

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508944

(P2005-508944A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 5/24	A 6 1 P 5/24	
A 6 1 P 5/38	A 6 1 P 5/38	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-533961 (P2003-533961)	(71) 出願人	593054125
(86) (22) 出願日	平成14年10月2日 (2002.10.2)		ハワード フローレイ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		オブ イクスペリメンタル フィジオロ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/001338		ジー アンド メディシン
(87) 国際公開番号	W02003/030930		HOWARD FLOREY INSTI
(87) 国際公開日	平成15年4月17日 (2003.4.17)		TUTE OF EXPERIMENTA
(31) 優先権主張番号	PR 8144		L PHYSIOLOGY AND ME
(32) 優先日	平成13年10月8日 (2001.10.8)		DICINE
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		オーストラリア3052 ビクトリア州パ
			ークビル、ユニバーシティ・オブ・メルボ
			ルン
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100103230
			弁理士 高山 裕貢
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト3レラキシン

## (57) 【要約】

ヒトH3プレプロレラキシン、ヒトH3プロレラキシン、ヒトH3レラキシン、修飾されたA鎖および/またはB鎖を持つヒトレラキシン類似体について述べる。また、ヒトH3プレプロレラキシン、ヒトH3プロレラキシン、ヒトH3レラキシン、ヒトレラキシン類似体をコードする核酸配列について開示する。さらに、H3レラキシンまたはその類似体の投与に応答する状態の処置のための方法を開示する。

【請求項 1】

10

H 3 レラキシンまたはその類似体が、ヒト H 3 レラキシン、ヒト H 3 プロレラキシン、ヒト H 3 プレプロレラキシン、またはその構成成分 A、B または C ペプチド鎖である、請求項 1 に記載の方法。

ヒト H 3 レラキシンまたはそのヒト H 3 レラキシン類似体が、  
以下のアミノ酸配列：

## 20

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
20

を有する A 鎖、または N - 末端から約 9 アミノ酸以下が切断されたアミノ酸配列、およ

30

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
20 25

40

ここに該 A 鎖および B 鎖は、A11-B10およびA24-B22間ジスルフィド結合によって連結し、該ヒト H 3 レラキシンまたはその類似体はレラキシン生物活性を持つ、請求項 2 に記載の方法。

ヒト H 3 レラキシン類似体が修飾された A 鎖および / または修飾された B 鎖を含み、該 H 3 レラキシン A 鎖はアミノ酸配列：

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys

【数 4】

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
20 25

該 A 鎖および B 鎖は、A11-B10およびA24-B22間ジスルフィド結合によって連結し、該ヒト H 3 レラキシン類似体はレラキシン生物活性を持つ、請求項 1 に記載の方法。

動脈性高血圧症の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

冠状動脈疾患、末梢血管障害を含む末梢血管障害、レイノー症候群を含む血管痙攣、中枢および末梢神経系、腎臓、眼および他の器官に関する微小血管疾患の処置のための方法 30  
である、請求項 1 に記載の方法。

血管障害、間質性線維症、糸球体硬化症、または他の腎臓疾患を含む腎臓疾患の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

パニック性発作、広場恐怖症、広域不安症、恐怖状態を含む不安症状を含む精神疾患の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

主要なうつ病、気分変調症、双極性および単極性のうつ病；神経障害または神経変成疾患（記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む）を含むうつ病または抑うつ障害の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

注意欠陥多動性障害、トゥレット症候群、衝動性、反社会性および人格障害、統合失調症に起因するものを含む精神疾患の陰性症状、獲得脳障害および前頭葉傷害を含む学習力、注意力および意欲の障害の処置のための方法である、請求項1に記載の方法。

薬物、アルコールおよびニコチン依存症を含む脱毛症の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む神経障疾患または神経変 50

成疾患の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

パーキンソン病、ハンチントン病、および食事後の運動不足、頭部外傷、外科、腫瘍または脊髄損傷を含む活動および運動障害の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

肺、心臓および心臓血管系、腎臓および尿生殖路、胃腸システム、皮膚、リウマチ性および肝胆汁性システムの繊維症を含む無制御または異常なコラーゲンあるいはフィブロネクチン形成と関連する疾患の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

分娩開始遅延、子宮頸部成熟損傷、および胎児性難産による長期分娩の予防の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ステロイドまたはペプチドホルモン生産に関連する副腎、卵巣および睾丸障害を含む内分泌障害の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

繊維嚢胞性疾患、乳汁分泌障害およびがんを含む乳腺疾患の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

免疫不全症、血液疾患および網内皮系悪性腫瘍を含む免疫障害の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

着床障害による不妊症を含む子宮内膜性疾患の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

ステロイドまたはペプチドホルモン生産に関係のある副腎障害、卵巣障害および睾丸障害を含む内分泌障害の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

バソプレッシンの減少または不適当な分泌を含む水分平衡に関連する疾患の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

胎盤機能不全の処置のための方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

血管疾患；動脈性高血圧症の処置；無制御または異常なコラーゲンあるいはフィブロネクチン形成と関連する疾患；腎臓疾患；精神障害；うつ病または抑うつ障害；神経疾患または神経変成疾患；学習力、注意力および意欲の障害；中毒障害；活動および運動障害；免疫疾患；乳腺疾患；子宮内膜疾患；内分泌障害；分娩開始遅延、子宮頸部成熟損傷；および胎児性難産による長期分娩の予防；洞性徐脈；脱毛；脱毛症；バソプレッシンの減少または不適当な分泌を含む水分平衡障害；または胎盤不足；の 1 つまたはそれ以上を処置するための薬剤の製造および H 3 レラキシンまたはその類似体の使用であって、任意に 1 つまたはそれ以上の製薬的に許容される担体および / 希釈剤および / または賦形剤とともに、ヒト H 3 レラキシン、または本明細書にて定義するその類似体の治療上有効な量をそのような処置を必要とする被験者に投与する。

【請求項 2 4】

H 3 レラキシンまたはその類似体が、ヒト H 3 レラキシン、ヒト H 3 プロレラキシン、ヒト H 3 プレプロレラキシン、またはその構成成分 A、B または C ペプチド鎖である、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 2 5】

ヒト H 3 レラキシンまたはそのヒト H 3 レラキシン類似体が、  
以下のアミノ酸配列：

10

20

30

40

50

## 【数 5】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
 20

(配列番号 4)

を有する A 鎖、または N - 末端から約 9 アミノ酸以下が切断されているアミノ酸配列、  
 および

10

以下のアミノ酸配列：

## 【数 6】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
 20 25

20

を有する B 鎖、またはアミノ末端から 9 アミノ酸以下および / またはカルボキシル末端  
 から約 5 アミノ酸以下が切断されているアミノ酸配列を含み、

ここに該 A 鎖および B 鎖は、A11-B10 および A24-B22 間ジスルフィド結合によって連結し、  
 ヒト H 3 レラキシンまたはその類似体はレラキシン生物活性を持つ、請求項 24 に記載  
 の使用。

## 【請求項 26】

ヒト H 3 レラキシン類似体が修飾された A 鎖および / または修飾された B 鎖を含み、該  
 H 3 レラキシン A 鎖はアミノ酸配列：

## 【数 7】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
 20

30

(配列番号 4)

(ここに、カルボキシル末端はアミド誘導体であり、および / または 12 位の Lys は Glu に  
 置換されており、および / または 19 位の Glu は Gln に置換されている) を有し、

該 H 3 レラキシン B 鎖はアミノ酸配列：

40

## 【数 8】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
 20 25

(配列番号 2)

(ここに、カルボキシル末端はアミド誘導体であり、および / または 2 位の Ala は Pro に

50

置換されており、および / または8位のArgはLysに置換されている)を有し、

該A鎖およびB鎖は、A11-B10およびA24-B22間ジスルフィド結合によって連結し、該ヒトH3レラキシン類似体はレラキシン生物活性を持つ、請求項23に記載の使用。

【請求項27】

動脈性高血圧症の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項28】

冠状動脈疾患、末梢血管障害を含む末梢血管障害、レイノー症候群を含む血管痙攣、中枢および末梢神経系、腎臓、眼および他の器官に関連する微小血管疾患の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項29】

血管障害、間質性線維症、糸球体硬化症、または他の腎臓疾患を含む腎臓疾患の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項30】

パニック性発作、広場恐怖症、広域不安症、恐怖状態を含む不安症状を含む精神疾患の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項31】

主要なうつ病、気分変調症、双極性および単極性のうつ病；神経障害または神経変成疾患(記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む)を含むうつ病または抑うつ障害の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項32】

注意欠陥多動性障害、トゥレット症候群、衝動性、反社会性および人格障害、統合失調症に起因するものを含む精神疾患の陰性症状、獲得脳障害および前頭葉傷害を含む学習力、注意力および意欲の障害の処置のため請求項23に記載の使用。

【請求項33】

薬剤、アルコールおよびニコチン依存症を含む脱毛症の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項34】

記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む神経疾患または神経変成疾患の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項35】

パーキンソン病、ハンチントン病、および食事後の運動不足、頭部外傷、外科、腫瘍または脊髄損傷を含む活動および運動障害の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項36】

肺、心臓および心臓血管系、腎臓および尿生殖路、胃腸システム、皮膚、リウマチ性および肝胆汁性システムの繊維症を含む無制御または異常なコラーゲンあるいはフィブロネクチン形成と関連する疾患の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項37】

分娩開始遅延、子宮頸部成熟損傷、および胎児性難産による長期分娩の予防の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項38】

ステロイドまたはペプチドホルモン生産に関連する副腎、卵巣および睾丸障害を含む内分泌障害の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項39】

繊維嚢胞性疾患、乳汁分泌障害およびがんを含む乳腺疾患の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項40】

免疫不全症、血液疾患および網内皮系の悪性腫瘍を含む免疫障害の処置のための請求項23に記載の使用。

【請求項41】

着床障害による不妊症を含む子宮内膜性疾患の処置のための請求項23に記載の使用。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 2】

ステロイドまたはペプチドホルモン生産に関連する副腎障害、卵巢障害および睾丸障害を含む内分泌障害の処置のための請求項 2 3 に記載の使用。

## 【請求項 4 3】

バソプレッシンの減少または不適当な分泌を含む水分平衡に関連する疾患の処置のための請求項 2 3 に記載の使用。

## 【請求項 4 4】

胎盤機能不全の処置のための請求項 2 3 に記載の使用。

10

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒト 3 レラキシン（以下、「H 3 レラキシン」という。）に関する。より詳細には、本発明は、治療における使用および処置の方法のみならず、H 3 レラキシン、プロ - およびプレプロ - H 3 レラキシン、これらの配列を含む個々のペプチド鎖、H 3 レラキシンの類似体、医薬組成物を含む組成物に関する。さらに、本発明は、H 3 レラキシン、H 3 プロ - およびプレプロ - レラキシン、H 3 レラキシン類似体、およびこれらの配列を含む個々のペプチド鎖をコードする核酸に関する。

## 【発明の背景】

## 【0002】

30

1926 年のヒサウ (Hisaw) の先駆的な研究により、動物でのペプチドホルモンであるレラキシンが、その恥骨結合弛緩作用の効果により重要な役割を果たし、こうして出生過程を促進することが示唆された。レラキシンは、妊娠中に卵巢の黄体中で合成され、分娩に先立って血流中に放出される。卵巢組織を得ることにより、ブタ (James et al (1977), Nature, 267, 554-546)、ラット (John et al (1981), Endocrinology 108, 726-729)、およびサメ (Schwabe et al (1982), Ann. N.Y. Acad. Sci. 380, 6-12) のレラキシンの分離およびアミノ酸配列の決定が可能となった。

## 【0003】

レラキシン遺伝子およびコードされたレラキシンポリペプチドは、ヒト、ブタ、ラット、ヒツジ、およびサメを含む多くの種にて同定されている。2 つの別個の遺伝子が報告されているヒトおよび高等霊長類を例外とし、これらすべての種ではたった 1 つのレラキシン遺伝子しかほ乳類にて特性化されていない。個々のヒトの遺伝子は、本発明者らによって同定され、H1 (Hudson et al (1983) Nature 301, 628-631) および H2 (Hudson et al (1984) Embo. J. 3, 2333-2339) と命名した。

40

## 【0004】

H 2 遺伝子にコードされているペプチドは、ヒトにて大部分は貯蔵され、循環形状である (Winslow et al (1992) Endocrinology 130, 2660-2668)。H1 レラキシンの発現は、脱落膜、胎盤および前立腺に限定されているが (Hansell et al (1991) J. Clin. Endocrinol. Metab. 72, 899-904)、H1 ペプチドは、ラット心房性生物検定にて H2 レラキシンのそれと同様の生物活性を持つ。

50

## 【 0 0 0 5 】

レラキシンの作用は、子宮筋層収縮阻害能、結合組織の再構築刺激能、および産道の組織の軟化誘引能を含む。さらに、レラキシンは、乳腺の増殖および分化を増進し、結合組織の主要な要素の1つであるコラーゲンの破壊を引き起こす。レラキシンは、コラーゲン合成を減少させ、コラゲナーゼの放出を増加させる(Unemori et al (1990) J.Biol. Chem. 265,10682-10685)。これらの発見は、近年多くの妊娠に関連した表現型特性を示した、レラキシン遺伝子ノックアウトマウス(Zhao et al (1999) Endocrinology 140,445-453)の樹立によって確認された。機能的に活性なレラキシン遺伝子を欠いたメスのマウスは、恥骨結合の恥骨間靭帯の弛緩および伸縮できず、自らの子供に乳を飲ませることができず、子供はレラキシン野生型またはレラキシンヘテロ接合型の母親に養育させなければ、次々に24時間以内に死んだ。 10

## 【 0 0 0 6 】

レラキシンが、妊娠のホルモンのみでなく、女性の生殖システムの細胞および組織以外に作用することを示唆する証拠が蓄積している。レラキシンは、腎臓、中脳、肺および抹消血管系の血管拡張(血管拡張)を引き起こし、これらの組織にて血流または血液還流の増加を導く(Bani et al (1997) Gen. Pharmacol. 28,13-22)。レラキシンは、また、心拍数および冠状動脈血流の増加を促し、糸球体ろ過率および腎血漿流量の両方を増加させる(Bani et al (1997) Gen. Pharmacol. 28,13-22)。脳は、レラキシンペプチドが血圧および飲酒に影響する脳室周囲器官(Parry et al (1990) JNeuroendocrinol. 2,53-58 ; Summerlee et al (1998) Endocrinology 139,2322- 2328; Sinnahay et al (1999) Endocrinology 140,5082-5086)の受容体に結合することが示されており(Osheroff et al (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 6413-6417; Tan et al (1999) Br. J. Pharmacol 127, 91-98)、レラキシンのもう1つの標的組織である。 20

## 【 0 0 0 7 】

冠状動脈疾患、末梢血管障害、動脈硬化に関連した腎臓疾患、または他の腎臓毛細管狭窄、あるいは眼または指先、中脳、肺および末梢血管のような体内における血管狭窄といった血管拡張に対応した様々な疾患におけるレラキシンの重要な臨床用途が生じる。

## 【 0 0 0 8 】

約20年前の2つのヒトレラキシン遺伝子およびコードされたヒトレラキシンペプチド産物の発見は、それ自体が大きな驚きであった。 30

## 【 0 0 0 9 】

国際的なレラキシン生物学の20年近くのさらなる研究および開発の利益には驚きではあったが、それよりも本発明者らは、3番目のヒトレラキシン遺伝子(H3)をコードする核酸配列、コードされたH3レラキシンペプチドおよびその構成ペプチド鎖を同定、分離および特性化した。H3レラキシンおよびその類似体の生産が、その利用および治療上の処置方法とともに可能となった。

## 【 0 0 1 0 】

(発明の概要)

本発明の第1の態様は、ヒトH3レラキシン、H3プロレラキシン、およびH3プレプロレラキシンのペプチド、これらの配列を含む個々のペプチド鎖およびその類似体、具体的には切断および/またはアミノ酸置換修飾の類似体に関する。より好ましくは、ペプチドは、様々な治療法によってヒトまたは動物に投与するための製薬的に許容される組成物として提供される。ペプチドは好ましくは、ペプチドおよび蛋白質の混入のない精製された、または均質な形態で、あるいは約90-99%純度の形態で単離される。 40

## 【 0 0 1 1 】

本発明の第2の態様では、A鎖およびB鎖を有するヒトH3レラキシンまたはヒトH3レラキシン類似体が、

以下のアミノ酸配列：



## 【数 1】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser  
 1 5 10 15

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
 20

(配列番号 4)

10

を有する A 鎖、または N - 末端から約 9 アミノ酸以下が切断されたアミノ酸配列、および

以下のアミノ酸配列：

## 【数 2】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 1 5 10 15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
 20 25

20

(配列番号 2)

を有する B 鎖、またはアミノ末端から 9 アミノ酸以下および / または該カルボキシル末端から約 5 アミノ酸以下が切断されているアミノ酸配列を含み、

ここに該 A 鎖および B 鎖は、A11-B10 および A24-B22 間ジスルフィド結合によって連結し、該ヒト H 3 レラキシンまたはその類似体は、レラキシン生物活性を持つ組成物を提供する。

## 【0 0 1 2】

本発明の第 3 の態様は、修飾された A 鎖および / または修飾された B 鎖を有するヒト H 3 レラキシン類似体が、

30

該 H 3 レラキシン A 鎖はアミノ酸配列：

## 【数 3】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser  
 1 5 10 15

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
 20

(配列番号 4)

40

(ここに該カルボキシル末端が、アミド誘導体であって、および / または 12 位の Lys は Glu に置換されており、および / または 19 位の Glu は Gln に置換されている) を有し、

