



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 28 916 T2** 2007.09.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 302 542 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 28 916.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP01/06162**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 951 893.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/006483**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.07.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.01.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.04.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

2000217442 18.07.2000 JP

2001026779 02.02.2001 JP

(73) Patentinhaber:

Takeda Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, JP

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

OHTAKI, Tetsuya, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0821, JP; MASUDA, Yasushi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0032, JP; TAKATSU, Yoshihiro, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0032, JP; WATANABE, Takuya, Osaka-shi, Osaka 532-0033, JP; TERAU, Yasuko, Kobe-shi, Hyogo 658-0063, JP; SHINTANI, Yasushi, Toyonaka-shi, Osaka 560-0005, JP; HINUMA, Syuji, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0821, JP

(54) Bezeichnung: **NEUES, PHYSIOLOGISCH AKTIVES PEPTID UND DESSEN VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf (1) ein Peptid, dadurch gekennzeichnet, das es dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 20 oder SEQ ID NR. 21 dargestellt ist, oder ein Salz davon.

STAND DER TECHNIK

[0002] Wichtige biologische Funktionen, einschließlich Aufrechterhaltung der Homöostase in dem lebenden Körper, Reproduktion, Entwicklung von Individuen, Metabolismus, Wachstum, Kontrolle des Nerven-, Zirkulations-, Immun-, Verdauungs- und Stoffwechselsystems, sensorische Anpassung usw., werden durch Zellen reguliert, die endogene Faktoren empfangen, wie verschiedene Hormone und Neurotransmitter, oder Sinnesstimulation, wie Licht oder Geruch, über spezifische Rezeptoren, die auf Zellmembranen vorliegen, die für diese Faktoren oder Stimulation reserviert sind und mit ihnen interagieren. Viele von diesen Rezeptoren für Hormone oder Neurotransmitter werden durch diese funktionelle Regulierung an Guanin-Nucleotid-bindende Proteine gekoppelt (hierin nachstehend manchmal nur als G-Proteine bezeichnet), und sind durch Entwickeln einer Vielzahl von Funktionen durch intrazelluläre Signaltransduktion über die Aktivierung der G-Proteine gekennzeichnet. Außerdem verfügen diese Rezeptorproteine über sieben gemeinsame Transmembrandomänen. Aus den obigen Gründen werden diese Rezeptoren daher gemeinsam als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder sieben-Transmembranrezeptoren bezeichnet. Wie oben angegeben, ist es bekannt, daß verschiedene Hormone oder Neurotransmitter und ihre Rezeptorproteine vorliegen und miteinander interagieren, um wichtige Rollen bei der Regulierung der biologischen Funktionen zu spielen. Jedoch ist es noch schlecht verstanden, ob irgendwelche anderen unbekannten Substanzen (Hormone, Neurotransmitter usw.) und Rezeptoren für diese Substanzen vorliegen.

[0003] In jüngsten Jahren ist das menschliche Gen bei einem zunehmenden Tempo durch gesammelte Sequenzinformationen durch Sequenzieren der menschlichen genomischen DNA oder verschiedener menschlicher Gewebe-abgeleiteter cDNA bei zufälligem und schnellem Fortschritt in der Genanalysetechnologie aufgeklärt worden. Basierend auf dem Vorhergehenden wird manifestiert, daß es viele Gene gibt, von denen angenommen wird, daß sie Proteine mit unbekannten Funktionen kodieren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren haben nicht nur sieben Transmembrandomänen, sondern viele gemeinsame Sequenzen liegen in ihren Nukleinsäuren oder Aminosäuren vor, und können daher klar als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in diesen Proteinen identifiziert werden. Andererseits werden diese G-Protein-gekoppelten Rezeptorgene durch Polymerase-Kettenreaktion (hierin nachstehend als PCR abgekürzt) unter Verwendung einer solchen Ähnlichkeit in der Struktur erhalten (Nature Cell Biology, 2, 703–708 (2000)). Bei diesen bis jetzt so erhaltenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren können Liganden für einige Rezeptoren, die Subtypen mit hoher Homologie in der Struktur für bekannte Rezeptoren sind, ohne weiteres vorhersehbar sein, aber in den meisten Fällen sind ihre endogenen Liganden unvorhersehbar, so daß keine Liganden, die diesen Rezeptoren entsprechen, gefunden werden. Aus diesem Grund werden diese Rezeptoren Orphan-Rezeptoren genannt. Es ist wahrscheinlich, daß nicht identifizierte endogene Liganden für diese Orphan-Rezeptoren an dem schlecht analysierten biologischen Phänomen beteiligt sein würden, da die Liganden unbekannt waren. Und wenn diese Liganden mit wichtigen physiologischen Wirkungen oder pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht werden, wird erwartet, daß die Entwicklung dieser Rezeptoragonisten und -antagonisten zum Durchbruch von neuen Arzneimitteln führen wird (Stadel, J. et al., TiPS, 18, 430–437, 1997; Marchese, A. et al., TiPS, 20, 370–375, 1999; Civelli, O. et al., Brain Res., 848, 63–65, 1999). Bis jetzt gibt es jedoch wenige Beispiele, um Liganden für Orphan-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren tatsächlich zu identifizieren.

[0004] Kürzlich versuchten einige Gruppen, Liganden für diese Orphan-Rezeptoren zu identifizieren, und berichteten über die Isolation von Liganden, die neue physiologisch wirksame Peptide sind, und die Bestimmung ihrer Strukturen. Reinsheid et al. und Meunier et al. führten unabhängig voneinander cDNA, die Orphan-G-Protein-gekoppelten Rezeptor LC132 oder ORL1 codiert, in Tierzellen ein, um einen Rezeptor zu exprimieren, isolierten ein neues Peptid aus Schweinehirn- und Rattenhirnextrakt unter Verwendung der Antwort des Rezeptors als ein Indikator, der in bezug auf seine Antwort Orphanin FQ oder Nociceptin genannt wird, und bestimmten seine Sequenz (Reinsheid, R. K. et al., Science, 270, 792–794, 1995; Meunier, J.-C. et al., Nature, 377, 532–535, 1995). Es wurde berichtet, daß dieses Peptid mit einem Schmerzgefühl verbunden ist. Weitere Untersuchungen an dem Rezeptor in der Knockout-Maus offenbarten, daß das Peptid im Gedächtnis involviert war (Manabe, T. et al., Nature, 394, 577–581, 1998).

[0005] Folglich wurden neue Peptide, einschließlich PrRP (Prolactin-releasing Peptid), Orexin, Apelin, Ghrelin und GALP (Galanin-artiges Peptid) usw. als Liganden für Orphan-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren isoliert (Hinuma, S. et al., *Nature*, 393, 272–276, 1998; Sakurai, T. et al., *Cell*, 92, 573–585, 1998; Tatemoto, K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 471–476, 1998; Kojima, M. et al., *Nature*, 402, 656–660, 1999; Ohtaki, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 274, 37041–37045, 1999).

[0006] Andererseits werden einige Rezeptoren für physiologisch aktive Peptide, die bisher unbekannt sind, durch ähnliche Verfahren aufgedeckt. Es wurde aufgedeckt, daß ein Rezeptor für Motilin, der mit der Kontraktion der Darmtrakte verbunden ist, GPR38 war (Feighner, S. D. et al., *Science*, 284, 2184–2188, 1999). Außerdem wurde SLC-1 als ein Rezeptor für das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH) identifiziert (Chambers, J. et al., *Nature*, 400, 261–265, 1999; Saito, Y. et al., *Nature*, 400, 265–269, 1999; Shimomura, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 622–626, 1999; Lembo, P. M. C. et al., *Nature Cell Biol.*, 1, 267–271, 1999; Bachner, D. et al., *FEBS Lett.*, 457, 522–524, 1999). Ebenso wurde berichtet, daß GPR14 (SENr) ein Rezeptor für Urotensin II ist (Ames, R. S. et al., *Nature*, 401, 282–286, 1999; Mori, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265, 123–129, 1999; Nothakker, H.-P. et al., *Nature Cell Biol.*, 1, 383–385, 1999; Liu, Q. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 174–178, 1999). Es wurde gezeigt, daß MCH an Fettleibigkeit beteiligt ist, da ihre Knockout-Mäuse einen hypophagischen und mageren Phänotyp zeigten (Shimada, M. et al., *Nature*, 396, 670–674, 1998), und da ihr Rezeptor aufgedeckt wurde, wurde es möglich, einen Rezeptorantagonisten zu untersuchen, der wahrscheinlich als ein Antifettsuchtmittel nützlich sein sollte. Es wurde außerdem berichtet, daß Urotensin II eine starke Wirkung auf das Herz-Kreislauf System zeigt, da es Herzischämie durch intravenöse Injektion an einen Affen induziert (Ames, R. S. et al., *Nature*, 401, 282–286, 1999).

[0007] Wie oben beschrieben, sind Orphan-Rezeptoren und Liganden dafür oftmals an einer neuen physiologischen Aktivität beteiligt, deren Erforschung zur Entwicklung von neuen Arzneimitteln führen wird. Jedoch sind die Untersuchungen der Liganden für Orphan-Rezeptoren von vielen Schwierigkeiten begleitet. Während die Gegenwart von vielen Orphan-Rezeptoren bisher aufgedeckt wurde, wurden nur wenige Liganden für diese Rezeptoren entdeckt.

[0008] Die betreffenden Erfinder fanden einen neuen Rezeptor ZAQ, ebenso offenbart in WO 0034334 und WO 9846620, der ein Orphan-G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist (ein Protein, enthaltend dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 1 der Beschreibung dargestellt ist: hierin nachstehend manchmal einfach als ZAQ in der Beschreibung bezeichnet). Jedoch war es bis jetzt unbekannt, was der Ligand war.

[0009] Es ist das Problem gewesen, einen Liganden für das Orphan-Rezeptorprotein ZAQ zu finden und ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung zu etablieren, gekennzeichnet durch die Verwendung von ZAQ und einem Liganden dafür.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die betreffenden Erfinder fanden eine Substanz mit einer Ligandenaktivität, die für ZAQ spezifisch ist, die in einem Milchextrakt vorlag, isolierten die Substanz und bestimmten ihre Struktur. Die Erfinder fanden ebenso ein Gen, das ein humanes Peptid von dieser aktiven Komponente kodiert, versuchten, das Gen in Tierzellen zu exprimieren, und bestätigten, daß eine peptidähnliche Substanz, die die ZAQ-exprimierten Zellen aktivieren kann, in dem Kulturüberstand sekretiert wurde.

[0011] Basierend auf diesen Ergebnissen fanden die betreffenden Erfinder heraus, daß Arzneimittel für die Behandlung von Krankheiten, die durch ZAQ vermittelt werden (ZAQ-Antagonisten oder -agonisten usw., speziell Mittel zur Vorbeugung/Behandlung von Verdauungskrankheiten usw.) durch das Screeningsystem unter Verwendung von ZAQ und einem ZAQ-Ligandenpeptid gescreent werden können.

[0012] Das heißt, die vorliegende Erfindung bezieht sich auf folgende Merkmale:

- (1) Peptid, bestehend aus der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NR. 20 oder SEQ ID NR. 21 dargestellt ist, oder ein Salz davon;
- (2) Peptid oder ein Salz gemäß (1), das aus der in SEQ ID NR. 20 dargestellten Aminosäuresequenz besteht;
- (3) Peptid oder ein Salz gemäß (1), das aus der in SEQ ID NR. 21 dargestellten Aminosäuresequenz besteht;
- (4) Polynukleotid, bestehend aus einem Polynukleotid, das für das Peptid gemäß (1) kodiert;
- (5) Polynukleotid gemäß (4), das eine DNA ist;

- (6) DNA gemäß (5), enthaltend die Basensequenz, die in SEQ ID NR. 26 oder SEQ ID NR. 27 dargestellt ist;
- (7) Rekombinanter Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß (4);
- (8) Transformant, transformiert mit dem rekombinanten Vektor gemäß (7);
- (9) Verfahren zur Herstellung des Peptids oder seines Salzes gemäß (1), das umfaßt, daß man den Transformanten von (8) kultiviert und das Peptid gemäß (1) produziert/akkumuliert.
- (10) Antikörper gegen das Peptid oder sein Salz gemäß (1).

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] [Fig. 1](#) zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschliche Gehirn-abgeleitete Protein der Erfindung kodiert, erhalten in BEISPIEL 1 (ZAQC), und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (fortgesetzt auf [Fig. 2](#)).

[0014] [Fig. 2](#) zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschliche Gehirn-abgeleitete Protein der Erfindung kodiert, erhalten in BEISPIEL 1 (ZAQC), und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (fortgesetzt von [Fig. 2](#) bis [Fig. 3](#)).

[0015] [Fig. 3](#) zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschliche Gehirn-abgeleitete Protein der Erfindung kodiert, erhalten in BEISPIEL 1 (ZAQC), und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (fortgesetzt von [Fig. 2](#)).

[0016] [Fig. 4](#) zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschliche Gehirn-abgeleitete Protein der Erfindung kodiert, erhalten in BEISPIEL 1 (ZAQT), und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (fortgesetzt auf [Fig. 5](#)).

[0017] [Fig. 5](#) zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschliche Gehirn-abgeleitete Protein der Erfindung kodiert, erhalten in BEISPIEL 1 (ZAQT), und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (fortgesetzt von [Fig. 4](#) bis [Fig. 6](#)).

[0018] [Fig. 6](#) zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschliche Gehirn-abgeleitete Protein der Erfindung kodiert, erhalten in BEISPIEL 1 (ZAQT), und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (fortgesetzt von [Fig. 5](#)).

[0019] [Fig. 7](#) zeigt ein Diagramm der Hydrophobie für das menschliche Gehirn-abgeleitete Protein der Erfindung.

[0020] [Fig. 8](#) zeigt die Ergebnisse der Expressions-Verteilungsanalyse von ZAQ, die in BEISPIEL 2 durchgeführt wurde.

[0021] [Fig. 9](#) zeigt die Aminosäuresequenzen von MIT1, menschentypischem ZAQ-Liganden-Präkursorpeptid (A-Typ) und menschentypischem ZAQ-Liganden-Präkursorpeptid (G-Typ), wobei „MIT1,“ „Mensch (A-Typ)“ und „Mensch (G-Typ)“ die Aminosäuresequenzen von MIT1, menschentypischem reifem ZAQ-Ligandenpeptid (A-Typ) bzw. menschentypischem reifem ZAQ-Ligandenpeptid (G-Typ) angibt.

[0022] [Fig. 10](#) zeigt die Ergebnisse der Analyse für die ZAQ-aktivierende Wirkung durch das ZAQ-Ligandenpeptid, gereinigt in BEISPIEL 6 (6-3).

[0023] [Fig. 11](#) zeigt eine Restriktionsenzymkarte von Plasmid pCAN618, verwendet in BEISPIEL 5 (5-11).

[0024] [Fig. 12](#) zeigt die Ergebnisse der Messung für die ZAQ-Rezeptor-aktivierenden Wirkungen durch menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid und MIT1, analysiert in BEISPIEL 8 (8-3), wobei -o- und -•- menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid bzw. MIT1 darstellen.

[0025] [Fig. 13](#) zeigt die Ergebnisse der Messung für I5E-Rezeptor-aktivierende Wirkungen durch menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid und MIT1, analysiert in BEISPIEL 8 (8-3), wobei -o- und -•- menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid bzw. MIT1 darstellen.

[0026] [Fig. 14](#) zeigt die Ergebnisse der Messung für die kontraktile Aktivität, analysiert in BEISPIEL 11, wobei -■- und -•- menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid bzw. MIT1 darstellen.

[0027] [Fig. 15](#) zeigt die Ergebnisse der Messung für den Bindungsassay, durchgeführt in BEISPIEL 12 unter Verwendung der Membranfraktion von ZAQ, wobei \blacksquare die ^{125}I -MIT1-spezifische Bindungsmenge darstellt, wenn menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid in variablen Konzentrationen (wie auf der x-Achse angegeben) als eine Testverbindung zugegeben wurde, und \bullet die ^{125}I -MIT1-spezifische Bindungsmenge angibt, wenn MIT1 ebenso als eine Testverbindung zugegeben wurde.

[0028] [Fig. 16](#) zeigt die Ergebnisse der Messung für den Bindungsassay, durchgeführt in BEISPIEL 12 unter Verwendung der Membranfraktion von I5E, wobei \square die ^{125}I -MIT1-spezifische Bindungsmenge darstellt, wenn menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid in variablen Konzentrationen (wie auf der x-Achse angegeben) als eine Testverbindung zugegeben wurde, und \circ die ^{125}I -MIT1-spezifische Bindungsmenge darstellt, wenn MIT1 in variablen Konzentrationen (wie auf der x-Achse angegeben) als eine Testverbindung zugegeben wurde.

BESTE WEISE ZUR DURCHFÜHRUNG DER ERFINDUNG

[0029] Das erfindungsgemäße Peptid oder sein Salz ist ein Peptid oder sein Salz, das an ein Protein, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, oder ein Salz davon binden kann (hierin nachstehend manchmal einfach als das gegenwärtige Protein bezeichnet), und ist ein Peptid mit der Fähigkeit zum Binden an das gegenwärtige Protein, um selbiges zu aktivieren, oder ein Salz davon.

[0030] Außerdem ist das erfindungsgemäße Peptid oder sein Salz ein Peptid oder sein Salz, das an ein Protein, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 36, 40, 47, 48 oder 49 dargestellt ist, oder ein Salz davon binden kann, und ist ein Peptid mit der Fähigkeit zum Binden an das Protein der Erfindung, um selbiges zu aktivieren, oder ein Salz davon.

[0031] Das erfindungsgemäße Peptid oder sein Salz ist ein Peptid, bestehend aus der durch SEQ ID NR. 20 oder SEQ ID NR. 21 dargestellten Aminosäuresequenz, und mit der Fähigkeit zum Binden an das gegenwärtige Protein der Erfindung, um selbiges zu aktivieren, oder ein Salz davon.

[0032] Die Fähigkeit des erfindungsgemäßen Peptids oder seines Salzes, an das Protein der Erfindung zu binden und das Protein der Erfindung zu aktivieren, kann durch das später beschriebene Verfahren analysiert werden.

[0033] Hierin nachstehend wird das Peptid oder sein Salz der Erfindung manchmal nur als das erfindungsgemäße Peptid bezeichnet.

[0034] Das gegenwärtige Protein (G-Protein-gekoppeltes Rezeptorprotein) ist ein Rezeptorprotein, enthaltend dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz (die Aminosäuresequenz in [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) oder [Fig. 4](#) bis [Fig. 6](#)), die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist.

[0035] Das erfindungsgemäße Peptid und das gegenwärtige Protein der Erfindung kann irgendein Peptid oder Protein sein, das von jeglichen Zellen von Menschen oder anderen Säugern abgeleitet wird (beispielsweise Meerschweinchen, Ratte, Maus, Kaninchen, Schwein, Schaf, Rind, Affe usw.) (beispielsweise Milzzelle, Nervenzelle, Gliazelle, β -Zelle der Bauchspeicheldrüse, Knochenmarkszelle, Mesangiumzelle, Langerhans-Zelle, Epidermiszelle, Epithelzelle, Endothelzelle, Fibroblast, Fibrozyt, Myozyt, Fettzelle, Immunzelle (beispielsweise Makrophage, T-Zelle, B-Zelle, natürliche Killerzelle, Mastzelle, Neutrophile, Basophile, Eosinophile, Monozyt), Megakaryozyt, Synovialzelle, Knorpelzelle, Knochenzelle, Osteoblast, Osteoklast, Brustdrüsenzelle, Hepatozyt, Interstitialzelle usw., die entsprechenden Präkursorzellen, Stammzellen, Krebszellen usw.) und Hämozytzen (beispielsweise MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01 usw.); oder jegliche Gewebe, in denen diese Zellen vorliegen, wie Gehirn oder jegliche Gehirnregionen (beispielsweise Riechkolben, Mandelkern, zerebraler Basalganglion, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Nucleus subthalamicus, Hirnrinde, Medulla oblongata, Kleinhirn, Hinterhauptpol, Stirnlappen, Schläfenlappen, Putamen, Nucleus caudatus, Corpus callosum, Substantia nigra), Rückenmark, Hypophyse, Magen, Bauchspeicheldrüse, Niere, Leber, Geschlechtsdrüse, Schilddrüse, Gallenblase, Knochenmark, Nebenniere, Haut, Muskel, Lunge, Magen-Darm-Trakt (beispielsweise Dickdarm und Dünndarm), Blutgefäß, Herz, Thymusdrüse, Milz, Glandula submandibularis, peripheres Blut, peripherer Hämozyt, Prostata, Testikel, Hoden, Eierstock, Plazenta, Uterus, Knochen, Gelenk, Skelettmuskel usw. (speziell Gehirn und Gehirnregion) usw.; das Peptid oder Protein kann ebenso ein synthetisches Peptid oder ein synthetisches Protein sein.

