAGCTG CTGTTGGATC   560
CTCTTGGCTT TTTTCTACCT GGTGCACTTC CGCCTATGGG   600
CCTGACCAGC GAGCCCAAAA GAAAGGGGAC ATTATCCTCG   640
GGGGGCTCTT TCCTATTCAT TTTGGGGTTG MMGTGAAAGA   680
TCAGGATCTA AAGTCGAGGC CGGAGTCCGT GGAGTGTATC   720
AGGTATAATT TCCGAGGATT TCGCTGGTTA CAAGCTATGA   760
TATTTGCCAT AGAGGAAATA AACAGCAGTC CAGCCCTTCT   800
```

TCCCAACATG ACCCTGGGAT ACAGGATATT CGACACTTGT 840
AACACCGTCT CTAAAGCCTT GGAGGCCACC CTGAGTTTTG 880
TGGCCCAGAA CAAAATTGAC TCTTTGAACC TTGATGAGTT 920
CTGCAACTGC TCAGAGCACA TCCCCTCTAC CATCGCAGTG 960
GTGGGAGCTA CTGGCTCGGG CATCTCCACA GCAGTGGCCA 1000
ACCTGCTGGG GCTCTTCTAC ATCCCCCAGG TCAGCTATGC 1040
CTCCTCCAGC AGACTCCTCA GCAACAAGAA TCAATTCAAG 1080
TCCTTCCTCC GCACCATACC CAATGATGAA CACCAGGCCA 1120
CGGCCATGGC TGACATCATC GAGTACTTCC GCTGGAACTG 1160
GGTGGGCACA ATTGCAGCTG ACGATGACTA TGGCCGGCCA 1200
GGGATCGAGA AGTTTCGAGA GGAAGCTGAG GAGAGGGACA 1240
TCTGCATCGA CTTCAGCGAG CTCATCTCCC AATACTCTGA 1280
TGAGGAAAAG ATCCAGCAGG TGGTGGAGGT GATCCAGAAT 1320
TCCACCGCCA AAGTCATTGT CCGTCTTCTC CAGCGGCCCA 1360
GACCTGGAAC CCCTCATCAA AGAGATCGTC CGGCGCAATA 1400
TCACAGGCAG GATCTGGCTG GCCAGCGAGS CTGGSCAGCT 1440
CTTCCCTGAT TGCTATGCCC GAGTATTTCC ATGTGGTCGG 1480
AGGCACCATT GGGTTTGGTT TGAAAGCTGG GCAGATCCCA 1520
GGCTTCCGGG AATTCCTGCA GAAAGTCCAC CCCAGGAAGT 1560
CTGTCCACAA TGGTTTTGCC AAGGAGTTTT GGGAAGAAAC 1600
ATTTAACTGC CACCTGCAAG AGGGTGCTAA AGGCCCATTA 1640
CCGGTGGACA CCTTCCTGAG AGGTCACGAA GAAGGAGGTG 1680
CCAGGTTAAG CAACAGTCCC ACTGCCTTCC GACCTCTGTG 1720
CACTGGGGAG GAGAACATCA GCAGTGTCGA GACTCCTTAC 1760
ATGGATTATA CACATTTACG GATATCCTAC AACGTCTACT 1800
TAGCCGTCTA CTCCATTGCT CATGCCCTAC AAGATATATA 1840
CACCTGCATA CCTGGGAGAG GGCTCTTCAC CAACGGTTCC 1880
TGCGCAGATA TCAAGAAGGT TGAAGCTTGG CAGGTCCTGA 1920
AACACCTGCG GCACCTAAAT TTTACCAGCA ATATGGGGGA 1960
GCAAGTAACT TTCGATGAAT GTGGAGACCT GGCAGGGAAC 2000
TATTCCATCA TCAACTGGCA CCTCTCCCCA GAGGACGGCT 2040
CCATAGTGTT TAAGGAAGTT GGATATTACA ATGTCTATGC 2080
CAAGAAAGGA GAGAGACTCT TCATCAATGA TGAAAAAATT 2120
CTGTGGAGTG GATTCTCAAG GGAGGTGC 2148

【図１ａ】

FIG. 1a.




【図１ｂ】

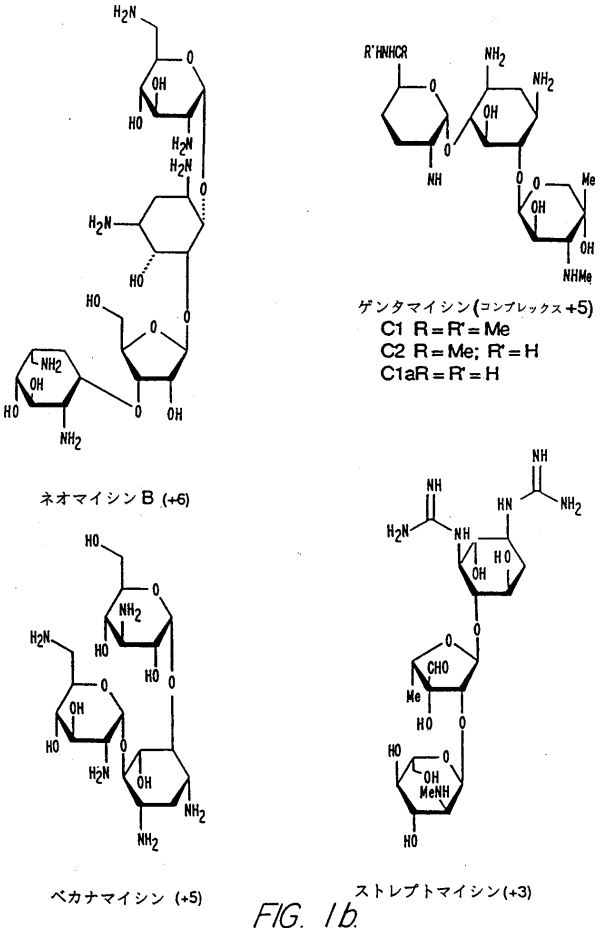
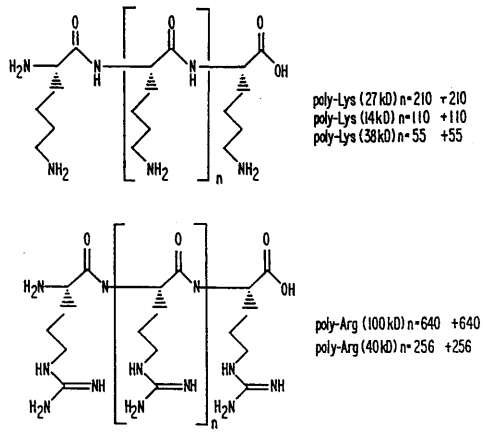



FIG. 1b.

【図１ｃ】




プロタミン+21

H N-Pro-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Pro-Val-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
Pro-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-OH

FIG. 1c.

【図１ｄ】

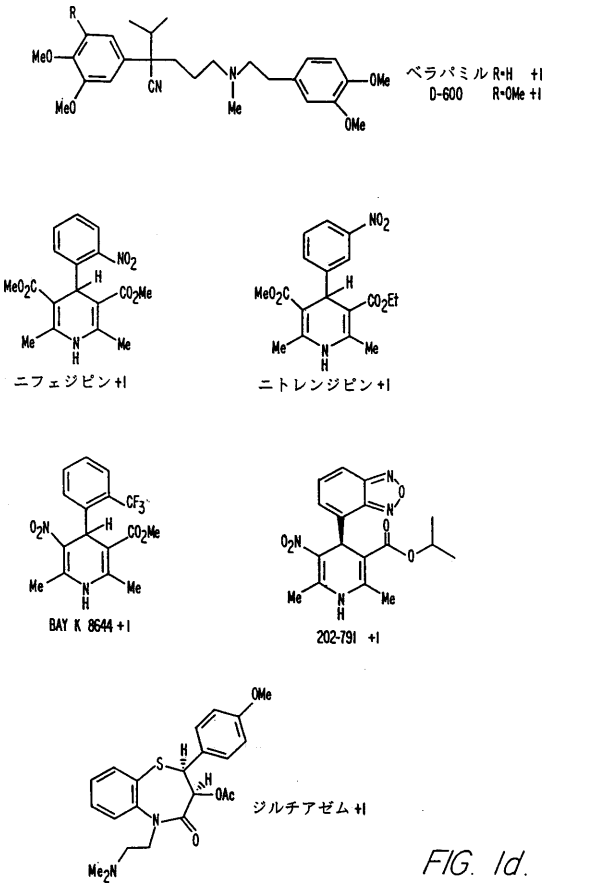



FIG. 1d.

【図１ｅ】

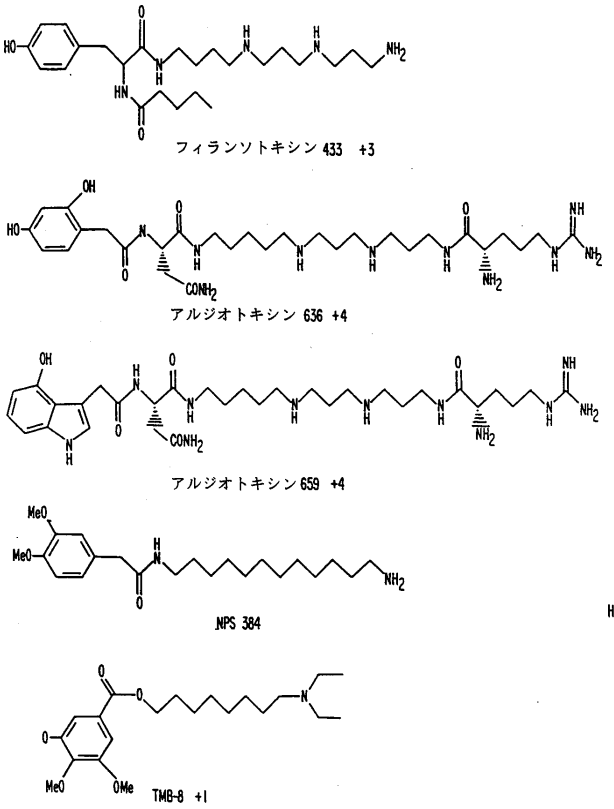



FIG. 1e.

【図１ｆ】

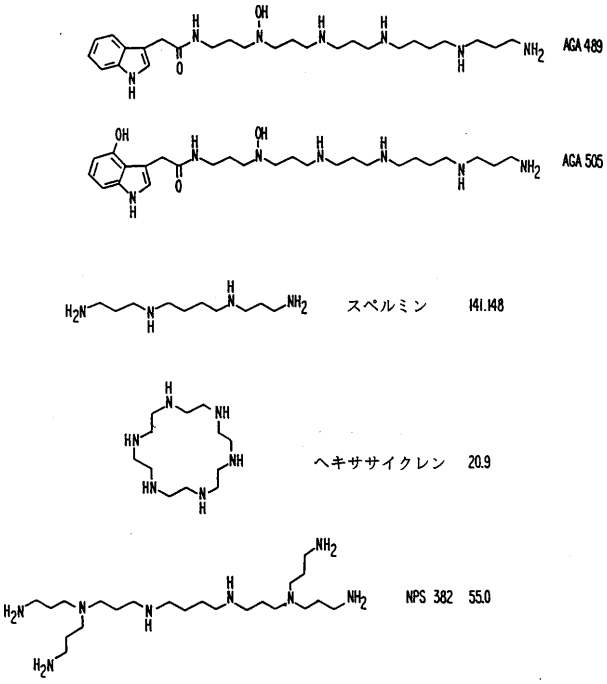



FIG. 1f.