該 H 3 レラキシン B 鎖のはアミノ酸配列：

## 【数 4】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 1 5 10 15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
 20 25

(配列番号 2)

(ここに、該カルボキシル末端はアミド誘導体であり、および / または2位のAlaはPro 10  
 に置換されており、および / または8位のArgはLysに置換されている)を有し、

該A鎖およびB鎖は、A11-B10およびA24-B22間ジスルフィド結合によって連結し、該ヒ  
 トH3レラキシン類似体は、レラキシン生物活性を持つ組成物を提供する。

## 【0013】

本発明の第4の態様は、ヒトH3プレプロレラキシンまたはヒトH3プロレラキシンを  
 含む組成物を提供し、ヒトH3プレプロレラキシンに関してシグナル、A鎖、B鎖および  
 C鎖を有し、かつヒトH3プロレラキシンに関してA鎖、B鎖およびC鎖を有し、該アミ  
 ノ酸鎖はアミノ酸配列：

該A鎖：

## 【数 5】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser  
 1 5 10 15

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
 20

(配列番号 4)

を含み、

該B鎖：

## 【数 6】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 1 5 10 15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
 20 25

(配列番号 2)

を含み、

該シグナル配列：

## 【数 7】

Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr  
 1 5 10 15

Gly Glu Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala  
 20 25

(配列番号 1)

10

20

30

40

50

を含み、

および該 C 鎖：

【数 8】

Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro  
1 5 10 15

Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala  
20 25 30

Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe  
35 40 45

Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly  
50 55 60

Ser Arg  
65

10

20

( 配列番号 3 )

を含む組成物を提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明の第 5 の態様は、H 3 レラキシンの該 C 鎖を含む組成物を提供し、該 C 鎖はアミノ酸配列：

【数 9】

Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro  
1 5 10 15

Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala  
20 25 30

Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe  
35 40 45

Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly  
50 55 60

Ser Arg  
65

30

40

( 配列番号 3 )

を有する組成物を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 6 の態様は、ヒトプレプロ - H 3 レラキシンをコードする核酸配列：

## 【数 1 0】

tataaatggg	gggccaagag	gcagcagaga	cactggccca	ctctcacgtt	caaagcgtct	60
ccgtccagca	tggccaggta	catgctgctg	ctgctcctgg	cggtatgggt	gctgaccggg	120
gagctgtggc	cgggagctga	ggcccgggca	gcgccttacg	gggtcaggct	ttgcggccga	180
gaattcatcc	gagcagtcac	cttcacctgc	gggggctccc	ggtaggagac	atcagacatc	240
ctggcccacg	aggctatggg	tgaggctggg	gagagagtgg	atgtagaagg	ggaacagggt	300
gctggatggg	tcccaggagc	taaggacaga	gataagagga	ggttgctgga	ggaggagggt	360
ccctgtcctg	ccacattcag	ccaggggacac	ctgcccagcc	ttgaaacaag	ggctcaggag	420
ttagcagagc	tgcagagctg	ggatgggggtg	ttgcaagcca	tccatggggg	ctggaagtct	480
gaggacagg	gggggcgggg	agcgtgccat	ttgcaaagac	aacaccgaag	tgttttccaa	540
ccctttccag	caggtaaatgt	gaagggtgtg	gtatacacat	agctgggttt	gtcacctaata	600
gcatgacctc	tccccagcaa	gttgggtttt	cttcctcttc	tgagtgtctt	ttttttggag	660
atgtggtctc	actccattgc	ccaggcttga	atgcagtggc	ccaatcactg	ctcattgcag	720
cctcgacctc	ccaggctcaa	gtgattctcc	tgcctccgcc	tccagagtag	ttgagaccac	780
aggcacctga	cacatgcct	ggctagtttt	aaattttttt	ttttagagaa	caggggtctc	840
actatgttgc	ctaggctgg	ctcgaaotcc	tgggctcaag	tgatcctccc	acctcggcct	900
ccctaagtgc	tgagattaga	gtctctgagt	gtcttttatct	tcaaattggga	gacacagttc	960
ctgaatcttg	caggattaag	tggtatgatt	aaatcaaaac	agattagggc	agagtctcag	1020
cagggcagcg	gcacaatctg	ggatccatca	ggagagtcag	aggggaacaga	agacctagct	1080
tcatgagggg	cagggacctg	gcaaatagat	attcatgatg	gtgagaagga	ggataggtat	1140
gagcgtggac	atagaagaca	caccacttgg	attcagatag	tagctctaca	atgtaatatg	1200

10

20

( 配列番号 6 )

## 【数 1 1】

tgtgtgttca	tgtgtacta	ttttttttt	ttttgagaca	gaatctcatt	ctgttgccca	1260	
ggctggagtg	cagtggtgca	atcttggtc	actgtaacct	ccatcacctg	ggttcaagcg	1320	
attctcgtgc	ctccagcctc	ccaagtagct	gggattacag	atgtgtgcca	ccatacctcg	1380	
ctaattcttt	tatttttagt	agagacagtt	tcaccatggt	ggccaggctg	gtctccaact	1440	
cctgacctca	ggtgatcctc	ccacctcagc	ctcccaaagt	gctgggatta	caggcatgag	1500	
ccaccgcgcc	cagccatgca	aattctttac	tgagtccctg	ctcagtgggtc	tcctctggaa	1560	
aatacgggtg	ataactgcac	ccacctcaac	tggttatcac	tgagaagaat	aaagaagtta	1620	
acctgctaaa	gcacttaaaa	cgttggttga	cacaaagtaa	gtgatcaata	aattattatt	1680	10
attattatta	ttattattat	tattattatt	tttgagacag	ggtcttgctc	tggtgcccag	1740	
actggagtgc	agtgggtgga	tcacagctca	ctgcagcttc	aacctcttgg	gctcaagcaa	1800	
ttctcctgcc	tcagcctcct	gagtagctgg	gactacaggc	ttgtgccaac	atgtctaact	1860	
ttttattatt	tgtagagaca	gggtagtgtc	gtgttgctca	ggctgttctt	gaactcctgg	1920	
ttctgggtgat	cctccagcat	gtgcccctgg	aagtgtctggg	attacagggtg	tgagacaccg	1980	
tgcccggact	caatagtcac	ttttgagtgc	tcacatggtt	ccagacattg	ttctaagttt	2040	
ttttttttta	tgaatattaa	ctccttataa	aacttgagaa	ggttggagta	attatttttt	2100	
tccactttgc	agaaaagaac	attgaggctc	caagaagtaa	atttacttgc	tcacgattag	2160	
agaagctgga	ttcatgtcca	gtcagcccag	ctcccaaagt	taccagggtcc	tcaattaata	2220	20
aagagtaagg	agaaataaat	gacagggctg	gggtgcggtg	ctcacgcctg	taatcccagc	2280	
actttgggtg	gctgagggtg	gcacatcact	tgaggtcagg	agtttgcgac	cagcctgaac	2340	
aacatggtga	accccatctc	tataacaata	caaaaatcag	ccaggcctgc	tggcagacac	2400	
ctgtaatccc	acctactctg	gcagagccag	aatttgaaac	caggactggg	tgggaataaaa	2460	
actctgaact	atgtctatga	ctgttgctac	aagatcagag	ctagactggc	caggagccat	2520	
gactgtgggt	gcagcagcag	ctgagccctg	atcactaact	ctgttcacat	tttgcaggag	2580	
ataccttccc	ggatgcagat	gctgatgaag	acagtctggc	aggcgagctg	gatgaggcca	2640	
tgggggtccag	cgagtggctg	gccctgacca	agtcacccca	ggccttttac	agggggcgac	2700	
ccagctggca	aggaacccct	ggggttcttc	ggggcagccg	agatgtcctg	gctggccttt	2760	30
ccagcagctg	ctgcaagtgg	gggtgtagca	aaagtgaat	cagtagcctt	tgctagtttg	2820	
agggctgggc	agccgtgggc	accaggacca	atgcccagc	cctgcatcc	actcaactag	2880	
tgtctggctg	ggcacctgtc	tttcgagcct	cacacattca	ttcatctc	tacaagtcac	2940	
agaggcactg	tgggtcagg	cacagtctcc	cgacaccacc	tatccaaccc	tgccttttga	3000	
ccagcctatc	atgacctgg	cccctaagga	agctgtgccc	ctgcctggtc	aagtggggac	3060	
ccccccatcc	tgacctctga	cctctcccca	gccctaacca	tgcgtttgcc	tggcctacac	3120	
actccactgc	cacaactggg	tcctactct	acctaggctg	gccacacaga	gacctctgcc	3180	
cccttcccag	tccaaactgt	ggccattgtc	ccctgaccag	ctaaaatcaa	gcctctgtct	3240	
cagtccagcc	tttgcacgca	cgttccctt	gcctgcttt	ccatcccctc	tccctccaac	3300	40
tcccctgcc	gagttccaag	gctgtggacc	ccagagaagg	tggcagggtg	ccccctagg	3360	
agagctctgg	gcacattcga	atcttcccaa	actccaataa	taaaaattcg	aagactttgg	3420	
cagagagtgt	gtgtgtgtgt	gtatggttg				3449	

を有する核酸配列を提供する。

## 【0 0 1 6】

本発明の第7の態様は、ヒトプロ-H3レラキシンをコードする核酸配列はA鎖、B鎖およびC鎖配列を含み、

該A鎖配列：

## 【数 1 2】

gatgtcctgg ctggcctttc cagcagctgc tgcaagtggg ggtgtagcaa aagtgaaatc 60  
agtagccttt gc 72

(配列番号 7)

を含み、

該 B 鎖配列：

## 【数 1 3】

cgggcagcgc cttacggggg caggctttgc ggccgagaat tcacccgagc agtcattctc 60  
acctgcgggg gctcccgggtg g 81

10

(配列番号 8)

を含み、

該 C 鎖配列：

## 【数 1 4】

agacgatcag acatcctggc ccaagaggct atgggagata ccttcccggg tgcagatgct 60  
gatgaagaca gtctggcagg cgagctggat gaggccatgg ggtccagcga gtggctggcc 120  
ctgaccaagt caccaccaggc cttttacagg gggcgaccca gctggcaagg aaccctggg 180  
gttcttcggg gcagccga 198

20

(配列番号 9)

を含む核酸配列を提供する。

## 【0 0 1 7】

本発明の第 8 の態様は、A 鎖および B 鎖を有するヒト H 3 レラキシンをコードする核酸配列であり、

該 A 鎖配列：

## 【数 1 5】

gatgtcctgg ctggcctttc cagcagctgc tgcaagtggg ggtgtagcaa aagtgaaatc 60  
agtagccttt gc 72

30

(配列番号 7)

を含み、

および該 B 鎖配列：

## 【数 1 6】

cgggcagcgc cttacggggg caggctttgc ggccgagaat tcacccgagc agtcattctc 60  
acctgcgggg gctcccgggtg g 81

(配列番号 8)

を含む、核酸配列を提供する。

40

## 【0 0 1 8】

本発明の第 9 の態様は、ヒト H 3 レラキシンの A、B または C ペプチド鎖をコードする核酸配列であり：

A 鎖：

## 【数 1 7】

gatgtcctgg ctggcctttc cagcagctgc tgcaagtggg ggtgtagcaa aagtgaaatc 60  
agtagccttt gc 72

(配列番号 7)

B 鎖：

50

## 【数 18】

```

cgggcagcgc cttacgggggt caggctttgc ggccgagaat tcatccgagc agtcattcttc      60
acctgcgggg gctcccgggtg g                                     81

```

( 配列番号 8 )

および C 鎖 :

## 【数 19】

```

agacgatcag acatcctggc ccacgagggt atgggagata ccttcccggg tgcagatgct      60
gatgaagaca gtctggcagg cgagctggat gaggccatgg ggtccagcga gtggctggcc      120
ctgaccaagt caccacaggc cttttacagg gggcgaccca gctggcaagg aaccctggg      180
gttcttcggg gcagccga                                     198

```

10

( 配列番号 9 )

をコードする核酸配列を提供する。

## 【0019】

核酸配列は、プラスミド、バクテリオファージまたはウイルス DNA あるいは RNA のようなベクターに含まれ、一重鎖または二重鎖であり、かつ、バクテリア細胞のような宿主システムにおける発現を高め、増強または他の効果を与えるようなプロモーター、またはエンハンサーあるいは他の配列を含むことができ、分離、精製された核酸である。

20

## 【0020】

核酸の三塩基コドンは、特定のアミノ酸をコードしている。当業者に周知のように、1 つ以上のコドンが同じアミノ酸をコードしている。さらに、核酸配列の修飾または変更の方法は、当業者に周知である。ヒト H3 レラキシン、プロ - H3 レラキシン、プレプロ - H3 レラキシンおよびその構成ペプチド鎖をコードする核酸のその様々な態様に関する本発明の限りでは、本発明は、同じ蛋白質産物をコードする核酸変異型、またはレラキシン生物活性を持つ蛋白質産物を含む。

## 【0021】

本発明のヌクレオチド配列態様は、ストリンジェントなハイブリダイゼーションによって規定される密接に関連する核酸配列を含む：この条件は、65 で一晩、0.25M  $H_2PO_4$  pH 7.2、1mmol EDTA、20%SDS の条件下で相補配列のアニーリングを行い；つづいて室温で 2xSSC、0.1%SDS にて5分間の洗浄を3回行い；そして最後に、6xSSCは0.9M NaCl pH 7.0、0.3M  $Na_3CO_3 \cdot H_2O$  である、0.1%SSC中にて65 で30分洗浄する。そのような配列は、H3 レラキシンに反応する生物学的または免疫学的、あるいは他の活性を持つ H3 レラキシンポリペプチドをコードするだろう。

30

## 【0022】

本発明の他の態様では、以下の1つまたはそれ以上の疾患の処置のための方法を提供している：冠状動脈疾患、末梢血管障害を含む末梢血管障害、レイノー症候群を含む血管痙攣、中枢および末梢神経系、腎臓、眼および他の器官に関する微小血管の疾患；（肺、心臓および心臓血管系、腎臓および尿生殖路、胃腸システム、皮膚、リウマチ性および胆汁性システムの繊維症を含む）繊維性疾患のような無制御または異常なコラーゲンあるいはフィブロネクチン形成と関連する疾患；血管障害、間質性線維症、糸球体硬化症、または他の腎臓疾患に関連する腎臓疾患；パニック性発作、広場恐怖症、広域不安症、恐怖状態を含む不安症状；主要なうつ病、気分変調症、双極性および単極性のうつ病を含むうつ病または抑うつ障害；神経障害または神経変成疾患（記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む）；学習力、注意力および意欲の障害（注意欠陥多動性障害、トゥレット症候群、衝動性、反社会性および人格障害、統合失調症に起因するものを含む）精神疾患、獲得脳障害および前頭葉傷害の陰性症状を含む）；中毒症状（薬剤、アルコールおよびニコチン中毒を含む）；活動および運動障害（パーキンソン病、ハンチントン病、および食事後の運動不足、頭部外傷、外科、腫瘍または脊髄損傷を含む）；免疫障害

40

50

(免疫不全症、血液疾患および網内皮系悪性腫瘍を含む)；乳腺疾患(繊維嚢胞性疾患、乳汁分泌障害およびがんを含む)；着床障害による不妊症を含む子宮内膜性疾患；内分泌障害(ステロイドまたはペプチドホルモン生産に関連する副腎障害、卵巣障害および睾丸障害を含む)；分娩遅延、子宮頸部成熟損傷；および胎児性難産による長期分娩の予防；洞性徐脈；脱毛；脱毛症；バソプレッシンの減少または不適当な分泌を含む水分平衡障害；または胎盤不足；の1つまたはそれ以上を処置するための方法であり、任意に1つまたはそれ以上の製薬的に許容される担体および/希釈剤および/または賦形剤とともに、ヒトH3レラキシン、または本明細書にて定義するその類似体の治療上有効な量をそのような処置を必要とする被験者に投与する方法を提供する。

#### 【0023】

本発明のもう一つの態様は、以下の1つまたはそれ以上の疾患の処置のための薬剤の製造におけるヒトH3レラキシンまたはその類似体の使用を提供する：冠状動脈疾患、末梢血管障害を含む末梢血管障害、レイノー症候群を含む血管痙攣、中枢および末梢神経系、腎臓、眼および他の器官に関する微小血管の疾患；(肺、心臓および心臓血管系、腎臓および尿生殖路、胃腸システム、皮膚、リウマチ性および肝胆汁性システムの繊維症を含む)繊維性疾患のような無制御または異常なコラーゲンあるいはフィブロンネクチン形成と関連する疾患；血管障害、間質性線維症、糸球体硬化症、または他の腎臓疾患に関連する腎臓疾患；パニック性発作、広場恐怖症、広域不安症、恐怖状態を含む不安症状態；主要なうつ病、気分変調症、双極性および単極性のうつ病を含むうつ病または抑うつ障害；神経障害または神経変成疾患(記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む)；学習力、注意力および意欲の障害(注意欠陥多動性障害、トゥレット症候群、衝動性、反社会性および人格障害、統合失調症に起因するものを含む精神疾患、獲得脳障害および前頭葉傷害の陰性症状を含む)；中毒症状(薬剤、アルコールおよびニコチン中毒を含む)；活動および運動障害(パーキンソン病、ハンチントン病、および食事後の運動不足、頭部外傷、外科、腫瘍または脊髄損傷を含む)；免疫障害(免疫不全症、血液疾患および網内皮系悪性腫瘍を含む)；乳腺疾患(繊維嚢胞性疾患、乳汁分泌障害およびがんを含む)；着床障害による不妊症を含む子宮内膜性疾患；内分泌障害(ステロイドまたはペプチドホルモン生産に係のある副腎障害、卵巣障害および睾丸障害を含む)；分娩遅延、子宮頸部成熟損傷；および胎児性難産による長期分娩の予防；洞性徐脈；脱毛；脱毛症；バソプレッシンの減少または不適当な分泌を含む水分平衡障害；または胎盤不足；の1つまたはそれ以上を処置するための薬剤の製造における使用であり、任意に1つまたはそれ以上の製薬的に許容される担体および/希釈剤および/または賦形剤とともに、ヒトH3レラキシンまたは本明細書にて定義するその類似体の治療上有効な量をそのような処置を必要とする被験者に投与する使用を提供する。