[0036] Das Peptid der Erfindung umfaßt Peptide, die bevorzugt vom Menschen oder anderen Säugern abgeleitet sind, stärker bevorzugt vom Menschen abgeleitet sind.

[0037] Beispiele der Aminosäuresequenz, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz aufweist, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, umfassen eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 90 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 95 % Homologie, und stärker bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist.

[0038] Bevorzugte Beispiele der Proteine mit im wesentlichen derselben Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, sind Proteine mit im wesentlichen derselben Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, und mit einer Eigenschaft, die im wesentlichen äquivalent zu der der Aminosäuresequenz ist, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, usw.

[0039] Bevorzugte Beispiele des gegenwärtigen Proteins der Erfindung, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, sind Proteine, die dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, und mit einer Aktivität, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, usw.

[0040] Die im wesentlichen äquivalente Aktivität bezieht sich auf beispielsweise eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität usw. Der Ausdruck im wesentlichen äquivalent wird in der Bedeutung verwendet, daß die Natur dieser Aktivitäten äquivalent ist. Deshalb ist es bevorzugt, daß diese Aktivitäten, wie eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität usw., in der Wirksamkeit äquivalent sind (beispielsweise etwa das 0,5-bis etwa 2fache), und es ist zulässig, daß sogar Unterschiede in den Eigenschaften, wie die Stärke dieser Aktivitäten und Molekulargewicht des Proteins, vorliegen.

[0041] Diese Aktivitäten, wie eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität usw., können gemäß den öffentlich bekannten Verfahren analysiert werden, und können ebenso beispielsweise durch die Assayverfahren oder die Screening-Verfahren, die später beschrieben werden, analysiert werden.

[0042] Hierin nachstehend wird das Protein, das die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, manchmal als ZAQ bezeichnet.

[0043] Das gegenwärtige Protein, das eingesetzt werden kann, umfaßt Proteine, umfassend (i) eine Aminosäuresequenz, dargestellt durch SEQ ID NR. 1, von der 1 oder 2 mehr (bevorzugt ungefähr 1 bis 30, stärker bevorzugt ungefähr 1 bis 20 und am stärksten bevorzugt mehrere (1 oder 2)) Aminosäuren gelöscht werden; (ii) eine Aminosäuresequenz, dargestellt durch SEQ ID NR. 20 oder SEQ ID NR. 21, zu der 1 oder 2 mehr (bevorzugt ungefähr 1 bis 30, stärker bevorzugt ungefähr 1 bis 20 und am stärksten bevorzugt mehrere (1 oder 2)) Aminosäuren hinzugefügt werden; (iii) eine Aminosäuresequenz, dargestellt durch NR. 20 oder SEQ ID NR. 21, in der 1 oder 2 mehr (bevorzugt ungefähr 1 bis 30, stärker bevorzugt ungefähr 1 bis 20 und am stärksten bevorzugt mehrere (1 oder 2)) Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt werden; und (iv) eine Kombination der obigen Aminosäuresequenzen, usw.

[0044] Beispiele der Aminosäuresequenz, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz aufweist, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist, umfassen eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 90 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 95 % Homologie, und stärker bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist.

[0045] Bevorzugte Beispiele von Proteinen, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist, umfassen Proteine mit im wesentlichen derselben Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist, und mit einer Eigenschaft, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist, usw.

[0046] Bevorzugte Beispiele des Proteins, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist, umfassen Proteine, die dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist, und eine Aktivität aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 36 dargestellt ist, usw., insbesondere Proteine, die in WO 98/46620 beschrieben sind, usw.

[0047] Beispiele der Aminosäuresequenz, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, umfassen eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 97 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, stärker bevorzugt mindestens etwa 99 % Homologie, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 99,5 % Homologie, zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, usw.

[0048] Bevorzugte Beispiele der Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, sind Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, und eine Eigenschaft aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, usw.

[0049] Bevorzugte Beispiele des Proteins, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, umfassen Proteine, die dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, und eine Aktivität aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 40 dargestellt ist, usw.

[0050] Beispiele der Aminosäuresequenz, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz aufweist, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, umfassen eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 95 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 96 % Homologie, und stärker bevorzugt mindestens etwa 97 % Homologie, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, usw.

[0051] Bevorzugte Beispiele der Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, sind Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, und eine Eigenschaft aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, usw.

[0052] Bevorzugte Beispiele des Proteins, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, sind Proteine, die dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, und eine Aktivität aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, usw.

[0053] Beispiele der Aminosäuresequenz, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz aufweist, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, umfassen eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 95 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 96 % Homologie, und stärker bevorzugt mindestens etwa 97 % Homologie, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, usw.

[0054] Bevorzugte Beispiele der Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, sind Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, und eine Eigenschaft aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, usw.

[0055] Bevorzugte Beispiele des Proteins, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, sind Proteine, die dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, und eine Aktivität aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, usw.; besonders bevorzugt sind Proteine, die in Biochem. Biophys. Acta, 1491, 369–375, 2000 beschrieben sind, usw.

[0056] Beispiele der Aminosäuresequenz, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz aufweist, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, umfassen eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 95 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 96 Homologie, und stärker bevorzugt mindestens etwa 97 % Homologie, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist.

[0057] Bevorzugte Beispiele der Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, sind Proteine, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, und eine Eigenschaft aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, usw.

[0058] Bevorzugte Beispiele des Proteins, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, sind Proteine, die dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, und eine Aktivität aufweisen, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, usw.; besonders bevorzugt sind Proteine, die in WO 98/46620 beschrieben sind, usw.

[0059] Die im wesentlichen äquivalente Aktivität bezieht sich beispielsweise auf eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität usw. Der Ausdruck im wesentlichen äquivalent wird in der Bedeutung verwendet, daß die Natur dieser Aktivitäten äquivalent ist. Deshalb ist es bevorzugt, daß diese Aktivitäten, wie eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität usw. in der Wirksamkeit äquivalent sind (beispielsweise etwa das 0,5-bis etwa 2fache), und es ist zulässig, daß sogar Unterschiede in den Eigenschaften, wie die Stärke dieser Aktivitäten und Molekulargewicht des Proteins, vorliegen.

[0060] Die Aktivitäten, wie eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität, usw. kann gemäß den öffentlich bekannten Verfahren analysiert werden.

[0061] Beispiele der Aminosäuresequenz, die im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz aufweist, die durch SEQ ID NR. 34 dargestellt ist, umfassen eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 60 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 70 % Homologie, stärker bevorzugt mindestens etwa 80 % Homologie, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 90 % Homologie, zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 34 dargestellt ist, usw.

[0062] Bevorzugte Beispiele des Peptids, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 34 dargestellt ist, sind ein Peptid, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 34 dargestellt ist, und eine Aktivität aufweist, die im wesentlichen zu der der Aminosäuresequenz äquivalent ist (beispielsweise eine kontraktile Aktivität im Krummdarm, eine kontraktile Aktivität im distalen Dickdarm, eine Relaxationsaktivität im proximalen Dickdarm usw.), die durch SEQ ID NR. 34 dargestellt ist, usw.; insbesondere MIT1, das später beschrieben wird, und so weiter.

[0063] In der gesamten vorliegende Beschreibung werden die Peptide und Proteine gemäß der konventionellen Weise zum Beschreiben von Peptiden dargestellt, das heißt, der N-Terminus (Aminoterminus) auf der linken und der C-Terminus (Carboxylterminus) auf der rechten Seite. In den gegenwärtigen Proteinen, einschließlich den Proteinen, die die durch SEQ ID NR. 1 gezeigte Aminosäuresequenz enthalten, kann der C-Terminus eine Carboxylgruppe (-COOH), ein Carboxylat (-COO⁻), ein Amid (-CONH₂) oder ein Ester (-COOR) sein.

[0064] Hierin umfassen Beispiele der Estergruppe, die durch R gezeigt wird, eine C₁₋₆-Alkylgruppe, wie Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl usw.; eine C₃₋₈-Cycloalkylgruppe, wie Cyclopentyl, Cyclohexyl usw.; eine C₆₋₁₂-Arylgruppe, wie Phenyl, α-Naphthyl usw.; eine C₇₋₁₄-Aralkylgruppe, wie eine Phenyl-C₁₋₂-alkylgruppe, z.B., Benzyl, Phenethyl usw.; eine α-Naphthyl-C₁₋₂-alkylgruppe, wie α-Naphthylmethyl usw.; und dergleichen. Außerdem kann Pivaloyloxymethyl oder dergleichen, das weitgehend als ein Ester zur oralen Verabreichung verwendet wird, ebenso verwendet werden.

[0065] Wo das Peptid der Erfindung Carboxylgruppe (oder ein Carboxylat) an einer anderen Stelle als den C-Terminus enthält, kann es amidiert oder verestert werden, und ein solches Amid oder solcher Ester wird ebenso in das Peptid/Protein der Erfindung einbezogen. Die Estergruppe kann dieselbe Gruppe sein, wie die, die in bezug auf den obigen C-terminalen Ester beschrieben wird.

[0066] Außerdem umfassen Beispiele des Peptids der Erfindung Varianten des obigen Peptids/Proteins, wobei die Aminogruppe an dem N-Terminus (z.B. Methioninrest) des Peptids mit einer Schutzgruppe geschützt wird (z.B. eine C₁₋₆-Acylgruppe, wie eine C₂₋₆-Alkanoylgruppe, z.B. Formylgruppe, Acetylgruppe usw.); die, wobei die N-terminale Region in vivo gespalten wird und die so gebildete Glutamygruppe pyroglutaminiert wird; die, wobei ein Substituent (z.B. -OH, -SH, Aminogruppe, Imidazolgruppe, Indolgruppe, Guanidinogruppe usw.)

an der Seitenkette einer Aminosäure in dem Molekül mit einer geeigneten Schutzgruppe geschützt wird (z.B. eine C₁₋₆-Acylgruppe, wie eine C₂₋₆-Alkanoylgruppe, z.B. Formylgruppe, Acetylgruppe usw.), oder konjugierte Peptide/konjugierte Proteine, wie Glycopeptide/Glycoproteine mit Zuckerketten.

[0067] Spezielle Beispiele des Peptids der Erfindung umfassen vom Menschen abgeleitete (stärker bevorzugt vom menschlichen Gehirn abgeleitete) Peptide, bestehend aus der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 20 dargestellt ist, vom Menschen abgeleitete (stärker bevorzugt vom menschlichen Gehirn abgeleitete) Peptide, bestehend aus der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist, usw. Stärker bevorzugt sind es vom Menschen abgeleitete Peptide, bestehend aus der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist.

[0068] Spezielle Beispiele des gegenwärtigen Proteins umfassen vom Menschen abgeleitete (bevorzugt vom menschlichen Gehirn abgeleitete) Proteine, die die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, usw.

[0069] Jedes Teilpeptid, das für das gegenwärtige Protein beschrieben ist, kann als das Teilpeptid des gegenwärtigen Proteins verwendet werden (hierin nachstehend manchmal nur als gegenwärtiges Teilpeptid bezeichnet). Beispielsweise kann ein Teil des gegenwärtigen Proteinmoleküls, der auf der Außenseite einer Zellmembran oder dergleichen exponiert wird, verwendet werden, so lange wie er eine im wesentlichen äquivalente Rezeptorbindungsaktivität aufweist.

[0070] Speziell ist das Teilpeptid des Proteins, das die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, ein Peptid, das die Teile enthält, die als extrazelluläre Domänen (hydrophile Domänen) in der hydrophoben Auswertungsanalyse, wie in [Fig. 7](#) gezeigt, analysiert worden sind. Ein Peptid, das einen hydrophoben Domänenteil enthält, kann ebenso verwendet werden. Außerdem kann das Peptid, das jede Domäne separat enthält, verwendet werden, aber das Peptid kann mehrere Domänen zusammen enthalten.

[0071] Die Anzahl an Aminosäuren in dem gegenwärtigen Teilpeptid beträgt mindestens 20, bevorzugt mindestens 50 und stärker bevorzugt mindestens 100 Aminosäuren in der Aminosäuresequenz, die das gegenwärtige oben beschriebene Protein bildet, und Peptide mit der Aminosäuresequenz mit solchen Anzahlen an Aminosäuren usw. sind bevorzugt.

[0072] Die im wesentlichen selbe Aminosäuresequenz umfaßt eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 50 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 70 % Homologie, stärker bevorzugt mindestens etwa 80 % Homologie, am stärksten bevorzugt mindestens etwa 90 % Homologie und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 % Homologie, zu diesen Aminosäuresequenzen.

[0073] Hierin wird der Ausdruck „im wesentlichen äquivalente Ligandenbindungsaktivität“ in derselben Bedeutung, wie oben definiert, verwendet. Die „im wesentlichen äquivalente Ligandenbindungsaktivität“ kam durch eine Modifikation von öffentlich bekannten Verfahren analysiert werden.

[0074] Das Teilpeptid des Proteins, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 36; SEQ ID NR. 40; SEQ ID NR. 47; SEQ ID NR. 48 oder SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, kann jedes Teilpeptid sein, so lange wie es das zuvor genannte Teilpeptid des Proteins ist, das dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 36; SEQ ID NR. 40, SEQ ID NR. 47, SEQ ID NR. 48 oder SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, und in den Proteinmolekülen werden beispielsweise die mit einer Seite, die sich außerhalb der Zellmembran erstreckt und im wesentlichen äquivalente Ligandenbindungsaktivität aufweist, eingesetzt. Die Anzahl an Aminosäuren in dem Teilpeptid beträgt mindestens 20, bevorzugt mindestens 50 und stärker bevorzugt mindestens 100 Aminosäuren in der Aminosäuresequenz, die das oben beschriebene Protein bildet, und Peptide mit der Aminosäuresequenz von solchen Anzahlen von Aminosäuren usw. sind bevorzugt. Die im wesentlichen selbe Aminosäuresequenz umfaßt eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 50 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 70 % Homologie, stärker bevorzugt mindestens etwa 80 % Homologie, am stärksten bevorzugt mindestens etwa 90 % Homologie und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 % Homologie, zu diesen Aminosäuresequenzen.

[0075] Als die Salze des Peptids der Erfindung und des gegenwärtigen Proteins oder seines Teilpeptids usw. sind physiologisch akzeptable Säureadditionssalze besonders bevorzugt. Beispiele von solchen Salzen sind Salze mit anorganischen Säuren (z.B. Salzsäure, Phosphorsäure, Bromwasserstoffsäure und Schwefelsäure), Salze mit organischen Säuren (z.B. Essigsäure, Ameisensäure, Propionsäure, Fumarsäure, Maleinsäure,

Bernsteinsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure, Oxalsäure, Benzoesäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure) und dergleichen.

[0076] Das erfindungsgemäße Peptid oder gegenwärtige Protein oder Salze davon sowie die Proteine, die die Aminosäuresequenz enthalten, die durch SEQ ID NR. 36, SEQ ID NR. 40, SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, oder Salze davon können durch ein öffentlich bekanntes Verfahren hergestellt werden, das verwendet wird, um ein Peptid/Protein aus oben beschriebenen menschlichen oder anderen Säugerzellen oder -geweben zu reinigen. Alternativ können sie ebenso durch Kultivieren einer Transformante hergestellt werden, die eine DNA trägt, die das erfindungsgemäße Peptid, das erfindungsgemäße Protein oder das Protein, das die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 36, SEQ ID NR. 40, SEQ ID NR. 47 dargestellt ist, kodiert, wie später beschrieben wird. Sie können ebenso durch die später beschriebene Peptid/Protein-Synthese oder durch eine Modifikation davon hergestellt werden. Außerdem kann das Protein, das die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 48 dargestellt ist, oder Salze davon durch eine Modifikation des Verfahrens, das in Biochem. Biophys. Acta, 1491, 369 – 375, 2000 beschrieben ist, hergestellt werden. Das Protein, das die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 49 dargestellt ist, oder Salze davon kann durch eine Modifikation des Verfahrens, das in WO 98/46620 beschrieben ist, hergestellt werden.

[0077] Wenn die Peptide/Proteine oder Salze davon aus menschlichem oder Säugergewebe oder -zellen hergestellt werden, werden die menschlichen oder Säugergewebe oder -zellen homogenisiert und mit einer Säure oder dergleichen extrahiert, und das Extrakt wird isoliert und durch eine Kombination von chromatographischen Techniken, wie Umkehrphasenchromatographie, Ionenaustauschchromatographie und dergleichen, gereinigt.

[0078] Um das Peptid der Erfindung, das gegenwärtige Protein, sein Teilpeptid oder seine Amide, oder Salze davon zu synthetisieren, können kommerziell erhältliche Harze, die für die Peptid/Protein-Synthese genutzt werden, verwendet werden. Beispiele von solchen Harzen umfassen Chlormethylharz, Hydroxymethylharz, Benzhydrylaminharz, Aminomethylharz, 4-Benzyloxybenzylalkoholharz, 4-Methylbenzhydrylaminharz, PAM-Harz, 4-Hydroxymethylmethylphenylacetamidomethylharz, Polyacrylamidharz, 4-(2',4'-Dimethoxyphenylhydroxymethyl)phenoxyharz, 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminoethyl)phenoxyharz usw. Unter Verwendung dieser Harze werden Aminosäuren, worin α -Aminogruppen und funktionelle Gruppen an den Seitenketten entsprechend geschützt werden, auf dem Harz in der Reihenfolge der Sequenz des Ziel-Peptids/Proteins gemäß den verschiedenen Kondensationsverfahren, die in der Technik öffentlich bekannt sind, kondensiert. Am Ende der Reaktion wird das Peptid/Protein aus dem Harz entfernt und gleichzeitig werden die Schutzgruppen entfernt. Darnach wird die intramolekulare Disulfid-Bindungsbildungs-Reaktion in einer stark verdünnten Lösung durchgeführt, um das Ziel-Peptid/Protein oder Amide davon zu erhalten.

[0079] Zur Kondensation der geschützten oben beschriebenen Aminosäuren kann eine Vielzahl von Aktivierungsreagenzien für die Peptid/Protein-Synthese verwendet werden, aber Carbodiimide werden besonders bevorzugt eingesetzt. Beispiele von solchen Carbodiimiden umfassen DCC, N,N'-Diisopropylcarbodiimid, N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid usw. Zur Aktivierung durch diese Reagenzien werden die geschützten Aminosäuren in Kombination mit einem Racemisierungsinhibitor (z.B. HOBt, HOObt) direkt zu dem Harz zugegeben, oder die geschützten Aminosäuren werden zuvor in Form von symmetrischen Säureanhydriden, HOBt-Estern oder HOObt-Estern aktiviert, gefolgt von der Zugabe der so aktivierten geschützten Aminosäuren zu dem Harz.