【図２】

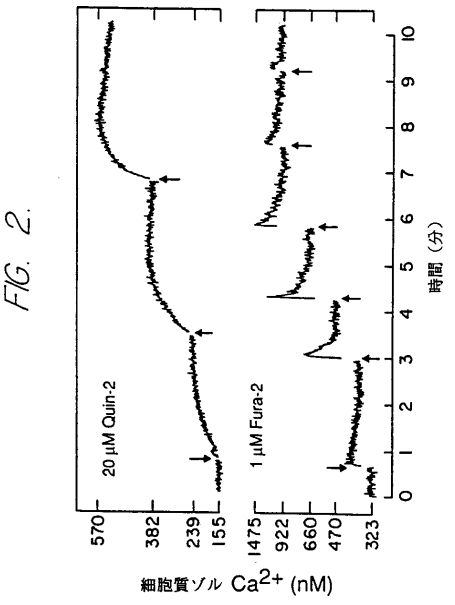



FIG. 2.

【図３ａ】

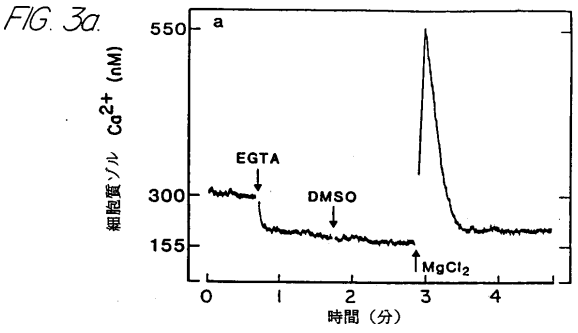



FIG. 3a.

【図３ｂ】

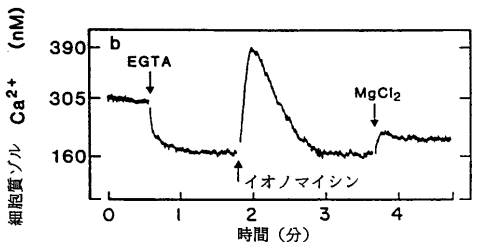
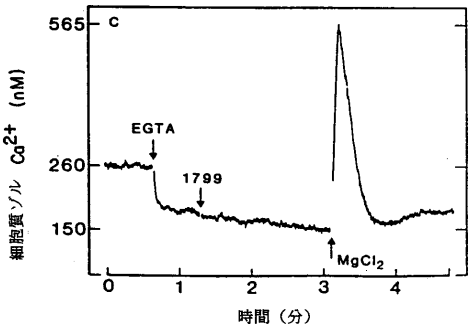



FIG. 3b.

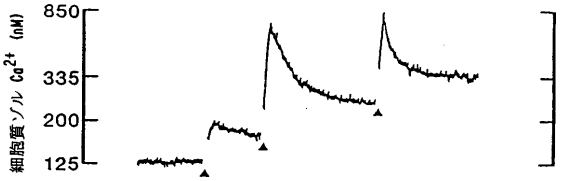
【図３ｃ】

FIG. 3c.



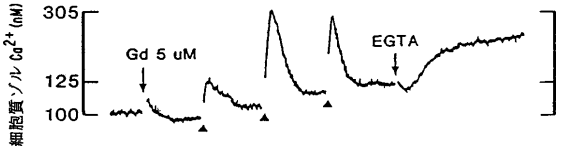

【図４ａ】

FIG. 4a.



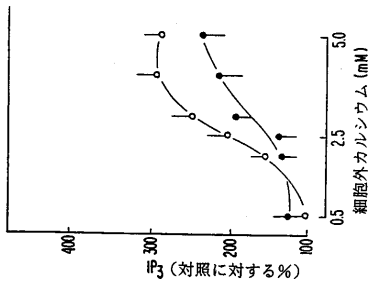

【図４ｂ】

FIG. 4b.



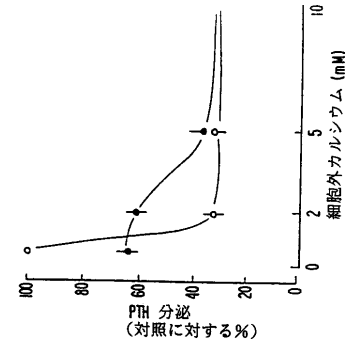

【図５ｂ】

FIG. 5b.



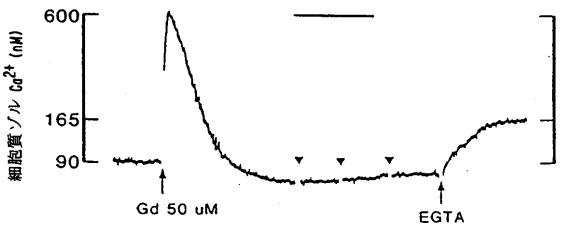

【図５ｃ】

FIG. 5c.



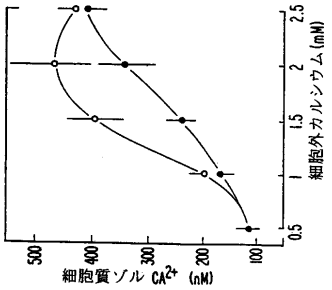

【図４ｃ】

FIG. 4c.




【図５ａ】

FIG. 5a.




【図６】

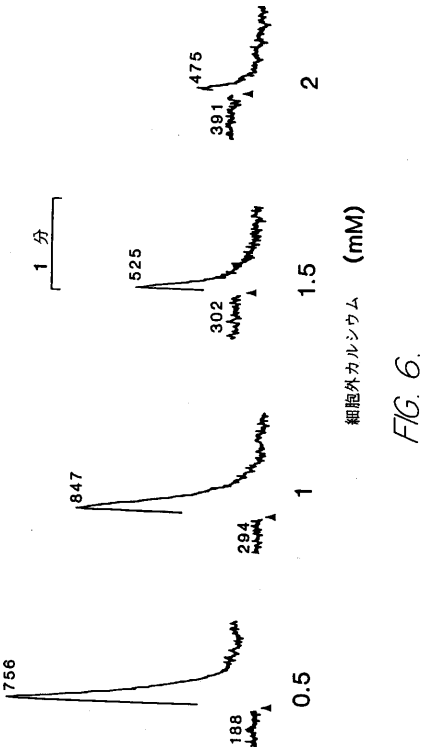



FIG. 6.

【図７】

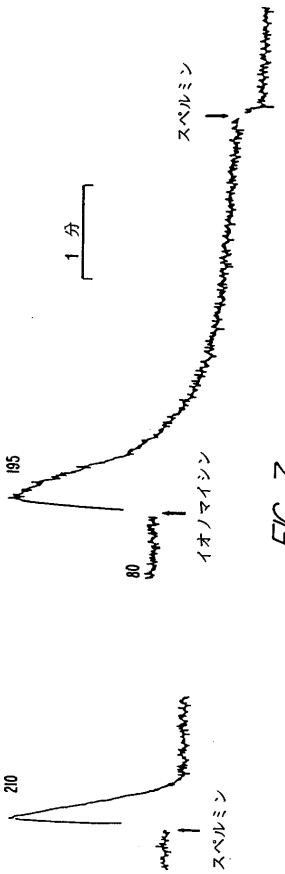



FIG. 7.

【図８ａ】

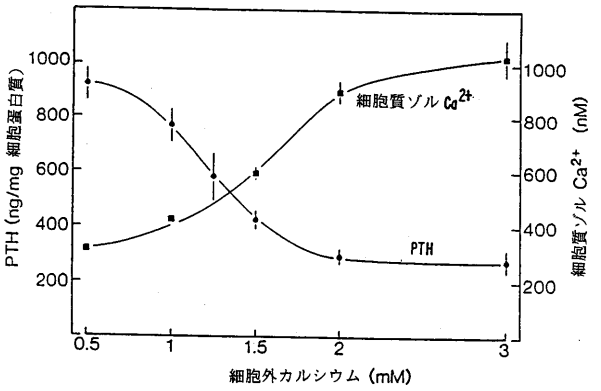
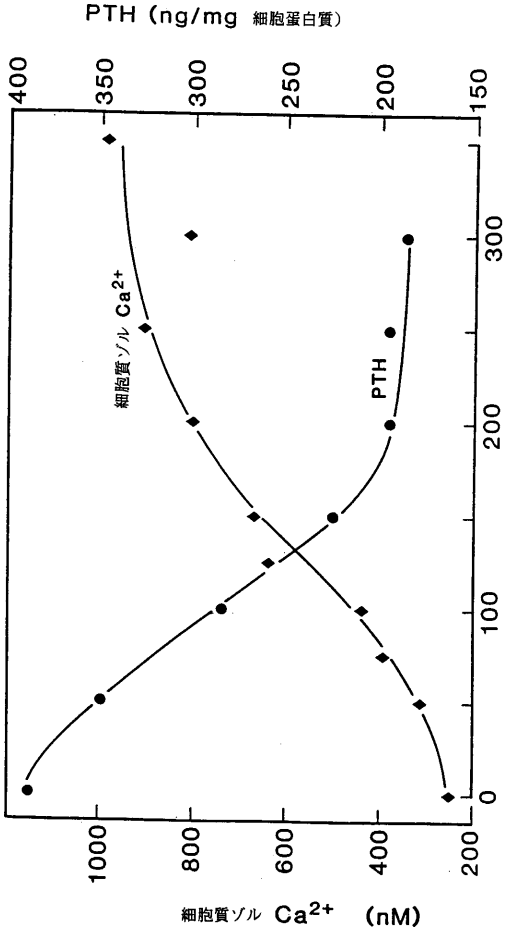



FIG. 8a.

【図８ｂ】

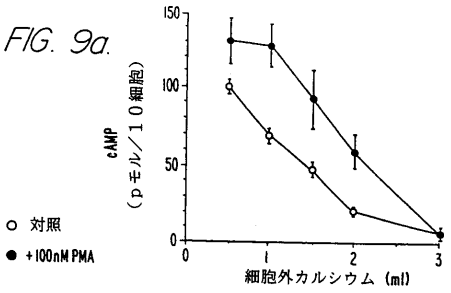



スペルミン (μM)

FIG. 8b.

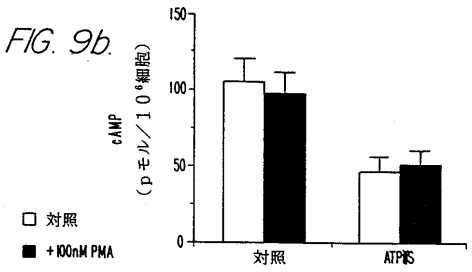
【図９ａ】

FIG. 9a.



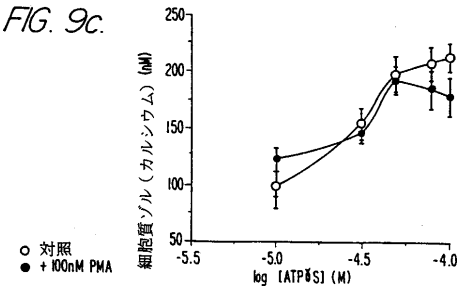

【図９ｂ】

FIG. 9b.