#### 【0024】

ヒトレラキシンの同定、および2つのヒトレラキシン遺伝子の当時の驚異的な同定後20年であり、さらに1つのレラキシン遺伝子が同定された。その種々の態様にて、本発明は：ヒトH3レラキシンをコードする核酸配列の特性化；精製核酸物質の分離；H3レラキシンをコードする核酸配列(mRNA、cDNAおよびDNA)の増幅；H3レラキシン配列の核酸のクローニング；核酸配列の同定、かつヒトH3プレプロレラキシン、H3プロレラキシンおよびH3レラキシンをコードするペプチド配列の同定を提供した。

#### 【0025】

ヒトH3レラキシンポリペプチドは、A鎖およびB鎖のジスルフィド架橋からなる。ヒトH3レラキシンのアミノ酸配列は、配列番号4に記載する。ヒトレラキシンのB鎖のアミノ酸配列は、配列番号2に記載する。

ヒトH3レラキシンの該AおよびB鎖は、A11-B10、A24-B22ジスルフィド結合型がこれらのシステイン結合間で起こる、システイン残基で結びついている。

ここで、ヒトH3レラキシンAおよびB鎖のアミノ酸配列を、以下に示す：

A鎖：

10

20

30

40

50



## 【数 2 0】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser  
 1 5 10 15

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
 20

(配列番号 4)

B 鎖 :

10

## 【数 2 1】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 1 5 10 15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
 20 25

(配列番号 2)

であり、該 A 鎖および B 鎖は A11-B10、A24-B22 間ジスルフィド結合によって連結している。 20

## 【0 0 2 6】

ヒト H 3 レラキシンは、古典的なレラキシン生物活性を持つ。ヒトレラキシン、H 1 および H 2 レラキシンは、T H P - 1 細胞 (Parsell et al (1996) J. Biol. Chem. 271, 27936-27941) のような、レラキシン受容体を発現している細胞に結合する。H 2 レラキシンは、これらの細胞の c A M P 産物の濃度依存的に増加調製する。本発明に関連して調製される合成 H 3 レラキシンは、ヒト H 2 レラキシンを維持し、c A M P の濃度依存的な増加を刺激する。H 3 レラキシンによって阻害されるようなヒトレラキシン受容体に関連する標的細胞における応答の特異性は、T H P - 1 細胞にて 1 μ m 濃度増加での c A M P 刺激応答のための牛インスリン (bINS) またはヒトインスリン (hINS3) の不活化によって明らか 30

## 【0 0 2 7】

ヒト H 3 レラキシンを備えたヒトレラキシン受容体の刺激によるセカンドメッセンジャー応答 (cAMP) の誘導は、ヒト H 3 レラキシンが、古典的なレラキシン生物活性を持つという決定的な証拠を提供する。レラキシン受容体を含む細胞、例えば、前記 T H P - 1 細胞におけるそのような分析は、レラキシン生物活性を決定する簡易な方法を提供する。加えて、細胞に発現するレラキシン受容体のレラキシン結合部位への結合にて P<sup>32</sup> - 標識した H 2 レラキシンと競合させたヒト H 3 レラキシンの活性は、さらにレラキシン生物活性の確実な立証を提供する。

## 【0 0 2 8】

40

レラキシン生物活性の決定のための他の生物活性 / 分析は、当業者に周知である。例えば、妊娠または非妊娠期の活性レラキシンの測定に用いられるバイオアッセイには、モルモット恥骨間結合分析 (guinea pig interpubic ligament assay) のような方法が使われる。(Steinetz et al (1960) Endocrinology 67, 102-115, and Siroshi et al (1983) American Journal of Obstetrics and Gynaecology 145: 402-405)。他のバイオアッセイは、T H P - 1 細胞の c A M P 産物を含む。(Parsell et al (1996) J. Biol. Chem 271, 27936-27941)。

## 【0 0 2 9】

本発明者らは、9つのアミノ酸以下を A 鎖の N - 末端から切断され、9つのアミノ酸以下を B 鎖の N - 末端から切断され、かつ、5つのアミノ酸以下を B 鎖の C - 末端から切断さ 50

れ調製された、H 3 レラキシン類似体を発見した。

結果、レラキシン類似体は、H 3 レラキシン A および B 鎖からなり、A 鎖はアミノ酸配列

【数 2 2】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser

1 5 10 15

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys

20

10

(配列番号 4)

を有し、アミノ末端から 9 アミノ酸以下が切断され、

および B 鎖はアミノ酸配列：

【数 2 3】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg

1 5 10 15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp

20

25

20

(配列番号 2)

を有し、アミノ末端から 9 アミノ酸以下および / またはカルボキシル末端から約 5 アミノ酸以下が切断され、

該 A 鎖および B 鎖は A11-B10、A24-B22 間ジスルフィド結合により連結し、該ヒト H 3 レラキシンまたはその類似体は、レラキシン生物活性を持つ。ヒト H 3 レラキシンの該 A 鎖は、10 番および 15 番の C y s 残基間の鎖内ジスルフィド結合を含む。

【0030】

ヒトレラキシン受容体を有する細胞においてセカンドメッセンジャーの誘導を観察する標準的な分析にて、全長の切断されていないヒト H 3 レラキシンおよび本物のヒト H 2 レラキシンに特徴的な態様にて上述の H 3 レラキシン類似体のすべてがサイクリック A M P 生産を誘導した。従って、上述の切断された H 3 レラキシン類似体は、レラキシン生物活性を持つ。

【0031】

本発明の他の態様は、修飾された A 鎖および / または修飾された B 鎖を有するヒト H 3 レラキシン類似体を含む構成物に関する。A 鎖、および / または B 鎖のカルボキシル末端は、アミド誘導体であってもよい。A 鎖の 12 位の L y s を G l u に置換し、および / または 19 位の G l u を、G l n に置換してもよい。B 鎖にて、2 位の A l a を P r o に置換し、および / または 8 位の A r g を L y s に置換してもよい。結果、修飾されたアミノ酸を有する H 3 レラキシン類似体は、以下に示すようなアミノ酸配列を有する：

【0032】

本発明の他の態様では、修飾された A 鎖および / または修飾された B 鎖を有するヒト H 3 レラキシン類似体を提供し、

該 H 3 レラキシン A 鎖はアミノ酸配列：

40

## 【数 2 4】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser

1 5 10 15

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys

20

(配列番号 4)

(ここに、カルボキシル末端がアミド誘導体であり、および / または 12 位の L y s を G l u に置換し、19 位の G l u を G l n に置換されている)を有し、

10

該修飾された B 鎖はアミノ酸配列：

## 【数 2 5】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg

1 5 10 15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp

20

25

(配列番号 2)

(ここに、カルボキシル末端がアミド誘導体であり、および / または 2 位の A l a を P r o に置換し、8 位の A r g を L y s に置換されている)を有し、

20

該 A および B 鎖は A11-B10 および A24-B22 間ジスルフィド結合により連結し、かつ、ヒト H 3 レラキシン類似体はレラキシン生物活性を持つ。

ヒト H 3 レラキシンをコードする核酸配列の単離、精製および特性化は、ヒト H 3 レラキシンのシグナル配列およびヒト H 3 レラキシンのプロ配列の特性および産生を可能にする。

ヒト H 3 レラキシンのシグナル配列および C 鎖の同定、精製、特性化は、プレプロ - およびプロ - ヒト H 3 レラキシンの産生を可能にする。

## 【0033】

本発明の他の態様は、ヒト H 3 プレプロレラキシンに関してシグナル、A 鎖、B 鎖および C 鎖を有し、ヒト H 3 プロレラキシンに関して A 鎖、B 鎖および C 鎖を有する、ヒト H 3 プレプロレラキシンまたはヒト H 3 プロレラキシンを含む組成物を提供し、該アミノ酸鎖はアミノ酸配列：

30

該 A 鎖：

## 【数 2 6】

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser

1 5 10 15

Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys

20

40

(配列番号 4)

を含み、

該 B 鎖：

## 【数 2 7】

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg

1 5 10 15

Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp

20 25

( 配列番号 2 )

を含み、

該シグナル配列：

10

## 【数 2 8】

Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr

1 5 10 15

Gly Glu Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala

20 25

( 配列番号 1 )

を含み、

および該 C 鎖は：

20

## 【数 2 9】

Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro

1 5 10 15

Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala

20 25 30

Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe

35 40 45

30

Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly

51 55 60

Ser Arg

65

( 配列番号 3 )

を含む、組成物を提供する。

40

## 【0 0 3 4】

本発明のさらなる態様は、ヒト H 3 レラキシンの C 鎖を提供し、該 C 鎖はアミノ酸配列：

## 【数 3 0】

Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro

1 5 10 15

Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala

20 25 30

Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe

35 40 45

10

Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly

50 55 60

Ser Arg

65

## (配列番号 3)

を有し、ヒト H 3 プロレラキシンは特徴的なレラキシン生物活性を持つ。

## 【0 0 3 5】

20

ヒト H 3 レラキシン、プロレラキシン、プレプロレラキシンおよび構成ペプチド鎖は、米国特許番号 US5,991,997、米国特許番号 US4,758,516、米国特許番号 US4,871,670、米国特許番号 US4,835,251、PCT/US90/02085 および PCT/US94/0699 に開示されているようなレラキシンの生産における有用な従来技術を用いて作成することができる。

## 【0 0 3 6】

アミノ酸が前記のように置換されたレラキシン類似体および誘導体は、例えば、Tsurus hita et al (1988) Gene Tissue : 135-139. に開示のある部位特異的変異導入技術を用いて組換え手法により生産できる。

## 【0 0 3 7】

1 つまたはそれ以上のアミノ酸が該 A および / または B 鎖の N - および / または C - 末端を切断したヒト H 3 レラキシン、その類似体あるいは前記のようなアミノ酸置換を有するヒト H 3 レラキシン類似体の開示された配列情報は、レラキシン合成のための Billesbach (1991) J. Biol. Chem. 266, 10754- 10761 の方法によって合成できる。さらに、ペプチド合成のよく知られている方法が、ここに引用された様々な H 3 レラキシン型を生産するために利用できる。

## 【0 0 3 8】

従って、レラキシンは、様々な疾患および障害の処置および診断に用いられる。例えば、レラキシンは、強皮症、鼻腔徐脈、心臓血管疾患、神経変成および神経疾患、脱毛症、うつ病の処置に有効であるという証拠が研究によって明らかとなった。米国特許番号 US5, 166, 191 および国際特許出願番号 PCT/US92/069 を参照のこと。該証拠はまた、慢性関節リウマチ性のような、コラーゲンまたはフィブロネクチンの異常な発現に関連する疾患および障害におけるレラキシンの使用を示唆する。

## 【0 0 3 9】

ヒト H 3 レラキシン、ヒト H 3 レラキシン不完全類似体、アミノ酸修飾された H 3 レラキシン類似体およびヒトプロレラキシンは、本発明のレラキシン受容体への結合およびレラキシン生物活性の保有によって提供した。それは、これらのレラキシン生物活性を持つヒト H 3 レラキシン型が、前記のような疾患および障害の処置のために使用されうることを直接的に示唆している。

## 【0 0 4 0】

本発明の別の態様では、以下の 1 つまたはそれ以上の疾患の処置のための方法を提供す

50

る。：冠状動脈疾患、末梢血管障害を含む末梢血管障害、レイノー症候群を含む血管痙攣、中枢および末梢神経系、腎臓、眼および他の器官に関連する微小血管疾患；（肺、心臓および心臓血管系、腎臓および尿生殖路、胃腸システム、皮膚、リウマチ性および肝胆汁性システムの繊維症を含む）繊維性疾患のような無制御または異常なコラーゲンあるいはフィブロネクチン形成と関連する疾患；血管障害、間質性繊維症、糸球体硬化症、または他の腎臓疾患に関連する腎臓疾患；パニック性発作、広場恐怖症、広域不安症、恐怖状態を含む不安症状態；主要なうつ病、気分変調症、双極性および単極性のうつ病を含むうつ病または抑うつ障害；神経障害または神経変成疾患（記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む）；学習力、注意力および意欲の障害（注意欠陥多動性障害、トゥレット症候群、衝動性、反社会性および人格障害、統合失調症に起因するものを含む精神疾患、獲得脳障害および前頭葉傷害の陰性症状を含む）；中毒症状（薬剤、アルコールおよびニコチン中毒を含む）；活動および運動障害（パーキンソン病、ハンチントン病、および食事後の運動不足、頭部外傷、外科、腫瘍または脊髄損傷を含む）；免疫障害（免疫不全症、血液疾患および網内皮系の悪性腫瘍を含む）；乳腺疾患（繊維嚢胞性疾患、乳汁分泌障害およびがんを含む）；着床障害による不妊症を含む子宮内膜性疾患；内分泌障害（ステロイドあるいはペプチドホルモン生産に関係のある副腎障害、卵巢障害および睾丸障害を含む）；分娩開始遅延、子宮頸部成熟損傷；および胎児性難産による長期分娩の予防；洞性徐脈；脱毛；脱毛症；パソプレッションの減少または不適当な分泌を含む水分平衡障害；または胎盤不足；の1つまたはそれ以上を処置するための方法であって、任意に1つまたはそれ以上の製薬的に許容される担体および／希釈剤および／または賦形剤とともに、ヒトH3レラキシンまたは本明細書にて定義するその類似体の治療上有効な量をそのような治療を必要とする被験者に投与する方法を提供する。

#### 【0041】

本発明の別の態様では、以下の1つまたはそれ以上の疾患の処置のための薬剤の製造におけるヒトH3レラキシンまたはその類似体の使用を提供する。：冠状動脈疾患、末梢血管障害を含む末梢血管障害、レイノー症候群を含む血管痙攣、中枢および末梢神経系、腎臓、眼および他の器官に関連する微小血管疾患；（肺、心臓および心臓血管系、腎臓および尿生殖路、胃腸システム、皮膚、リウマチ性および肝胆汁性システムの繊維症を含む）繊維性疾患のような無制御または異常なコラーゲンあるいはフィブロネクチン形成と関連する疾患；血管障害、間質性繊維症、糸球体硬化症、または他の腎臓疾患に関連する腎臓疾患；パニック性発作、広場恐怖症、広域不安症、恐怖状態を含む不安症状態；主要なうつ病、気分変調症、双極性および単極性のうつ病を含むうつ病または抑うつ障害；神経障害または神経変成疾患（記憶喪失または他の記憶障害、痴呆、アルツハイマー病を含む）；学習力、注意力および意欲の障害（注意欠陥多動性障害、トゥレット症候群、衝動性、反社会性および人格障害、統合失調症に起因するものを含む精神疾患、獲得脳障害および前頭葉傷害の陰性症状を含む）；中毒症状（薬、アルコールおよびニコチン中毒を含む）；活動および運動障害（パーキンソン病、ハンチントン病、および食事後の運動不足、頭部外傷、外科、腫瘍または脊髄損傷を含む）；免疫障害（免疫不全症、血液疾患および網内皮系の悪性腫瘍を含む）；乳腺疾患（繊維嚢胞性疾患、乳汁分泌障害およびがんを含む）；着床障害による不妊症を含む子宮内膜性疾患；内分泌障害（ステロイドまたはペプチドホルモン生産に関連する副腎障害、卵巢障害および睾丸障害を含む）；分娩開始遅延、子宮頸部成熟損傷；および胎児性難産による長期分娩の予防；洞性徐脈；脱毛；脱毛症；パソプレッションの減少または不適当な分泌を含む水分平衡障害；または胎盤不足；の1つまたはそれ以上を処置するための薬剤の製造における使用であって、任意に1つまたはそれ以上の製薬的に許容される担体および／希釈剤および／または賦形剤とともに、ヒトH3レラキシンまたは本明細書にて定義するその類似体の治療上有効な量をそのような処置を必要とする被験者へ投与する使用を提供する。

#### 【0042】

作用機序にとらわれることを意図しないが、発明者らは、H3レラキシンは脳、および神経を含む体の他の部分において、例えば細胞でのcAMP生産の誘導を介して神経伝達

物質または神経調節物質として作用すると考えている。

【0043】

以下に定義するように、H3レラキシンは驚くことに、別名で核不確体 (nucleus incertus) と呼ばれる、背側被蓋核の腹側正中部 (vmDTg) の神経構造部位において発現していることが明らかとなった (Goto et al (2001) Journal of Comparative Neurology 438: 86-122)。核不確体 (nucleus incertus) からの遠心性神経および求心性神経を重要前脳部との間でやりとりする広範囲なパターンから、この領域は注意力、意欲、運動力、および学習 (Goto et al) に対する影響を以て行動活性化を調節でき、本明細書中に記載する治療の処置様相を起こすことができる脳幹ネットワークの一部として提示される。これは、大脳皮質および他の相当する脳領域における豊富に分布するレラキシン結合部位と一致する。 (Osheroff and Phillips (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6413-6417; and Tan et al (1999) Br. J. Pharmacol. 127, 91-98)。