[0080] Lösungsmittel, die zur Verwendung geeignet sind, um die geschützten Aminosäuren zu aktivieren oder mit dem Harz zu kondensieren, können aus den Lösungsmitteln ausgewählt werden, die dafür bekannt sind, daß sie für die Peptid/Protein-Kondensationsreaktionen nützlich sind. Beispiele von solchen Lösungsmitteln sind Säureamide, wie N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid, N-Methylpyrrolidon usw.; halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie Methylenchlorid, Chloroform usw.; Alkohole, wie Trifluorethanol usw.; Sulfoxide, wie Dimethylsulfoxid usw.; Ether, wie Pyridin, Dioxan, Tetrahydrofuran usw.; Nitrile, wie Acetonitril, Propionitril usw.; Ester, wie Methylacetat, Ethylacetat usw.; und geeignete Gemische aus diesen Lösungsmitteln. Die Reaktionstemperatur wird geeigneterweise aus dem Bereich ausgewählt, der dafür bekannt ist, daß er auf die Proteinbindungsreaktionen anwendbar ist, und wird normalerweise in dem Bereich von ungefähr -20°C bis 50°C ausgewählt. Die aktivierten Aminosäurederivate werden im allgemeinen in einem Überschuß vom 1,5- bis 4fachen verwendet. Die Kondensation wird unter Verwendung der Ninhydrinreaktion kontrolliert; wenn die Kondensation unzureichend ist, kann die Kondensation durch Wiederholen der Kondensationsreaktion ohne die Entfernung der Schutzgruppen vollendet werden. Wenn die Kondensation nach dem Wiederholen der Reaktion noch unzureichend ist, werden nicht-umgesetzte Aminosäuren mit Essigsäureanhydrid oder Acetylimidazol acetyliert.

[0081] Beispiele der Schutzgruppen, die verwendet werden, um die Ausgangsaminogruppen zu schützen, umfassen Z, Boc, t-Pentyloxycarbonyl, Isobornyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, Adamantyloxycarbonyl, Trifluoracetyl, Phthaloyl, Formyl, 2-Nitrophenylsulfenyl, Diphenylphosphinothioyl, Fmoc usw.

[0082] Eine Carboxylgruppe kann durch beispielsweise Alkylveresterung (in der Form von linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylestern der Alkyleinheit, wie Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, t-Butyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl, 2-Adamantyl usw.), Aralkylveresterung (beispielsweise Veresterung in Form von Benzylester, 4-Nitrobenzylester, 4-Methoxybenzylester, 4-Chlorbenzylester, Benzhydrylester usw.), Phenacylveresterung, Benzyloxycarbonylhydrazidierung, t-Butoxycarbonylhydrazidierung, Tritylhydrazidierung oder dergleichen geschützt werden.

[0083] Die Hydroxylgruppe von Serin kann beispielsweise durch ihre Veresterung oder Veretherung geschützt werden. Beispiele von Gruppen, die geeigneterweise für die Veresterung verwendet werden, umfassen eine Niederalkanoylgruppe, wie Acetylgruppe, eine Aroylgruppe, wie Benzoylgruppe, und eine Gruppe, die von Kohlensäure abgeleitet ist, wie Benzyloxycarbonylgruppe und Ethoxycarbonylgruppe. Beispiele einer Gruppe, die geeigneterweise für die Veretherung verwendet wird, umfassen Benzylgruppe, Tetrahydropyranylgruppe, t-Butylgruppe usw.

[0084] Beispiele von Gruppen zum Schutz der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyrosin umfassen Bzl, Cl₂-Bzl, 2-Nitrobenzyl, Br-Z, t-Butyl usw.

[0085] Beispiele von Gruppen, die verwendet werden, um die Imidazoleinheit von Histidin zu schützen, umfassen Tos, 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl, DNP, Benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, Fmoc usw.

[0086] Beispiele der aktivierten Carboxylgruppen in den Ausgangsaminosäuren umfassen die entsprechenden Säureanhydride, Azide, aktivierten Ester (Ester mit Alkoholen (z.B. Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol, 2,4-Dinitrophenol, Cyanomethylalkohol, p-Nitrophenol, HONB, N-Hydroxysuccimid; N-Hydroxyphthalimid, HOBt)). Als die aktivierten Aminosäuren, worin die Aminogruppen in dem Ausgangsmaterial aktiviert werden, werden die entsprechenden Phosphoramide eingesetzt.

[0087] Um die Schutzgruppen zu beseitigen (abzuspalten), werden katalytische Reduktion unter Wasserstoffgasstrom in Gegenwart eines Katalysators, wie Pd-Ruß oder Pd-Kohlenstoff eine Säurebehandlung mit wasserfreiem Fluorwasserstoff, Methansulfonsäure, Trifluormethansulfonsäure oder Trifluoracetat, oder eine Gemischlösung aus diesen Säuren; eine Behandlung mit einer Base, wie Diisopropylethylamin, Triethylamin, Piperidin oder Piperazin; und Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak verwendet. Die Beseitigung durch die oben beschriebene Säurebehandlung wird im allgemeinen bei einer Temperatur von ungefähr -20 °C bis 40 °C durchgeführt. Bei der Säurebehandlung ist es effizient, einen Kationenfänger, wie Anisol, Phenol, Thioanisol, m-Cresol, p-Cresol, Dimethylsulfid, 1,4-Butandithiol oder 1,2-Ethandithiol zuzugeben. Außerdem wird die 2,4-Dinitrophenylgruppe, die als die Schutzgruppe für das Imidazol von Histidin verwendet wird, durch eine Behandlung mit Thiophenol entfernt. Die Formylgruppe, die als die Schutzgruppe des Indols von Tryptophan verwendet wird, wird durch die zuvor genannte Säurebehandlung in Gegenwart von 1,2-Ethandithiol oder 1,4-Butandithiol sowie durch eine Behandlung mit einem Alkali, wie einer verdünnten Natriumhydroxidlösung, verdünntem Ammoniak usw., beseitigt.

[0088] Der Schutz von funktionellen Gruppen, die nicht an der Reaktion der Ausgangsmaterialien beteiligt sein sollten, die Beseitigung der Schutzgruppen und die Aktivierung der funktionellen Gruppen, die an der Reaktion beteiligt sind, können entsprechend aus den öffentlich bekannten Gruppen und öffentlich bekannten Mitteln ausgewählt werden.

[0089] Bei einem anderen Verfahren zur Erhaltung der Amide des Peptids/Proteins wird beispielsweise die α-Carboxylgruppe der Carboxyl-terminalen Aminosäure zunächst durch Amidierung geschützt; die Peptidkette wird dann von der Aminogruppenseite auf eine gewünschte Länge verlängert. Danach werden ein Peptid/Protein, bei dem nur die Schutzgruppe der N-terminalen α-Aminogruppe aus der Peptidkette beseitigt worden ist, und ein Peptid/Protein, bei dem nur die Schutzgruppe aus der C-terminalen Carboxylgruppe beseitigt worden ist, hergestellt. Die zwei Peptide/zwei Proteine werden in einem Gemisch aus den oben beschriebenen Lösungsmitteln kondensiert. Die Einzelheiten der Kondensationsreaktion sind dieselben, wie oben beschrieben. Nach dem das geschützte Peptid/geschützte Protein, das durch Kondensation erhalten wurde, gereinigt wurde, wurden alle Schutzgruppen durch das oben beschriebene Verfahren beseitigt, um das gewünschte rohe Peptid/rohe Protein zu erhalten. Das rohe Peptid/rohe Protein wird durch verschiedene Reinigungsmittel ge-

reinigt. Lyophilisierung der Hauptfraktion ergibt das Amid des gewünschten Peptids/Proteins.

[0090] Um das veresterte Peptid/Protein herzustellen, wird beispielsweise die α -Carboxylgruppe der Carboxyl-terminalen Aminosäure mit dem gewünschten Alkohol kondensiert, um den Aminosäureester herzustellen, worauf die Verfahrensweise folgt, die der Herstellung des amidierten Proteins oben ähnelt, wodurch das gewünschte veresterte Peptid/Protein erhalten wurde.

[0091] Das Peptid der Erfindung kann gemäß der öffentlich bekannten Peptidsynthese hergestellt werden.

[0092] Das Teilpeptid des gegenwärtigen Proteins der Erfindung oder Salze davon kann durch öffentlich bekannte Verfahren zur Peptidsynthese oder durch Spalten des gegenwärtigen Proteins mit einer geeigneten Peptidase hergestellt werden.

[0093] Für die Verfahren zur Peptidsynthese kann beispielsweise entweder Festphasensynthese oder Flüssigphasensynthese verwendet werden. Das heißt, das Teilpeptid oder die Aminosäuren, die das Peptid der Erfindung oder das Protein der Erfindung bilden, werden mit dem verbliebenen Teil kondensiert. Wo das Produkt Schutzgruppen umfaßt, werden diese Schutzgruppen entfernt, wodurch das gewünschte Peptid erhalten wurde. Öffentlich bekannte Verfahren zur Kondensation und Beseitigung der Schutzgruppen werden in (1) bis (5) nachstehend beschrieben.

(1) M. Bodanszky & M. A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder & Luebke: The Peptide, Academic Press, New York (1965)

(3) Nobuo Izumiya, et al.: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and experiments of peptide synthesis), veröffentlicht von Maruzen Co. (1975)

(4) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

(5) Haruaki Yajima Hrsg.: Zoku Iyakuhi no Kaihatsu (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Bd. 14, Peptide Synthesis, veröffentlicht von Hirokawa Shoten

[0094] Nach der Beendigung der Reaktion kann das Produkt durch eine Kombination von konventionellen Reinigungsverfahren, wie Lösungsmittlextraktion, Destillation, Säulenchromatographie, Flüssigchromatographie und Umkristallisierung gereinigt und isoliert werden, wodurch das Peptid oder das Teilpeptid der Erfindung erhalten wird. Wenn das Peptid oder das Teilpeptid, das durch die obigen Verfahren erhalten wurde, in einer freien Form vorliegt, kann das Peptid in ein entsprechendes Salz durch ein öffentlich bekanntes Verfahren umgewandelt werden; wenn das Protein in einer Salzform erhalten wird, kann es in eine freie Form durch ein öffentlich bekanntes Verfahren umgewandelt werden.

[0095] Die DNA, die das Peptid/Protein der Erfindung kodiert, kann jede DNA sein, so lange wie sie die Basensequenz umfaßt, die das oben beschriebene Peptid/Protein der Erfindung kodiert. Eine solche DNA kann ebenso irgendeine der genomischen DNA, genomischen DNA-Bibliothek, cDNA, abgeleitet von den oben beschriebenen Zellen oder Geweben, cDNA-Bibliothek, abgeleitet von den oben beschriebenen Zellen oder Geweben, und synthetische DNA sein. Der Vektor, der für die Bibliothek verwendet werden soll, kann eine Bakteriophage, Plasmid, Cosmid, Phagemid und dergleichen sein. Außerdem kann die DNA durch Umkehrtranskriptase-Polymerase-Kettenreaktion (hierin nachstehend RT-PCR abgekürzt) mit gesamter RNA- oder mRNA-Fraktion, hergestellt aus den oben beschriebenen Zellen oder Geweben, amplifiziert werden.

[0096] Speziell kann die DNA, die das Peptid der Erfindung kodiert, irgendeine von beispielsweise der DNA sein, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 26 oder SEQ ID NR. 27 dargestellt ist.

[0097] Beispiele der DNA, die zu der DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 26 dargestellt ist, unter hochstringenten Bedingungen hybridisierbar ist, umfassen DNAs mit mindestens etwa 60 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 70 % Homologie und stärker bevorzugt mindestens etwa 80 % Homologie, zu der DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 26 dargestellt ist, usw.

[0098] Beispiele der DNA, die zu der DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 27 dargestellt ist, unter hochstringenten Bedingungen hybridisierbar ist, umfassen DNAs mit mindestens etwa 60 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 70 % Homologie und stärker bevorzugt mindestens etwa 80 % Homologie, zu der DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 27 dargestellt ist, usw.

[0099] Ebenso kann die DNA, die das gegenwärtige Protein der Erfindung kodiert, irgendeine von beispielsweise einer DNA, die eine Basensequenz umfaßt, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist,

und einer DNA sein, die DNA enthält, die zu einer DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, unter hochstringenten Bedingungen hybridisierbar ist, und ein Protein kodiert, das eine Aktivität aufweist (z.B. eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität usw.), die im wesentlichen zu der des Proteins der Erfindung äquivalent ist.

[0100] Beispiele der DNA, die zu einer DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, unter hochstringenten Bedingungen hybridisierbar ist, umfassen DNAs mit mindestens etwa 90 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 95 % Homologie und stärker bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, zu der Basensequenz, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, usw.

[0101] Die Hybridisierung kann durch öffentlich bekannte Verfahren oder durch Modifikationen davon beispielsweise gemäß dem Verfahren, das in Molecular Cloning, 2nd. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) beschrieben ist, durchgeführt werden usw. Eine kommerziell erhältliche Bibliothek kann ebenso gemäß den Instruktionen des beiliegenden Herstellerprotokolls verwendet werden. Die Hybridisierung kann bevorzugt unter hochstringenten Bedingungen durchgeführt werden.

[0102] Die hochstringenten Bedingungen, die hierin verwendet werden, sind beispielsweise eine Natriumkonzentration von ungefähr 19 bis 40 mM, bevorzugt ungefähr 19 bis 20 mM bei einer Temperatur von ungefähr 50 bis 70 °C, bevorzugt ungefähr 60 bis 65 °C. Insbesondere sind Hybridisierungsbedingungen bei einer Natriumkonzentration von etwa 19 mM bei einer Temperatur von etwa 65 °C am stärksten bevorzugt.

[0103] Speziell gibt es für die DNA, die das Peptid kodiert, das die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 20 dargestellt ist, eine DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 26 dargestellt ist; gibt es für die DNA, die das Peptid kodiert, das die Aminosäuresequenz enthält, das durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist, eine DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 27 dargestellt ist; gibt es für die DNA, die das Peptid kodiert, die die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 22 dargestellt ist, eine DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 28 dargestellt ist; und gibt es für die DNA, die das Peptid kodiert, das die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 23 dargestellt ist, eine DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 29 dargestellt ist.

[0104] Für die DNA, die das Protein kodiert, die die Aminosäuresequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, gibt es eine DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist.

[0105] Die Nukleotide (Oligonukleotid), die die Basensequenz oder einen Teil der Basensequenz umfassen, die komplementär zu der DNA ist, die das Peptid der Erfindung kodiert, werden in der Bedeutung verwendet, daß nicht nur die DNA, die das Peptid der Erfindung kodiert, sondern auch RNA einbezogen ist.

[0106] Antisense(oligo)nukleotide (Nukleinsäure), die die Replikation oder Expression des Gens für das Peptid der Erfindung inhibieren können, können konstruiert und synthetisiert sein, basierend auf der geklonten oder bestimmten Basensequenzinformation der DNA, die das Peptid kodiert. Ein solches (Oligo)nukleotid (Nukleinsäure) ist zur RNA des Gens für das Peptid der Erfindung hybridisierbar, wodurch die Synthese oder Funktion der RNA inhibiert wird, oder kann die Genexpression des Peptids der Erfindung über Interaktion mit RNA, die mit dem Peptid der Erfindung verbunden ist, modulieren oder kontrollieren. (Oligo)nukleotide, die zu den ausgewählten Sequenzen von RNA, die mit dem Peptid der Erfindung verbunden ist, komplementär sind, und (Oligo)nukleotide, die speziell mit der RNA, die mit dem Peptid der Erfindung verbunden sind, hybridisierbar sind, sind beim Modulieren oder Kontrollieren der Genexpression des Peptids der Erfindung in vivo und in vitro nützlich und zur Behandlung oder Diagnose von Krankheiten usw. nützlich.

[0107] Der Ausdruck „entsprechend“ wird in der Bedeutung verwendet, die homolog zu oder komplementär zu einer speziellen Sequenz des Nukleotids oder Basensequenz oder Nukleinsäure, einschließlich Gen, ist. Der Ausdruck „entsprechend“ zwischen Nukleotiden, Basensequenzen oder Nukleinsäuren und Peptiden bezieht sich normalerweise auf Aminosäuren eines Peptids unter Instruktionen, die aus der Sequenz von Nukleotiden (Nukleinsäuren) oder ihren Komplements abgeleitet sind. Die 5'-Enden-Haarnadelschleife, die 5'-Enden-6-Basenpaar-Wiederholungen, die 5'-Enden-untranslatierte Region, das Polypeptid-Translationsinitiationscodon, die Protein-kodierende Region, das ORF-Translationsinitiationscodon, die 3'-untranslatierte Region, die 3'-Enden-Palindromregion und die 3'-Enden-Haarnadelschleife können als bevorzugte Targetregionen ausgewählt werden, obwohl jede andere Region ebenso als ein Target in Genen des Peptids der Erfindung ausgewählt werden kann.

[0108] Die Beziehung zwischen den targetierten Nukleinsäuren und den (Oligo)nukleotiden, die komplementär zu mindestens einem Teil des Targets sind, speziell die Beziehung zwischen dem Target und den (Oligo)nukleotiden, die zu dem Target hybridisierbar sind, kann als „Antisense“ bezeichnet werden. Beispiele von Antisense(oligo)nukleotiden umfassen Polydeoxynukleotide, die 2-Deoxy-D-ribose tragen, Polydeoxynukleotide, die D-Ribose tragen, jeder andere Typ von Polynukleotiden, die N-Glycoside einer Purin- oder Pyrimidinbase sind, oder andere Polymere, die Nicht-Nukleotidhauptketten umfassen (z.B. Proteinnukleinsäuren und kommerziell erhältliche synthetische sequenzspezifische Nukleinsäurepolymere) oder andere Polymere, die Nicht-standardverknüpfungen umfassen (vorausgesetzt, daß die Polymere Nukleotide mit einer solchen Konfiguration enthalten, die die Basenpaarung oder Basenstapelung erlauben, wie sie in DNA oder RNA gefunden werden können) usw. Die Antisense-Polynukleotide können doppelsträngige DNA, einsträngige DNA, doppelsträngige RNA, einsträngige RNA oder ein DNA : RNA-Hybrid sein, und können außerdem nicht-modifizierte Polynukleotide oder nicht-modifizierte Oligonukleotide umfassen, die mit öffentlich bekannten Modifikationstypen, beispielsweise die mit Markierungen, die in der Technik bekannt sind, die mit caps-methylierten Polynukleotiden, die mit Substitution von einem oder mehreren natürlich vorkommenden Nukleotiden durch ihre Analoga, die mit intramolekularen Modifikationen von Nukleotiden, wie die mit ungeladenen Verknüpfungen (z.B. Methylphosphonate, Phosphotriester, Phosphoramidate, Carbamate usw.) und die mit geladenen Verknüpfungen oder Schwefel-umfassenden Verknüpfungen (z.B. Phosphorthioate, Phosphordithioate usw.), die mit Seitenkettengruppen, wie Proteine (Nukleasen, Nukleaseinhibitoren, Toxine, Antikörper, Signalpeptide, Poly-L-lysin usw.), Saccharide (z.B. Monosaccharide usw.), die mit Intercalatoren (z.B. Acridin, Psoralen usw.), die, umfassend Chelatoren (z.B. Metalle, radioaktive Metalle, Bor, oxidative Metalle usw.), die, umfassend Alkylierungsmittel, die mit modifizierten Verknüpfungen (z.B. α -anomere Nukleinsäuren usw.), und dergleichen. Hierin sind unter den Ausdrücken „Nukleosid“, „Nukleotid“ und „Nukleinsäure“ Einheiten zu verstehen, die nicht nur die Purin- und Pyrimidinbasen enthalten, sondern ebenso andere heterocyclische Basen, die modifiziert worden sind. Diese Modifikationen können methylierte Purine und Pyrimidine, acylierte Purine und Pyrimidine und andere heterocyclische Ringe umfassen. Modifizierte Nukleotide und modifizierte Nukleotide umfassen ebenso Modifikationen auf der Zuckereinheit, wobei beispielsweise eine oder mehrere Hydroxylgruppen gegebenenfalls mit einem Halogenatom(en), einer aliphatischen Gruppe(n) usw. substituiert sein kann, oder zu den entsprechenden funktionellen Gruppen, wie Ethern, Aminen oder dergleichen, umgewandelt werden kann/können.