【図９ｃ】

FIG. 9c.




【図１０ａ】

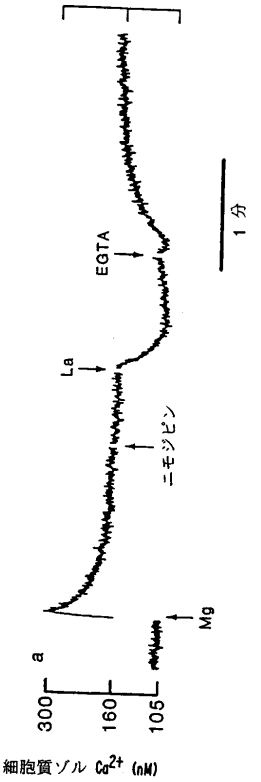



FIG. 10a.

【図１０ｂ】




FIG. 10b.

【図１０ｃ】

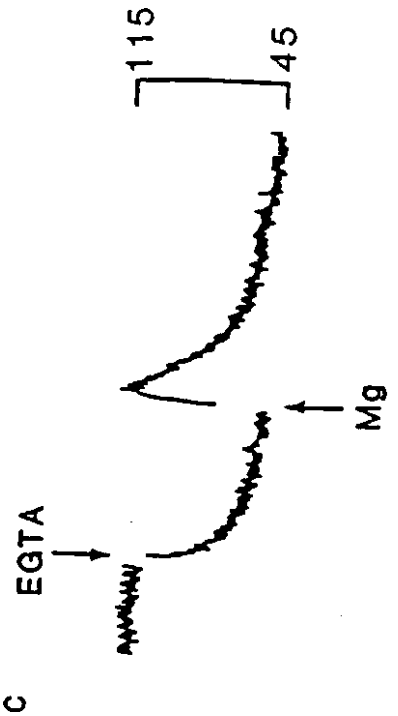
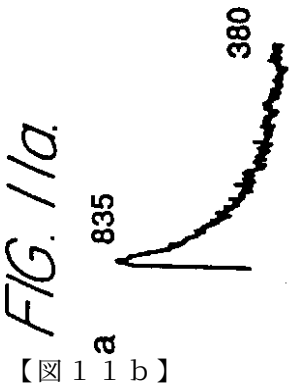
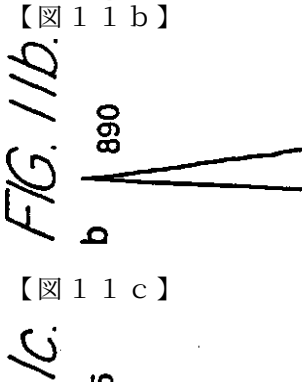



FIG. 10c.

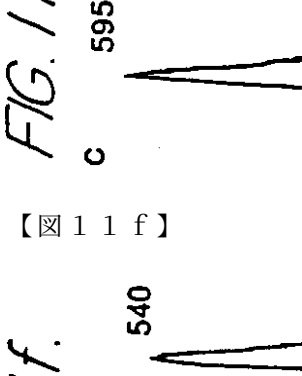
【図１１ａ】



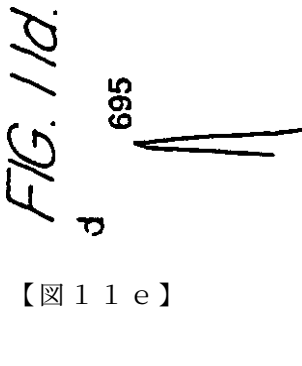

【図１１ｂ】



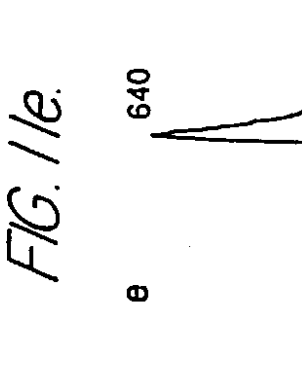

【図１１ｃ】



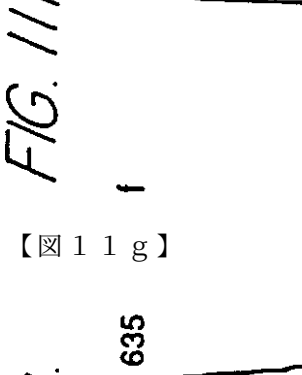

【図１１ｄ】



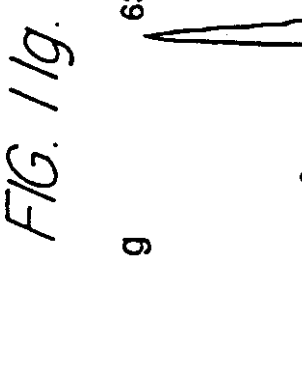

【図１１ｅ】



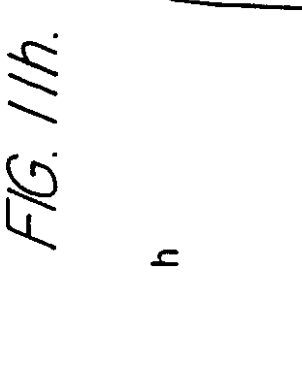

【図１１ｆ】




【図１１ｇ】

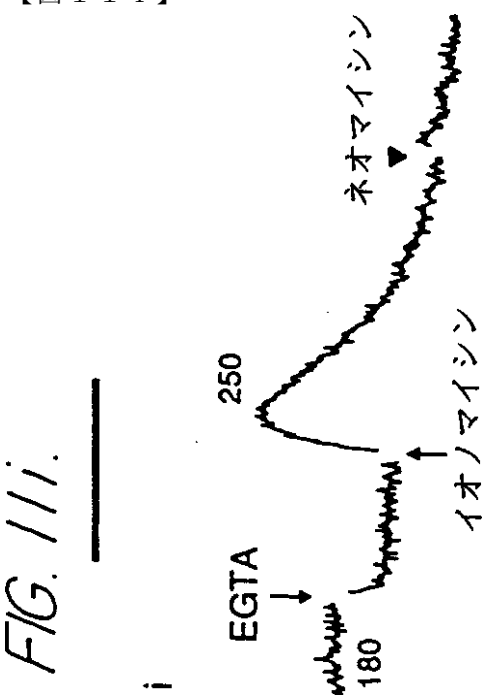



【図１１ｈ】



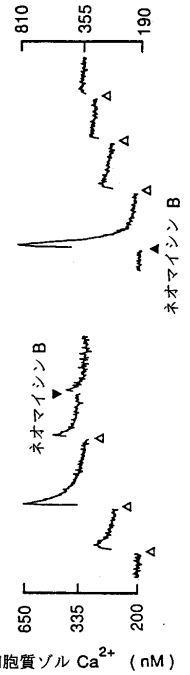
【図１１ｉ】

FIG. 11i.



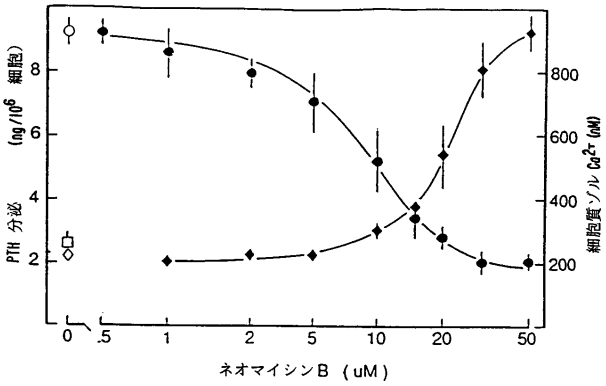

【図１２】

FIG. 12.



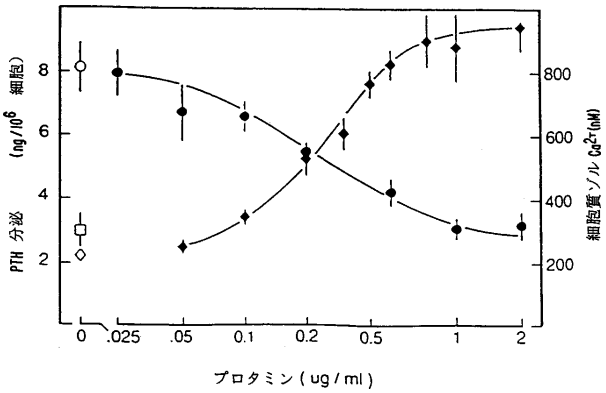

【図１３ａ】

FIG. 13a.



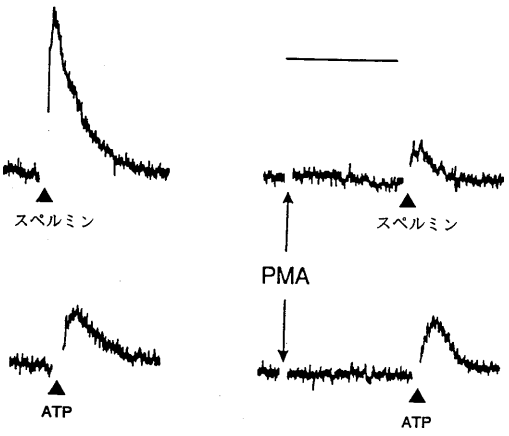

【図１３ｂ】

FIG. 13b.




【図１４】

FIG. 14.



【図１５】

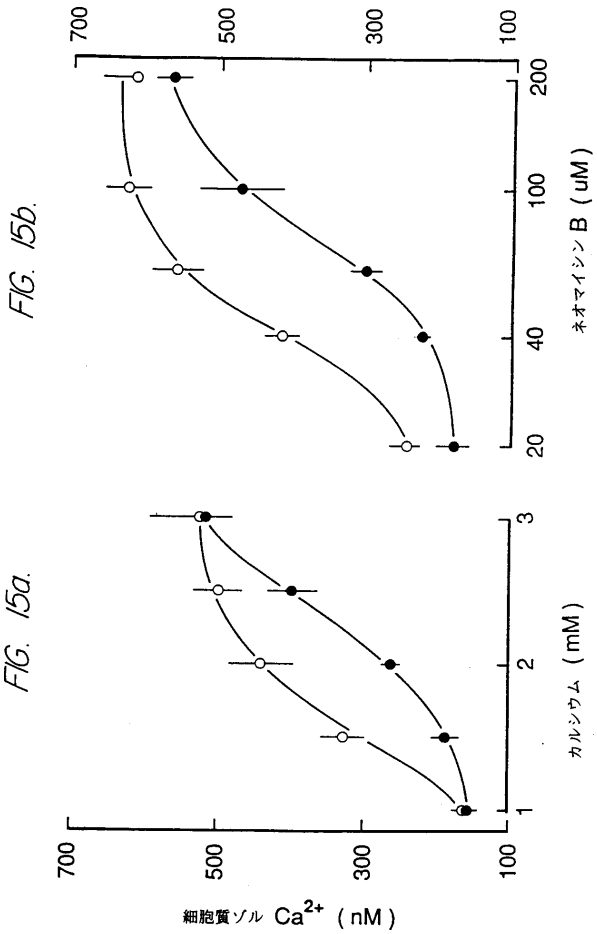



FIG. 15a.