10

【0044】

H3レラキシンは血液脳関門を通過でき、あるいは、例えば PCT/W089/10134 に開示の方法の脂肪親和性賦形剤の使用、フロイ (Frey) の方法による鼻腔内投与 (米国特許番号 US 6,313,093) によって、血液脳関門を開くあるいは H3レラキシンの共同投与 / 時の投薬によって漏出を可能にする、1つまたはそれ以上の糖類またはアミノ酸あるいは他の物質 (例えば、Naito US Patent 6,294,520 を参照) の使用を含む当業者によって周知の方法によって、血液脳関門を通過することを促進するように処理できる。

【0045】

本明細書中で述べる H3レラキシンおよび類似体は、精神障害、学習障害、注意および記憶の障害、中毒障害および活動および運動障害を含む、神経性疾患のような広く表現できる広い範囲の処置に有用になりうる。

20

【0046】

H3レラキシンは、以下に述べるようなレラキシン受容体に結合する。

便宜上、特に示さない限り、ヒト H3レラキシン、1つまたはそれ以上のアミノ酸がヒト H3レラキシンの該 A および B 鎖の該 N - および / または C - 末端以下を切断したヒト H3レラキシンの類似体、1つまたはそれ以上のアミノ酸がここで述べたような修飾または他のアミノ酸の置換を受けたヒト H3レラキシンの類似体、およびまとめてヒト H3レラキシンと呼ばれるヒト H3プレプロレラキシンを含む。

30

【0047】

本発明にて使用する好適な医薬組成物は、所望の目的を達成するために有効な量を含む活性成分を含む。より明確には、治療上有効な量とは、処置中の被験者の進行阻害または既存の症状の緩和をするための有効な量を意味する。有効な量の決定は、特にここに提供した詳細な開示に照らして、当業者であれば可能である。

【0048】

本発明の方法にて使用される任意の組成物に関して、治療上の有効濃度は、細胞培養分析にてまず評価することができる。例えば、その服用量は、細胞培養において決定されるような IC<sub>50</sub> sub. 50 を含む循環濃度範囲を達成するための動物モデルにて策定することができる。そのような情報は、ヒトにてより正確に有用な服用量を決定するために使用することができる。

40

【0049】

治療上の有効濃度は、患者の症状の改善または生存期間の延長に帰着する組成物の量を参考にする。そのような組成物の毒性および治療効果は、例えば、LD<sub>50</sub> sub. 50 (集団の 50% の致死量) および ED<sub>50</sub> sub. 50 (集団の 50% の治療上効果のある量) 判定などの、細胞培養または実験動物の標準の製薬的処置によって決定することができる。毒性および治療効果間の量比は、治療指数であり、LD<sub>50</sub> sub. 50 および ED<sub>50</sub> sub. 50 間の比率として表すことができる。高い治療評価を示す組成物が好まれる。これらの細胞培養分析および動物実験から得られたデータは、ヒトに使用する投薬量の範囲の公式化に使用することができる。そのような組成物の投薬量は、好適には毒性のほとんどないまたは全くない ED<sub>50</sub> sub. 50 を含

50

む循環濃度範囲内にする。投薬量は、使用した投与剤形および利用した投薬ルートに依存するこの範囲内で変化する。正確な剤形、投薬ルートおよび投薬量は、患者の状態を診る個々の内科医によって選択することができる。(Fingl et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1pl参照)。

#### 【0050】

投薬量および投薬間隔は、レラキシン生物活性および効果を維持するために十分な、活性部分の血清レベルを提供するために個々に調節することができる。

H3レラキシンの投与は、同様の効用を持つ薬剤のための投与の許容可能な様態のうちのどれによってでも可能であり、好適には全身性投与によって可能である。

#### 【0051】

疾患および障害に関連する上記の同定したレラキシンの多くの処置のためのヒト投薬量は、未だH3レラキシン全体に最適化されていないが、日々の投薬量は、体重の約0.05~500.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ であり、好適には約5.0~200.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ であり、より好適には約10.0~100.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ である。一般に、それはH3レラキシンの血清濃度に近似または妊婦でのレラキシンの正常循環レベルより多い、すなわち1.0ng/ml、1.0~20ng/mlのような、好適には1.0~20ng/mlを得るようにする。

#### 【0052】

70kgの人に対する投与のための投与量範囲は、約7.0  $\mu\text{g}$ ~3.5mg/日であり、好適には約42.0  $\mu\text{g}$ ~2.1mg/日であり、最適には84.0~700.0  $\mu\text{g}/\text{日}$ である。投与したH3レラキシンの量は、もちろん、被験者および症状の度合い、投与の方法および予定、かつ内科医の判断およびそのような類似体または誘導体の生物活性に依存するだろう。1つの処置計画は、より高い初期投薬レベル(たとえば、100~200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ )を用いた後、約1.0ng/mlの安定したH3レラキシン血清濃度を達成するために投薬量を減少することができる。他の処置計画は、特に分娩後のうつ病には、レラキシンの正常妊娠レベル(約1.0ng/ml)に達するのに十分なH3レラキシンの量の投与を要し、続いてH3レラキシン血清レベルが検知できなくなるまで徐々に減少する投薬量で(例えば、約20ピコグラム/ml未満)、任意にその投薬レベルに達する処置を中止する。

#### 【0053】

任意の投薬の製薬的に許容される様態が、使用されうる。H3レラキシンは、単独または例えば錠剤、カプセル、粉末、液体、ゲル、懸濁液、坐薬、エアゾルなどのような固体、半固体、液体あるいはエアゾル投与剤形を含む他の製薬的に許容される賦形剤との組合せの投与が可能である。そのようなタンパク質は、正確な投薬量の単一の投与にふさわしい単一投与剤形において所定の比率での延長投与のための、蓄積注射、浸透圧ポンプ(Alzaによって作製されたAlzet挿入のような)、錠剤、経皮的(電気輸送を含む)パッチなどを含む、(例えば、遅い放出の生物浸食可能なデリバリーシステムの使用)、持続または制御放出投薬形にて投与され、組成物は、一般に便利な製薬的担体または賦形剤および/またはH3レラキシン、H3プロレラキシンおよびH3プレプロレラキシンまたはその誘導体を含む。さらに、これらの組成物は、他の活性成分、担体、補助剤などを含む。

#### 【0054】

本発明の好適な態様としての、持続/制御放出H3レラキシン製剤は、薬物分散を開始させる選択的な浸透性外部バリアー、および予め決定した比率で徐々に減少するH3レラキシンの供給投与量になるように設計した内部H3レラキシン含有部分である。(例えば、初め約500  $\mu\text{g}/\text{日}$ で供給し、10  $\mu\text{g}/\text{日}$ の比率で減少させるためのマトリックスにH3レラキシンを約30mgを含む。)。

#### 【0055】

本発明のもう1つの好適な態様としての、持続/制御放出型H3レラキシンが、薬剤投与開始にて選択的浸透可能な外部バリアー、治療に効果的な日々の投与量のH3レラキシンの供給投与量になるように設計した部分を含む第1の内相H3(例えば、約500  $\mu\text{g}/\text{日}$ の継続的な供給のためのマトリックスにてH3レラキシンの約50mgを含む)、かつ第1の内相からH3レラキシンの枯渇に始まる、前もって定義した割合(例えば、50  $\mu\text{g}/\text{日}$

10

20

30

40

50



で減少する約500  $\mu\text{g}$ /日の開始供給のためのマトリックスにH3レラキシンの約3mgを含む)で次第に減少するH3レラキシンの供給投薬を目指した、第2の内相H3レラキン部分を持つ。

【0056】

一般に、投与の所望の様態に依存して、製薬的に許容される構成は、H3レラキシンの重量の約0.1%~90%を、好適には約0.5%~50%を含み、単独またはH3レラキンとの組み合わせであり、残りは、適切な製薬的賦形剤、担体などを含む。実際、そのような投与剤形を調製する方法は、当業者によって周知である；例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975を参照。

【0057】

局所投与または選択的摂取の場合は、薬の効果的な局所濃度は、血漿濃度と関係がない。

投与した組成物の量は、もちろん、処置された被験者、被験者の体重、疾患の程度、投与の方法および内科医の判断に依存するだろう。

【0058】

投与の好適なルートは、例えば、経口、直腸、粘膜側または腸内投与を含むことができる。非経口投与は、一般に皮下、皮内、筋肉内または静脈内のどれか、より好適には皮下への注入によって特徴づけられる。注入物質は、液状の溶液または懸濁液のどちらか、注入前の液体に溶解または懸濁するために適した固形、あるいは乳剤のような従来の形で準備することができる。好適な賦形剤としては、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどがある。さらに、所望であれば、投与される医薬組成物は、湿潤または乳化物質、pH緩衝剤、可溶性増進剤などのような少量の無毒な補助剤を含んでいてもよく、例えば、酢酸ナトリウム、ソルピタンモノラウレート、トリエタノールアミン、オレイン酸塩、シクロデキストリンなどである。

【0059】

非経口投与のためのより最近考案された方法として、投薬の一定のレベルが維持されるような遅い放出または持続放出性システムの注入を採用している。例えば、米国特許番号US3,710,795.を参照。

【0060】

別法として、1つは、例えば、多くは蓄積または持続放出型剤形での、固形腫瘍への直接の組成物の注入による、システム化された方法よりむしろ局所へのH3の投与が可能である。

【0061】

さらに、1つは、例えば、腫瘍特異的抗体でコートしたリポソーム中の標的の薬物送達システムにおける薬物の投与が可能であり、リポソームは、標的とされ、腫瘍によって選択的に取り上げられるだろう。

【0062】

本発明の医薬組成物は、例えば、従来の混合、溶解、粒状化、糖衣錠形成、ゲル状、乳化、カプセルに入れる、取り込むまたは凍結乾燥する工程によって、それ自体知られている方法で製造される。

【0063】

こうして本発明に従って使用される医薬組成物は、製薬的に使用できる調合薬での活性な組成物の処理を促進する補形剤および補助剤を含む1つまたはそれ以上の製薬的に許容される担体を使用する従来方法にて公式化することができる。適切な剤形は、選択した投与ルートに依存する。

【0064】

組成物は、例えば、ボラス注入または継続的投入、注入によって非経口投与のために策定することができる。注入の剤形は、投与剤形の単位に存在し、例えば、アンプル中または追加予防薬を備えた多重薬剤コンテナー中に存在することができる。組成物は、油性または水性媒体中に懸濁、溶解あるいは乳化のような剤形で保持され、懸濁、安定化およ

10

20

30

40

50

び／または分散剤のような決まった物質を含んでもよい。

【0065】

非経口投与のための医薬的剤形は、水溶性の剤形にて活性な組成物の水溶液を含む。加えて、活性な組成物の懸濁液は、適当な油性注入懸濁液として調製することができる。好適な脂肪親和性溶剤または媒体は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルあるいはトリグリセリド、またはリポソームのような合成脂肪酸エステルを含む。水性注入懸濁液は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランのような懸濁液の粘性を増加させる物質を含んでいてもよい。任意に、該懸濁液が、高濃度溶液の調製を可能にするための組成物の可溶性を増加する、適切な安定剤または賦形剤をも含んでいてもよい。

10

【0066】

または、該活性成分が、例えば使用前の滅菌性無発熱物質水といった、適切な媒体を備えた構成のための粉末剤形中であってもよい。

【0067】

該組成物を、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドのような従来の坐薬基剤を含む、坐薬または保持浣腸剤のような直腸組成物中に形成してもよい。

【0068】

さらに上述した剤形の組成物を、持続性薬剤調製液として形成してもよい。そのような長時間作用性剤形を、移植（例えば、皮下または筋肉内）または筋肉内注入によって投与してもよい。こうして、例えば、組成物は、適した複合体または疎水性物質（例えば、許容される油液中の乳剤のような）またはイオン交換樹脂、あるいは、例えば難溶性の塩のような、難溶性の誘導体と一緒に形成してもよい。

20

【0069】

本発明の疎水性組成物のための製薬的担体は、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマー、および水相を含む共溶媒システムである。該共溶媒システムは、VPD共溶媒システムであってよい。VPDは、3% w/vのベンジルアルコール溶液、8% w/vの無極性界面活性剤ポリソルベート80、および65% w/vポリエチレングリコール300の溶液であり、無水エタノール中にて容量増加した。VPD共溶媒システム（VPD：5W）は、水中にてVPDを5%デキストロースで1：1に希釈したものからなる。本共溶媒システムは、疎水性組成物をよく溶解し、それ自体がシステム化された投与での低い毒性を実現する。必然的に、共溶媒システムの比率は、その溶解性および毒性特性の無効化なしに大幅に変更してもよい。さらに、共溶媒組成物の属性は変化しても良い。：例えば、他の低毒性無極性界面活性剤を、ポリソルベート80の代わりに用いてもよく；ポリエチレングリコールの画分サイズを、変更しても良く；生物適合性ポリマーを、ポリエチレングリコール、例えばポリビニルピロリドンに置換してもよく；および他の糖類または多糖を、デキストロースの代わりにしても良い。

30

【0070】

または、疎水性の製薬的組成物の他の配達システムを、用いることができる。リポソームおよび乳剤は、疎水性の薬剤の配達媒体または担体の例としてよく知られている。ジメチルスルホキシドのようなある有機溶媒を通常、より強い毒性を犠牲にするが、用いてもよい。加えて、該組成物を、例えば、治療上の薬剤を含む固形疎水性ポリマーの半透性マトリックスのような継続放出システムを利用して配達してもよい。様々な継続放出マトリックスが確立され、当業者に周知である。継続放出性カプセルは、その化学的性質に依存し、数週間から100日以上期間にて組成物を放出できる。治療薬の化学的性質および生物学的安定性に依存した、タンパク質安定化の付加戦略を採用できる。

40

【0071】

医薬組成物は、安定な固体またはゲル相担体あるいは賦形剤をも包含できる。そのような担体または賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類、スターチ、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールを含むが、それに制限されない。

50

## 【0072】

ヒトH3レラキシンを含む剤形は、単独またはラクトースのような不活性担体との組合せ、あるいは他の製薬的に許容される賦形剤と共に、鼻または肺の吸入エアゾルまたは霧状の溶液として、あるいは吸入のためのミクロ粉末として、呼吸器系器官に投与される。そのような場合、剤形の粒子は、有利に50ミクロン未満の直径、好適には10ミクロン未満の直径を持つことができる。H3レラキシンの投与に適合することができるインスリンのための投与方法を開示している、米国特許番号US5,364,838を参照。

## 【0073】

脱毛症のような疾患の治療のためのH3レラキシンは、(例えば、米国特許番号US4,938,953に開示のある、蛋白質成分の包含に必要な、当業者に周知の方法によって適合した) シャンプーまたは任意に吸収を促進するためにH3レラキシン濃度を増加したゲル(例えば、米国番号08/050,745に開示されている)のような頭皮への使用される剤形の局所投与である。

10

## 【0074】

経口投与にて、組成物は、当業者に周知の製薬的に許容される担体と活性な組成物の組合せにより容易に剤形化することができる。そのような担体は、本発明の組成物を処置される患者による経口摂取のために、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして剤形化することができる。用いる経口のための製薬的調製液は、任意に生じる混合物を挽き、顆粒の混合物を処理し、適切な補助物を加えた後、所望であれば、錠剤または糖衣錠の核を得る固形賦形剤を入手してもよい。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール；例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ポテトデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよび/またはポリビニルピロリドン(PVP)のようなセルロース調合液を含む糖類のような充填剤である；である。所望であれば、崩壊剤は、クロスリンクしたポリビニルピロリドン、寒天またはアルギン酸あるいはアルギン酸ナトリウムのようなその塩を加えることができる。

20

## 【0075】

糖衣剤の核には、適したコーティングを施している。本目的のために、濃縮した糖溶液を、使用し、任意にガムアラビン酸、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタニウム、ラッカー溶液、および適した有機溶媒または溶媒混合液を含むことができる。染料または色素は、識別または活性な組成物投薬量の異なる組合せの特性化のための錠剤または糖衣錠コーティングを加えてもよい。

30

## 【0076】

経口で使用することができる製薬的調製液は、グリセロールまたはソルビトールのようなゼラチンまたは可塑剤で作られた柔軟で密閉したカプセルはもちろん、ゼラチンで作られた押し込み型カプセルを含む。押し込み型カプセルは、ラクトースのような充填剤、デンプンのような接着剤、および/またはタルクまたはステアリン酸マグネシウム、および任意の安定剤のような潤滑剤を備えた混和剤中に活性成分を含むことができる。柔軟なカプセルにて、活性な成分を、脂肪油、流動パラフィン、または液体のポリエチレングリコールのような適切な液体中に懸濁または溶解することができる。さらに、安定剤を加えることができる。すべての経口投与のための剤形は、そのような投薬にふさわしい投与剤形にしなければならない。

40

## 【0077】

吸入による投薬のために、本発明にて使用する組成物は、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスといった、適した高圧ガスの使用と共に、加圧したパックまたは噴霧器からエアゾルスプレー提示の形状にて都合良く配送される。加圧したエアゾル投薬単位の場合は、一定量にするために弁を提供することにより解決できる。カプセルおよびカート

50

リッジ、例えば、吸入器か通気器で使用するためのゼラチンは、組成物の粉末・ミックスおよびラクトースまたはデンプンのような適切な粉末・ベースを含む剤形にすることができる。

#### 【0078】

本発明の様々な態様として、以下に実施例を挙げて詳しく説明するが、それらに限定されるものではない。

#### 【0079】

以下の例にて、ラットは、ヒト脳での発現の位置づけを可能にした、ラット脳における mRNA およびタンパク質レベルでの H3 レラキシン発現を位置づけるための実験モデルとして用いた。この点にて、ラット脳は、ヒト脳の標準的相対的な解剖モデルである (Goto et al (2001) The Journal of Comparative Neurology 438: 86-122)。