[0109] Die Antisense-Nukleinsäure ist RNA, DNA oder eine modifizierte Nukleinsäure. Spezielle Beispiele der modifizierten Nukleinsäure sind Schwefel- und Thiophosphatderivate von Nukleinsäuren und die, die gegen den Abbau von Polynukleosidamiden oder Oligonukleosidamiden resistent sind, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Antisense-Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung können bevorzugt modifiziert werden, basierend auf der folgenden Gestaltung, das heißt, durch Erhöhen der intrazellulären Stabilität der Antisense-Nukleinsäure, Erhöhen der zellulären Durchlässigkeit der Antisense-Nukleinsäure, Erhöhen der Affinität der Nukleinsäure für den targetierten codierenden Strang auf ein höheres Niveau, oder Minimieren der Toxizität, wenn vorhanden, von der Antisense-Nukleinsäure.

[0110] Viele dieser Modifikationen sind in der Technik bekannt, wie in J. Kawakami, et al., Pharm. Tech. Japan, Bd. 8, S. 247, 1992; Bd. 8, S. 395, 1992; S. T. Crooke, et al. Hrsg., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993; usw. offenbart.

[0111] Die Antisense-Nukleinsäure kann veränderte oder modifizierte Zucker, Basen oder Verknüpfungen umfassen. Die Antisense-Nukleinsäure kann ebenso in einer spezialisierten Form bereitgestellt werden, wie Liposomen, Mikrokügelchen, oder kann auf die Gentherapie angewandt werden, oder kann in Kombination mit angelagerten Einheiten bereitgestellt werden. Diese angelagerten Einheiten umfassen Polykationen, wie Polylysin, die als Ladungsneutralisatoren der Phosphathauptkette fungieren, oder hydrophobe Einheiten, wie Lipide (z.B. Phospholipide, Cholesterole usw.), die die Interaktion mit Zellmembranen verbessern oder die Aufnahme von Nukleinsäure erhöhen. Bevorzugte Beispiele der Lipide, die angelagert werden sollen, sind Cholesterole oder Derivate davon (z.B. Cholesterylchlorameisensäureester, Cholsäure usw.). Diese Einheiten können mit der Nukleinsäure an den 3'- oder 5'-Enden davon zugeführt werden und können ebenso daran durch eine Base, einen Zucker oder intramolekulare Nukleosidverknüpfung angelagert sein. Andere Einheiten können Capping-Gruppen sein, die speziell an den 3'- oder 5'-Enden der Nukleinsäure plziert sind, um den Abbau durch Nukleasen, wie Exonuklease, RNase, usw. zu verhindern. Diese Capping-Gruppen umfassen Hydroxylschutzgruppen, die in der Technik bekannt sind, einschließlich Glykolen wie Polyethylenglykol, Tetraethylenglykol und dergleichen, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0112] Die inhibierende Wirkung der Antisense-Nukleinsäure kann unter Verwendung der Transformante der vorliegenden Erfindung, des Genexpressionssystems der vorliegenden Erfindung in vivo und in vitro oder des

Translationssystem des Proteins in vivo und in vitro untersucht werden. Die Nukleinsäure kann auf die Zellen durch eine Vielzahl von öffentlich bekannten Verfahren angewendet werden.

[0113] Die DNA, die das gegenwärtige Teilpeptid kodiert, kann jede DNA sein, so lange wie sie die Basensequenz enthält, die das oben beschriebene gegenwärtige Teilpeptid kodiert. Die DNA kann ebenso irgendeine von genomischer DNA, genomischer DNA-Bibliothek, cDNA, abgeleitet aus den oben beschriebenen Zellen und Geweben, cDNA-Bibliothek, abgeleitet aus den oben beschriebenen Zellen und Geweben, und synthetischer DNA sein. Der Vektor, der für die Bibliothek verwendet werden soll, kann ein Bakteriophage, Plasmid, Cosmid und Phagemid sein. Die DNA kann ebenso direkt durch Umkehrtranskriptase-Polymerase-Kettenreaktion (hierin nachstehend als RT-PCR abgekürzt) unter Verwendung der mRNA-Fraktion, hergestellt aus den oben beschriebenen Zellen und Geweben, amplifiziert werden.

[0114] Speziell kann die DNA, die das gegenwärtige Teilpeptid kodiert, irgendeine von beispielsweise einer DNA, die eine Teilbasensequenz der DNA mit der Basensequenz, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, enthält, oder (2) einer DNA sein, die eine Teilbasensequenz der DNA mit einer Basensequenz enthält, die zu der Basensequenz, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, unter hochstringenten Bedingungen hybridisierbar ist, und ein Protein kodiert, das eine Aktivität aufweist (z.B. eine Ligandenbindungsaktivität, eine Signaltransduktionsaktivität usw.), die im wesentlichen zu der des gegenwärtigen Proteins äquivalent ist.

[0115] Beispiele der DNA, die zu einer DNA, die die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, unter hochstringenten Bedingungen hybridisierbar ist, umfassen DNAs, die eine Basensequenz mit mindestens etwa 90 % Homologie, bevorzugt mindestens etwa 95 % Homologie und stärker bevorzugt mindestens etwa 98 % Homologie, zu der Basensequenz, die durch SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, enthalten, usw.

[0116] Zum Klonen der DNA, die das Peptid der Erfindung vollständig kodiert, kann die DNA durch PCR unter Verwendung von synthetischen DNA-Primern, die einen Teil der Basensequenz einer DNA enthalten, die das Peptid der Erfindung kodiert, amplifiziert werden, oder die DNA, die in einen geeigneten Vektor eingeführt wird, kann durch Hybridisierung mit einem markierten DNA-Fragment oder synthetischer DNA, die einen Teil oder die vollständige Region des Peptids der Erfindung kodieren, ausgewählt werden. Die Hybridisierung kann beispielsweise gemäß dem Verfahren durchgeführt werden, daß in Molecular Cloning, 2nd, (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) beschrieben ist. Die Hybridisierung kann ebenso unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Bibliothek gemäß dem Protokoll, das in den beiliegenden Instruktionen beschrieben ist, durchgeführt werden.

[0117] Das Klonen der DNA, die das gegenwärtige Protein oder sein. Teilpeptid vollständig kodiert (hierin nachstehend nur als das gegenwärtige Protein bezeichnet), kann in einer Weise durchgeführt werden, die dem Klonen der DNA, die das Peptid der Erfindung vollständig kodiert, ähnlich ist.

[0118] Die Umwandlung der Basensequenz der DNA kann durch öffentlich bekannte Verfahren, wie ODA-LA PCR, das Gapped Duplex-Verfahren oder das Kunkel-Verfahren usw., oder Modifikationen davon, durch PCR oder unter Verwendung von öffentlich bekannten Kits, erhältlich als MutanTM-supper Express Km (hergestellt von Takara Shuzo Co., Ltd.), MutanTM-K (hergestellt von Takara Shuzo Co., Ltd.) oder dergleichen bewirkt werden.

[0119] Die geklonte DNA, die das Peptid/Protein kodiert, kann als solches in Abhängigkeit des Zwecks oder, wenn gewünscht, nach der Digestion mit einem Restriktionsenzym oder nach der Addition eines Linkers dazu verwendet werden. Die DNA kann ATG als ein Translationsinitiationscodon an dem 5'-Ende davon tragen und kann außerdem TAA, TGA oder TAG als ein Translationsterminationscodon an dem 3'-Ende davon tragen. Diese Translationsinitiations- und -terminationscodone können ebenso unter Verwendung eines geeigneten synthetischen DNA-Adapters zugefügt werden.

[0120] Der Expressionsvektor für das Peptid/Protein kann hergestellt werden, beispielsweise durch (a) Exzidieren des gewünschten DNA-Fragments aus der DNA, die das Peptid/Protein der Erfindung kodiert, und dann (b) Ligieren des DNA-Fragments mit einem geeigneten Expressionsvektor stromabwärts eines Promotors in dem Vektor.

[0121] Beispiele des Vektors umfassen Plasmide, abgeleitet von E. Coli (z.B. pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), Plasmide, abgeleitet von Bacillus subtilis (z.B. pUB110, pTP5, pC194), Plasmide, abgeleitet von Hefe

(z.B. pSH19, pSH15), Bakteriophagen, wie λ Phage usw., Tierviren, wie Retrovirus, Vacciniavirus, Baculovirus usw. sowie pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo, pcDNA3.1, pRc/CMV2, pRc/RSV (Invitrogen), usw.

[0122] Der Promotor, der in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann jeder Promotor sein, wenn er mit einem Wirt, der für die Genexpression verwendet werden soll, gut zusammenpaßt. Bei der Verwendung von Tierzellen als Wirt umfassen die Beispiele des Promotors SR α -Promotor, SV40-Promotor, HIV-LTR-Promotor, CMV-Promotor, HSV-TK-Promotor usw.

[0123] Unter diesen wird der CMV-Promotor oder SR α -Promotor bevorzugt verwendet. Wenn der Wirt Bakterien der Gattung *Escherichia* ist, umfassen bevorzugte Beispiele des Promotors trp-Promotor, lac-Promotor, recA-Promotor, λ P_L-Promotor, lpp-Promotor usw. Bei der Verwendung von Bakterien der Gattung *Bacillus* als Wirt sind bevorzugte Beispiele des Promotors SPO1-Promotor, SPO2-Promotor und penP-Promotor. Wenn Hefe als Wirt verwendet wird, sind bevorzugte Beispiele des Promotors PHO5-Promotor, PGK-Promotor, GAP-Promotor und ADH-Promotor. Wenn Insektenzellen als Wirt verwendet werden, umfassen bevorzugte Beispiele des Promotors Polyhedrin-Promoter und P10-Promotor.

[0124] Zusätzlich zu den vorhergehenden Beispielen kann der Expressionsvektor außerdem gegebenenfalls einen Enhancer, ein Splicing-Signal, ein Poly-A-Additionssignal, einen Selektionsmarker, SV40-Replikationsstartpunkt (hierin nachstehend manchmal als SV40ori abgekürzt) usw. umfassen. Beispiele des Selektionsmarkers umfassen Dihydrofolatreduktase- (hierin nachstehend manchmal als dhfr abgekürzt) -Gen [Methotrexat-Resistenz (MTX-Resistenz)], Ampicillin-Resistenzgen (hierin manchmal als Amp^r abgekürzt), Neomycin-Resistenzgen (hierin nachstehend manchmal als Neo^r abgekürzt, G418-Resistenz) usw. Insbesondere kann, wenn dhfr-Gen als der Selektionsmarker in CHO-(dhfr)-Zellen verwendet wird, die Selektion ebenso auf Thymidin-freien Medien durchgeführt werden.

[0125] Wenn notwendig, wird eine Signalsequenz, die mit einem Wirt zusammenpaßt, zu dem N-Terminus des Proteins der Erfindung zugefügt. Beispiele der Signalsequenz, die verwendet werden kann, sind Pho-A-Signalsequenz, OmpA-Signalsequenz usw. bei der Verwendung von Bakterien der Gattung *Escherichia* als Wirt; α -Amylase-Signalsequenz, Subtilisin-Signalsequenz, usw. bei der Verwendung von Bakterien der Gattung *Bacillus* als Wirt; MFa-Signalsequenz, SUC2-Signalsequenz usw. bei der Verwendung von Hefe als Wirt; bzw. Insulin-Signalsequenz, α -Interferon-Signalsequenz, Antikörpermolekül-Signalsequenz usw. bei der Verwendung von Tierzellen als Wirt.

[0126] Unter Verwendung des Vektors, der die DNA umfaßt, die das so konstruierte Peptid/Protein der Erfindung kodiert, können Transformanten hergestellt werden.

[0127] Beispiele des Wirts, der eingesetzt werden kann, sind Bakterien, die zu der Gattung *Escherichia* gehören, Bakterien, die zu der Gattung *Bacillus* gehören, Hefeinsektenzellen, Insekten und Tierzellen usw.

[0128] Spezielle Beispiele der Bakterien, die zu der Gattung *Escherichia* gehören, umfassen *Escherichia coli* K12 DH1 [Prpc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)], C600 (Genetics, 39, 440 (1954)), usw.

[0129] Beispiele der Bakterien, die zu der Gattung *Bacillus* gehören, umfassen *Bacillus subtilis* MI114 [Gene, 24, 255 (1983)], 207–21 (Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)), usw.

[0130] Beispiele von Hefe umfassen *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-SD, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, *Pichia pastoris*, usw.

[0131] Beispiele von Insektenzellen umfassen für den Virus AcNPV *Spodoptera-frugiperda*-Zellen (Sf-Zellen), MG1-Zellen, abgeleitet vom Mitteldarm von *Trichoplusia ni*, High FiveTM-Zellen, abgeleitet vom Ei von *Trichoplusia ni*, Zellen, abgeleitet von *Mamestra brassicae*, Zellen, abgeleitet von *Estigmene acrea*, usw.; und für den Virus BmNPV werden *Bombyx-mori*-N-Zellen (BmN-Zellen), usw. verwendet. Beispiele der Sf-Zelle, die verwendet werden kann, sind Sf9-Zellen (ATCC CRL1711) und Sf21-Zellen (beide Zellen werden in Vaughn, J. L. et al., In Vivo, 13, 213–217 (1977), usw. beschrieben).

[0132] Als das Insekt kann beispielsweise eine Larve von *Bombyx mori* usw. verwendet werden [Maeda, et al., Nature, 315, 592 (1985)].

[0133] Beispiele von Tierzellen umfassen Affenzellen COS-7, Vero, Zellen vom Chinesischen Hamster CHO (hierin nachstehend als CHO-Zellen bezeichnet), dhfr-Gen-defiziente Zellen vom Chinesischen Hamster CHO (hierin nachstehend einfach als CHO(dhfr⁻)-Zelle bezeichnet), Maus-L-Zellen, Maus-AtT-20, Maus-Myelomzellen, Ratten-GH3, Menschen-FL-Zellen, usw.

[0134] Bakterien, die zu der Gattung *Escherichia* gehören, können beispielsweise durch das Verfahren transformiert werden, das in Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972) oder Gen, 17, 107 (1982), usw. beschrieben ist.

[0135] Bakterien, die zu der Gattung *Bacillus* gehören, können beispielsweise durch das Verfahren transformiert werden, das in Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979), usw. beschrieben ist.

[0136] Hefe kann beispielsweise durch das Verfahren transformiert werden, das in Enzymology, 194, 182–187 (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1929 (1978), usw. beschrieben ist.

[0137] Insektenzellen oder Insekten können beispielsweise gemäß dem Verfahren transformiert werden, das in Bio/Technology, 6, 47–55 (1988), usw. beschrieben ist.

[0138] Tierzellen können beispielsweise gemäß dem Verfahren transformiert werden, das in Saibo Kogaku (Cell Engineering), Extraausgabe 8, Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol (New Cell Engineering Experimental Protocol), 263–267 (1995), (veröffentlicht von Shujunsha), oder Virology, 52, 456 (1973) beschrieben ist.

[0139] Daher kann die Transformante, transformiert mit dem Expressionsvektor, der die DNA umfaßt, die das G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein kodiert, erhalten werden.

[0140] Wenn der Wirt Bakterien sind, die zu der Gattung *Escherichia* oder der Gattung *Bacillus* gehören, kann die Transformante geeigneterweise in einem flüssigen Medium inkubiert werden, welches Materialien umfaßt, die für das Wachstum der Transformante erforderlich sind, wie Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Materialien und so weiter. Beispiele der Kohlenstoffquellen umfassen Glukose, Dextrin, lösliche Stärke, Saccharose usw. Beispiele der Stickstoffquellen umfassen anorganische oder organische Materialien, wie Ammoniumsalze, Nitratsalze, Maisquellwasser, Pepton, Casein, Fleischextrakt, Sojabohnenkuchen, Kartoffelextrakt usw. Beispiele der anorganischen Materialien sind Calciumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid usw. Außerdem können Hefe, Vitamine, Wachstumsbeschleunigungsfaktoren usw. ebenso zu dem Medium zugegeben werden. Bevorzugt wird der pH des Mediums auf etwa 5 bis etwa 8 eingestellt.

[0141] Ein bevorzugtes Beispiel des Mediums zur Inkubation der Bakterien, die zu der Gattung *Escherichia* gehören, ist M9-Medium, ergänzt mit Glukose und Casaminoäuren [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431–433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972]. Wenn notwendig, kann eine Chemikalie wie 3 β -Indolylacrylsäure zu dem Medium zugegeben werden, wodurch der Promotor effizient aktiviert wird.

[0142] Wenn die Bakterien, die zu der Gattung *Escherichia* gehören, als der Wirt verwendet werden, wird die Transformante normalerweise bei etwa 15 °C bis etwa 43 °C für etwa 3 Stunden bis etwa 24 Stunden kultiviert. Wenn notwendig, kann die Kultur belüftet oder gerührt werden.

[0143] Wenn die Bakterien, die zu der Gattung *Bacillus* gehören, als der Wirt verwendet werden, wird die Transformante im allgemeinen bei etwa 30 °C bis etwa 40 °C für etwa 6 Stunden bis etwa 24 Stunden kultiviert. Wenn notwendig, kann die Kultur belüftet oder gerührt werden.

[0144] Wenn Hefe als Wirt verwendet wird, wird die Transformante beispielsweise in Burkholder-Minimalmedium [Bostian, K. L. et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 77, 4505 (1980)] oder in SD-Medium, ergänzt mit 0,5 % Casaminoäuren, kultiviert [Bitter, G. A. et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 81, 5330 (1984)]. Bevorzugt wird der pH des Mediums auf etwa 5 bis etwa 8 eingestellt. Im allgemeinen wird die Transformante bei etwa 20 °C bis etwa 35 °C für etwa 24 Stunden bis etwa 72 Stunden kultiviert. Wenn notwendig, kann die Kultur belüftet oder gerührt werden.

[0145] Wenn Insektenzellen oder Insekten als Wirt verwendet werden, wird die Transformante in Grace-Insektenmedium kultiviert (Grace, T. C. C., Nature, 195, 788 (1962)), zu dem ein geeignetes Additiv, wie immobilisiertes 10%iges Rinderserum, zugegeben wird. Bevorzugt wird der pH des Mediums auf etwa 6,2 bis etwa 6,4 eingestellt. Normalerweise wird die Transformante bei etwa 27 °C für etwa 3 Tage bis etwa 5 Tage kultiviert,

und wenn notwendig, kann die Kultur belüftet oder gerührt werden.

[0146] Wenn Tierzellen als Wirt eingesetzt werden, wird die Transformante in beispielsweise MEM-Medium, umfassend etwa 5 % bis etwa 20 % fetales Rinderserum, [Science, 122, 501 (1952)], DMEM-Medium [Virology, 8, 396 (1959)], RPMI-1640-Medium [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], 199-Medium [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], usw. kultiviert. Bevorzugt wird der pH des Mediums auf etwa 6 bis etwa 8 eingestellt. Die Transformante wird normalerweise bei etwa 30 °C bis etwa 40 °C für etwa 15 Stunden bis etwa 60 Stunden kultiviert, und wenn notwendig, kann die Kultur belüftet oder gerührt werden.

[0147] Wie oben beschrieben, kann das Peptid/Protein in der Zelle, Zellmembran oder der Außenseite der Transformante usw. hergestellt werden.

[0148] Das Peptid/Protein kann von der oben beschriebenen Kultur durch die folgenden Verfahren abgetrennt und gereinigt werden.