FIG. 15b.

【図１６】

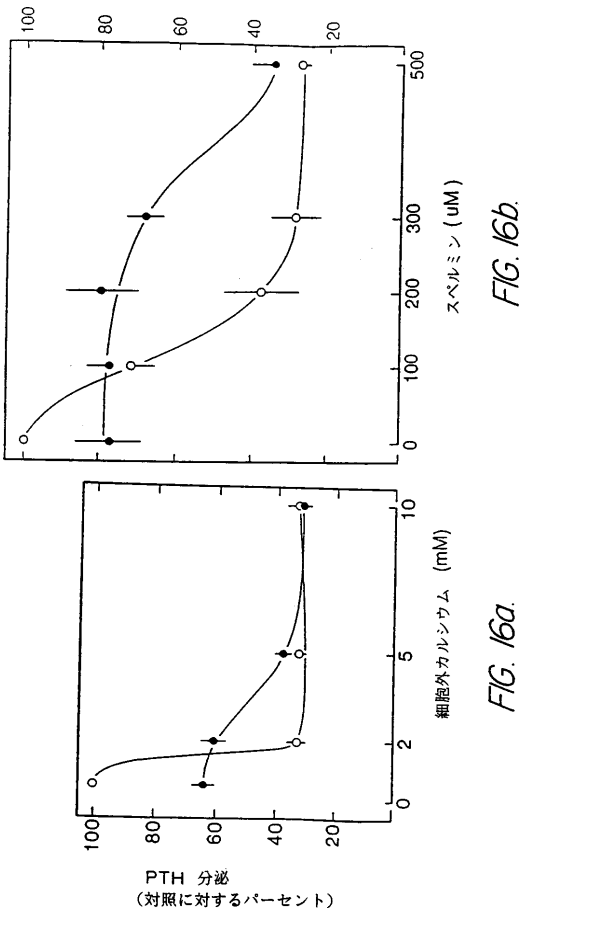



FIG. 16a.

FIG. 16b.

【図１７】

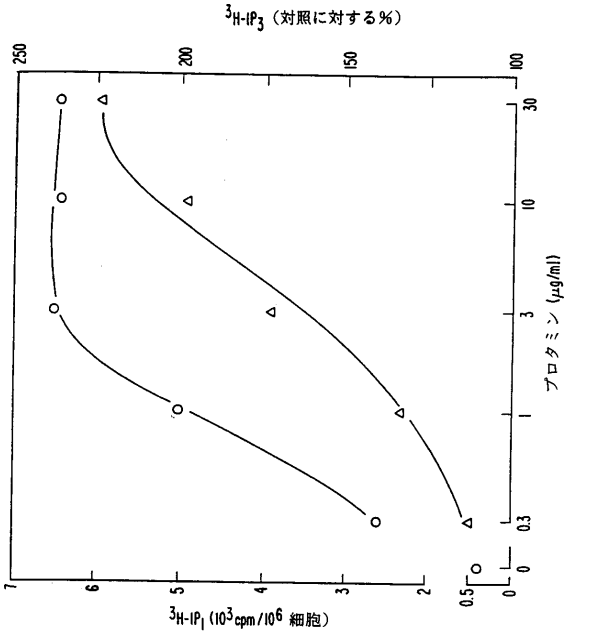



FIG. 17.

【図１８ａ】

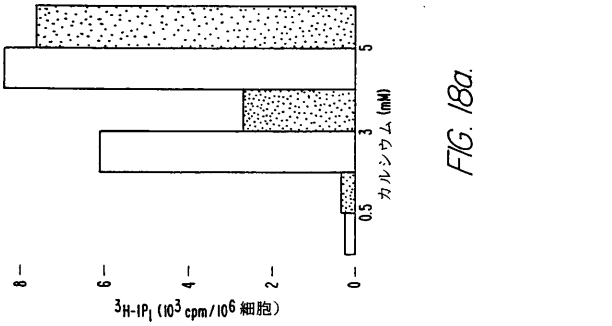



FIG. 18a.

【図１８ｂ】

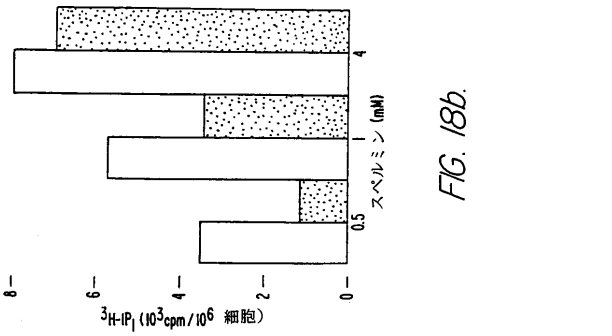



FIG. 18b.

【図１９】

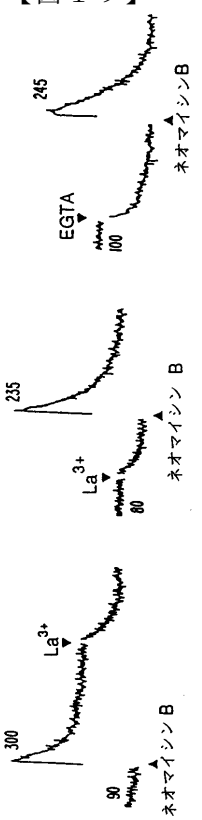



FIG. 19.

【図２０ａ】

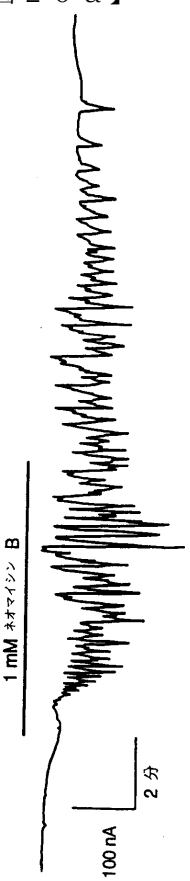



FIG. 20a.

【図２０ｂ】

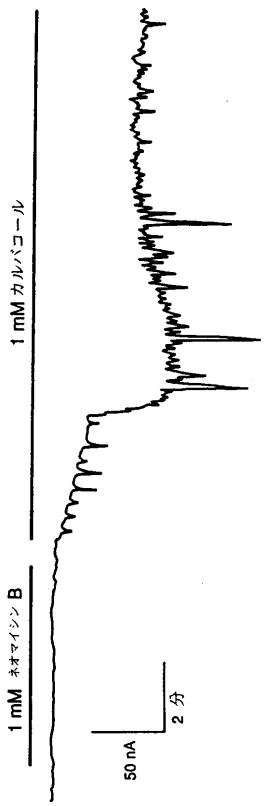



FIG. 20b.

【図２１】

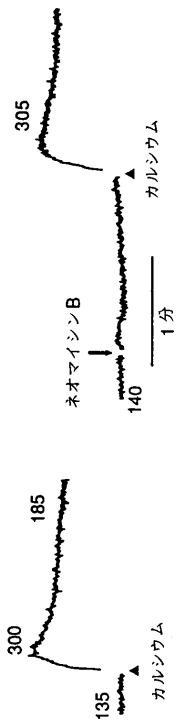
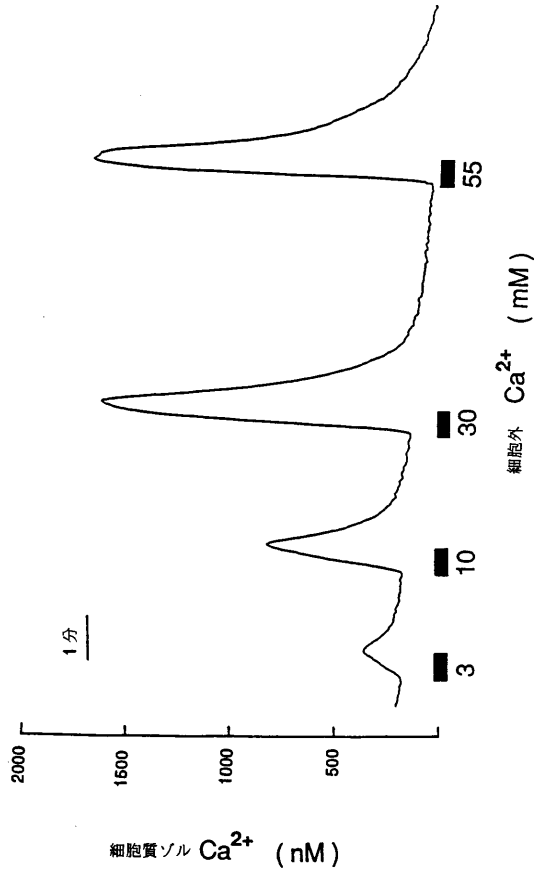



FIG. 21.

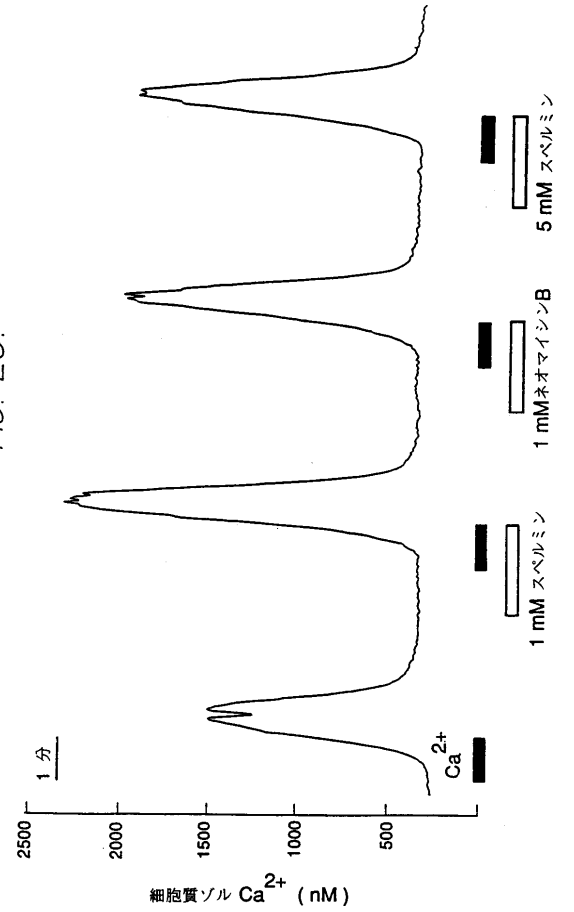
【図２２】

FIG. 22.



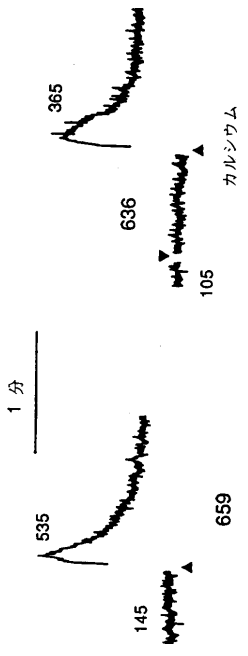

【図２３】

FIG. 23.




【図２４】

FIG. 24.




【図２５】

FIG. 25a.