#### 【0080】

##### (実施例1)

##### 核酸配列の同定、特性化、精製および操作

組織 RNA / DNA 抽出および RT-PCR - ヒトゲノム DNA は、標準プロトコールを用いてヒト CL より抽出した (Sambrook et al 1989) 分子クローニング中: 実験マニュアル、第2版、Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY)。ヒト CL およびマウス組織を、液体窒素の存在状態にてきれいにさいの目に切断し、直ちに RNA Wiz 試薬 (Ambion Inc., Austin, TX) で均質化し、RNA を製造元の取り扱い説明書に従って抽出した。個々のサンプルからの全 RNA (5 µg) は、逆転写 (RT) 反応に使い、製造元の取り扱い説明書によれば 20 µg 量に Superscript II RT-PCR kit (Gibco-BRL, Rockville, MD) を用いて行った。100ng のプライマーおよび 150ng の cDNA 鋳型を含む 50 µl 反応液を、すべて PCR 反応に利用した。マウス組織を、特異的フォワード [5' TGC GGAGGCTCACGATGGCGC 3'] およびリバーズ [5' GACAGCAGCTTGCAGGCACGG 3'] プライマーを用いて、319 bp の産物の生成によって M3 レラキシン発現の選別をした。マウスレラキシン (M1) 発現は、公開された配列 (Evans et al (1993) J. Mol. Endocrinol. 10, 15-23) に基づく特異的フォワード [5' GTGAATATGCCCGTGAATTGATC3'] およびリバーズ [5' AGCGTCGTATCGAAAGGCTCT 3'] プライマーを用いて、150 bp 産物の生成によって判断した。

#### 【0081】

ヒト CL cDNA は、フォワード 1 [5' ACGTTCAAAGCGTCTCCGTCC 3']、フォワード 2 [5' CGGTGGAGACGATCAGACATC3']、およびリバーズ [5' ATGGCAGGACTGGGGCATTGG 3'] の、H3 レラキシンの特異的プライマーを用いた RT - PCR 反応に使い、フォワード 1 / リバーズおよびフォワード 2 / リバーズのそれぞれで 504 bp および 310 bp の産物を生成した。我々が以下に示す、すべてのプライマーの組合せは、ゲノム DNA の混入を制御するために、それぞれマウスおよびヒトのレラキシン配列にて 1 つのイントロンを交配した。すべての実験にて GAPDH フォワード [5' TGATGACATCAAGAAGGTGG 3'] およびリバーズ [5' TTTCTTAC TCCTTGAGGCC 3'] プライマーによる 246 bp の産物は、質および cDNA の等価ローディングの制御のために分離 PCR 反応にて用いた。RT - PCR による M3 レラキシンの発現は、単に 1 つの代表的な実験が示す結果であるが、少なくとも 2 つの動物から抽出された cDNA 試料にて行った。マウス PCR 反応は、以下の (タッチダウン) アニーリング温度を用いて Perkin Elmer 遺伝子増幅装置にて達成した。: 64 (2 cycles)、63 (2 cycles)、62 (2 cycles)、61 (2 cycles)、60 (32 cycles)。ヒト CL cDNA における H3 レラキシン発現は、以下のアニーリング温度にて RT - PCR によって行った。: 60 (2 cycles)、59 (2 cycles)、58 (2 cycles)、57 (2 cycles)、56 (32 cycles)。PCR 産物のアリコートをし、エチジウムブロマイドで汚染した 2% (w/v) のアガロース・ゲル上で電気泳動にかけ、撮影した。マウス組織試料は、サザンブロット分析のために、Hybond NX 薄膜 (Amersham International, Aylesbury, UK) に転写した。

#### 【0082】

付加的 PCR 反応は、マウス脳およびリバーズ M3 プライマー (上記) および ATG 開始コドンの前からのフォワードプライマー (5' GGG TCGCAGGCATCTCAACTG'3) を用いて、マウス

脳および卵巣 cDNA を用いて行った。結果物は、全長 H3 レラキシンのコーディング配列を含む。PCR は、上記のように行なったが、以下に示すアニーリング温度にて行った。: 60 (2 cycles)、59 (2 cycles)、58 (2 cycles)、57 (2 cycles)、56 (32 cycles)。<sup>32</sup>P - 標識した特異的 H3 レラキシン cDNA プローブを生成するためおよびヒト複合組織分析の後発プローブとして活用するために、RT-PCR は、ヒトゲノム DNA (50 ng) で行った。該 H3 レラキシン遺伝子のエクソン配列の特異的なフォワード (5' CGGATGC AGATGCTGATGAAG 3') およびリバース (5' GTGCCTGAGCCCACAGTGCCT 3') プライマーは、以下のアニーリング温度にて使用した。: 60 (2 cycles)、59 (2 cycles)、58 (2 cycles)、56 (2 cycles)、54 (32 cycles)。これらの産物は、前記のマウス PCR 産物と同様に、2% (w/v) のアガロース・ゲル上で分離した。バンドは、UV ライト下で期待するサイズで検出され (マウス 319 bp、478 bp、ヒト 374 bp)、超清浄™ 15 DNA 精製キット (Geneworks Pty Ltd, Adelaide, Australia) を用い、ゲルから切り出し溶出した。バンドは、該 pGEM-T ベクター (Promega, Madison, WI) にサブクローニングし、その後、多数のサブクローンを、製造元の取り扱い説明書に従って ABI PRISM 377 自動 DNA シークエンサー (Biosystems 提供, Melbourne, Australia) を用いて両鎖をシークエンスした。

10

20

30

40

50

#### 【0083】

サザンブロット解析 - 膜上の PCR 産物は、M1 レラキシン (5' CAAGCAGAGCTGGCTCCTCC TGGCT CAAAGCCAAATCTTC 3') および M3 レラキシン (5' AATTTGGCTCTTGCTACAGCCCCACTCG CAG CAACTGCT 3') cDNA 配列に対して特異的内在性オリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼおよび [<sup>32</sup>P] ATP を用いて標識した。ハイブリダイゼーションを、5 × SSC (1 × SSC; 0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7)、5 × Denhardt's、1% SDS および 100 μg / ml の超音波分解したニシン精子中で 55 にて一晩行った。メンブレンは、室温で 24 時間 BioMAX MR フィルム (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) に感光する前に、室温で 2 × SSC、0.2% SDS 中で 5 分間 3 回洗浄後、0.1 × SSC、0.1% SDS にて 55 で 30 分洗浄した。

#### 【0084】

ノーザンブロット解析 - さらに M3 レラキシン mRNA の発現を検討し、心臓、脳、肺、オスマウスの胸腺および脾臓、および卵巣、子宮内膜、子宮筋層、メスマウスの子宮頸管および膈からの全 RNA (5 - 25 μg) を、妊娠 7.5 日、10.5 日および 18.5 日から集め、標準化 MOPS / ホルムアルデヒドゲル上で泳動した。その後、RNA を、最適化 Hybond-NX 膜にトランスファーし、M3 レラキシンの特異的プライマー (上記参照) によって生じた、319 bp の PCR 産物に対応する <sup>32</sup>P - 標識したプローブを備えた M3 レラキシン mRNA のプローブとした。この産物を、特異的リバースプライマー (上記) および、前記の (31) に開示されている T7 ポリメラーゼを用いて [<sup>32</sup>P] dCTP にて標識した。膜を、0.25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.2、1mM EDTA、20% SDS 中にて 65 で一晩ハイブリダイズ後、室温で 2 × SSC、0.1% SDS にて 5 分間 3 回洗浄し、最後に 0.1 × SSC、0.1% SDS 中にて 65 で 30 分間洗浄した。膜を、Fuji X 2000 Phosphorimager (Fuji Photo Company, Japan) で分析する前に、室温で 48 時間 phosphorimager プレートにまず感光し、その後 80 で Hyperscreen (Amersham Pharmacia, Sydney, Australia) と共に BioMAX MS フィルム (Integrated Sciences, Melbourne, Australia) に感光した。個々の実験にて、脳、脾臓、肝臓および精巣からの全 RNA (200 μg) は、mRNA 精製キット (Amersham Pharmacia) を用いて、ポリ A - RNA を精製し、上述のようにノーザンブロットを行った。ヒト複合組織発現アレイ (CLONTECH laboratories, Palo Alto, CA) は、製造元の奨励する <sup>32</sup>P - 標識した H3 レラキシン特異的プローブをハイブリダイズした。ゲノム DNA から分離した H3 レラキシン配列の 374 bp 断片は、H3 レラキシン特異的リバースプライマー (上述の)、および T7 ポリメラーゼ (Bathgate et al (1999) Biol. Reprod. 61, 1090-1098) を用いて [<sup>32</sup>P] dCTP で標識した。膜を、上記の phosphorimager plate および BioMAX film にて感光した。

#### 【0085】

in situ ハイブリダイゼーション組織化学 - 冠状断片 (14 μm) を、低温保持装置上

にて16で切断し、シランコートしたスライド上にマウントした。断片を、10分間クロロホルム中で脱脂し、すすぎ、4にて100%エタノール中に保存した。M3レラキシンmRNA配列の3つのオリゴヌクレオチド(39mer) [5' GGTGGTCTGTATTG GCTTCTCCATCAGCGAAGAAGTCCC3]; [5' AATTTGGCTCTTGCTACAGCCCCACTC GCACGAACTGCT 3'] および [5' TAAGGAGACAGTGGACCCCTTGGTGCCTCGCCTGT AGGA 3']、および既知のM1レラキシン配列 (Evans et al (1993) J. Mol. Endocrinol. 10, 15-23) の3つのオリゴヌクレオチド [5' GCACATCCGAATGAATCCGTCCATCCACTCCTCCGAGAC3]、[5' CAAGCAGAGCTGGCTCCTCCTGGCTCAAAGCCAATCTTC 3'] および [5' GTTGTAGCTCTGGGAGCGAGGCCTGAGCCTCAGACAGTA 3'] は、商業的に調製されている (Geneworks Pty Ltd.)。プローブを、末端デオキシヌクレオチド転移酵素を用いて、 $1 \times 10^9$  d.p.m./ $\mu$ gの特異的活性のために [ $^{-32}$ S] dATP (1200Ci/mmol; NEN, A 10 MRAD-Biotech, Melbourne, Australia) で標識した (Roche Diagnostics; Wisden et al (1994) 脳の in situ ハイブリダイゼーションプロトコル中にて (Wisden, W. and Morris, B. j. eds), pp 9-34, Academic Press, London)。遺伝子配列データベース (Celera, EMBL and Genbank; NCBI/NIH Blast Service) に対して用いた配列のスクリーニングでは、適当なM1およびM3レラキシンmRNAとのみホモロジーを示した。

#### 【0086】

断片は、50%ホルムアルデヒド、 $4 \times$  SSC、10%デキストラン硫酸塩および0.2Mジチオスレイトールを含むハイブリダイゼーションバッファー中で複合 $^{35}$ S-標識したプローブ (各30fmolプローブ/スライド) で42にて一晩インキュベートした。スライドを、55で1時間 $1 \times$  SSC中にて洗浄し、0.1 $\times$  SSC中にてすすぎ、その後 20 Kodak BioMAX MRに10日間並べ乾燥した。

#### 【0087】

ハイブリダイゼーションの信頼性は、ハイブリダイゼーションバッファーに対して無標識のプローブの100倍過剰の付加によってすべての領域で確実にシグナルをブロックすることができるという実証によって確認し、非特異性またはバックグラウンドハイブリダイゼーション (データ掲載せず) に相当するものをのぞいた。さらに、3つのオリゴヌクレオチドプローブを、M3レラキシン遺伝子配列の非重複部位であり、完全に異なるものを使用した。

#### 【0088】

ヒトレラキシン (H3) 研究:

固相合成 - H3遺伝子にコードされた推定ペプチド配列を、シグナルペプチドおよびB鎖、およびH3レラキシンプロホルモンのB/CおよびC/A鎖結合間の推定シグナルペプチドおよび蛋白質分解酵素切断部位に基づく固相合成方法によって作製した (詳細な結果を参照)。簡易な合成として、我々は、そのカルボキシル末端アミド誘導体として該AおよびBペプチドの調製を選択した。選択的S-保護したAおよびB鎖は、前記Dawson et al (1999) J. Pept. Res. 53, 542-547の連続フローFmoc固相法によって0.1mmol規模で合成した。選択的S-保護は、以下のシステイン残基に対して行った。: A<sup>10,15</sup> および B<sup>22</sup> のトリチル (Trt)、A<sup>24</sup> の第3-ブチル、および A<sup>11</sup> および B<sup>10</sup> のアセトアミドメチル (Acm) (アミノ酸残基の番号に関しては図2Aを参照)。

#### 【0089】

合成の完了にて、S-保護したAおよびB鎖を、固相担体から離し、同時に側鎖を、捕捉剤の存在下でTFAを処理することによって脱保護した。選択的ジスルフィド結合形成は、特にMaruyama et al (1992) J. Prot. Claim. 11, 1-12のボンビキシンの合成に記載のするように成した。

#### 【0090】

ペプチド特性化 - ペプチドは、GBC自動分析機 (Melbourne, Australia) にて24時間酸性水解物の複製アミノ酸分析によって測定した。MALDITOF質量分析 (MS) は、遅延イオン抽出を備えたBruker Biflex 機器 (Bremen, Germany) 上で19.5kvで線状モードにて行った。

#### 【0091】

他のレラキシンおよびインスリンペプチド - ヒトINSL3を、ヒツジINSL3 (Dawson e 50

et al (1999) J. Pept. Res. 53,542-547)に使用する方法と同様の方法で合成し、上記に概説したようなMSおよびアミノ酸分析にて特性化した。H 1 レラキシンは、前記のように合成し(Wade et al (1996)Biomed. Pept. Prot. Nucl. Acids 2,27-32)、合成 H 2 レラキシンは、Connetics Corporation (Palo Alto, CA)から頂き、および牛インスリンは、Roche Diagnostics (Sydney, Australia)の製品を購入した。

#### 【 0 0 9 2 】

THP - 1 細胞生物アッセイ - ヒト単球性細胞株 (THP - 1) にて cAMP 生産を誘導する H 3 レラキシンの能力は、以下の修飾を持ち、Parseil と同僚の方法による (Parseil et al (1996) J. Biol. Chem. 271,27936-27941) H 1 および H 2 レラキシンと同等であった。 ; トリパンブルーを用いた生存テストした THP-1 細胞を、培地に懸濁し、60,000 細胞/ウェル濃度で 96 ウェルプレートに移植した。ペプチド (H 1、H 2、H 3 レラキシン、ヒト INS L 3 および牛インスリン) を、RPMI 培地中に 1 μM フォルスコリンおよび 50 μM イソブチルメチルキサンチン (IBMX) と共にウェルに付加し、37 °C で 30 分間インキュベートした。その後プレートを、短く遠心し、培地を取り除き、リシスバッファーに細胞を懸濁した。cAMP レベルは、cAMP Biotrak EIA システム (Amersham International, Aylesbury, UK) を用いて溶解液中で測定した。結果を、H2 レラキシンで達成された cAMP の最大刺激との比較での最大レラキシン応答 (%) として示した。データを、4 通り行った 3 つの実験の平均値 ± SEM で表わし、PRISM (Graphpad Inc., San Diego, CA) を使用してプロットした。

10

#### 【 0 0 9 3 】

THP - 1 細胞結合アッセイ - THP - 1 細胞を、スピンドウンし、結合バッファー (20mM HEPES、50mM NaCl、1.5mM CaCl<sub>2</sub>、1% BSA、0.1mg/ml lysine、0.01% NaN<sub>4</sub>、pH 7.5) (Parseil et al (1996) J. Biol. Chem. 271,27936-27941) 中に、96 ウェルプレートに 2 × 10<sup>6</sup> 細胞/ウェルになるように再懸濁した。細胞を、無標識の H 1、H 2 および H 3 レラキシン (100pM ~ 30nM) の増加濃度の非存在下または存在下にて、25 °C で 90 分間、<sup>32</sup>P - 標識した H 2 (B 3 3) レラキシン (100 pM: 前記 (Tan et al (1999) Br. J. Pharmacol. 127,91-98) のように標識したもの) と結合バッファー中にインキュベートした。非特異的な結合は、H 2 レラキシン (1 μM) を示す。細胞を、パックード 96 ウェルプレート細胞ハーベスタ (Packard 96 well plate cell harvester) および 0.5% のポリエチレンアミンで処理したワットマン GF/C ガラスファイバーフィルター (Whatman GF/C glass fibre filters) を用いて集めた。フィルターを、処理済みの結合バッファー (20mM HEPES、50mM NaCl、1.5mM CaCl<sub>2</sub>) で 3 回洗浄し、37 °C オープンで乾燥し、液体シンチレーション分光測定法 (TopCount, Canberra Packard, Australia) にて放射活性を測定した。

20

30

#### 【 0 0 9 4 】

抗体交差反応 - H 3 レラキシンを認識するよく特性化したヒトレラキシン抗体の能力は、ラジオイミノアッセイによって H 1 および H 2 レラキシンと比較してテストした。簡単には、ヤギ抗 H 2 レラキシン (Lucas et al (1989) J. Endocrinol. 120, 449-57) を、4 °C で一晩、0.05 M 炭酸ナトリウムバッファーで 1:1000 希釈し、96 ウェル ELISA プレート (使い捨ての製品, Adelaide, Australia) 上にコートした。50 μl の分析バッファー (1% BSA を含む PBS-T) 中に溶解したヒトレラキシンペプチドの PBS - T (リン酸緩衝生理食塩水 ; 0.05% Tween 20、pH 7.4) 希釈液にて 2 回洗浄後、前記に 50 μl の分析バッファー中で 50,000cpm の <sup>125</sup>I - 標識したレラキシンを共に加えた。H 2 レラキシンは、<sup>125</sup>I - 標識し、H P L C (Palejwala et al (1998) J. Endocrinology 139,12018-1212) によって精製した。4 °C のプレートで一晩インキュベーション後、PBS-T で 2 回洗浄した。該抗体結合 <sup>125</sup>I - 標識した H 2 レラキシンを、1M NaOH の付加によって集め、Packard 5010 gamma counter (Canberra Packard) で計測するためにチューブに注いだ。実験は、少なくとも 2 度行い、同様の結果を得た。データは、3 通り行われた 1 つの代表的な実験の平均値 ± SEM として示し、PRISM を用いて示した。