[0149] Wenn das Peptid/Protein aus der Kultur oder Zellen extrahiert wird, werden nach der Kultivierung die Transformanten oder Zellen durch ein öffentlich bekanntes Verfahren gesammelt und in einem geeigneten Puffer suspendiert. Die Transformanten oder Zellen werden dann durch öffentlich bekannte Verfahren, wie Ultraschallbehandlung, eine Behandlung mit Lysozym und/oder Gefrier-Tau-Kreislauf, gefolgt von Zentrifugation, Filtration usw. gespalten. So kann das rohe Extrakt des Proteins erhalten werden. Der Puffer, der für die Verfahrensweisen verwendet wird, kann einen Proteinmodifikator, wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, oder ein oberflächenaktives Mittel, wie Triton X-100TM, usw. umfassen. Wenn das Peptid/Protein in der Kultur sekretiert wird, kann nach der Beendigung der Kultivierung der Überstand von den Transformanten oder Zellen abgetrennt werden, um den Überstand durch ein öffentlich bekanntes Verfahren zu sammeln.

[0150] Das Peptid/Protein, das in dem so erhaltenen Kulturüberstand oder Extrakt enthalten ist, kann durch geeignetes Kombinieren der öffentlich bekannten Verfahren zur Trennung und Reinigung gereinigt werden. Diese öffentlich bekannten Verfahren zur Trennung und Reinigung umfassen ein Verfahren, das den Unterschied in der Löslichkeit nutzt, wie Aussalzen, Lösungsmittelausfällung usw.; ein Verfahren, das hauptsächlich den Unterschied im Molekulargewicht nutzt, wie Dialyse, Ultrafiltration, Gelfiltration, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese usw.; ein Verfahren, das den Unterschied in der elektrischen Ladung nutzt, wie Ionenaustauschchromatographie usw.; ein Verfahren, das den Unterschied in der spezifischen Affinität nutzt, wie Affinitätschromatographie usw.; ein Verfahren, das den Unterschied in der Hydrophobie nutzt, wie Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie usw.; ein Verfahren, das den Unterschied im isoelektrischen Punkt nutzt, wie isoelektrische Fokussierungselektrophorese; und dergleichen.

[0151] Wenn das so erhaltene Peptid/Protein in freier Form vorliegt, kann es in das Salz durch öffentlich bekannte Verfahren oder Modifikationen davon umgewandelt werden. Wenn andererseits das Protein in Form eines Salzes erhalten wird, kann es in die freie Form oder in die Form eines anderen Salzes durch öffentlich bekannte Verfahren oder Modifikationen davon umgewandelt werden.

[0152] Das Peptid/Protein, das durch die Rekombinate hergestellt wird, kann vor oder nach der Reinigung mit einem geeigneten Protein-modifizierenden Enzym behandelt werden, so daß das Protein geeignet modifiziert oder teilweise entfernt werden kann. Beispiele des Proteinmodifizierenden Enzyms umfassen Trypsin, Chymotrypsin, Arginylendopeptidase, Proteinkinase, Glykosidase oder dergleichen.

[0153] Die Aktivität des so hergestellten Peptids der Erfindung kann durch einen Bindungstest an eine markierte Form des Peptids der Erfindung und des gegenwärtigen Proteins, durch einen Enzymimmunoassay unter Verwendung eines speziellen Antikörpers oder dergleichen bestimmt werden.

[0154] Die Aktivität des hergestellten gegenwärtigen Proteins der Erfindung kann durch den Bindungstest an eine markierte Form des Peptids der Erfindung, durch einen Enzymimmunoassay unter Verwendung eines speziellen Antikörpers oder dergleichen bestimmt werden.

[0155] Die Antikörper für das Peptid der Erfindung, das gegenwärtige Protein der Erfindung, seine Teilpeptide oder Salze davon können irgendwelche polyklonalen Antikörper und monoklonalen Antikörper sein, so lange wie sie das Peptid der Erfindung, das gegenwärtige Protein der Erfindung, seine Teilpeptide oder Salze davon erkennen können.

[0156] Die Antikörper für das Peptid der Erfindung, das gegenwärtige Protein der Erfindung, seine Teilpeptide oder Salze davon (hierin nachstehend manchmal nur als das Peptid/Protein usw. der Erfindung bezeichnet) können durch öffentlich bekannte Verfahren zur Herstellung von Antikörpern oder Antisera unter Verwendung des Peptids/Proteins usw. der Erfindung als Antigene hergestellt werden.

[Herstellung des monoklonalen Antikörpers]

(a) Herstellung von Zellen, die den monoklonalen Antikörper produzieren

[0157] Das Peptid/Protein usw. wird den Säugern entweder allein oder zusammen mit Trägern oder Verdünnungsmitteln an der Stelle, wo die Produktion des Antikörpers durch die Verabreichung möglich ist, verabreicht. Um die Antikörperproduktivität bei der Verabreichung zu verstärken, können komplettes Freund-Adjuvans oder inkomplettes Freund-Adjuvans verabreicht werden. Die Verabreichung wird normalerweise einmal aller zwei bis sechs Wochen und zwei- bis zehnmal insgesamt durchgeführt. Beispiele der verwendbaren Säuger sind Affen, Kaninchen, Hunde, Meerschweinchen, Mäuse, Ratten, Schafe und Ziegen, wobei die Verwendung von Mäusen und Ratten bevorzugt ist.

[0158] Bei der Herstellung von Zellen, die den monoklonalen Antikörper produzieren, wird ein Warmbluttier, beispielsweise Mäuse, die mit einem Antigen immunisiert sind, wobei auf den Antikörpertiter geachtet wird, ausgewählt, dann wird die Milz oder der Lymphknoten nach zwei bis fünf Tagen nach der letzten Immunisierung gesammelt und die darin enthaltenden Antikörper-produzierenden Zellen werden mit Myelomzellen fusioniert, wodurch Hybridome, die den monoklonalen Antikörper produzieren, erhalten wurden. Die Messung des Antikörpertiters in Antisera kann beispielsweise durch Umsetzen eines markierten Peptids/Proteins, das später beschrieben wird, mit dem Antiserum, gefolgt von Analysieren der Bindungsaktivität des Markierungsmittels, das an den Antikörper bindet, durchgeführt werden. Die Fusionierung kann beispielsweise durch das bekannte Verfahren von Koehler und Milstein [Nature, 256, 495, (1975)] durchgeführt werden. Beispiele des Fusionsbeschleunigers sind Polyethylenglykol (PEG), Sendai-Virus usw., wobei PEG bevorzugt eingesetzt wird.

[0159] Beispiele der Myelomzellen sind gesammeltes NS-1, P3U1, SP2/0 usw. Insbesondere wird P3U1 bevorzugt eingesetzt. Ein bevorzugtes Verhältnis der Zahl der verwendeten Antikörperproduzierenden Zellen (Milzzellen) zu der Zahl der Myelomzellen liegt innerhalb eines Bereiches von ungefähr 1 : 1 bis 20 : 1. Wenn PEG (bevorzugt PEG 1000 bis PEG 6000) in einer Konzentration von ungefähr 10 bis 80 % zugegeben wird, gefolgt von Inkubieren bei etwa 20 bis 40 °C, bevorzugt bei 30 bis 37 °C für etwa 1 bis 10 Minuten, kann eine effiziente Zellfusion durchgeführt werden.

[0160] Verschiedene Verfahren können zum Screenen eines Hybridoms, das den monoklonalen Antikörper produziert, verwendet werden. Beispiele von solchen Verfahren umfassen ein Verfahren, umfassend das Zugabe des Überstandes von Hybridom zu einer festen Phase (beispielsweise Mikroplatte), an der das Peptid/Protein usw. der Erfindung als ein Antigen direkt oder zusammen mit einem Träger adsorbiert ist, Zugabe eines Anti-Immunglobulin-Antikörpers (wenn Mauszellen für die Zellfusion verwendet werden, wird Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper verwendet), markiert mit einer radioaktiven Substanz oder einem Enzym oder Protein A, und Detektieren des monoklonalen Antikörpers, der an die feste Phase gebunden ist, und ein Verfahren, umfassend das Zugabe des Überstandes von Hybridom zu einer festen Phase, an der ein Anti-Immunglobulin-Antikörper oder Protein A adsorbiert ist, Zugabe des Peptids/Proteins usw., markiert mit einer radioaktiven Substanz oder einem Enzym, und Detektieren des monoklonalen Antikörpers, der an die feste Phase gebunden ist.

[0161] Der monoklonale Antikörper kann gemäß öffentlich bekannten Verfahren oder ihren Modifikationen ausgewählt werden. Im allgemeinen kann die Selektion in einem Medium für Tierzellen, ergänzt mit HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin), bewirkt werden. Jedes Selektions- und Wachstumsmedium kann eingesetzt werden, insofern das Hybridom dort wachsen kann. Beispielsweise kann RPMI-1640-Medium, umfassend 1 % bis 20 %, bevorzugt 10 % bis 20 % fetales Rinderserum, GIT-Medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), umfassend 1 % bis 10 % fetales Rinderserum, ein serumfreies Medium zur Kultivierung eines Hybridoms (SFM-101, Nissui Seiyaku Co., Ltd.) und dergleichen für das Selektions- und Wachstumsmedium verwendet werden. Die Kultivierung wird im allgemeinen bei 20 °C bis 40 °C, bevorzugt bei 37 °C, für etwa 5 Tage bis etwa 3 Wochen, bevorzugt 1 bis 2 Wochen, normalerweise in 5 % CO₂ durchgeführt. Der Antikörpertiter des Kulturüberstandes eines Hybridoms kann wie in dem oben beschriebenen Assay für den Antikörpertiter in Antisera bestimmt werden.

(b) Reinigung des monoklonalen Antikörpers

[0162] Trennung und Reinigung eines monoklonalen Antikörpers kann durch konventionelle Verfahren durchgeführt werden, wie Trennungs- und Reinigungsverfahren des polyklonalen Antikörpers, wie Trennung und Reinigung von Immunoglobulinen [beispielsweise Aussalzen, Alkoholausfällung, isoelektrische Punktausfällung, Elektrophorese, Adsorption und Desorption mit Ionenaustauschern (z.B. DEAE), Ultrazentrifugation, Gel-filtration oder ein spezifisches Reinigungsverfahren, welches nur das Sammeln eines Antikörpers mit einem aktivierten Adsorptionsmittel, wie eine Antigen-Bindungsfestphase, Protein A oder Protein G, und Dissoziieren der Bindung, um den Antikörper zu erhalten, umfaßt].

[Herstellung des polyklonalen Antikörpers]

[0163] Der polyklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung kann durch öffentlich bekannte Verfahren oder Modifikationen davon hergestellt werden. Beispielsweise wird ein Säuger mit einem Immunogen (das Peptid/Protein usw. der Erfindung als ein Antigen) per se immunisiert, oder ein Komplex aus Immunogen und einem Trägerprotein wird gebildet und ein Warmbluttier wird mit dem Komplex in einer ähnlichen Weise zu dem oben beschriebenen Verfahren für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern immunisiert. Das Produkt, das den Antikörper für das Peptid/Protein usw. der Erfindung umfaßt, wird aus dem immunisierten Tier gesammelt, gefolgt von Trennung und Reinigung des Antikörpers.

[0164] In dem Komplex aus Immunogen und Trägerprotein, der verwendet wird, um einen Säuger zu immunisieren, kann der Typ des Trägerproteins und das Mischverhältnis von Träger zu Hapten jeder Typ und jedes Verhältnis sein, so lange wie der Antikörper effizient für das Hapten, das durch Vernetzen mit dem Träger immunisiert wird, produziert wird. Beispielsweise wird Rinderserumalbumin, Rinderthyroglobulin oder Schlüssel-ochlimpethemocyanin usw. mit dem Hapten in einem Träger-zu-Hapten-Gewichtsverhältnis von ungefähr 0,1 bis 20, bevorzugt etwa 1 bis etwa 5 verknüpft.

[0165] Eine Vielzahl von Kondensationsmitteln kann zum Verknüpfen von Träger mit Hapten verwendet werden. Glutaraldehyd-, Carbodiimid-, Maleimid-aktivierter Ester und aktivierte Esterreagenzien, umfassend eine Thiolgruppe oder Dithiopyridylgruppe, werden zum Verknüpfen verwendet.

[0166] Das Kondensationsprodukt wird den Warmbluttieren entweder allein oder zusammen mit Trägern oder Verdünnungsmitteln an der Stelle, die den Antikörper durch Verabreichung produzieren kann, verabreicht. Um die Antikörperproduktivität bei der Verabreichung zu verstärken, kann komplettes Freund-Adjuvans oder inkomplettes Freund-Adjuvans verabreicht werden. Die Verabreichung wird normalerweise alle 2 bis 6 Wochen und 3 bis 10 Mal insgesamt durchgeführt.

[0167] Der polyklonale Antikörper kann aus Blut, Aszites usw., bevorzugt aus dem Blut des Säugers, der durch das oben beschriebene Verfahren immunisiert wird, gesammelt werden.

[0168] Der Titer des polyklonalen Antikörpers in Antiserum kann durch dieselbe Verfahrensweise wie die zur Bestimmung des oben beschriebenen Serumantikörpertiters analysiert werden. Die Trennung und Reinigung des polyklonalen Antikörpers kann durchgeführt werden, indem dem Verfahren zur Trennung und Reinigung von Immunoglobulinen, das wie bei der Trennung und Reinigung von hierin zuvor beschriebenen monoklonalen Antikörpern durchgeführt wird, gefolgt wird.

[0169] Das Peptid der Erfindung, die DNA, die das Peptid der Erfindung kodiert (hierin nachstehend manchmal nur als die erfindungsgemäße DNA bezeichnet), und der Antikörper für das Peptid der Erfindung (hierin nachstehend manchmal nur als der erfindungsgemäße Antikörper bezeichnet) sind nützlich zum Implementieren (1) von Mitteln für die Vorbeugung/Behandlung von verschiedenen Krankheiten, die mit dem Protein der Erfindung verbunden sind; (2) Screenen einer Verbindung oder ihres Salzes, die die Bindungseigenschaft des Peptids der Erfindung an das Protein der Erfindung verändert; (3) Quantifikation des Peptids der Erfindung oder seines Salzes; (4) Gendiagnose; (5) Arzneimittel, umfassend die Antisense-DNA; (6) Arzneimittel, umfassend den Antikörper der Erfindung; (7) Präparieren nicht-menschlicher Tiere, die die erfindungsgemäße DNA tragen; (8) Arzneimitteldesign, basierend auf dem Vergleich zwischen Liganden und Rezeptoren, die strukturell analog sind, usw.

[0170] Das Peptid der Erfindung, die erfindungsgemäße DNA und der erfindungsgemäße Antikörper werden speziell in bezug auf ihre Anwendungen nachstehend beschrieben.

(1) Therapeutika/Präventivmittel für Krankheiten, mit denen das Peptid der Erfindung verbunden ist

[0171] Wie hierin nachstehend beschrieben wird, ist klar geworden, daß das Peptid der Erfindung ein Ligand für das Protein der Erfindung ist (G-Protein-gekoppelter Rezeptor), da das Peptid der Erfindung als ein humoraler Faktor in vivo vorliegt und das Protein der Erfindung aktiviert, um die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Zelle zu erhöhen, in der das Protein der Erfindung exprimiert worden ist.

[0172] Ebenso wird erkannt, daß das Peptid der Erfindung etwa 56 % Homologie zu Schlangengift Mamba Intestinal Toxin 1 (manchmal als MIT1 abgekürzt; SEQ ID NR. 34; Toxicon, 28, 847–856, 1990; FEBS Letters, 461, 183–188, 1999) auf einem Aminosäureniveau aufweist.

[0173] Es wurde berichtet, daß MIT1 die Kontraktion im Krummdarm oder distalen Dickdarm oder Relaxation im proximalen Dickdarm induziert, und sein Grad war so wirksam wie vergleichbar mit 40 mM Kaliumchlorid (FEBS Letters, 461, 183–188, 1999). Jedoch wurde die Stelle oder der Mechanismus seiner Wirkung nicht gelöst. Die betreffenden Erfinder klärten, daß die Wirkung von MIT1 ebenso durch das Protein der Erfindung vermittelt wurde.

[0174] Im Hinblick auf das Vorhergehende weist das Peptid der Erfindung eine Aktivität zum Induzieren der Kontraktion oder Relaxation der gesamten Darmtrakte auf, um die Darmtraktmotilität (Verdauungsaktivität) usw. zu kontrollieren (z.B. später beschriebenes BEISPIEL 11). Wenn daher die DNA usw. der Erfindung fehlt oder wenn ihr Expressionsniveau abnormal verringert wird, entwickeln sich verschiedene Krankheiten, wie Verdauungsstörungen (z.B. Enteritis, Verstopfung, Malabsorptionssyndrom usw.).

[0175] Folglich kann das Peptid der Erfindung oder die DNA der Erfindung als Arzneimittel für die Behandlung oder Vorbeugung usw. von verschiedenen Krankheiten verwendet werden, einschließlich Verdauungsstörungen (z.B. Enteritis, Verstopfung, Malabsorptionssyndrome usw.) oder dergleichen.

[0176] Wenn ein Patient ein verringertes Niveau an dem Peptid der Erfindung in seinem Körper aufweist oder es ihm daran dort mangelt, so daß die Signaltransduktion nicht vollständig oder normal in den Zellen, in denen das Protein der Erfindung exprimiert wird, ausgeübt wird, kann das Peptid der Erfindung seine Rolle ausreichend oder geeignet für den Patient bereitstellen, (a) durch Verabreichen der erfindungsgemäßen DNA an den Patienten, um das Peptid der Erfindung in dem Körper zu exprimieren, (b) durch Einführen der erfindungsgemäßen DNA in eine Zelle, die das Peptid der Erfindung exprimiert, und dann Transplantieren der Zellen in den Patienten, oder (c) durch Verabreichen des Peptids der Erfindung an den Patienten, oder dergleichen.

[0177] Wenn die erfindungsgemäße DNA als die oben beschriebenen Präventivmittel/Therapeutika verwendet werden, wird die DNA selbst an den Menschen oder ein anderes Warmbluttier verabreicht; oder die DNA wird in einen geeigneten Vektor, wie Retrovirusvektor, Adenovirusvektor, Adenovirus-assoziiertes Virusvektor usw., eingeführt und dann an den Menschen oder ein anderes Warmbluttier in einer konventionellen Weise verabreicht. Die erfindungsgemäße DNA kann ebenso als eine intakte DNA verabreicht werden; oder die DNA kann zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung mit physiologisch akzeptablen Trägern, wie Hilfsmitteln usw., hergestellt werden, um ihre Aufnahme zu beschleunigen, und die Zusammensetzung kann durch Genkanone oder durch einen Katheter, wie einen Katheter mit einem Hydrogel, verabreicht werden.

[0178] Wenn das Peptid der Erfindung als die zuvor genannten Therapeutika/Präventivmittel verwendet wird, wird das Peptid vorteilhafterweise auf einem Reinheitsniveau von mindestens 90 %, bevorzugt mindestens 95 %, stärker bevorzugt mindestens 98 % und am stärksten bevorzugt mindestens 99 % verwendet.

[0179] Das Peptid der Erfindung kann oral, beispielsweise in Form von Tabletten, die nach Bedarf zuckerüberzogen sein können, Kapseln, Elixieren, Mikrokapseln usw., oder parenteral in Form von Injektionspräparaten, wie einer sterilen Lösung und einer Suspension in Wasser oder mit einer anderen pharmazeutisch akzeptablen Flüssigkeit, verwendet werden. Diese Präparate können durch Mischen des Peptids der Erfindung mit einem physiologisch akzeptablen bekannten Träger, einem Aromastoff einem Trägerstoff, einem Vehikel, einem Antiseptikum, einem Stabilisator, einem Bindemittel usw. in einer Einheitsdosierungsform hergestellt werden, die in einer allgemein akzeptierten Weise erforderlich ist, die auf die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten angewendet wird. Der Wirkstoff in dem Präparat wird in einer solchen Dosis kontrolliert, daß eine geeignete Dosis innerhalb des angegebenen spezifizierten Bereiches erhalten wird.