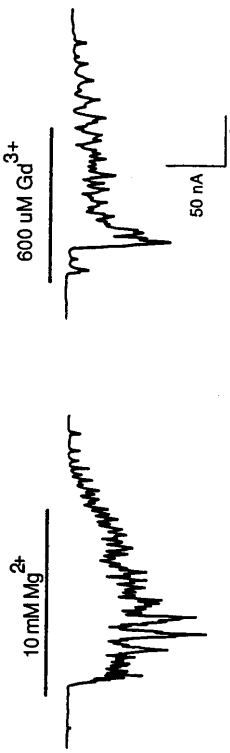



FIG. 25b.




FIG. 25c.

【図２６】

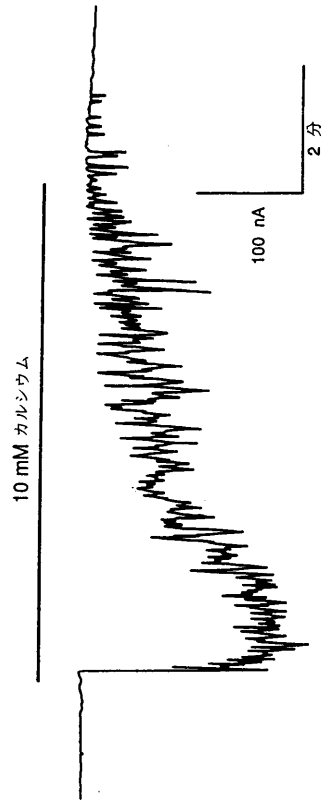



FIG. 26.

【図２７】

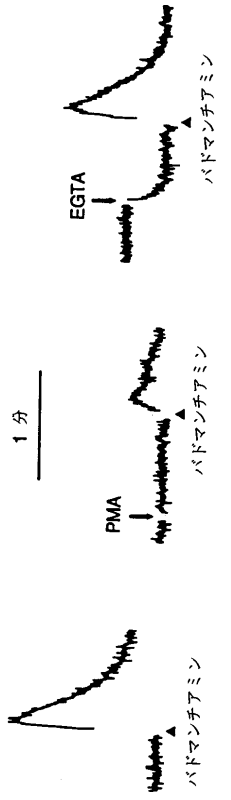



FIG. 27.

【図２８】

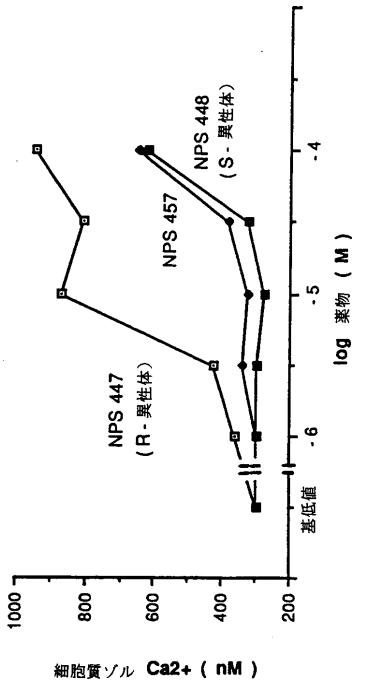



FIG. 28.

【図２９】

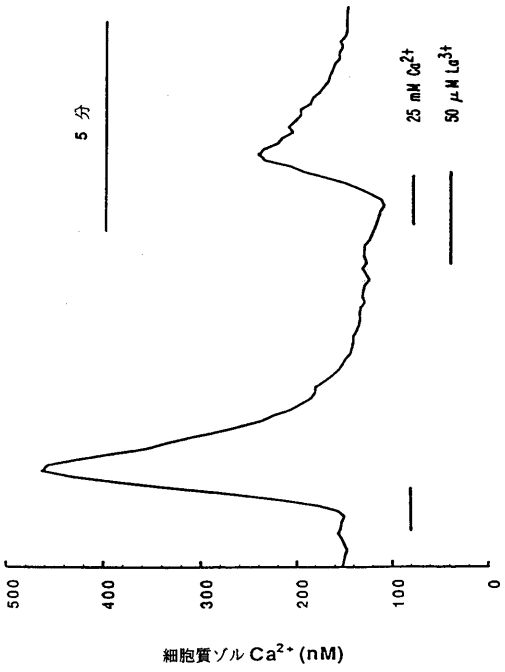
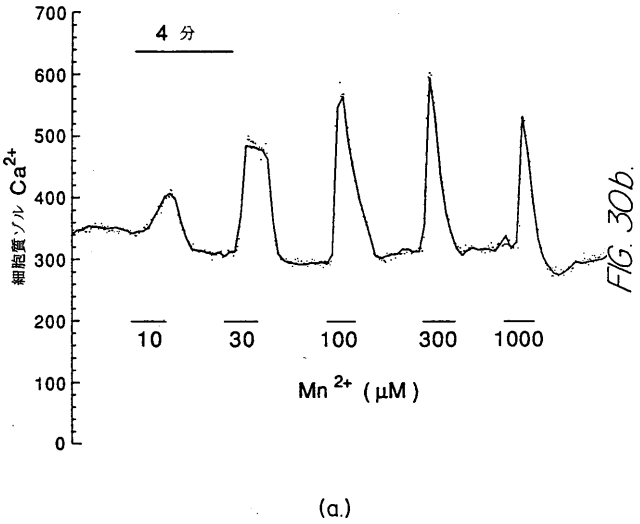



FIG. 29.

【図３０ａ】

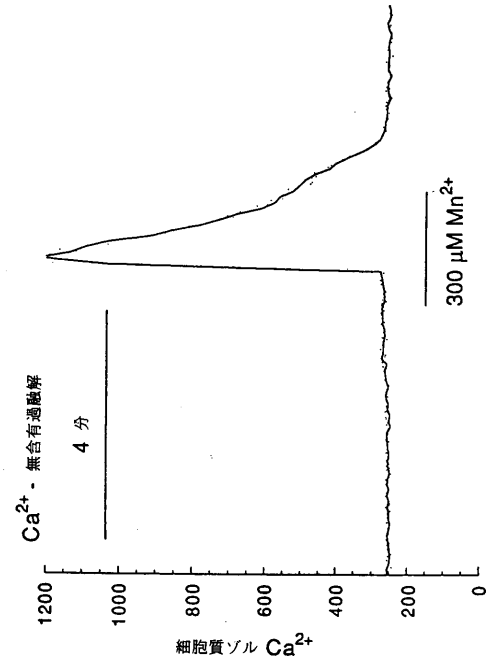
FIG. 30a.




(a.)

FIG. 30b.

【図３０ｂ】




(b.)

【図３１ａ】

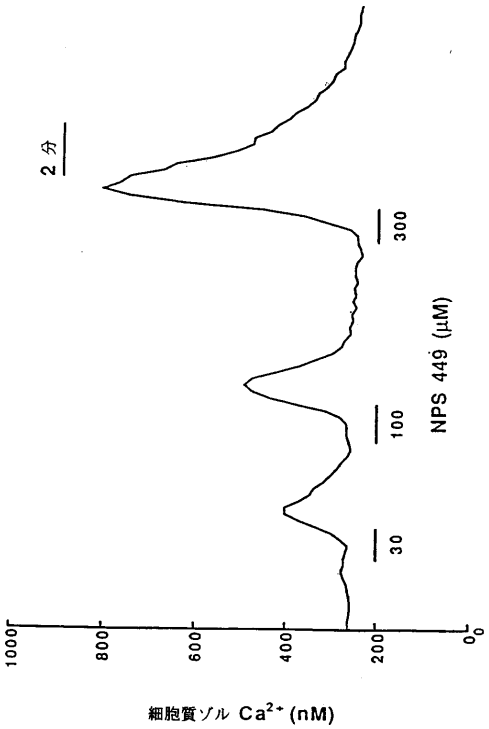



FIG. 31a.

【図３１ｂ】

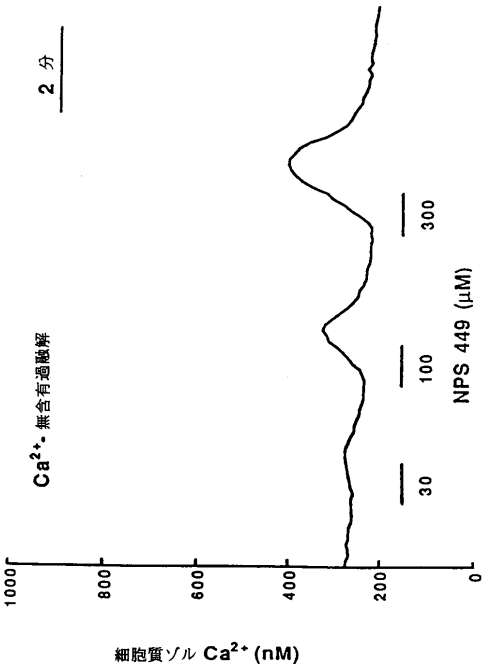



FIG. 31b.

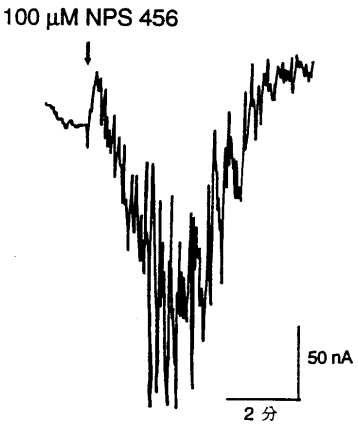
【図３２】




FIG. 32.

【図３３】

FIG. 33.




【図３４】

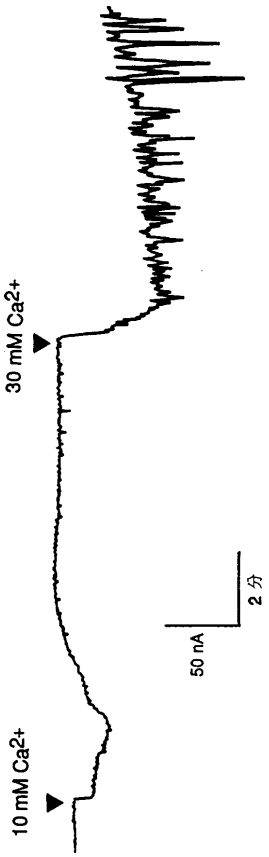



FIG. 34.

【図３５】

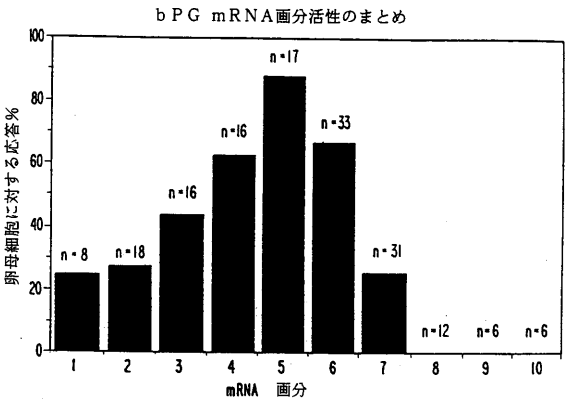



FIG. 35.