40

#### 【 0 0 9 5 】

50

### マウスレラキシン (M3) 研究 :

動物 - これらの研究に使用したすべてのオスおよびメスマウスは、年齢を揃え、同じ系統 (C57BLK6J) のものを用いた。動物は、制御した環境にて飼育し、げっ歯動物実験のえさ (Barastock Stockfeeds, Melbourne, Australia) および水への到達を備えた 14 時間の明期、10 時間の暗期管理を維持した。メスマウス (3.5 月齢) を、交尾させ、膣のプラグの識別から妊娠時期を計った。妊娠 7.5 日、10.5 日および 18.5 日にて、マウスを組織収集のために犠牲にした。組織を、非妊娠のオスおよびメスマウス (4 月齢) から集めた。これらの実験は、科学的な目的のための実験動物の世話および方法に関するオーストラリア規約に従って、ハワード・フロリー動物研究倫理委員会 (Howard Florey Institute's Animal Experimental Ethics Committee) によって承認された。

10

#### 【0096】

組織収集 - 動物を、イソフルオレンの薬剤過剰摂取で殺した (Abbott Australasia Pty Ltd, Sydney, Australia)。脳、心臓、胸腺、脾臓、肺、肝臓、腎臓、皮膚および腸を、メスマウスの生殖器 (卵巣、子宮内膜、子宮筋層、頸部、膣; おのおのの妊娠期にて  $n = 2$ ) およびオスマウスの生殖器 (精巣、副睾丸、前立腺;  $n = 3$ ) と一緒に集めた。追加した動物から、オスの脳 ( $n = 3$ ) を、視床下部、皮質、海馬、視床、骨髄および小脳を含む特定領域の解剖を行い、即時に液体窒素中に置き、RNA 調製のために使用するまで - 80℃ にて貯蔵した。メスの脳 ( $n = 3$ ) を集め、*in situ* ハイブリダイゼーション・組織化学のために即時にドライアイスで凍結した (Burazin et al (2001) J. Neuroendocrinol. 13 358-370)。子宮外妊娠の外科手術を受けている妊娠初期の女性のヒト CL は、ハワード・フロリー人間倫理委員会 (Howard Florey Institute Human Ethics Committee) の承認および患者の書面による承諾を以て利用した。

20

#### 【0097】

(実施例 2)

#### ヒトおよびマウスのヒト H3 レラキシン遺伝子

ヒトおよびマウスの H3 レラキシン配列は共に、機能的遺伝子の典型的な特徴を含む (図 1 A は、ヒト; 図 1 B は、マウス)。それぞれ、ヒトおよびマウス各々の推定 ATG 開始コドンの上流 65、および 59 bp に転写の開始のための推定 TATA ボックスを含む。ポリアデニル化シグナルは、ヒトおよびマウス遺伝子それぞれのインフレーム TAG 停止コドンから 582 および 448 bp 下流部位にて、両遺伝子の 3' 非翻訳領域中存在する。シグナルイントロンは、他のレラキシンおよびインスリンファミリーメンバーのそれと同様の位置に対応する、両遺伝子の配列中の同一部位にてコーディング部位に挿入する (Hudson et al (1983) Nature 301, 628-631; Evans et al (1993) J. Mol. Endocrinol. 10, 15-23; Ivell, R (1997) Rev. Reprod. 2, 133-138)。H3 レラキシン遺伝子は、第 19 番染色体上の 19p13.3 に位置し、該マウスの遺伝子は、第 8 番染色体の 8C2 に位置している。H3 および M3 レラキシン遺伝子の派生コーディング部位は、それぞれ 142 および 141 アミノ酸であった。

30

#### 【0098】

ジスルフィド結合形成に必要なシステイン残基は、システイン結合のまわりの柔軟性に必要な保存されたグリシン残基と共に正確な位置に保持されている (Biillesbach et al (2000) Int. J. Pept. Prot. Res. 46, 238-243)。重要なことに、B 鎖 (R-X-X-X-R-X-X-I) の核中に結合するレラキシン受容体にとって不可欠であると明らかになった残基 (Biillesbach et al (2000) J. Biol. Chem. 275, 35276-35280) は、ヒトおよびマウスの両方に保持されている。従って、ヒトの配列は直接アミノ酸相同性上の hINSL5 ペプチド配列に最も密接に似ているが、この結合モチーフの存在が、ペプチドがレラキシンペプチドにより似ていることを示唆する。面白いことに、M3 レラキシン A 鎖は、既特性化された M1 レラキシン配列が、最終システイン残基の前のエクストラチロシン残基を含むような、ファミリーメンバーのシステイン・パターンに一致する (Fig. 2A)。

40

#### 【0099】

該 H3 (ヒト H3) および M3 (マウス「3」レラキシン) 配列は、核酸レベルでのコ

50



ーディング部位にて70%以上の相同性を共有している。しかしながら、相同性は、派生アミノ酸配列にて最も著しい。両派生プロ-ホルモン配列は、両ヒトおよびマウスペプチド中のアラニンおよびアルギニン間の同一部位で開裂するようなATG開始コドンの後方に典型的なシグナル配列を含む(Nielsen et al (1997) Prot. Engineer. 10,1-6)。レラキシシンファミリーの他のメンバーと強力に共に発見されたB/C連結部の基本アミノ酸のアルギニン-アルギニンペアは、トリプトファンおよびアルギニン間での開裂を明らかにしている。同様に、C/A連結部の開裂は、これが弱いフリン(プロタンパクコンバーターゼ)分裂サイト(Nakayama, K. (1997) Biochem. J. 327,625-635)に相当するような、図1Aおよび図1Bに示したようなアルギニンおよびアスパルギン酸間で最もよく起こる可能性がある。従って、両H3およびM3レラキシシンは、27アミノ酸のB鎖、66アミノ酸のC-ペプチドおよび24アミノ酸のA鎖を含むと考えられる。

10

#### 【0100】

H1、H2およびM1レラキシシンとH3およびM3レラキシシンのAおよびB鎖配列の比較を図2Aに概説する。3つの変異体が保存されている、M3およびH3配列間の両AおよびB鎖にて2つのアミノ酸の相違しかない。対して、M1およびH2レラキシシン間の相同性は、AおよびB鎖それぞれにて、42%および45%しかない。さらに、B鎖の重要な核成分およびA鎖の重要な構成成分以外に、H2およびH3レラキシシン間、およびM1およびM3レラキシシン間ではほとんど相同性がない。興味深いことに、H3およびM3レラキシシンは、他のインスリン/レラキシシンファミリーメンバーのCペプチドドメインの相同性は20%未満であることと比較すると、この部位の高い相同性を示す(73%)。H3およびM3レラキシシンのCペプチド全長は、それぞれ65および66アミノ酸であり、他のレラキシシンのそれと比べて非常に短い(H1およびH2では102アミノ酸、M1レラキシシンでは99アミノ酸)。Cペプチド鎖全長および配列相同性は、INSL5 (24%)と最も類似している。

20

#### 【0101】

2つの遺伝子の全長アミノ酸配列は、インスリン/レラキシシンファミリーおよび作製した系統発生樹の他のメンバーと並べた(図2B)。さらに、H3およびM3レラキシシン配列は、進化の初期に他のレラキシシンから分岐したこれらの特定のレラキシシンの進化を示し、別系統下に分類した。これは、本分析にてH3レラキシシンと最も近い主要構造の類似を共有する、INSL5の事例でもある。

30

#### 【0102】

(実施例3)

#### ペプチド合成

H3レラキシシンは、低収率での固相合成によって調製した(0.7%)。MALDITOF MSは、5,494.7のMH<sup>+</sup>のシグナル産物を示した(理論価値: 5,497.5)。アミノ酸分析においても、その正確な組成物を確認した。

#### 【0103】

#### ヒトレラキシシンH3 [hRIx-3 A(1-24) アミド-B (1-27) アミド]の化学合成

分離したH3レラキシシンペプチド鎖のアミノ酸配列に相当する、選択的S-保護したAおよびB鎖は、Atherton, E and Sheppard, RC. (固相ペプチド合成。IRL Press at Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 1989)に記載のある一般的な手法を用いた連続フロ-型9-フルオレニルメトキシカルボニル固相合成法によって合成した(Fmoc)。両ペプチドを、Fmocペプチドアミド連結ポリエチレングリコールポリスチレン(Fmoc-PAL-PEG-PS)支持体(Biosystems提供)を用いて、ペプチド-カルボキシル末端アミドとして0.1 mmol規模で調製した。A鎖会合のために、Fmoc-アミノ酸の4倍過剰量を(Auspep, Melbourne, Australia)、ジメチルホルムアミド(DMF)中にて1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)によって活性化し、B鎖合成の間それぞれの残基を、DMF中にて2-(1H-ベンゾトラゾール-1-yl)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)およびジイソプロピルエチルアミン(DIEA)によって活性化した。両鎖合成のためのN-Fmoc脱保護は、DMF中にて20%のピペリジンと

40

50

共に行った。カップリングは、ダブルカップリングを除き一般に30分間行い、A鎖残基のSer<sup>7, 8, 21</sup>およびすべてのシステイン、およびB鎖残基のArg<sup>1, 12, 16</sup>、Ala<sup>2, 3, 17</sup>およびCys<sup>10</sup>のダブルカップリングのための時間を拡張した。側鎖保護は、第3ブチルエステルおよびAsp、Glu、ThrおよびSerのためのエーテル、LysおよびTrpのためのプトキシカルボニル(Boc)、Argのための2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル基(Pbf)およびB鎖Gly<sup>11</sup>のためのアミド結合保護N-(2-Fmoc-オキシ-4-メトキシベンジル)[FmocHmb]によって行った。選択的S-保護は、以下のシステイン残基のために行った。: A鎖中のCys<sup>10, 15</sup>のトリチル(Trt)、およびB鎖中のCys<sup>22</sup>、A鎖中のCys<sup>24</sup>第4-ブチル(tBu)、およびA鎖Cys<sup>11</sup>およびB鎖Cys<sup>10</sup>のアセトアミドメチル(Acm)である。

【0104】

10

(i) ヒトレキシシンH3、A鎖[Cys<sup>11</sup>(Acm), Cys<sup>24</sup>(tBu)](1-24)アミドの合成

[1]

合成の組成物にて、チオールの急冷を助長するために、保護したA鎖樹脂を、95%トリフルオロ酢酸(TFA)/2.5%エタンジチオール(EDT)/2.5%水に4滴のトリエチルシランを加えたものと2.5時間室温で処理した。TFAを、窒素気流下で最小容量になるまで除き、冷却したジエチルエーテルから2度沈殿した。その後、沈殿物を0.1%TFA溶液に溶解し、凍結乾燥した。該天然のS-縮小した[チオール-Cys<sup>10, 15</sup>, Cys<sup>11</sup>(Acm), Cys<sup>24</sup>(t-Bu)]A鎖を、室温で4時間0.1M Gly-NaOH, pH 8.3中にて直接空気酸化した。分析的逆過程高性能液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)モニタリングで、分子内ジスルフィド結合構成の完全性を確認し、その後きれいなTFAを数滴加え、粗酸化した物質を直接凍結乾燥した。

20

【0105】

(ii) ヒトレキシシンH3、B鎖[Cys<sup>10</sup>(Acm)](1-27)アミドの合成 [2]

合成の組成物にて、チオールの急冷を助長するために、保護したB鎖樹脂を、82.5%TFA/5%フェノール/5%水/5%チオアニソール/2.5%エタンジチオールに4滴のトリエチルシランを加えたもので2.5時間室温で処理した。TFAを、窒素気流下で最小容量になるまで除き、冷却したジエチルエーテルから2度沈殿した。その後、沈殿物を0.1%TFA溶液に溶解し、凍結乾燥した。その後、該天然のB鎖を、以下に記載のようにRP-HPLCによって精製した。

【0106】

(iii) ヒトレキシシンH3、A鎖[Cys<sup>11</sup>(Acm), Cys<sup>24</sup>(Pyr)](1-24)アミドの合成 [3]

30

ペプチド1の25mg(9.65μmol)および2,2'-ジピリジルジスルフィド(DPDS)の35mg(158.86μmol)を、4.5mlのTFAおよび0.5mlのチオアニソール中に共に溶解し、その後生じた溶液を冷却した。これに、5mlのトリフルオロメタン硫酸(TFMSA)/TFA(1:5 v/v)を加え、全混合物を30分間0℃以下にて攪拌しておいた。該[Cys<sup>11</sup>(Acm), Cys<sup>24</sup>(Pyr)]A鎖アミドペプチドを、冷エーテルから沈殿し、その後、遠心して得た該沈殿物を、6Mグアニン塩酸塩(GdHCl) pH 8.0に懸濁し、RP-HPLCによって精製した(生成ペプチド3:4%)。(RP-HPLC精製に代わる方策として、ペプチド3を、20%酢酸溶液中でセファデックスG-25ゲルろ過カラム上にて脱塩した。)

【0107】

(iv) ヒトレキシシンH3、A[Cys<sup>11</sup>(Acm)](1-24)アミド-B[Cys<sup>10</sup>(Acm)](1-27)アミドの合成 [4]

40

精製したA鎖ペプチド3(1.0mg, 0.38μmol)および精製したB鎖ペプチド2(1.2mg, 0.38μmol)を、それぞれ1.0mlおよび0.5mlの0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>に別々に溶解した。その後、該B鎖溶液にA鎖をゆっくり加え、反応混合物を室温で30分間強力に攪拌した。溶液を、詳細を以下に示すように0.5mlの氷酢酸で酸性化し、続いてRP-HPLCを行い、ビスジスルフィド結合鎖結合産物を分離した。(RP-HPLC精製に代わる方策として、生じたA/B産物であるペプチド4を、20%酢酸溶液中でセファデックスG-25ゲルろ過カラム上にて脱塩した。)

【0108】

(B鎖可溶性を高める、鎖組合せのための代替方法は、以下のとおりである: ペプチド

50

3 および精製した [Cys<sup>10</sup> (Acm) ] B 鎖をそれぞれ 8M GdHCl、pH 4.5 溶液中に 1.0 ml/mg の濃度にて溶解した。B 鎖溶液に A 鎖をゆっくり加え、反応混合物を 37 で 24 時間強力に攪拌した。) )

【 0 1 0 9 】

(v) ヒトレキシシン H 3 [hRlx-3A(1-24)アミド-B(1-27) アミドの合成

精製した 4 つのペプチドすべてを、第 3 および最後のジスルフィド結合を形成するために使用した (100% 回収を仮定し、0.39  $\mu$ mol と予測した)。ペプチドを、80mM HCl および酢酸の溶液中に溶解した。その後、95% 酢酸溶液中の 20mM ヨウ素に滴下し加えた (Acm 群に対してヨウ素の 25 倍量)。該反応は、過酸化物を 20mM のアスコルビン酸水溶液で急冷後、室温にて暗中で 1 時間行った。レキシシンの精製は、RP-HPLC によって行い、ペプチド 3 開始物質と比較して 0.74% の最終産物のを得た。

10

【 0 1 1 0 】

精製

分離した天然の鎖および中間ペプチドは、モデル 996 フォトダイオード配列検知器 (model 996 photodiode array detector) に関連したウォーター 600 多溶解性配達システム (Waters 600 multisolvent delivery system) を使用し、RP-HPLC によって精製した。C<sub>4</sub> シリカゲルが詰まった 10 x 250mm Vydac 218 TP カラム (330A 穴サイズ, 10  $\mu$ m 粒子サイズ) を用いた。ペプチドは、線形勾配モード中に (A) 0.1% TFA (v/v) 溶液および (B) アセトニトリル (v/v) 中の 0.1% TFA の溶解システムで溶出した (25-50% B 30 分以上)。所望画分を、マトリックス - 支持したレーザー脱着電離質量分析 (MALDI-TOF MS) によって収集および同定し、凍結乾燥した。

20

【 0 1 1 1 】

(ペプチド特性)

ペプチド定量を、GBC 自動分析機 (Melbourne, Aust) にて 24 時間の酸加水分解物の複製アミノ酸分析によって行った。MALDI TOF MS は、遅延イオン抽出を備えた Bruker Biflex 機器 (Bremen, Germany) にて 19.5kv の線状モードで行った。

【 0 1 1 2 】

(実施例 4)

レキシシン生物活性

合成 H 3 レキシシンのレキシシン生物活性の証明 - 合成 H 3 レキシシン C 末端アミド誘導体を、レキシシン受容体発現細胞株 THP-1 (Parsell et al (1996) J. Biol. Chem. 271, 27936-27941) にてレキシシン生物活性の検討をした。H 2 レキシシンは、これらの細胞からの cAMP 生産にて濃度依存的に生産増加した (図 3A)。合成 H 3 レキシシンもまた、H 1 ( $pEC_{50} = 9.10 \pm 0.05$  [0.794 nM] ; n=3) および H 2 ( $pEC_{50} = 9.67 \pm 0.11$  [0.214 nM] ; n=3) レキシシンよりわずかに低い活性ではあるが、cAMP ( $pEC_{50} = 8.68 \pm 0.08$  [2.11 nM] ; n=3) の濃度依存的に刺激増加した。この応答の特異性を、1  $\mu$ M 以内の濃度上昇にて cAMP 応答を刺激するためのウシインスリン (bINSL)、またはヒトインスリン 3 (hINSL3) の不活化により証明した。