[0180] Additive, die mit Tabletten, Kapseln usw. mischbar sind, umfassen ein Bindemittel, wie Gelatine, Maisstärke, Tragant und Gummiarabikum, einen Trägerstoff, wie kristalline Cellulose, ein Quellungsmittel, wie Mais-

stärke, Gelatine, Alginsäure usw., ein Schmiermittel, wie Magnesiumstearat, ein Süßungsmittel, wie Saccharose, Lactose und Saccharin, und einen Geschmacksstoff, wie Pfefferminze, Akamonoöl oder Kirsche usw. Wenn die Einheitsdosierungen in der Form von Kapseln vorliegen, können flüssige Träger wie Öle und Fette außerdem zusammen mit den oben beschriebenen Additiven verwendet werden. Eine sterile Zusammensetzung zur Injektion kann gemäß einer konventionellen Weise formuliert werden, die verwendet wird, um pharmazeutische Zusammensetzungen herzustellen, beispielsweise durch Lösen oder Suspendieren der Wirkstoffe in einem Vehikel, wie Wasser zur Injektion mit einem natürlich vorkommenden Pflanzenöl, wie Sesamöl und Kokosnußöl usw., um die pharmazeutische Zusammensetzung herzustellen.

[0181] Beispiele eines wässrigen Mediums zur Injektion umfassen physiologische Kochsalzlösung und eine isotonische Lösung, die Glukose und andere Hilfsmittel enthält (z.B. D-Sorbitol, D-Mannitol, Natriumchlorid usw.), und kann in Kombination mit einem geeigneten Auflösungshilfsmittel, wie einem Alkohol (z.B. Ethanol oder dergleichen), einem Polyalkohol (z.B. Propylenglykol und Polyethylenglykol), einem nicht-ionischen oberflächenaktiven Mittel (z.B. Polysorbate 80TM, HCO-50 usw.) oder dergleichen verwendet werden. Beispiele des öligen Mediums umfassen Sesamöl und Sojabohnenöl, das ebenso in Kombination mit einem Auflösungshilfsmittel wie Benzylbenzoat und Benzylalkohol verwendet werden kann. Sie können außerdem mit einem Puffer (z.B. Phosphatpuffer, Natriumacetatpuffer usw.), einem Desinfektionsmittel (z.B. Benzalkoniumchlorid, Prokainhydrochlorid usw.), einem Stabilisator (z.B. menschliches Serumalbumin, Polyethylenglykol usw.), einem Konservierungsmittel (z.B. Benzylalkohol, Phenol usw.), einem Antioxidationsmittel usw. formuliert werden. Die so hergestellte Flüssigkeit zur Injektion wird normalerweise in eine geeignete Ampulle gefüllt.

[0182] Der Vektor, in den die erfindungsgemäße DNA eingeführt wird, kann ebenso zu pharmazeutischen Präparaten in einer Weise hergestellt werden, die den obigen Verfahrensweisen ähnlich ist. Diese Präparate werden im allgemeinen parenteral verwendet.

[0183] Da das so erhaltene pharmazeutische Präparat sicher und gering toxisch ist, kann das Präparat an den Säuger verabreicht werden (z.B. Mensch, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Schwein, Rind, Pferd, Katze, Hund, Affe usw.).

[0184] Die Dosis des Peptids der Erfindung variiert in Abhängigkeit der Zielkrankheit, des Patienten, an den sie verabreicht werden soll, der Verabreichungsweise usw.; beispielsweise beträgt bei der oralen Verabreichung des Peptids der Erfindung für die Behandlung einer Verdauungsstörung die Dosis normalerweise etwa 1 mg bis etwa 1000 mg, bevorzugt etwa 10 bis etwa 500 mg, und stärker bevorzugt etwa 10 bis etwa 200 mg pro Tag für Erwachsene (bei 60 kg Körpergewicht). Bei der parenteralen Verabreichung variiert die Einzeldosis in Abhängigkeit des Patienten, an den sie verabreicht werden soll, der Zielkrankheit usw., aber es ist für die Behandlung einer Verdauungsstörung vorteilhaft, den Wirkstoff intravenös bei einer täglichen Dosis von etwa 1 bis etwa 1000 mg, bevorzugt etwa 1 bis etwa 200 mg, und stärker bevorzugt etwa 10 bis etwa 100 mg für Erwachsene (bei 60 kg Körpergewicht) zu verabreichen. Für andere Tierespezies kann die entsprechende Dosis, auf 60 kg Körpergewicht umgerechnet, verabreicht werden.

(2) Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend den erfindungsgemäßen Antikörper

[0185] Der Antikörper der Erfindung mit der Wirkung, das Peptid der Erfindung zu neutralisieren, kann als Präventivmittel/Therapeutika für Krankheiten verwendet werden, die mit der Überexprimierung des Peptids der Erfindung verbunden sind (beispielsweise Verdauungsstörungen (z.B. Enteritis, Durchfall, Verstopfung, Malabsorptionssyndrom usw.)).

[0186] Das Therapeutika/Präventivmittel für die oben beschriebenen Krankheiten, umfassend den Antikörper der Erfindung, können an den Menschen oder ein anderes Warmbluttier (z.B. Ratte, Kaninchen, Schaf, Schwein, Rind, Katze, Hund, Affe usw.) direkt als ein flüssiges Präparat oder als eine pharmazeutische Zusammensetzung in einer geeigneten Präparatform oral oder parenteral verabreicht werden. Die Dosis variiert in Abhängigkeit des Patienten, an den sie verabreicht werden soll, der Zielkrankheit, den Zuständen, der Verabreichungsweise usw.; wenn sie für die Behandlung/Vorbeugung des erwachsenen Patienten mit beispielsweise Verdauungsstörung verwendet wird, wird der Antikörper der Erfindung vorteilhaft an den Patienten durch intravenöse Injektion verabreicht, normalerweise in einer Einzeldosis von ungefähr 0,01 bis 20 mg/kg Körpergewicht, bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 10 mg/kg Körpergewicht, und stärker bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 5 mg/kg Körpergewicht, ungefähr ein- bis fünfmal, bevorzugt ungefähr ein- bis dreimal pro Tag. Für die andere parenterale Verabreichung und orale Verabreichung kann die entsprechende Dosis verabreicht werden. Wenn die Zustände sehr ernst sind, kann die Dosis in Abhängigkeit der Zustände erhöht werden.

[0187] Der Antikörper der Erfindung kann direkt als solcher oder in Form einer geeigneten pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung, die für die oben beschriebene Verabreichung verwendet wird, enthält einen pharmakologisch akzeptablen Träger mit den zuvor genannten Verbindungen oder Salzen davon, ein Verdünnungsmittel oder Trägerstoff. Eine solche Zusammensetzung wird in dem Präparat, das zur oralen oder parenteralen Verabreichung geeignet ist, bereitgestellt.

[0188] Das heißt, Beispiele der Zusammensetzung zur oralen Verabreichung umfassen feste oder flüssige Präparate, speziell Tabletten (einschließlich Dragees und Tabletten in Filmhüllenform), Pillen, Granulate, pulverförmige Präparate, Kapseln (einschließlich weiche Kapseln), Sirup, Emulsionen, Suspensionen usw. Eine solche Zusammensetzung wird durch öffentlich bekannte Verfahren hergestellt und enthält ein Vehikel, ein Verdünnungsmittel oder einen Trägerstoff der konventionell in dem Bereich der pharmazeutischen Präparate verwendet wird. Beispiele des Vehikels oder Trägerstoffes für Tabletten sind Lactose, Stärke, Saccharose, Magnesiumstearat usw.

[0189] Beispiele der Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung, die verwendet werden kann, sind Injektionen, Zäpfchen usw., und die Injektionen umfassen die Form von intravenösen, subkutanen, transkutanen, intramuskulären und Tropfinjektionen usw. Diese Injektionen werden durch öffentlich bekannte Verfahren hergestellt, beispielsweise durch Lösen, Suspendieren oder Emulgieren des zuvor genannten Antikörpers oder seiner Salze in einem sterilen wässrigen oder öligen flüssigen Medium. Für das wässrige Medium zur Injektion werden beispielsweise physiologische Kochsalzlösung und isotonische Lösungen, die Glukose und anderes Hilfsmittel enthalten., usw. verwendet. Geeignete Auflösungshilfsmittel, beispielsweise Alkohol (z.B. Ethanol), Polyalkohol (z.B. Propylenglykol oder Polyethylenglykol), nicht-ionische oberflächenaktive Mittel [z.B. Polysorbat 80, HCO-50 (Polyoxyethylenaddukt (50 mol) von hydriertem Rizinusöl)] können in Kombination verwendet werden. Für die ölige Lösung werden beispielsweise Sesamöl, Sojabohnenöl und dergleichen verwendet, und Auflösungshilfsmittel, wie Benzylbenzoat, Benzylalkohol usw. können in Kombination verwendet werden. Die so hergestellte Flüssigkeit zur Injektion wird normalerweise in eine geeignete Ampulle gefüllt. Das Zäpfchen, das zur rektalen Verabreichung verwendet wird, wird durch Mischen des zuvor genannten Antikörpers oder seiner Salze mit konventionellen Zäpfchengrundlagen hergestellt.

[0190] Die oben beschriebene orale oder parenterale pharmazeutische Zusammensetzung wird vorteilhaft in einer Einheitsdosierungsform hergestellt, die für die Dosis des Wirkstoffes geeignet ist. Beispiele einer solchen Einheitsdosierungsform umfassen Tabletten, Pillen, Kapseln, Injektionen (Ampullen), Zäpfchen usw. Es ist bevorzugt, daß der oben beschriebene Antikörper im allgemeinen in einer Dosis von 5 bis 500 mg pro Einheitsdosierungsform, 5 bis 100 mg speziell für Injektionen und 10 bis 250 mg für andere Präparate enthalten ist.

[0191] Jede oben beschriebene Zusammensetzung kann außerdem andere aktive Komponenten enthalten, wenn die Formulierung mit dem Antikörper keine nachteilige Interaktion hervorruft.

(3) Präparieren von nicht-menschlichen Tieren, die die erfindungsgemäße DNA tragen.

[0192] Unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA können nicht-menschliche transgene Tiere, die das Protein usw. der Erfindung exprimieren, präpariert werden. Beispiele der nicht-menschlichen Tiere umfassen Säuger (beispielsweise Ratten, Mäuse, Kaninchen, Schafe, Schweine, Rinder, Katzen, Hunde, Affen usw.) (hierin nachstehend nur als Tiere bezeichnet), wobei Mäuse und Kaninchen besonders geeignet sind.

[0193] Um die erfindungsgemäße DNA auf das Zieltier zu übertragen, ist es im allgemeinen vorteilhaft, die DNA in einem Genkonstrukt zu verwenden, das stromabwärts eines Promotors ligiert wird, der die DNA in Tierzellen exprimieren kann. Wenn beispielsweise die erfindungsgemäße DNA, die von Kaninchen abgeleitet ist, übertragen wird, wird beispielsweise das Genkonstrukt, in dem die DNA stromabwärts eines Promotors ligiert wird, der die erfindungsgemäße DNA, abgeleitet von Tieren, exprimieren kann, umfassend die erfindungsgemäße DNA, die stark zu der Kaninchen-abgeleiteten DNA homolog ist, in befruchtete Kanincheneizellen mikroinjiziert; daher kann das DNA-übertragene Tier, das ein hohes Niveau des Proteins usw. der Erfindung produzieren kann, hergestellt werden. Beispiele der Promotoren, die nutzbar sind, umfassen Virus-abgeleitete Promotoren und ubiquitäre Expressionspromotoren, wie ein Metallothioneinpromotor, aber Promotoren von NGF-Gen und Enolase, die speziell in dem Gehirn exprimiert werden, werden bevorzugt verwendet.

[0194] Die Übertragung der erfindungsgemäßen DNA im Stadium der befruchteten Eizelle sichert die Gegenwart der DNA in allen Keim- und Somazellen in dem produzierten Tier. Die Gegenwart des Proteins usw. der Erfindung in den Keimzellen in dem DNA-übertragenen Tier bedeutet, daß alle Keim- und Somazellen das Protein usw. der Erfindung in allen Nachkommen des Tiers umfassen. Die Nachkommen des Tieres, die das Gen

übernehmen, umfassen das Protein usw. der Erfindung in allen Keim- und Somazellen.

[0195] Die DNA-übertragenen Tiere der vorliegenden Erfindung können in der konventionellen Umgebung gehalten und als Tiere, die die DNA nach dem Bestätigen der stabilen Retention des Gens in den Tieren durch Paarung tragen, fortgepflanzt werden. Außerdem führt die Paarung von männlichen und weiblichen Tieren, die die Ziel-DNA umfassen, zum Erhalt homozygoter Tiere mit dem übertragenen Gen auf beiden homologen Chromosomen. Durch Paarung der männlichen und weiblichen Homozygoten kann die Fortpflanzung so durchgeführt werden, daß alle Nachkommen die DNA umfassen.

[0196] Da das Protein usw. der Erfindung stark in den Tieren exprimiert wird, bei denen die erfindungsgemäße DNA übertragen worden ist, sind die Tiere zum Screenen von Agonisten oder Antagonisten zu dem Protein usw. der Erfindung nützlich.

[0197] Die Tiere, bei denen die erfindungsgemäße DNA übertragen worden ist, können ebenso als Zellquellen für Gewebekultur verwendet werden. Das Protein usw. der Erfindung kann durch beispielsweise direktes Analysieren der DNA oder RNA in Geweben aus der Maus, in die die erfindungsgemäße DNA übertragen worden ist, oder durch Analysieren von Geweben, die das Protein umfassen, welches aus dem Gen exprimiert wird, analysiert werden. Zellen aus den Geweben, die das Protein usw. der Erfindung umfassen, werden durch die Standardgewebekulturtechnik kultiviert. Unter Verwendung dieser Zellen kann beispielsweise die Funktion von Gewebezellen, wie Zellen, die aus dem Gehirn oder peripheren Geweben abgeleitet sind, die im allgemeinen schwer zu kultivieren sind, untersucht werden. Unter Verwendung dieser Zellen ist es beispielsweise möglich, Pharmazeutika auszuwählen, die verschiedene Gewebefunktionen erhöhen. Wenn eine stark exprimierende Zelllinie erhältlich ist, kann das Protein usw. der Erfindung aus der Zelllinie isoliert und gereinigt werden.

[0198] In der Beschreibung und den Zeichnungen werden die Codes von Basen und Aminosäuren durch Abkürzungen gezeigt, und in diesem Fall werden sie gemäß der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature oder durch übliche Codes in der Technik angegeben, Beispiele von denen werden nachstehend gezeigt. Bei Aminosäuren, die ein optisches Isomer aufweisen können, liegt die L-Form vor, wenn nicht anders angegeben.

DNA:	Deoxyribonukleinsäure
cDNA:	komplementäre Deoxyribonukleinsäure
A:	Adenin
T:	Thymin
G:	Guanin
C:	Cytosin
Y:	Thymin oder Cytosin
N:	Thymin, Cytosin, Adenin oder Guanin
R:	Adenin oder Guanin
M:	Cytosin oder Adenin
W:	Thymin oder Adenin
S:	Cytosin oder Guanin
RNA:	Ribonukleinsäure
mRNA:	Messenger-Ribonukleinsäure
dATP:	Deoxyadenosintriphosphat
dTTP:	Deoxythymidintriphosphat
dGTP:	Deoxyguanosintriphosphat
dCTP:	Deoxycytidintriphosphat
ATP:	Adenosintriphosphat
Gly oder G:	Glycin
Ala oder A:	Alanin
Val oder V:	Valin
Leu oder L:	Leucin
Ile oder I:	Isoleucin
Ser oder S:	Serin
Thr oder T:	Threonin
Cys oder C:	Cystein
Met oder M:	Methionin
Glu oder E:	Glutaminsäure

Asp oder D:	Asparaginsäure
Lys oder K:	Lysin
Arg oder R:	Arginin
His oder H:	Histidin
Phe oder F:	Phenylalanin
Tyr oder Y:	Tyrosin
Trp oder W:	Tryptophan
Pro oder P:	Prolin
Asn oder N:	Asparagin
Gln oder Q:	Glutamin
pGlu:	Pyroglutaminsäure
Xaa:	nicht identifizierter Aminosäurerest

[0199] Ebenso werden die Substituenten, Schutzgruppen, Reagenzien usw., die häufig in der Beschreibung benutzt werden, durch die folgenden Symbole dargestellt.

Me:	Methylgruppe
Et:	Ethylgruppe
Bu:	Butylgruppe
Ph:	Phenylgruppe
TC:	Thiazolidin-4(R)-Carboxamidgruppe
Bom:	Benzyloxymethyl
Bzl:	Benzyl
Z:	Benzyloxycarbonyl
Br-Z:	2-Brombenzyloxycarbonyl
Cl-Z:	2-Chlorbenzyloxycarbonyl
Cl ₂ Bzl:	2,6-Dichlorbenzyl
Boc:	t-Butyloxycarbonyl
HOBt:	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt:	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
PAM:	Phenylacetamidomethyl
Tos:	p-Toluolsulfonyl
Fmoc:	N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl
DNP:	Dinitrophenyl
Bom:	tert-Butoxymethyl
Trt:	Trityl
Bom:	Benzyloxymethyl
Z:	Benzyloxycarbonyl
MeBzl:	4-Methylbenzyl
DCC:	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
HONB:	1-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboxyimid
NMP:	N-Methylpyrrolidon
HONB:	N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboxyimid
NMP:	N-Methylpyrrolidon
TFA:	Trifluoressigsäure
CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
GDP:	Guanosin-5'-diphosphat
Fura-2AM:	Pentacetoxymethyl-1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
Fluo-3AM:	Pentacetoxymethyl-1-[2-amino-5-(2,7-dichlor-6-hydroxy-3-oxy-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
HEPES:	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
SDS:	Natriumdodecylsulfat
BSA:	Rinderserumalbumin
HBSS:	Hanks-Mineralsalzmedium
EIA:	Enzymimmunoassay

[0200] Die Sequenzidentifikationsnummern in dem Sequenzprotokoll der Beschreibung geben die folgenden

Sequenzen an.

[SEQ ID NR. 1]

[0201] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des Proteins der Erfindung, abgeleitet von menschlichem Gehirn.

[SEQ ID NR. 2]

[0202] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das Protein der Erfindung kodiert, abgeleitet von menschlichem Gehirn, enthaltend die Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist (ZAQC).

[SEQ ID NR. 3]

[0203] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das Protein der Erfindung kodiert, abgeleitet von menschlichem Gehirn, enthaltend die Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist (ZAQT).

[SEQ ID NR. 4]

[0204] Diese zeigt die Basensequenz des Primers 1, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 5]

[0205] Diese zeigt die Basensequenz des Primers 2, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 6]

[0206] Diese zeigt die Basensequenz des Primers 3, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 2.

[SEQ ID NR. 7]

[0207] Diese zeigt die Basensequenz des Primers 4, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 2.

[SEQ ID NR. 8]

[0208] Diese zeigt die Basensequenz der ZAQ-Sonde, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 2.

[SEQ ID NR. 9]

[0209] Diese zeigt die Basensequenz des Primers ZAQC Sal, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 2.

[SEQ ID NR. 10]

[0210] Diese zeigt die Basensequenz des Primers ZAQC Spe, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 2.

[SEQ ID NR. 11]

[0211] Diese zeigt die N-terminale Aminosäuresequenz von ZAQ-aktiviertem Peptid, gereinigt in dem später beschriebenen BEISPIEL 3 (3-8).