【図３６ａ】

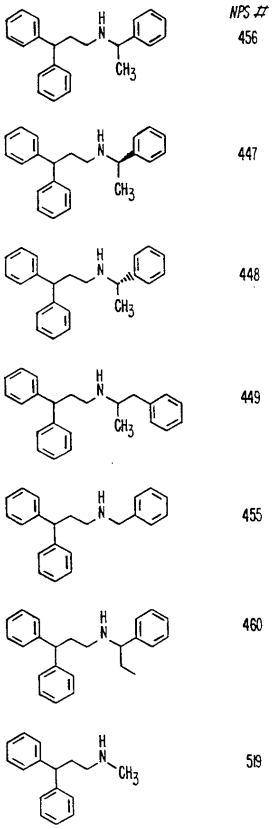



FIG. 36a.

【図３６ｂ】

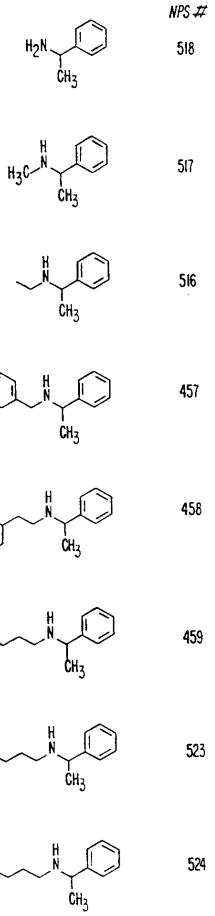



FIG. 36b.

【図３６ｃ】

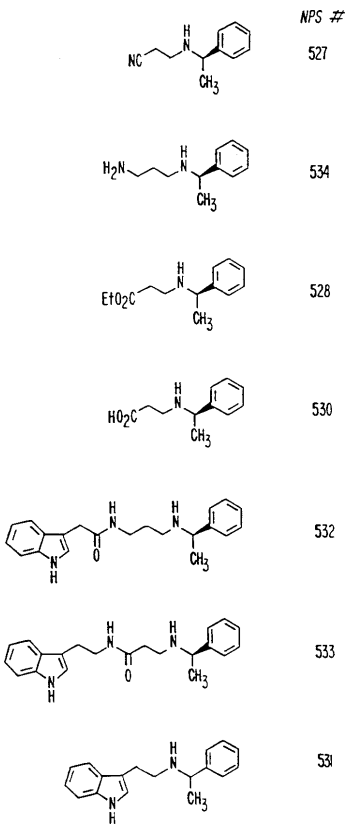



FIG. 36c.

【図３６ｄ】

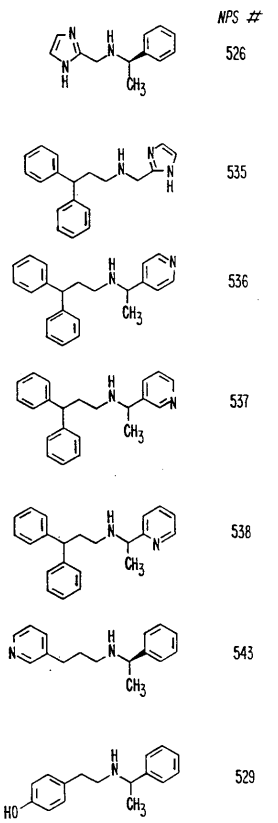



FIG. 36d.

【図３６ｅ】

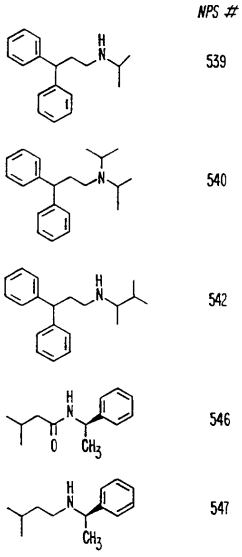



FIG. 36e.

【図３６ｆ】

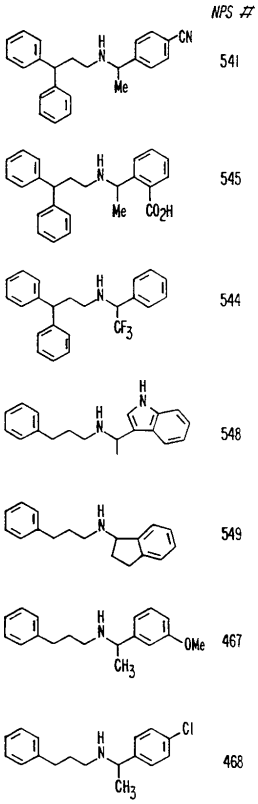



FIG. 36f.

【図３６ｇ】

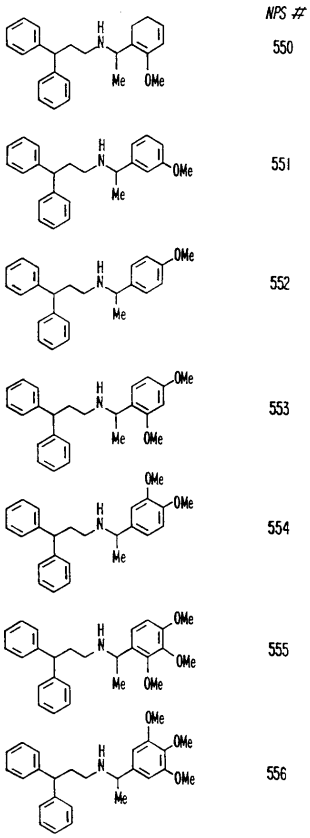



FIG. 36g.

【図３６ｈ】

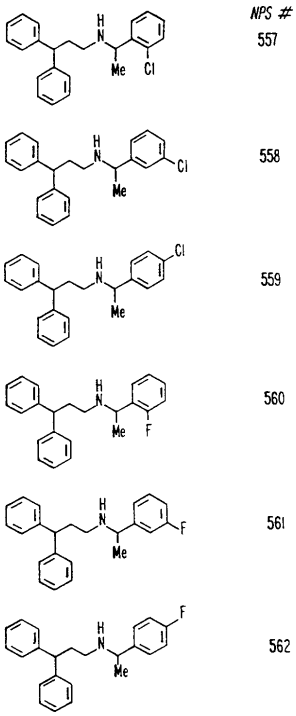



FIG. 36h.

【図３６ｉ】

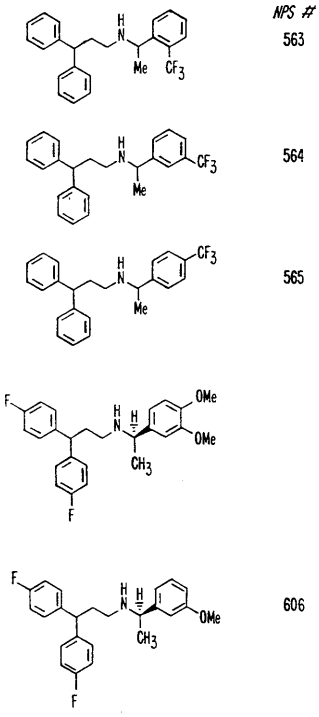



FIG. 36i.

【図３６ｊ】

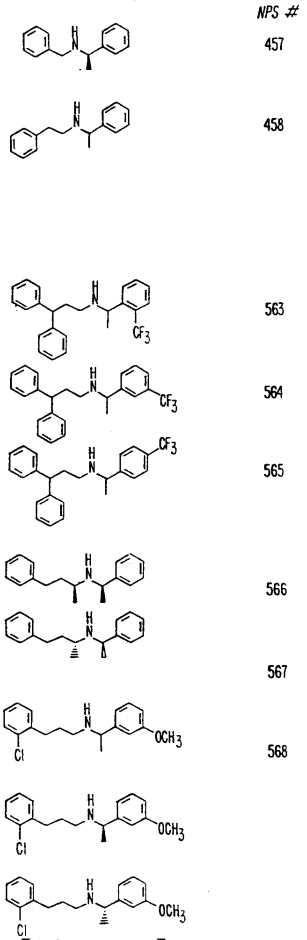



FIG. 36j.

【図３６ｋ】

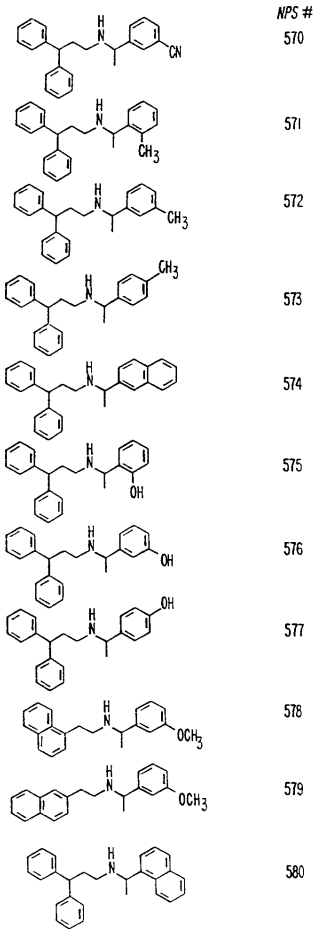



FIG. 36k.

【図３６Ｌ】

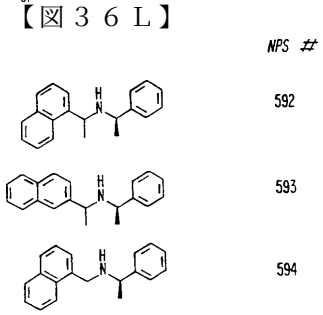



FIG. 36L.

【図３６ｍ】

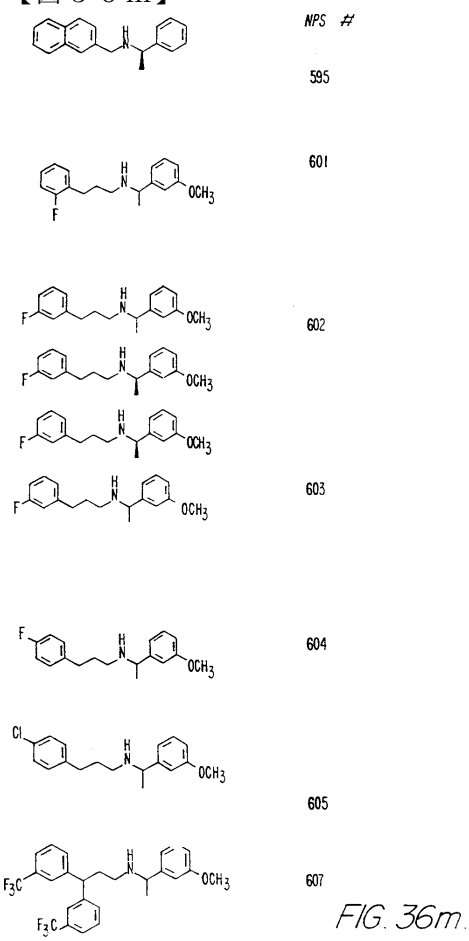



FIG. 36m.