30

【 0 1 1 3 】

合成 H 3 レキシシンを、親和性の H 2 レキシシン ( $pK_i = 8.74 \pm 0.11$ ; n = 11) および H 1 レキシシン ( $pK_i = 8.9 \pm 0.11$ ; n = 7) のそれより低い ( $pK_i = 7.5 \pm 0.16$  ; n = 3)、THP-1 細胞のレキシシン結合部位へ結合する <sup>33</sup>P - 標識した H 2 レキシシンの競合能力の検討も行った (図 3B)。しかしながら、これらのデータは、合成 H 3 レキシシンペプチドの結合、およびヒトレキシシン受容体の刺激によるセカンドメッセンジャー応答を誘導するという決定的な証拠を提供する。

40

【 0 1 1 4 】

H 3 レキシシンを認識する、よく特性化した H 2 レキシシン抗体の能力 - H 1 および H 3 レキシシンを認識する、よく特性化した抗 - H 2 レキシシン抗体の能力を、放射免疫測定によって検討した。図 4 に示したように、H 2 レキシシンは、高い特異性を備えた抗 H 2 レキシシン抗体に結合する <sup>125</sup>I - 標識した H 2 レキシシンに置換することができる

50

。対して、H 1 および H 3 レラキシンは、置換された<sup>1 2 5</sup> I - 標識した H 2 レラキシン結合の弱い置換能力によって決定されるような抗血清を備えた弱い交叉反応を示した。さらに、置換曲線の非類似は、すべての抗体エピトープが 2 つのペプチドによって認識されるとは限らないことを示す。

#### 【 0 1 1 5 】

##### ( 実施例 5 )

##### H 3 レラキシンの発現

マウスでのレラキシン遺伝子の発現 - M 3 レラキシン m R N A の発現を、RT-PCR産物のサザンブロッティングを用いて M 1 レラキシン m R N A 発現と比較した。本技術は単に半量的であるが、我々に M 1 レラキシンと比較して、M 3 レラキシン発現の潜在部位を決定10  
することを可能にした。発現実験および複製実験の結果が、同じ結果であった。M 3 レラキシン m R N A は、M 1 レラキシンが発見された C57BLK6J マウスの多くの組織で発現しているが、2 つのマウスレラキシン間の発現パターンは、違っている。オスの非再生組織にて M 1 レラキシン発現の最も高いレベルは、脳にて見られ、胸腺、心臓および腎臓で中程度のレベル、肺、脾臓および皮膚でより低いレベルの発現が見られ、腸での発現は見られなかった。興味深いことに、M 3 レラキシン発現は、脳で最も高いレベルで検知されたが、胸腺、肺および脾臓で中程度のレベルが発現し、心臓および肝臓ではほんの低レベルのみであり、かつ腎臓、皮膚および腸にて全く発現しない。メスのマウスでは、これらの組織での両遺伝子の発現のほぼ同じパターンを示した。オスの再生組織にて M 3 レラキシン20  
m R N A は、精巣でのみ著しく発現するが、M 1 レラキシン m R N A は、精巣、副睾丸および前立腺にて検知した。両レラキシンとも、乳腺、非妊娠、妊娠および授乳中のマウスの卵巣、および妊娠マウスの子宮内膜および子宮筋層中の女性生殖器に検出した。M 1 レラキシン発現が、非妊娠および授乳中のマウスからの卵巣と比較して妊娠後期の卵巣においてより高かったが、M 3 レラキシン m R N A のかなりの発現を、すべての卵巣の段階にて観察した。M 3 レラキシン m R N A の高レベルが、脳にて検出され、さらにこの組織の詳しい分析が、両レラキシンがいくつかの異なる部位で発現することを明らかにした。一方、M 1 レラキシン m R N A は、常に視床下部、海馬、皮質、視床、脳橋/骨髄および小脳に発現し、M 3 レラキシン m R N A は、視床および脳橋/骨髄に高発現することが明らかとなり、よって 2 つのレラキシンは、マウスにて別の役割を果たすかもしれないことが示唆された。30

#### 【 0 1 1 6 】

ノーザン解析 - M 3 レラキシン m R N A が R T - P C R およびサザンブロット分析によって明確に同定された組織を、ノーザンブロットによりさらに検討した。心臓、脳、肺、胸腺、脾臓、卵巣、子宮内膜、子宮筋層、子宮頸部および膣からの全 R N A ( 5 - 25 μ g ) を、<sup>3 2</sup> P - 標識した M 3 レラキシン特異的プローブでまず調査したが、非特異的なハイブリダイジングバンドが様々な組織にて検出される。その後、脳 ( 15 μ g ) 、脾臓 ( 5 μ g ) 、肝臓 ( 5 μ g ) および睾丸 ( 25 μ g ) からのポリ A - R N A を分析し、R T - P C R およびサザンブロット分析によって検出した M 3 レラキシン発現と合わせて、特定の ~ 1 . 2 k b のハイブリダイジングバンドを脳にて同定した。得た転写産物サイズは、M 3 レラキシン転写配列 ( ~ 1 k b ) とポリ A テイル ( ~ 2 0 0 b p ) に基づく、予想サイズと一致した。40

#### 【 0 1 1 7 】

ヒト組織における H 3 レラキシンの発現 - Clonetechn の複合組織発現アレイを、ヒト組織にて H 3 レラキシンの発現の検討部位に用いた。該アレイは、8 つの異なる対照 R N A および D N A を含む 7 6 の異なるヒト組織からの標準化ポリ A - R N A ( 50 - 750 n g ) を含み、ナイロン膜状にスポットした。該アレイでは、ゲノム D N A から調製した H 3 レラキシン転写産物の 3 ' 末端からの<sup>3 2</sup> P - 標識した 3 7 4 b p の H 3 レラキシン特異的遺伝子断片で調査した。この D N A 断片は、両ストランド上に配列していた。非常に弱いハイブリダイジングシグナルが、脾臓、胸腺、周辺血中白血球、リンパ節および精巣にて観察されたが、これらのシグナルはバックグラウンドよりかるうじて認識可能であり、よってデータは示さない。R T - P C R もまた、H 3 レラキシン配列に基づく 2 つの異なるプラ50

イマーの組合せを用いて、妊娠初期からのヒトC Lにて行った。H 2 レラキシンおよびG A P D Hの転写産物が、容易に増幅した(データ非表示)ようなP C R条件の変更後でさえ、任意のPCR反応にて特異的なバンドは観察されず、cDNAの完全性を確認した。

#### 【0118】

マウス脳におけるレラキシンm R N Aの分布 - 脳にてR T - P C RおよびノーザンブロットによってM 3 レラキシンm R N Aの高レベルな発現が検出され、その分布を、インサイチュウハイブリダイゼーション組織化学(Burazin et al (2001) J Neuroendocrinol. 13, 358-370)を用いて、さらに検討した。多数の特異的<sup>35</sup>S 標識したオリゴヌクレオチドプローブを、メスC57BLK6Jマウス脳の上下全体にわたるM 3 レラキシンm R N Aの細胞分布を決定するために用いた。M 3 レラキシンm R N Aは、脳核では全体にわたって検出されなかったが、脳橋/骨髄にて最も強く検出された(図7)。M 3 レラキシンm R N Aの最も強いレベルが、背側被蓋交叉の核の腹内側縁部に存在した。加えて、M 3 レラキシンm R N Aは、海馬および嗅覚部位にても、はるかに低いレベルだが検知した。M 3 レラキシンをコードするm R N Aの低レベルを含む脳部位は、インサイチュウハイブリダイゼーション組織化学に関連した感度制限により本研究にて検知されなかったかもしれない。M 1 レラキシンm R N Aが、背側被蓋交叉核の腹内側縁部に検出されなかったため、脳のM 3 レラキシンm R N Aの分布はM 1 レラキシンm R N Aのそれと異なる(データ非表示)。

#### 【0119】

(実施例6)

ヒト、マウスおよびラットの前駆レラキシンH 3 cDNA配列は、好適な発現トランスファクターを用いて原核性および真核性両方の細胞システムにて発現している。これらのシステムは、バクテリアおよび酵母発現システムのみならず昆虫細胞、植物細胞および鳥類細胞を含む他の高等真核細胞および適したほ乳類宿主細胞を含む。さらに、これらの3つの配列の融合タンパク産物は、宿主細胞の原核性および真核性蛋白質特性の関連部分によって生産される。融合産物は、融合産物が続いて取り除かれうる蛋白質産物の精製を促進する。すべてのトランスファクターを、修飾されたCペプチド配列の除去を促進するためにB / CおよびC / A結合修正を備えた短いCペプチド前駆レラキシンを生じる修正を備えたコドン置換/削除/付加産物によって修飾することもできる。

#### 【0120】

短いCペプチド置換産物およびB / CおよびC / A結合修正を用いたレラキシン合成は、米国特許番号US 5,759,807に記載されており、そのような方法は、H 3 レラキシンの生産のために使用することができる。

#### 【0121】

本明細書および特許請求の範囲の全体にわたって、「含む」という単語、または「含む」あるいは「含むんでいる」のような変形は、特に記載がなければ、規定の文字列または段階あるいは文字列のグループまたは段階の除去ではなく、規定の文字列または段階あるいは文字列のグループまたは段階の包括を示すと理解される。

#### 【0122】

本明細中の任意の先行技術文献が、知識あるいはオーストラリアで通例の一般的な知識を形成することを示唆するいずれの形態ではなく、そのように解釈してはならない。

#### 【0123】

配列リスト表

配列番号 1	シグナルペプチド配列
配列番号 2	B鎖ペプチド配列
配列番号 3	C鎖ペプチド配列
配列番号 4	A鎖ペプチド配列
配列番号 6	ゲノムDNA配列
配列番号 7	A鎖核酸配列
配列番号 8	B鎖核酸配列

## 配列番号 9 C鎖核酸配列

## 【図面の簡単な説明】

## 【0124】

【図1】H3(A)およびM3(B)遺伝子のDNA配列の構築 予測TATAボックスおよびポリアデニル化配列のみでなく、開始および停止コドンには、アンダーラインを付した。推定されるシグナルペプチド、およびB-、C-およびA-鎖ペプチド配列の位置を、矢印で示した。A-およびB-鎖配列を箱で囲み、レラキシン受容体結合も関与する残基には、影を付した。ヒト(A)およびマウス(B)の両配列におけるC-鎖の同一位置であるイントロン配列は、一番下に文字で示し、イントロンの正確なサイズを示した。

## 【0125】

【図2】H3およびM3レラキシンと他のレラキシンおよびインスリンファミリーメンバーの配列比較 (A)は、H3およびM3レラキシンと他のヒトおよびマウスレラキシン配列からのA-鎖およびB-鎖配列の配列である。コンセンサス配列を、箱で囲んだ；Cons 1,2,3は：ヒトレラキシン1、2および3のコンセンサス配列である。Cons 3は：B鎖のH3およびM3レラキシンおよびA鎖のH3、R3およびM3レラキシンのコンセンサス配列である。Cons マウスは：M1およびM3レラキシンのコンセンサス配列である。ラットの配列は、ESTクローンに由来する(詳細な結果を参照。。「+」は、同類の置換を示し、「・」は、類似性のないものを示す。(B)は、ヒトレラキシン/インスリン/IGFスーパーファミリーのヒトの配列と、H3およびM3レラキシンの全長配列の、進化系統樹を示す。

## 【0126】

【図3】ヒトレラキシン受容体発現細胞株におけるH1およびH2レラキシンと比較したH3の生物活性 (A)は、THP-1細胞のペプチド刺激によるcAMPの蓄積を示す。データは、H2レラキシン(n=3)の最大応答(%)の平均値で示す。牛インスリン(bINSL)およびヒトインスリン3(hINSL3)への応答も、分析の特異性を強調表示している。H1、H2およびH3は；それぞれヒト1、2および3レラキシンを示す。(B)は、H1(n=7)、H2(n=11)およびH3(n=3)レラキシンペプチドとTHP-1細胞に結合する<sup>33</sup>P-標識したH2レラキシン(B33)の活性を比較したものである。データは、特異的な結合の平均値(%)で示す。

## 【0127】

【図4】H3レラキシンを認識するよく特性化されたH2レラキシン抗体の活性 H2レラキシン抗体は、ELISAプレート上に固定され、<sup>125</sup>I-標識したH2レラキシンに対して、H1、H2およびH3レラキシンを作用させ競争実験を行った。結果を、典型的な分析の3通り測定の特異的な結合の平均値(%)で示す。

## 【配列表】

10

20

30

## SEQUENCE LISTING

<110> Howard Florey Institute of Experimental Physiology  
 and Medicine  
 5 University of Melbourne

<120> H3 Relaxin 10

<130> 7640120/PAS  
 10

<160> 10

<170> PatentIn version 3.0

15 <210> 1  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> H3-signal 20

20 <400> 1  
 Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala  
 20 25

25 <210> 2  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> H3-B chain 30

30 <400> 2  
 Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp  
 35 20 25

<210> 3 40

<211> 66  
 <212> PRT  
 <213> H3-C chain

5 <400> 3  
 Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala  
 20 25 30  
 10 Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe  
 35 40 45  
 Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly  
 50 55 60  
 Ser Arg

15 65

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 20 <213> H3-A chain

<400> 4  
 Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser  
 1 5 10 15  
 25 Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys  
 20

<210> 5  
 <211> 117  
 30 <212> PRT  
 <213> H3-Prorelaxin

<400> 5  
 Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg  
 35 1 5 10 15  
 Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg Ser Asp Ile  
 20 25 30  
 Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala Asp



35                      40                      45  
 Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu  
 50                      55                      60  
 Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro  
 5 65                      70                      75                      80  
 Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu  
 85                      90                      95  
 Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu  
 100                      105                      110  
 10 Ile Ser Ser Leu Cys  
 115  
  
 <210> 6  
 <211> 3449  
 15 <212> DNA  
 <213> human  
  
 <400> 6  
 tataaatggg gggccaagag gcagcagaga cactggccca ctctcacgtt caaagcgtct 60  
 20 ccgtccagca tggccaggta catgctgctg ctgctcctgg cggatatggg gctgaccggg 120  
 gagctgtggc cgggagctga ggcccgggca gcgccttacg gggtcaggct ttgcggccga 180  
 gaattcatcc gagcagtcac cttcacctgc gggggctccc ggtggagacg atcagacatc 240  
 ctggccccacg aggctatggg tgaggctggg gagagagtgg atgtagaagg ggaacagggtg 300  
 gctggatggg tcccaggagc taaggacaga gataagagga gggttctgga ggaggagggt 360  
 25 cctgtcctg ccacattcag ccagggacac ctgcccagcc ttgaaacaag ggctcaggag 420  
 ttagcagagc tgcagagctg ggatgggggtg ttgcaagcca tccatggggg ctggaagtct 480  
 gaggacaggt gggggcgggg agcgtgccat ttgcaaagac aacaccgaag tgttttccaa 540  
 ccctttccag caggtaatgt gaagggtgtg gtatacacat agctggggtt gtcacctaat 600  
 gcattgacctc tcccagcaa gttgggtttt cttccgtctc tgagtgtctt ttttttggag 660  
 30 atgtgggtctc actccattgc ccaggcttga atgcagtggc ccaatcactg ctcatcgag 720  
 cctcgacctc ccaggctcaa gtgattctcc tgcctccgcc tccagagtag ttgagaccac 780  
 aggcacctga caccatgcct ggctagtttt aaattttttt tttgtagaaa cagggtctc 840  
 actatgttgc ctaggotggg ctcgaaactc tgggctcaag tgatcctccc accteggcct 900  
 ccctaagtgc tgagattaga gtctctgagt gtcttttatct tcaaattggga gacacagttc 960  
 35 ctgaatcttg caggattaag tggatgatt aaatcaaac agattagggc agagtctcag 1020  
 cagggcagcg gcacaatctg ggatccatca ggagagtcag agggaacaga agacctagct 1080  
 tcatgagggg cagggacctg gcaaatagat attcatgatg gtgagaagga ggataggtat 1140  
 gagcgtggac atagaagaca caccacttgg attcagatag tagctctaca atgtaatagt 1200