[SEQ ID NR. 12]

[0212] Diese zeigt die Basensequenz des Primers ZF1, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 4.

[SEQ ID NR. 13]

[0213] Diese zeigt die Basensequenz des Primers ZF2, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 4.

[SEQ ID NR. 14]

[0214] Diese zeigt die Basensequenz des Primers ZF3, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 4.

[SEQ ID NR. 15]

[0215] Diese zeigt die 3'-terminale Basensequenz der DNA, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpeptid kodiert, das in dem später beschriebenen BEISPIEL 4 erworben wurde.

[SEQ ID NR. 16]

[0216] Diese zeigt die Basensequenz des Primers ZAQL-CF, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 4.

[SEQ ID NR. 17]

[0217] Diese zeigt die Basensequenz des Primers ZAQUAL-XR1, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 4.

[SEQ ID NR. 18]

[0218] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 4.

[SEQ ID NR. 19]

[0219] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 4.

[SEQ ID NR. 20]

[0220] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des menschentypischen reifen ZAQ-Ligandenpeptids.

[SEQ ID NR. 21]

[0221] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des menschentypischen reifen ZAQ-Ligandenpeptids.

[SEQ ID NR. 22]

[0222] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des menschentypischen ZAQ-Ligandenpräkursorpeptids.

[SEQ ID NR. 23]

[0223] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des menschentypischen ZAQ-Ligandenpräkursorpeptids.

[SEQ ID NR. 24]

[0224] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die die DNA enthält, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert, das durch SEQ ID NR. 28 dargestellt ist.

[SEQ ID NR. 25]

[0225] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die die DNA enthält, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert, das durch SEQ ID NR. 29 dargestellt ist.

[SEQ ID NR. 26]

[0226] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschentypische reife ZAQ-Ligandenpeptid kodiert, das durch SEQ ID NR. 20 dargestellt ist.

[SEQ ID NR. 27]

[0227] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschentypische reife ZAQ-Ligandenpeptid kodiert, das durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist.

[SEQ ID NR. 28]

[0228] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert, das durch SEQ ID NR. 22 dargestellt ist.

[SEQ ID NR. 29]

[0229] Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert, das durch SEQ ID NR. 23 dargestellt ist.

[SEQ ID NR. 30]

[0230] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 5 (5-1).

[SEQ ID NR. 31]

[0231] Diese zeigt die N-terminale Aminosäuresequenz von menschentypischem ZAQ-Ligandenpeptid, analysiert in dem später beschriebenen BEISPIEL 6 (6-2).

[SEQ ID NR. 32]

[0232] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 7.

[SEQ ID NR. 33]

[0233] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 7.

[SEQ ID NR. 34]

[0234] Diese zeigt die Aminosäuresequenz vom Schlangengift MIT1, gereinigt in dem später beschriebenen BEISPIEL 8.

[SEQ ID NR. 35]

[0235] Diese zeigt die Basensequenz der cDNA, die das menschentypische I5E-Rezeptorprotein kodiert.

[SEQ ID NR. 36]

[0236] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des menschentypischen I5E-Rezeptorproteins.

[SEQ ID NR. 37]

[0237] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 9.

[SEQ ID NR. 38]

[0238] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 9.

[SEQ ID NR. 39]

[0239] Diese zeigt die Basensequenz der cDNA, die das neue G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein (rZAQ1) kodiert.

[SEQ ID NR. 40]

[0240] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteins (rZAQ1).

[SEQ ID NR. 41]

[0241] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 10.

[SEQ ID NR. 42]

[0242] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 10.

[SEQ ID NR. 43]

[0243] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 10.

[SEQ ID NR. 44]

[0244] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 10.

[SEQ ID NR. 45]

[0245] Diese zeigt die Basensequenz des Primers, verwendet in dem später beschriebenen BEISPIEL 10.

[SEQ ID NR. 46]

[0246] Diese zeigt die Basensequenz der cDNA, die das neue G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein (rZAQ2) kodiert.

[SEQ ID NR. 47]

[0247] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteins (rZAQ2)

[SEQ ID NR. 48]

[0248] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des Maus-abgeleiteten G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteins (GPR73).

[SEQ ID NR. 49]

[0249] Diese zeigt die Aminosäuresequenz des Maus-abgeleiteten G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteins (ml5E).

[SEQ ID NR. 50]

[0250] Diese zeigt die Basensequenz der cDNA, die das Maus-abgeleitete G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein (GPR73) kodiert.

[SEQ ID NR. 51]

[0251] Diese zeigt die Basensequenz der cDNA, die das Maus-abgeleitete G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein (ml5E) kodiert.

[SEQ ID NR. 52]

[0252] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes #1, verwendet in REFERENZBEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 53]

[0253] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes #2, verwendet in REFERENZBEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 54]

[0254] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes #3, verwendet. in REFERENZBEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 55]

[0255] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes #4, verwendet in REFERENZBEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 56]

[0256] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes #5, verwendet in REFERENZBEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 57]

[0257] Diese zeigt die Basensequenz des DNA-Fragmentes #6, verwendet in REFERENZBEISPIEL 1.

[SEQ ID NR. 58]

[0258] Diese zeigt die Basensequenz der synthetischen DNA, die den menschentypischen ZAQ-Liganden kodiert, der durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist.

[0259] Die Transformante *Escherichia coli* DH5 α /pCR2.1-ZAQC, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 1, ist im National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (jetzt überholt Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH)), mit Sitz im Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan, unter der Zugangsnummer FERM BP-6855 seit 23. August 1999 und im Institute for Fermentation, Osaka (IFO), mit Sitz in 2-17-85, Juso-honmachi, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka, Japan, unter der Zugangsnummer IFO 16301 seit 4. August 1999 hinterlegt.

[0260] Die Transformante *Escherichia coli* DH5 α /pCR2.1-ZAQT, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 1, ist im National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (jetzt überholt Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience und Human Technology (NIBH)) unter der Zugangsnummer FERM BP-6856 seit 23. August 1999 und im Institute for Fermentation, Osaka (IFO) unter der Zugangsnummer IFO 16302 seit 4. August 1999 hinterlegt.

[0261] Die Transformante *Escherichia coli* TOP10/pHMITA, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 4, ist im National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (jetzt überholt Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH)) unter der Zugangsnummer FERM BP-7219 seit 13. Juli 2000 und im Institute for Fermentation, Osaka (IFO) unter der Zugangsnummer IFO 16440 seit 26. Mai 2000 hinterlegt.

[0262] Die Transformante *Escherichia coli* TOP10/pHMITG, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 4, ist im National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (jetzt überholt Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH)) unter der Zugangsnummer FERM BP-7220 seit 13. Juli 2000 und im Institute for Fermentation, Osaka (IFO) unter der Zugangsnummer IFO 16441 seit 26. Mai 2000 hinterlegt.

[0263] Die Transformante *Escherichia coli* DH5 α /pCR2.1-rZAQ1, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 9, ist im National Institute of Advanced Industrial Science und Technology, International Patent Organism Depositary (jetzt überholt Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH)) unter der Zugangsnummer FERM BP-7275 seit 21. August 2000 und im Institute for Fermentation, Osaka (IFO) unter der Zugangsnummer IFO 16459 seit 1. August 2000 hinterlegt.

[0264] Die Transformante *Escherichia coli* DH10B/pCMV-rZAQ2, erhalten in dem später beschriebenen BEISPIEL 10, ist im National Institute of Advanced Industrial Science und Technology, International Patent Organism Depositary (jetzt überholt Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and

Technology, National Institute of Bioscience und Human Technology (NIBH)) unter der Zugangsnummer FERM BP-7276 seit 21. August 2000 und im Institute for Fermentation, Osaka (IFO) unter der Zugangsnummer IFO 16460 seit 1. August 2000 hinterlegt.

[0265] Die Transformante *Escherichia coli* MM294 (DE3)/pTCh1ZAQ, erhalten in dem später beschriebenen REFERENZBEISPIEL 1, ist im National Institute of Advanced Industrial Science und Technology, International Patent Organism Depository unter der Zugangsnummer FERM BP-7571 seit 27. April 2001 und im Institute for Fermentation, Osaka (IFO) unter der Zugangsnummer IFO 16527 seit 16. Januar 2001 hinterlegt.

BEISPIELE

[0266] Hierin nachstehend wird die vorliegende Erfindung ausführlich in bezug auf die BEISPIELE und REFERENZBEISPIELE beschrieben, aber soll den Umfang der vorliegenden Erfindung nicht darauf beschränken. Die Genmanipulationsverfahren unter Verwendung von *Escherichia coli* wurden gemäß den Verfahren durchgeführt, die in der Molekularen Klonierung beschrieben sind.

BEISPIEL 1

Klonen der cDNA die das G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein ZAQ kodiert, und Bestimmung der Basensequenz

[0267] Unter Verwendung der menschlichen hypophysären cDNA (CLONTECH Laboratories, Inc.) als eine Matrize und zwei Primern, nämlich Primer 1

(5'-GTC GAC ATG GAG ACC ACC ATG GGG TTC ATG G-3'; SEQ ID NR:4)

und Primer 2

(5'-ACT AGT TTA TTT TAG TCT GAT GCA GTC CAC CTC TTC-3'; SEQ ID NR:5) wurde PCR durchgeführt.

Die Reaktionslösung in der obigen Reaktion bestand aus 1/10 Volumen der oben beschriebenen cDNA, 1/50 Volumen von Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH Laboratories, Inc.), 0,2 µM Primer 1, 0,2 µM Primer 2, 200 µM dNTPs und einem Puffer, zugeführt mit dem Enzym, um das Endvolumen von 25 µl herzustellen. Bei der PCR wurde, nachdem die Reaktionslösung bei 94 °C für 2 Minuten erhitzt wurde, eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 20 Sekunden, gefolgt von 72 °C für 100 Sekunden dreimal wiederholt, wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 20 Sekunden und bei 68 °C für 100 Sekunden dreimal wiederholt, wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 20 Sekunden, bei 64 °C für 20 Sekunden und bei 68 °C für 100 Sekunden 38 Mal wiederholt, und schließlich wurde eine Extensionsreaktion bei 68 °C für 7 Minuten durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurde das Reaktionsprodukt zu dem Plasmidvektor pCR2.1 (Invitrogen, Inc.) gemäß den Instruktionen, die dem TA-Klonierungskit beigelegt sind (Invitrogen, Inc.), subkloniert. Dann wurde es in *Escherichia coli* DH5α eingeführt, und die Klone, die die cDNA trugen, wurden in LB-Agarmedium, das Ampicillin enthält, selektiert. Die Sequenz von jedem Klon wurde analysiert, wodurch zwei cDNA-Sequenzen erhalten wurden, die das neue G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein kodierten, d. h., ZAQ (SEQ ID NR. 2) und ZAQ (SEQ ID NR. 3). Die Proteine mit der Aminosäuresequenz, die aus dieser cDNA abgeleitet wurde, wurde als ZAQ bezeichnet, da sie alle dieselbe Basensequenz haben (SEQ ID NR. 1). Die Transformante, die die DNA trägt, die durch SEQ ID NR. 2 dargestellt ist, wurde *Escherichia coli* DH5α/pCR2.1-ZAQ genannt, und die Transformante, die die DNA trägt, die durch SEQ ID NR. 3 dargestellt ist, wurde *Escherichia coli* DH5α/pCR2.1-ZAQ genannt.

BEISPIEL 2

Analyse der Expressionsverteilung von ZAQ durch Taqman PCR

[0268] Die Primer und eine Sonde, die in Taqman PCR verwendet werden sollte, wurden unter Verwendung von Primer Express Ver. 1.0 (PE Biosystems Japan) untersucht, und Primer 3

(5'-TCATGTTGCTCCACTGGAAGG-3' (SEQ ID (NR: 6))),

Primer 4

(5'-CCAATTGTCTTGAGGTCCAGG-3' (SEQ ID NR: 7))

und ZAQ-Sonde

(5'-TTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAG-3' (SEQ ID NR: 8)) wurden selektiert. FAM (6-Carboxyfluorescein) wurde als ein Reporterfarbstoff für die Sonde zugegeben.

[0269] Das PCR-Fragment, das unter Verwendung von pAK-ZAQ als eine Matrize, und Primer ZAQ Sal (5'-GTCGACATGGAGACCACCATGGGGTTCATGG-3' (SEQ ID NR: 9)) und Primer ZAQ Spe (5'-ACTAGTT-TATTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3' (SEQ ID NR:10)) amplifiziert wurde, wurde mit CHROMA

SPIN200 gereinigt (CLONTECH Laboratories, Inc. (CA,USA)), und dann auf eine Konzentration von 10^0 – 10^6 Kopien/ μ l zur Verwendung als eine Standard-DNA eingestellt. Menschliche Multiple Tissue cDNA Panel I und Panel II (CLONTECH Laboratories, Inc.) wurden als die cDNA-Quelle für jedes Gewebe verwendet. Zu den Primern, der Sonde und Matrize wurde Taqman Universal PCR Master Mix (PE Biosystems Japan) in der Menge zugegeben, die durch die beiliegenden Instruktionen angegeben werden, und dann wurden PCR und Analyse mit ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System (PE Biosystems Japan) durchgeführt.

[0270] Die Ergebnisse werden in [Fig. 8](#) und Tabelle 1 gezeigt. Die Expression von ZAQ wurde hauptsächlich in den Hoden gefunden, und als nächstes an den Stellen, wie Lunge, Gehirn und andere.

Tabelle 1

Gewebe	ZAQ (Kopien μ l)
Gehirn	6,1
Herz	2,9
Niere	2,8
Leber	2,6
Lunge	7,0
Bauchspeicheldrüse	2,1
Plazenta	3,2
Skelettmuskel	2,6
Dickdarm	1,8
Eierstock	3,4
Leukozyt	0,0
Prostata	0,7
Dünndarm	2,2
Milz	2,1
Hoden	28,0
Thymusdrüse	1,1

BEISPIEL 3

Isolation von ZAQ-aktivierendem Peptid

(3-1) Herstellung von Milchextraktlösung

[0271] Unter Verwendung von kommerziell erhältlicher Milch, die bei einer niedrigen Temperatur pasteurisiert wurde, wurden die folgenden. Verfahrensweisen durchgeführt, um eine Extraktlösung herzustellen. Zwei Liter Milch wurden bei 10.000 U/min für 15 Minuten bei 4 °C mit einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert (CR26H, R10A Rotor: Hitachi, Ltd.). Der erhaltene Überstand wurde durch Gaze filtriert, wodurch Lipide entfernt wurden. Essigsäure wurde zu dem Überstand zugegeben, um die Konzentration auf die Endkonzentration von 1 M einzustellen, und das Gemisch wurde für 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Dann wurde das Gemisch bei 10.000 U/min für 15 Minuten mit einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert (CR26H R10A Rotor: Hitachi System Engineering Co., Ltd.). Der erhaltene Überstand wurde filtriert, wodurch unlösliche Stoffe entfernt wurden. Während des Rührens wurde Aceton doppelt so viel wie das Volumen des Überstandes dazugegeben. Das Rühren wurde bei 4 °C für 3 Stunden fortgesetzt. Dann wurde das Gemisch bei 10.000 U/min für 15 Minuten mit einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert (CR26H R10A Rotor: Hitachi, Ltd.). Der erhal-

tene Überstand wurde filtriert, wodurch die unlöslichen Stoffe entfernt wurden. Der erhaltene Überstand wurde einem Rotationsverdampfer zugeführt, wodurch Aceton entfernt wurde, und auf 1350 ml Endvolumen konzentriert. Dann wurden jeweils 675 ml des resultierenden Konzentrats mit 338 ml Diethylether gemischt, und das Gemisch wurde in einem Trenntrichter kräftig geschüttelt, wodurch es in zwei Phasen getrennt wurde, um die wässrige Phase zu sammeln. Dieselbe Verfahrensweise wurde einmal in bezug auf die erhaltene wässrige Phase wiederholt, wodurch eine klare wässrige Lösung erhalten wurde. Die erhaltene wässrige Lösung wurde auf 800 ml unter Verwendung eines Rotationsverdampfers konzentriert, wodurch ein Endextrakt erhalten wurde.

(3-2) Grobfractionierung der Milchextraktlösung unter Verwendung von C18-Umkehrphasenchromatographie

[0272] Methanol wurde zu 10 g einer Sep-Pak C18-Säule (Waters), gepackt mit Octadecylgrupprefixiertem Kieselgel, zugegeben, wodurch das Gel quoll. Die Säule wurde dann mit 1 M Essigsäure äquilibriert. Die Extraktlösung, hergestellt in (3-1) (die Extraktlösung aus 2 Liter Milch), wurde auf die Säule geladen. Dann wurden 100 ml 1 M Essigsäure durch die Säule geführt, wodurch das Gel gewaschen wurde. Dann wurde die Säule mit 200 ml von 60 % Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure eluiert, wodurch die gewünschte rohe Peptidkomponente eluiert wurde. Nachdem das erhaltene Eluat unter Verwendung eines Rotationsverdampfers konzentriert wurde, wurde das Konzentrat mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis).

(3-3) Grobfractionierung der Milchextraktlösung durch Sulfopropyl-Ionenaustauschchromatographie

[0273] SP Sephadex C-25 (Amersham Pharmacia Biotech), das in 100 mM HCl quoll, wurde auf eine Säule aus Polypropylen in einem Volumen von 2 ml geladen. Die Säule wurde mit destilliertem Wasser und Ammoniumformiat (pH 4,0) gewaschen und mit Elutionsmittel I äquilibriert (2 M Ammoniumformiat : Acetonitril : Wasser = 1 : 25 : 74). Das lyophilisierte Produkt, das in (3-2) erhalten wurde, wurde in 20 ml Elutionsmittel I gelöst. Die resultierende Lösung wurde auf 2 ml SP Sephadex C-25 geladen. Nachdem die Säule mit 10 ml Elutionsmittel I gewaschen wurde, wurde das Peptid mit jeweils 10 ml Elutionsmittel II (2 M Ammoniumformiat : Acetonitril : Wasser = 1 : 2,5 : 6,5), Elutionsmittel III (2 M Ammoniumformiat : Acetonitril : Wasser = 1 : 1 : 2) und Elutionsmittel IV (2 M Ammoniumformiat : Acetonitril : Wasser = 1 : 0,5 : 0,5) in dieser Reihenfolge gewaschen. Jedes der Eluate I bis IV wurde mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis).

(3-4) Fraktionierung des Milchextraktes durch TSKgel-ODS80Ts-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0274] Mittels Führen von 91,7 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser) und 8,3 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) durch eine Säule für TSKgel-ODS80Ts-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso Co., Ltd., 4,6 mm × 25 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 40 °C wurde die Säule äquilibriert. Die lyophilisierten Produkte der Eluate I bis IV, erhalten in (3-3), wurden in 4 ml 1 M Essigsäure gelöst, und dann der Chromatographiebehandlung unterzogen. Das heißt, 4 ml der Lösung des lyophilisierten Produktes wurden auf die Säule geladen, und die Konzentration des Elutionsmittels B wurde auf 67 Vol.-% Elutionsmittel A/33 Vol.-% Elutionsmittel B über 1 Minute erhöht und dann mit einem linearen Gradienten von 67 Vol.-% Elutionsmittel A/33 Vol.-% Elutionsmittel B auf 0 Vol.-% Elutionsmittel A/100 Vol.-% Elutionsmittel B über die nächsten 40 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min erhöht.

[0275] Jeweils 1 ml Eluat wurde entnommen, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde, und 2 µl von jeder Fraktion wurden mit 150 µl von 0,2 % Rinderserumalbumin (BSA)/destilliertem Wasser gemischt, gefolgt von Lyophilisierung. Das lyophilisierte Produkt wurde als eine Assayprobe zum Messen der die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration erhöhenden Aktivität verwendet, die später in (3-5) beschrieben wurde.