【図３６ｎ】

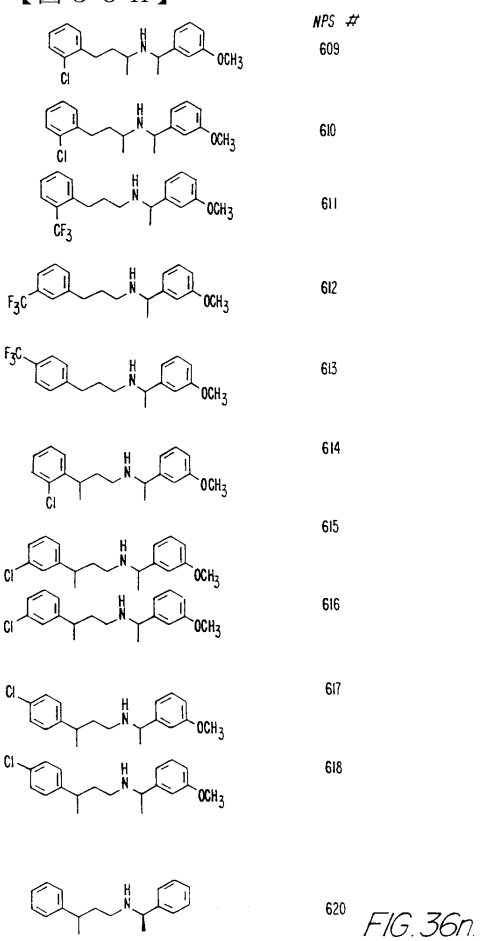
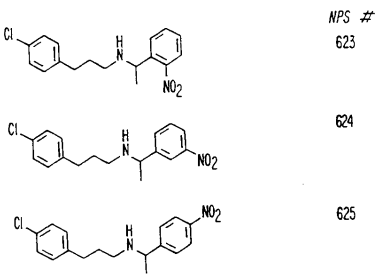



FIG. 36n.

【図３６ｏ】



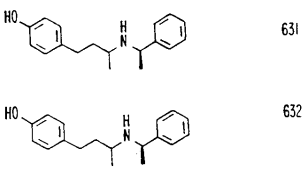




FIG. 36o.

【図３６ｐ】

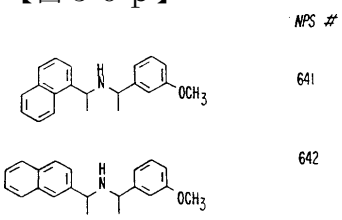



FIG. 36p.

【図３６ｑ】

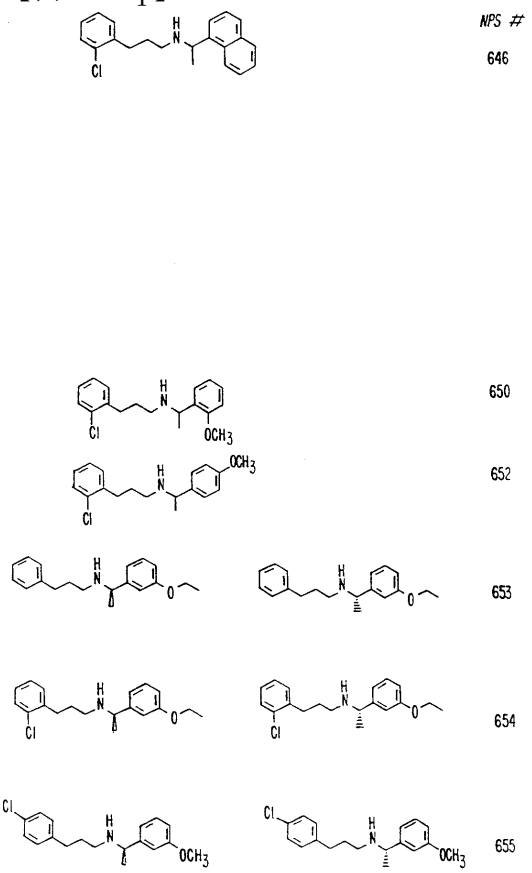



FIG. 36q

【図３６ｒ】

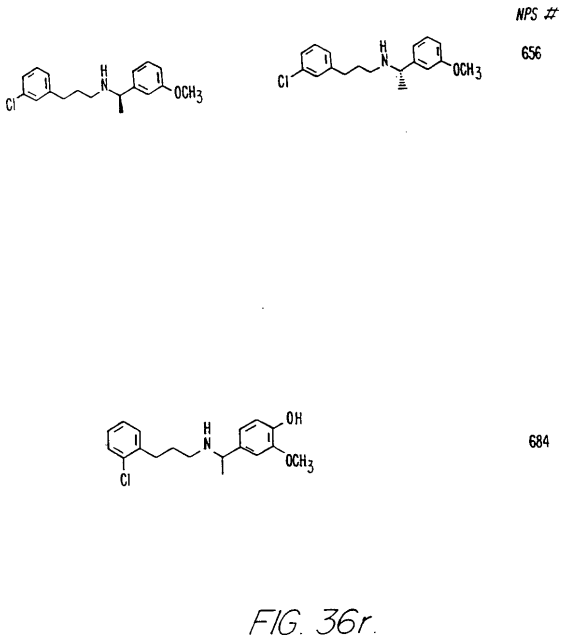



FIG. 36r.

【図３６ｓ】

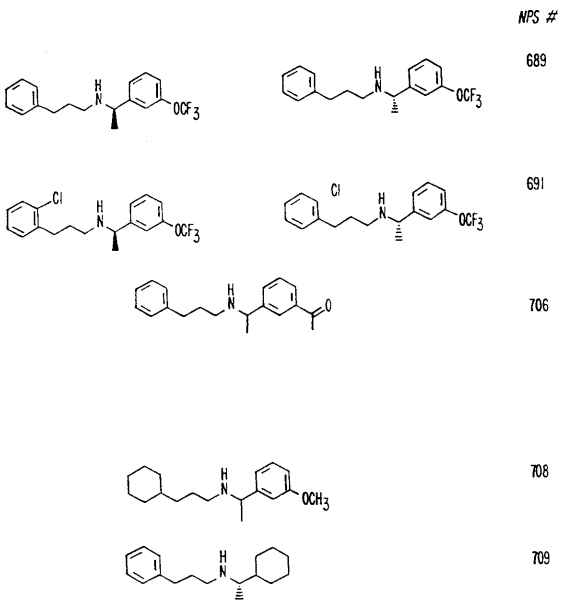



FIG. 36s.

【図３６ｔ】

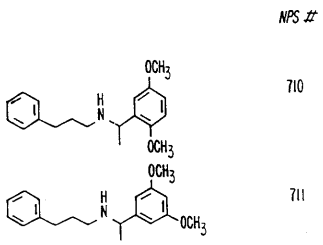



FIG. 36t.

【図３７ａ】

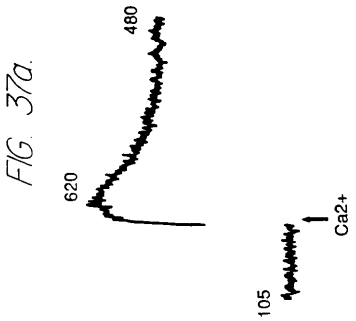



FIG. 37a.

【図３７ｂ】

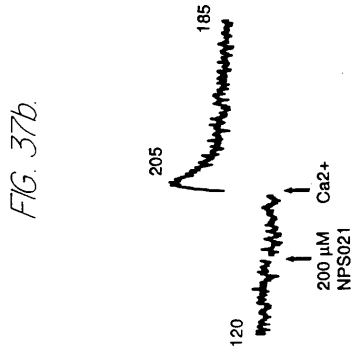



FIG. 37b.

【図３８】

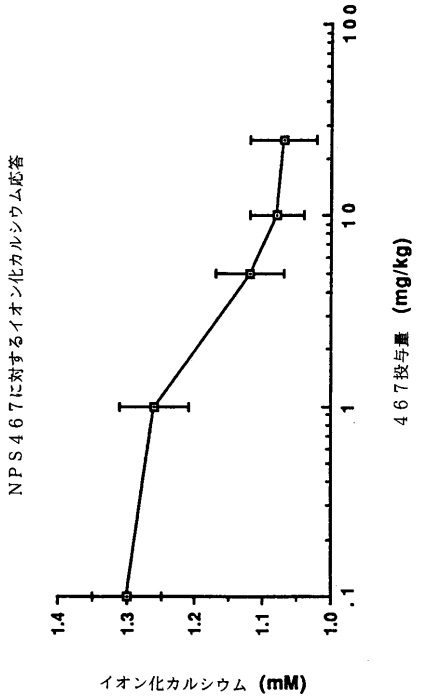



FIG. 38

【図３９】

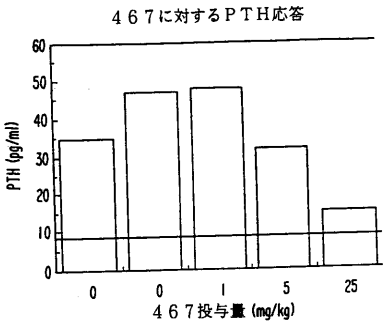



FIG. 39.

【図４０】

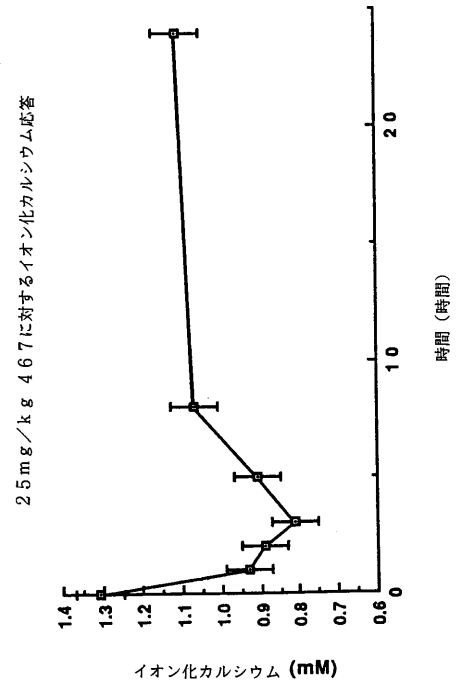
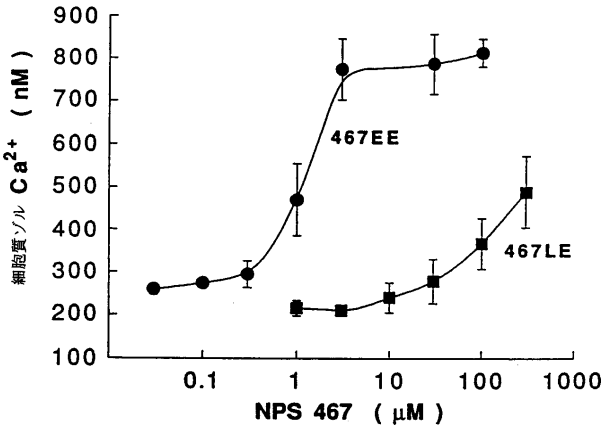



FIG. 40.

【図４１】

FIG. 41.




【図４２】

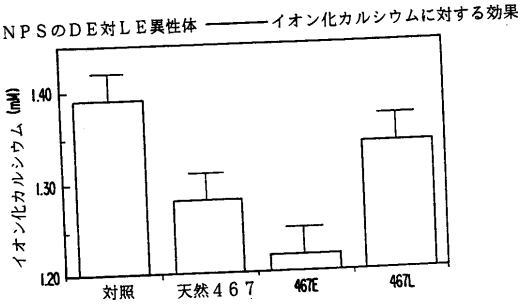
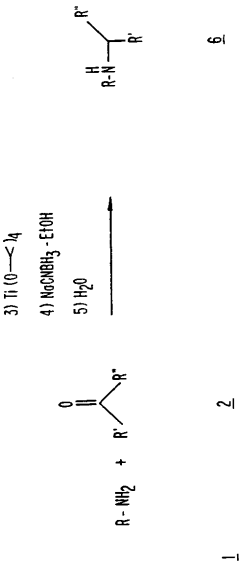



FIG. 42.