	tgtgtgttca	tgtgtacta	ttttttttt	ttttgagaca	gaatctcatt	ctgttgccca	1260
	ggctggagt	cagtgggtg	atcttggctc	actgtaacct	ccatcacctg	ggttcaagcg	1320
	attctcgtgc	ctccagcctc	ccaagtagct	gggattacag	atgtgtgcca	ccatacctcg	1380
	ctaactcttt	tatttttagt	agagacagtt	tcaccatggt	ggccaggtcg	gtctccaact	1440
5	cctgacctca	ggtgatcctc	ccacctcagc	ctcccaaagt	gctgggatta	caggcatgag	1500
	ccaccggcgc	cagccatgca	aattctttac	tgagtccctg	ctcagtggtc	tcctctggaa	1560
	aatacgggtg	ataactgcac	ccacctcaac	tggttatcac	tgagaagaat	aaagaagtta	1620
	acctgctaaa	gcacttaaaa	cgttgtttga	cacaaagtaa	gtgatcaata	aattattatt	1680
	attattatta	ttattattat	tattattatt	tttgagacag	ggtcttgctc	tgttgccag	1740
10	actggagtgc	agtgggtgga	tcacagctca	ctgcagcttc	aacctcttgg	gctcaagcaa	1800
	ttctcctgcc	tcagcctcct	gagtagctgg	gactacaggc	ttgtgccaac	atgtctaact	1860
	ttttattatt	tgtagagaca	gggtagtgct	gtgttggtcc	ggctgttctt	gaactcctgg	1920
	ttctgggtgat	cctccagcat	gtgcccctgg	aagtgtctgg	attacaggtg	tgagacaccg	1980
	tgcccggact	caatagtcac	ttttgagtgc	tcacatggtt	ccagacattg	ttctaagtgt	2040
15	ttttttttta	tgaatattaa	ctccttataa	aacttgagaa	ggttgaggta	attatttttt	2100
	tcacttttgc	agaaaagaac	attgaggctc	caagaagtaa	atttacttgc	tcacgattag	2160
	agaagctgga	ttcatgtcca	gtcagcccag	ctcccaaagt	taccaggtcc	tcaattaata	2220
	aagagtaagg	agaaataaat	gacagggctg	ggtgcggtgg	ctcacgcctg	taatcccagc	2280
	actttgggtg	gctgaggtgg	gcacatcact	tgaggtcagg	agtttgcgac	cagcctgaac	2340
20	aacatgggtg	accccatctc	tataacaata	caaaaatcag	ccaggcctgc	tggcagacac	2400
	ctgtaatccc	acctactctg	gcagagccag	aatttgaacc	caggactggg	tgggaataaaa	2460
	actctgaact	atgtctatga	ctgttgctac	aagatcagag	ctagactggc	caggagccat	2520
	gactgtgggt	gcagcagcag	ctgagccctg	atcactaact	ctgttcatct	tttgaggag	2580
	ataccttccc	ggatgcagat	gctgatgaag	acagtctggc	aggcgagctg	gatgaggcca	2640
25	tgggggtccg	cgagtggctg	gccctgacca	agtcacccca	ggccttttac	agggggcgac	2700
	ccagctggca	aggaacccct	gggggtcttc	ggggcagccg	agatgtcctg	gctggccttt	2760
	ccagcagctg	ctgcaagtgg	gggtgtagca	aaagtgaat	cagtagcctt	tgctagtttg	2820
	agggctgggc	agccgtgggc	accaggacca	atgcccaggt	cctgccatcc	actcaactag	2880
	tgtctggctg	ggcacctgtc	tttcgagcct	cacacattca	ttcattcatc	tacaagtcac	2940
30	agaggcactg	tgggctcagg	cacagtctcc	cgacaccacc	tatccaaccc	tgccctttga	3000
	ccagcctatc	atgaccttgg	cccctaagga	agctgtgccc	ctgcctgggc	aagtggggac	3060
	ccccccatcc	tgacccctga	cctctcccca	gccctaacca	tgcgtttgcc	tggcctacac	3120
	actccactgc	cacaactggg	tcctactctc	acctaggctg	gccacacaga	gacccctgcc	3180
	cccttcccag	tccaaactgt	ggccattgtc	ccctgaccag	ctaaaatcaa	gcctctgtct	3240
35	cagtccagcc	tttgcaagca	cgttcccttt	gccctgcttt	ccatcccttc	tccttccaac	3300
	tcccttgcca	gagttccaag	gctgtggacc	ccagagaagg	tggcaggtgg	ccccctagg	3360
	agagctctgg	gcacattcga	atcttcccaa	actccaataa	taaaaattcg	aagactttgg	3420
	cagagagtgt	gtgtgtgtgt	gtatgggtg				3449

10

20

30

40

<210> 7  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 5 <213> A chain

<400> 7  
 gatgtcctgg ctggccttcc cagcagctgc tgcaagtggg ggtgtagcaa aagtgaatc 60  
 agtagccttt gc 72 10

<210> 8  
 <211> 81  
 <212> DNA  
 <213> B chain

15 <400> 8  
 cgggcagcgc cttacggggc caggccttgc ggcgagaat tcatccgagc agtcattctc 60  
 acctgcgggg gctcccggtg g 81 20

20 <210> 9  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> c chain

25 <400> 9  
 agacgatcag acatcctggc ccacgaggct atgggagata ccttcccgga tgcagatgct 60  
 gatgaagaca gtctggcagg cgagctggat gaggccatgg ggtccagcga gtggctggcc 120  
 ctgaccaagt caccocaggc cttttacagg gggcgacca gctggcaagg aaccctggg 180  
 gttcttcggg gcagccga 198 30

30 <210> 10  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> cDNA

35 <400> 10  
 cgggcagcgc cttacggggc caggccttgc ggcgagaat tcatccgagc agtcattctc 60  
 acctgcgggg gctcccggtg gagacgatca gacatcctgg cccacgaggc tatgggagat 120

5

10

【 図 1 A 】

A: H3 レラキシン形成遺伝子配列

**TATAAATGGGGGGCCAGAGGCGAGCAGACACTGGCCCACTCTCAAGTTCAAAGCGTCT**  
**CGCTCCAGCATGGCCAGCGTACATGCTGTGCTGCTCTGGCGGTATGGGTGCTGACCGGG**  
M A R Y M L L L L L A V W V L T G  
↓  
**GAGCTGTGGCCGGGAGCTGAGGCGCCGGGACAGCGCTTACGGGCTCAGGCTGTGGCGGCA**  
R L W P G A E A R A A P Y G V R L C G S  
↓  
**GATTCATCCGAGCAGTCACTCTCACTGCGGGGGCTCCCGGTGGAGCAGATCAGACATC**  
E F I R A V I F T C G G S R W R R S D I  
↓  
**CTGGCCACGAGGCTATGG>>gttagaggtggggagagagtggatgtagaaggggaacag-**  
L A H E A K  
  
- - - - -intron 2318bp- - - - -  
**-cactaacctctgtccatcttbttagcag<<GAGATACCTTCCCGATGTCAGATGTATGA**  
G D T F P D A D A D E  
  
**GACACTCTGGCAGGCGAGCTGGATGAGGCGCATGGGCTCACGAGATGGCTGGCCCTGACC**  
D S L A G E L D E A M G S S E W L A T  
↓  
**AAGTCACCCAGGCGCTTTACAGGGGGCGACCAAGCTGCGCAAGAACCCCTCGAGGTTCTT**  
K S P A G A F Y R G R P S N Q T P G V L  
  
**CGGGGAGCGCCAGATGCTCTGCTGCGCTTCTTCAGCAGCTGCTGCAAGTGGGGGTATGAC**  
R G S R D V L A G L S S S C C K W G C S  
↓  
**AAAAGTGAATCAGTAGCCTTTTGCTAGTTTAGGGGCTGGGCAGCCGTGGCACCCAGGACC**  
K S E I S S L C \*  
  
**AATGCCCACATCTGCCATTCATCTCAACTAGTGTCTGGCTGGGCACCTGTCTTTCCGAGCC**  
TCAACATCTCATTCATCATCTCAAGTCTCAGCAGGACCATGTGGGCTCAGGCACAGTCTC  
CGCAGCAGCCATCTATCCAGCTCTGCGCTTTGACACCGCATCATGCAAGCTGGCCCTGATAG  
AGCTGTGCGCCCTCGCTGCTGCTGAGCTGGGAGCCGCCCATCTGACCGCTGACCTCTCCCC  
TACCTTAACCATGGTGTGCTGCGCTACCTACCTACCTACCTGCGCACCATGGGCTGCCCTACTC  
TAGCTTAGGCTGGCGACACAGAGACGCTGCCCTCCCGCTTCCAGCTCAAACTGTGCCATCTC  
CCCGTCAGGCTCAATTAATCAGGCTCTGTCTGATCGCCAGCCTTTGACAGCAGGCTCTCTT  
TGCCCTGCTTTCCATCCCTCTCTCCATCACTCCCTGCGCAGAGTTCAGACAGCTGTGGAC  
CCGACGAGAAGGTGGGAGGCTGGGCCCTTAGGAGAGCTCTGGGCACATTCGAATCTCTCCCA  
ACTCCCAATTAATAAATCTGACAGCTTTGGCAGAGAGTGCTGTGTCTGTATGATGTG

【 ㄨ 1 B 】

### BH3レラキシン形成遺伝子配列

**TATGAAATAGGGGATCGGAGGTGGTCAGATAGAGCACTTGGGTCGACGGCATCTCAACTG**  
**ATCATGCGCAATGCTCGGGCTCTGCTGCTGTGGCTTCTCGGGCTTCTCTCGGGCTCTGAGG**  
M A M L L G L L L A S K A L L G A L G  
signal peptide  
**CTGACGCGGCGAGCGGAGCGCGGCGCCCTACGGGGTGAAAGCTCTCGGTCGGGAGTTCATC**  
L Q A E A R P A P Y G V L L C G R E F I  
B chain  
**CGCGCGGTGATCTTCACTTCGCGAGAGCTACAGATCGCGCGGCGGACATCTTGGCCAC**  
R A V I F T C T G G S R W R R A D I L A H  
**GAACTCTCGG>>gttgagtgcttaggcaatcaactggaaacaggtgtcttgtaagcgca-**  
**E S L**  
intron 1446b  
**-cttttgcaag>>gggaacttcttcgcttagtgagaaagcaatcacagacacactctggccagc**  
**G D F F A D G E A N T D H L A S**  
**GAGCTGGATGAAGCGGTGGCTCCAGCGAGTGGCTGGCCCTATACCAATATCCCCAGGCT**  
E L D E A V G S S E W L A L T K S P Q A  
c chain  
**TTCTACGGTGGTCTGAGCGAGCTGGAAGGGTCACTTGCGAGTGGTTCGGGCGAGCAGAT**  
F Y G G R A S W G G S P G V V R G S R D  
**GTGTGGCTGCGCTTTCAGCAGTGTGCTGCGAGTGGGGCTGTAGCAAGGCCAAATTAGC**  
V L A L S S S C E F W G C S K S Q I S  
A chain  
**AGCTTGTGCTAGGATCAGGTTGAGCAATGAGAAAGCGGGCGGTGCCTGCAAGCTGCTGT**  
**S L C \***  
**CAGCTGTGGGATGTTCAAGAGCATCTCTACAGGGGAGGCACCAAGGGGTCCACTGTGTCCT**  
**TTCACGACCTCTTGCCCAAGATGCACACTAGTGGGCCAACCTTCCCCACCTTGCTGCGG**  
**GCCCCCTCTCTATCCAGCGCCAAACGAAACTGTTTTCAGTACTGAGTCTTCGCGTGCCA**  
**CACCTTCACCCCGCAGCGCCAGCGCGAACCAAGTACGCCCTCTTAAACGGTGACCA**  
**TAAGCTCTGCGCCCACTTCCACCTCTAGTCCGGGCGCTAATTGCGCCGCTCTCCCTGGCTA**  
**AGCTGCCGCCCCCCCAAAAAAAGAAACAGAGCATCTGTTCGACAGCCCGGACATGAG**  
**AGCCCTGTGCTCTCAGTACAGAGTCTCTCCACCATAAATAAGGTTTCAGTTCTGAG**

## 【図 2 A】

A.

B 鎖列

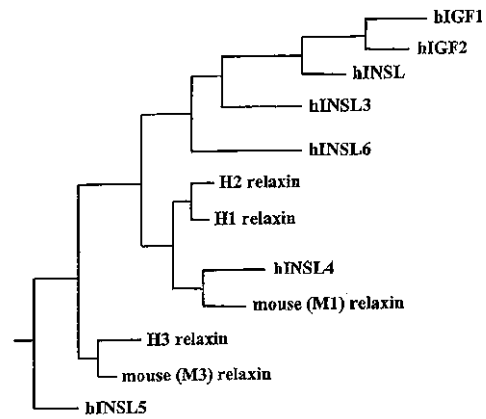
	1	5	10	15	20	25
Human 1	KWKDDV	KLCREL	VRAQLA	ICGMSTWS		
Human 2	DSWMEE	VIKLCREL	VRAQLA	ICGMSTWS		
Cons 1,2,3	.....+LCGRE+RA.I..CG.S.W.					
Human 3	RAAPYGV	RLCGREF	IRAVIFT	CGGSEW		
Cons 3	R.APYGV+LCGREFIRAVIFTGGSEW					
Mouse 3	RPAPYGV	RLCGREF	IRAVIFT	CGGSEW		
Cons Mouse	.....+++CGRE+.R.+I..CG.S..					
Mouse 1	RVSEZWH	DGPIRM	CGREYARE	LKICGASV	GRRLAL	

A 鎖列

	1	5	10	15	20
Human 1	RPYVAL	PEKCC	LIGCT	RSRLAKYC	
Human 2	QLYSAL	ANKCCH	VGCTK	RLARFC	
Cons 1,2,3	...+L...CC..GC+K...+..C				
Human 3	DVLAGL	SSSCC	WGC	SKSISL	LC
Cons 3	DVLAGLSSSCC+WGCSSK+ISSLC				
Rat 3	DVLAGL	SSSCC	WGC	SKSISL	LC
Mouse 3	DVLAGL	SSSCC	WGC	SKSISL	LC
Cons Mouse	+...+S..CC..GCS+.I..L-C				
Mouse 1	ESGGLM	SQQCH	VGC	RRSLAKLYC	

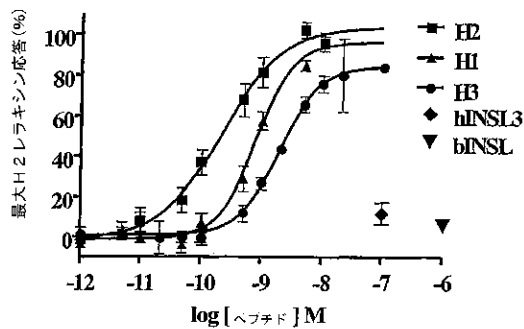
## 【図 2 B】

B.

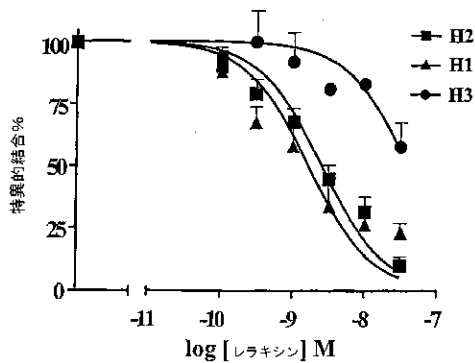


## 【図 3】

A.

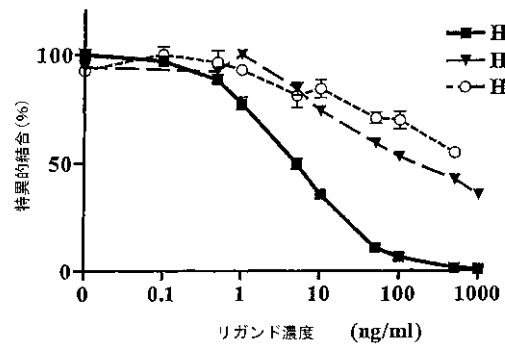


B.



## 【図 4】

Fig. 4



【手続補正書】

【提出日】平成16年6月8日(2004.6.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005508944000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01338										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>												
Int. Cl. 7: A61K 38/22												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SEE DATABASES BELOW												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPAT, Medline: Keywords used - relaxin, prorelaxin, preprorelaxin, human, H3, disease, disorder, therapy, treatment, administration GenBank, EMBL, PDB Nucleic Acids, GenPept, TREMBL, Swiss-Prot, PIR - SEQ. ID. NOs.:1-10												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
P, X	BATHGATE, R.A. et al. Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. The Journal of Biological Chemistry. 2002, January. Vol. 277, No. 2, pages 1148-1157. See the entire document, in particular Figure 1.	1-44										
X	WO 01/68862 A1 (ZYMOGENETICS, INC.) 20 September 2001. See the entire document, in particular SEQ. ID. NOs:1 and 2; and pages 42 to 46.	1-44										
A	GAVINO, E.S. and FURST, D.E. Recombinant relaxin: a review of pharmacology and potential therapeutic use. BioDrugs. 2001. Vol. 15, No. 9, pages 609-14. See entire document.	1-44										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 10 December 2002		Date of mailing of the international search report 20 DEC 2002										
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer  <b>JULIE CAIRNDUFF</b> Telephone No : (02) 6283 2545										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU02/01338

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member	
WO	01/68862	AU	36817/01
END OF ANNEX			



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/06	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 9/08	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 9/14	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 15/04	A 6 1 P 15/04	
A 6 1 P 15/06	A 6 1 P 15/06	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/14	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/30	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 P 25/32	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 39/02	A 6 1 P 39/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100087114

弁理士 齋藤 みの里

(72)発明者 ジェフリー・トレギアー

オーストラリア 3 1 2 2 ビクトリア州ホーソーン、ホーソーン・グローブ 6 2 番

(72)発明者 ロス・アレキサンダー・デイビッド・バスゲイト

オーストラリア 3 0 5 5 ビクトリア州ブランズウィック・ウエスト、ウォレス・ストリート 1 / 3 2 番

(72)発明者 クリシャン・スレンドラン・サミュエル

オーストラリア 3 1 5 0 ビクトリア州グレン・ウェイバリー、ペアツリー・ウェイ 7 番

(72)発明者 ターニャ・クリスティーン・ブラジン

オーストラリア 3 0 8 5 ビクトリア州マクレオード、ダンバーガン・クレセント 5 2 番

(72)発明者 アンドリュー・ローレンス・ガンドラッチ

オーストラリア 3 1 2 2 ビクトリア州ホーソーン、ウィリアム・ストリート 2 1 番

(72)発明者 ジョン・デズモンド・ウェイド

オーストラリア 3 1 2 6 ビクトリア州カンタベリー、ミルトン・ストリート 1 エイ 番

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA19 BA20 BA21 DB51 NA14 ZA021

ZA022 ZA121 ZA122 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA201 ZA202 ZA221

ZA222 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA421 ZA422 ZA661 ZA662 ZA811

ZA812 ZA891 ZA892 ZA921 ZA922 ZB091 ZB092 ZB151 ZB152 ZB261  
ZB262 ZC031 ZC032 ZC391