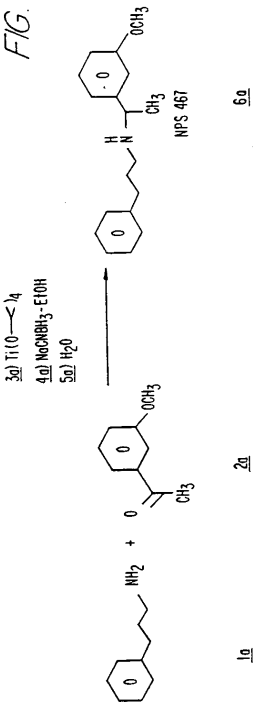
【図４３ａ】

FIG. 43a.




【図４３ｂ】

FIG. 43b.




【図４４】

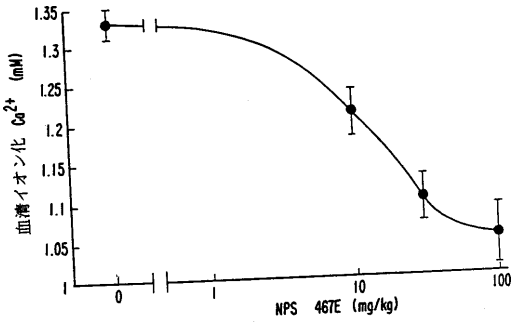



FIG. 44.

【図４５】

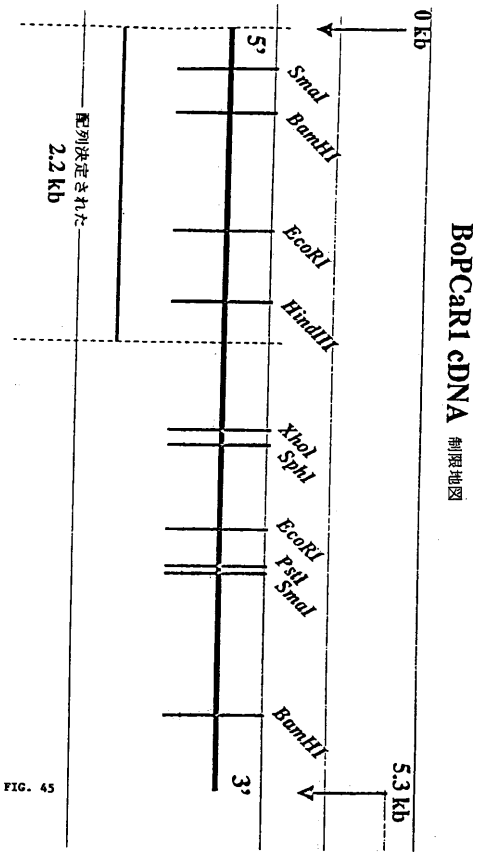



FIG. 45

【図４６】

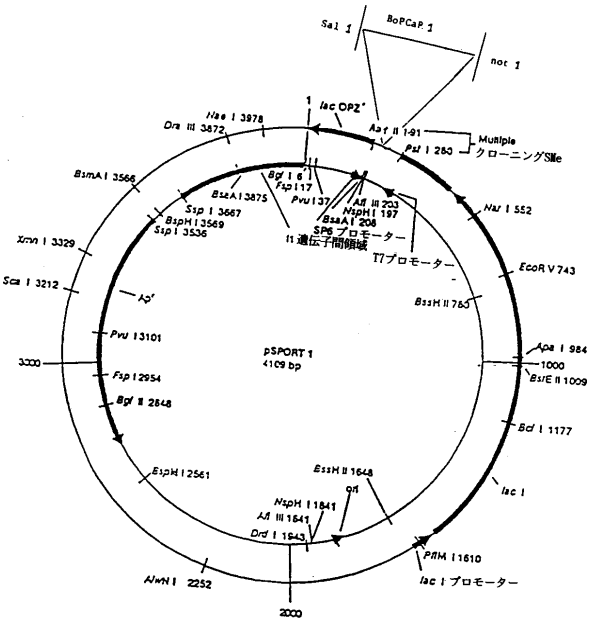



FIG. 46

【図４７】

```
   1 CCACGCGTCCGCGGA AAAAAAAAAAAAGTT CCCCACTCTAGTACA GAGAAGGTTGGCAGA

  60 GTCGTAAGCCCCCAA CCTCTTAAACTTCTC TGCATCTCCAAGGAG AAGGAGGGAAGAGGG
 120 GTTCTTTCCGACCTG AGGAGCTGGATCTGG GGTCCGAGAACCCCA AGGTAGCACCGGAAA
 180 GAACAGCACAGGAGG CGAGAGCGTGCGGTG GCCGGTKGGCGGGAG AACCAGACCCGACKY
 240 CGCGGTCCTCGGYGC TGCCGGGKYCCSGGG ACTCAGCTCAGCACG ACTGGGAAGCCGAAA
 300 GTACTACACACGGTC TCTGCATGATGTGAC TTCTGAAGACTCAAG AGCCACCCACTTCAC
 360 TAGTCTGCAATGGAG AAGGCAGAAATGGAA AGTCAAACCCCACGG TTCCATTCTATTAAT
 420 TCTGTAGACATGTGC CCCCACTGCAGGGAG TGAGTCGCACCAAGG GGGAAAGTCCTCAGG
 480 GGCCCCCAGACCACC AGCGCTTGAGTCCCT CTTCCTGGAGAGAAA GCAGAACTATGGCAC
 540 TTTATAGCTGCTGTT GGATCCTCTTGGCTT TTTTCTACCTGGTGC ACTTCCGCCTATGGG
 600 CCTGACCAGCGAGCC CAAAAGAAAGGGGAC ATTATCCTCGGGGGG CTCTTTCCTATTCAT
 660 TTTGGGGTTGMMGTG AAAGATCAGGATCTA AAGTCGAGGCCGGAG TCCGTGGAGTGTATC
 720 AGGTATAATTTCCGA GGATTTCGCTGGTTA CAAGCTATGATATTT GCCATAGAGGAAATA
 780 AACAGCAGTCCAGCC CTTCTTCCCAACATG ACCCTGGGATACAGG ATATTCGACACTTGT
 840 AACACCGTCTCTAAA GCCTTGGAGGCCACC CTGAGTTTTGTGGCC CAGAACAAAATTGAC
 900 TCTTTGAACCTTGAT GAGTTCTGCAACTGC TCAGAGCACATCCCC TCTACCATCGCAGTG
 960 GTGGGAGCTACTGGC TCGGGCATCTCCACA GCAGTGGCCAACCTG CTGGGGCTCTTCTAC
1020 ATCCCCCAGGTCAGC TATGCCTCCTCCAGC AGACTCCTCAGCAAC AAGAATCAATTCAAG
1080 TCCTTCCTCCGCACC ATACCCAATGATGAA CACCAGGCCACGGCC ATGGCTGACATCATC
1140 GAGTACTTCCGCTGG AACTGGGTGGGCACA ATTGCAGCTGACGAT GACTATGGCCGGCCA
1200 GGGATCGAGAAGTTT CGAGAGGAAGCTGAG GAGAGGGACATCTGC ATCGACTTCAGCGAG
1260 CTCATCTCCCAATAC TCTGATGAGGAAAAG ATCCAGCAGGTGGTG GAGGTGATCCAGAAT
1320 TCCACCGCCAAAGTC ATTGTCCGTCTTCTC CAGCGGCCCAGACCT GGAACCCCTCATCAA
1380 AGAGATCGTCCGGCG CAATATCACAGGCAG GATCTGGCTGGCCAG CGAGSCTGGSCAGCT
1440 CTTCCCTGATTGCTA TGCCCGAGTATTTCC ATGTGGTCGGAGGCA CCATTGGGTTTGGTT
1500 TGAAAGCTGGGCAGA TCCCAGGCTTCCGGG AATTCCTGCAGAAAG TCCACCCCAGGAAGT
1560 CTGTCCACAATGGTT TTGCCAAGGAGTTTT GGGAAGAAACATTTA ACTGCCACCTGCAAG
1620 AGGGTGCTAAAGGCC CATTACCGGTGGACA CCTTCCTGAGAGGTC ACGAAGAAGGAGGTG
1680 CCAGGTTAAGCAACA GTCCCACTGCCTTCC GACCTCTGTGCACTG GGGAGGAGAACATCA
1740 GCAGTGTCGAGACTC CTTACATGGATTATA CACATTTACGGATAT CCTACAACGTCTACT
1800 TAGCCGTCTACTCCA TTGCTCATGCCCTAC AAGATATATACACCT GCATACCTGGGAGAG
1860 GGCTCTTCACCAACG GTTCCTGCGCAGATA TCAAGAAGGTTGAAG CTTGGCAGGTCCTGA
1920 AACACCTGCGGCACC TAAATTTTACCAGCA ATATGGGGGAGCAAG TAACTTTCGATGAAT
1980 GTGGAGACCTGGCAG GGAACTATTCCATCA TCAACTGGCACCTCT CCCCAGAGGACGGCT
2040 CCATAGTGTTTAAGG AAGTTGGATATTACA ATGTCTATGCCAAGA AAGGAGAGAGACTCT
2100 TCATCAATGATGAAA AAATTCTGTGGAGTG GATTCTCAAGGGAGG TGC 2148
```

FIG. 47

フロントページの続き

(74)代理人 100105991
弁理士 田中 玲子
(74)代理人 100106840
弁理士 森田 耕司
(72)発明者 ネメス、エドワード・エフ
アメリカ合衆国８４１０８ユタ州、ソルト・レイク・シティ、イー・フォーチュナ・ドライブ３２５８番
(72)発明者 ブラウン、エドワード・エム
アメリカ合衆国０２１８６マサチューセッツ州、ミルトン、ハイランド・ストリート３４１番
(72)発明者 ヒバート、スティーブン・シー
アメリカ合衆国０２１８７マサチューセッツ州、ウェルズリー、ハンプシャー・ロード１４６番
(72)発明者 ヴァン・ウェイジネン、ブラッドフォード・シー
アメリカ合衆国８４１０２ユタ州、ソルト・レイク・シティ、ナンバー５０７、イースト・３００・サウス１０７０番
(72)発明者 バランドリン、マニュエル・エフ
アメリカ合衆国８４１２１ユタ州、ソルト・レイク・シティ、サウス・１５８５・イースト５７８７番
(72)発明者 フラー、フォレスト・エイチ
アメリカ合衆国８４１０３ユタ州、ソルト・レイク・シティ、ミリタリー・ウェイ１４０１番
(72)発明者 デル・マー、エリック・ジー
アメリカ合衆国８４１０８ユタ州、ソルト・レイク・シティ、イースト・セント・メアリーズ・サークル２９６７番

合議体
審判長 星野 紹英
審判官 瀬下 浩一
審判官 川上 美秀

(56)参考文献 特表平６－５１０５３１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K45/00
C12N15/00
BIOSIS(STN)