(3-5) Messung der die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration erhöhenden Aktivität unter Verwendung von FLI-PR

[0276] Die Zelllinie, die ZAQ stabil exprimieren kann, wurde folgendermaßen hergestellt. Das heißt, ein Klon von DH5α/pCR2.1-ZAQC, erhalten in BEISPIEL 1, wurde in LB-Medium, das mit Ampicillin ergänzt wurde, während kräftigen Schüttelns inkubiert, wodurch Plasmid pCR2.1-ZAQC erhalten wurde. Das Plasmid wurde mit Restriktionsenzymen Sal I und Spe I digeriert, um den Insert-Teil, der ZAQ kodiert, zu exzidieren. Dann wurde pAKKO-1.11H (Biochemica et Biophysica Acta, 1219 (1994) 251–259), das ebenso mit Restriktionsenzymen Sal I und Spe I digeriert wurde, mit dem Insert-Teil unter Verwendung von Ligation Express Kit ligiert (CLONTECH Laboratories, Inc. (CA, USA)), was zu E. coli DH10B durch das Elektroporationsverfahren trans-

fektiert wurde. Die Struktur des Plasmids, das in dem erhaltenen Klon enthalten ist, wurde durch Restriktionsenzymbehandlung und Sequenzanalyse analysiert. Das korrekt konstruierte Plasmid wurde als Plasmid pAK-ZAQC zur CHO-Zellexpression verwendet.

[0277] Dieses Plasmid pAK-ZAQC wurde zu einer CHO/dhfr-Zelle (American Type Culture Collection) unter Verwendung von CellPfect Transfection Kit (Amersham Pharmacia Biotech) transfektiert. Zunächst wurden 120 µl Puffer A (CellPfect Transfection Kit) zu einer Lösung aus 4 µg Plasmid-DNA in 120 µl destilliertem Wasser zugegeben, und das Gemisch wurde gerührt. Nach dem Stehenlassen für 10 Minuten wurden 240 µl Puffer B (CellPfect Transfection Kit) zu dem Gemisch zugegeben. Das Gemisch wurde kräftig gerührt, wodurch der DNA-Calciumphosphatkomplex gebildet wurde, der die DNA enthielt. 5×10^5 CHO/dhfr-Zellen wurden auf einer 60-mm-Petrischale inokuliert. Nach der Inkubation in Ham-F-12-Medium (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), ergänzt mit 10 % fetalem Rinderserum (BIO WHITTAKER, Inc.), wurden bei 37 °C unter 5 % CO₂ für einen Tag 480 µl einer Suspension aus dem DNA-Calciumphosphatkomplex tropfenweise zu den Zellen auf der Petrischale zugegeben. Nach der Inkubation bei 37 °C unter 5 % CO₂ für 6 Stunden wurden die Zellen zweimal mit serumfreien Ham-F-12-Medium gewaschen, und 1,2 ml Puffer (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1,4 mM Na₂HPO₄, pH 7,1), ergänzt mit 15 % Glycerol, wurden zu den Zellen auf der Schale zugegeben, um die Zellen für 2 Minuten zu behandeln. Die Zellen wurden erneut zweimal mit serumfreien Ham-F-12-Medium gewaschen, gefolgt von der Inkubation in Ham-F-12-Medium, enthaltend 10 % fetales Rinderserum, bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht. Die Zellen wurden mit Trypsin zur Dispersion behandelt, aus der Schale rückgewonnen, und jeweils 2×10^4 wurden in einer 6-Lochplatte inokuliert. Die Inkubation wurde in Dulbecco's Modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), ergänzt mit 10 % dialysiertem fetalem Rinderserum (JRH BIOSCIENCES), 1 mM MEM nicht-essentieller Aminosäurelösung (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, bei 37 °C unter 5 % CO₂ initiiert. Die transformierten CHO-Zellen, in die das Plasmid eingeführt wurde, konnten in dem Medium überleben, aber nicht-transfizierte Zellen starben allmählich ab. Daher wurde das Medium ausgetauscht, wodurch die toten Zellen alle 2 Tage nach der Initiierung der Inkubation entfernt wurden. Etwa 21 Kolonien der transformierten CHO-Zellen, die nach 8 bis 10 Tagen der Inkubation wuchsen, wurden ausgewählt. RNA wurde aus jeder der ausgewählten Zellen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen RNA-Isolationskits gewonnen, gefolgt von dem öffentlich bekannten RT-PCR-Verfahren, um den ZAQC-Expressions-CHO-Zellen-B-1-Klon auszuwählen (hierin nachstehend nur als ZAQC-B1-Zelle bezeichnet), der hohe Expression von ZAQC zeigt.

[0278] Zur Kontrolle wurde ETA-(Endothelin-A-Rezeptor)-exprimierender CHO-Zellen-Klon Nr. 24 (hierin nachstehend nur als ETA24-Zelle bezeichnet; siehe Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279, 675–685, 1996) verwendet.

[0279] Die die intrazelluläre Ca²⁺-Ionenkonzentration erhöhende Aktivität von ZAQC-B1-Zellen oder ETA24-Zellen wurde für die in (3-4) oben erhaltenen Proben unter Verwendung des FLIPR analysiert (Molecular Devices, Inc.). Die ZAQC-B1-Zellen und ETA24-Zellen, die beide in DMEM-Medium, ergänzt mit 10 % dialysiertem fetalem Rinderserum (hierin nachstehend als dFBS bezeichnet), subkultiviert wurden, wurden verwendet. Die ZAQC-B1-Zellen und ETA24-Zellen wurden jeweils in dem Medium (10 % dFBS-DMEM) suspendiert, um die Konzentration auf 15×10^4 Zellen/ml einzustellen. Ein aliquoter Teil von 200 µl von jeder Zellsuspension wurde auf jedem Loch ($3,0 \times 10^4$ Zellen/200 µl/Loch) in einer 96-Lochplatte für FLIPR inokuliert (Black Plate Clear Bottom, Coster), die in einem Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht inkubiert wurde, und die so erhaltenen Zellen wurden verwendet (hierin nachstehend als die Zellplatte bezeichnet). Zwanzig Milliliter von H/HBS (9,8 g Nissui Hanks 2 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,35 g Natriumhydrogencarbonat, 4,77 g HEPES, eingestellt auf pH 7,4 mit einer Natriumhydroxidlösung, gefolgt von Sterilisation durch einen Sterilisationsfilter), 200 µl von 250 mM Probenecid und 200 µl fetales Rinderserum (FBS) wurden gemischt. Ebenso wurden 2 Phiole (50 µg) Fluo 3-AM (Dojin Chemical Research Institute) in 40 µl Dimethylsulfoxid und 40 µl von 20%iger Pluronsäure (Molecular Probes, Inc.) gelöst, und die resultierende Lösung wurde zu dem obigen H/HBSS-Probenecid-FBS-Gemisch zugegeben. Nach dem Mischen wurde das Medium von der Zellplatte entfernt, und jeweils 100 µl des Gemisches wurden in jedem Loch der Zellplatte unter Verwendung einer 8-Kanal-Pipette dispensiert. Die Zellplatte wurde dann bei 37 °C unter 5 % CO₂ für eine Stunde (Farbstoffladung) inkubiert. Für die Assayproben, erhalten in dem oben beschriebenen BEISPIEL (3-4), wurden 150 µl H/HBSS, enthaltend 2,5 mM Probenecid und 0,1 % CHAPS, zu jeder Fraktion zur Verdünnung zugegeben. Die verdünnte Lösung wurde auf eine 96-Lochplatte für FLIPR übertragen (V-Bottom Plate, Coster, hierin nachstehend als die Probenplatte bezeichnet). Nach Beendigung der Farbstoffladung auf die Zellplatte wurde die Zellplatte viermal mit dem Waschpuffer, bestehend aus H/HBSS, ergänzt mit 2,5 mM Probenecid, unter Verwendung eines Plattenwäschers gewaschen (Molecular Devices, Inc.). Nach dem Waschen wurden 100 µl des Waschpuffers für weitere Verfahren sichergestellt. Diese Zellplatte und die Probenplatte wurden auf FLIPR gegeben, um einen Assay durchzuführen (durch FLIPR wurden 50 µl der Probe aus der Probenplatte zu der Zellplatte über-

tragen).

[0280] Infolgedessen wurde die die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration erhöhende Aktivität, die für ZAQC-B1-Zellen spezifisch ist, in Fraktion Nr. 53 gefunden, die durch Anwenden von oben beschriebenen Elutionsmittel IV (3-3) auf die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie in (3-4) oben fraktioniert wurde.

(3-6) Reinigung unter Verwendung von TSKgel-Super-Phenyl-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0281] (1) Mittels Führen von 91,7 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser)/8,3 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) durch eine Säule zur TSKgel-Super-Phenyl-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso Co., Ltd., 0,46 cm × 10 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 40 °C wurde die Säule äquilibriert. Die Fraktion Nr. 53, erhalten in oben beschriebenen (3-4), wurde der Chromatographie unterzogen. Das heißt, 1 ml der Fraktion Nr. 53 wurde auf die Säule geladen, und die Konzentration an Elutionsmittel B wurde auf 75 Vol.-% Elutionsmittel A/25 Vol.-% Elutionsmittel B über 1 Minute erhöht und dann mit einem linearen Gradienten auf 67 Vol.-% Elutionsmittel A/33 Vol.-% Elutionsmittel B über 75 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min erhöht.

[0282] Jeweils 500 µl Eluat wurde entnommen, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde, und 25 µl jeder fraktionierten Fraktion wurden mit 150 µl 0,2 % BSA gemischt, gefolgt durch Lyophilisierung mit einem Gefriertrockner (12EL; VirTis). Das lyophilisierte Produkt wurde mit 150 µl H/HBSS, enthaltend 2,5 mM Probenecid und 0,1 % CHAPS, zugegeben, wodurch das lyophilisierte Produkt gelöst wurde. Unter Verwendung von 50 µl der resultierenden Lösung wurde die die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration erhöhende Aktivität durch das in (3-5) oben beschriebene Verfahren gemessen, wodurch die Wirkung der Aktivierung des Rezeptors zu den ZAQC-B1-Zellen analysiert wurde. Das Ergebnis offenbart, daß die Komponente mit der Wirkung zum Aktivieren des Rezeptors für die Ziel-ZAQC-B1-Zellen, d. h., die ZAQ-aktivierende Komponente, hauptsächlich in Fraktion Nr. 103–105 eluiert wurde.

(3-7) Reinigung unter Verwendung von µRPC C2/C18 ST4.6/100 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0283] Mittels Führen von 95 Vol.-% Elutionsmittel A (Heptafluorbuttersäure/destilliertes Wasser)/5 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Heptafluorbuttersäure/100 % Acetonitril) durch eine Säule zur µRPC C2/C18 ST4.6/100 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Amersham Pharmacia Biotech, 0,46 cm × 10 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 40 °C wurde die Säule äquilibriert.

[0284] Nachdem die Fraktionen Nr. 103–105, ausgewählt aus den Fraktionen, die in (3-6) oben durch TSKgel-Super-Phenyl-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie erhalten wurden, direkt auf die µRPC C2/C18 ST4.6/100-Umkehrphasensäule geladen wurden, wurde die Elution durch schnelles Erhöhen von 95 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Heptafluorbuttersäure/destilliertes Wasser)/5 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Heptafluorbuttersäure/100 % Acetonitril) auf 65 Vol.-% Elutionsmittel A/35 Vol.-% Elutionsmittel B bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über 1 Minute und dann durch Erhöhen mit einem linearen Gradienten auf 50 Vol.-% Elutionsmittel A/50 Vol.-% Elutionsmittel B über die nächsten 60 Minuten durchgeführt, wodurch das Eluat gewonnen wurde. Das Eluat wurde als ein einzelner Peak bei 210 nm durch UV-Absorption detektiert.

[0285] Jeweils 500 µl Eluat wurden entnommen, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde, und jeweils 25 µl aus den erhaltenen Fraktionen wurden mit 150 µl 0,2 % BSA gemischt, gefolgt von Lyophilisierung mit einem Gefriertrockner (12EL; VirTis). Das lyophilisierte Produkt wurde mit 150 µl H/HBSS, enthaltend 2,5 mM Probenecid und 0,1 % CHAPS, zugegeben, wodurch das lyophilisierte Produkt gelöst wurde. Unter Verwendung von 50 µl der Lösung wurde die Rezeptoraktivierungsaktivität auf die ZAQ-C-B1-Zellen durch das in (3-5) oben beschriebene Testverfahren analysiert. Das Ergebnis offenbarte, daß die Komponente mit der Rezeptoraktivierungsaktivität auf die jeweiligen ZAQ-C-B1-Zellen, nämlich die ZAQ-aktivierende Komponente, hauptsächlich in Fraktionen Nr. 82 bis 84 eluiert wurde. Dieser Aktivierungspeak stimmte vollständig mit dem UV-Absorptionspeak bei 210 nm überein, was zu der Schlußfolgerung führt, daß das Produkt genug gereinigt wurde, um das einzelne Peptid zu erhalten.

(3-8) Analyse der Struktur von gereinigtem ZAQ-aktivierendem Peptid

[0286] Das folgende Verfahren wurde verwendet, um die Struktur der ZAQ-aktivierenden Komponente zu be-

stimmen, die in dem oben beschriebenen BEISPIEL (3-7) erhalten wurde. Die gereinigte ZAQ-aktivierende Komponente wurde lyophilisiert, und das lyophilisierte Produkt wurde in Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Ein aliquoter Teil der Lösung wurde für das N-terminale Aminosäuresequenzieren unter Verwendung eines Proteinsequenzers bereitgestellt (Perkin-Elmer, Inc., PE Biosystems Procise 491cLC). Infolgedessen konnten 14 Reste von den Aminosäureresten von dem N-Terminus bis zu dem 16. Aminosäurerest identifiziert werden (Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly (SEQ ID NR. 11; Xaa ist ein nicht-identifizierter Rest)).

BEISPIEL 4

Klonen der cDNA für menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid

[0287] Eine Blast-Suche wurde in einer Datenbank unter Verwendung der N-terminalen Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 11) des gereinigten ZAQ-aktivierenden Peptids, das aus Milch in BEISPIEL 3 extrahiert wurde, als Abfrage durchgeführt. So wurde menschliches EST (X40467) entdeckt, das dieselbe Basensequenz wie die der DNA aufweist, die das Peptid mit der Aminosäuresequenz kodiert, die durch SEQ ID NR. 11 dargestellt ist. Da diese Sequenz kein vollständiges offenes Leseraster aufweist, wurde die nicht-identifizierte Sequenz durch das RACE-Verfahren identifiziert, und folglich wurde der cDNA-Klon mit dem vollständigen offenen Leseraster erhalten.

[0288] Basierend auf den Informationen aus EST (X40467) wurden Primer ZF1 (SEQ ID NR. 12), ZF2 (SEQ ID NR. 13) und ZF3 (SEQ ID NR. 14) konstruiert, und das 3'-RACE-Experiment wurde unter Verwendung von menschlicher Testis-Marathon-Ready-cDNA (CLONTECH Laboratories, Inc.) als eine Matrize durchgeführt.

ZF1: 5'-GGTGCCACGCGAGTCTCAATCATGCTCC-3' (SEQ ID Nr.: 12)

ZF2: 5'-GGGGCCTGTGAGCGGGATGTCCAGTGTG-3' (SEQ ID Nr.: 13)

ZF3: 5'-CTTCTTCAGGAAACGCAAGCACACACC-3' (SEQ ID Nr.: 14)

[0289] Eine PCR-Reaktionslösung für 3'-RACE wurde durch Mischen von 1 µl 50 × Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH Laboratories, Inc.), 5 µl 10 × Advantage 2 PCR-Puffer angelagert (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37,5 µg/ml BSA, 0,05 % Tween-20, 0,05 % Nonidet-P40), 4 µl dNTP-Gemisch (jeweils 2,5 mM, TaKaRa Shuzo Co., Ltd.), 1 µl 10 µM Primer ZF1, 1 µl 10 µM Primer AP1 (Primer AP1 wurde mit menschlichem Testis-Marathon-Ready-cDNA-Kit von CLONTECH Laboratories, Inc. zugeführt), 5 µl Matrizen-cDNA (CLONTECH Laboratories, Inc., menschliche Testis-Marathon-Ready-cDNA) und 33 µl destilliertes Wasser hergestellt. Die Reaktion wurde unter den Bedingungen durchgeführt: nach der primären Denaturierung bei 94 °C für 60 Sekunden wurde ein Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 72 °C für 4 Minuten fünfmal wiederholt, wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 70 °C für 4 Minuten fünfmal wiederholt, und wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 68 °C für 44 Minuten 25 Mal wiederholt.

[0290] Dann wurde Nested-PCR unter Verwendung des Reaktionsgemischs aus dem PCR als eine Matrize durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde durch Mischen von 1 µl 50 × Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH), 5 µl 10 × Advantage 2 PCR Puffer angelagert (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37,5 µg/ml BSA, 0,05 % Tween-20, 0,05 % Nonidet-P40), 4 µl dNTP-Gemisch (jeweils 2,5 mM, TaKaRa Shuzo Co., Ltd.), 1 µl 10 µM Primer ZF2, 1 µl 10 µM Primer AP2 (Primer AP2 wurde mit menschlichem Testis-Marathon-Ready-cDNA-Kit von CLONTECH Laboratories, Inc. zugeführt), 5 µl Matrizen-DNA (50fache Verdünnung des PCR-Reaktionsgemisches) und 33 µl destilliertes Wasser hergestellt. Die Reaktion wurde unter den Bedingungen durchgeführt: nach der primären Denaturierung bei 94 °C für 60 Sekunden wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 72 °C für 4 Minuten fünfmal wiederholt, wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 70 °C für 4 Minuten fünfmal wiederholt, und eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 68 °C für 44 Minuten 25 Mal wiederholt.

[0291] Außerdem wurde zweites Nested-PCR unter Verwendung der Reaktionslösung des PCR als eine Matrize durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde durch Mischen von 1 µl 50 × Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH Laboratories, Inc.), 5 µl 10 × Advantage 2 PCR Puffer angelagert (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37,5 µg/ml BSA, 0,05 % Tween-20, 0,05 % Nonidet-P40), 4 µl dNTP-Gemisch (jeweils 2,5 mM, TaKaRa Shuzo Co., Ltd.), 1 µl 10 µM Primer ZF3, 1 µl 10 µl Primer AP2 (Primer AP2 wurde mit menschlichem Testis-Marathon-Ready-DNA-Kit von CLONTECH Laboratories, Inc. zugeführt), 5 µl Matrizen-cDNA (50fache Verdünnung des PCR-Reaktionsgemisches) und 33 µl destilliertes Wasser hergestellt. Die Reaktion wurde unter den Bedingungen durchgeführt: nach der primären Denaturierung bei 94 °C für 60 Sekunden wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 72 °C für 4 Minuten fünfmal wieder-

holt, wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 70 °C für 4 Minuten fünfmal wiederholt, und wurde eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 30 Sekunden und dann bei 68 °C für 44 Minuten 25 Mal wiederholt. Das erhaltene DNA-Fragment wurde unter Verwendung von TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Inc.) gemäß dem Protokoll, das in dem beiliegenden Handbuch beschrieben ist, geklont. Die Basensequenz der geklonten DNA wurde unter Verwendung eines ABI377DNA-Sequenzers dekodiert, um die 3'-Ende-Sequenz (SEQ ID NR. 15) zu identifizieren.

[0292] Basierend auf der Basensequenz, die durch SEQ ID NR. 15 dargestellt ist, und der Informationen aus EST (X40467) wurden Primer ZAQL-CF (SEQ ID NR. 16) und Primer ZAQL-XR1 (SEQ ID NR. 17) hergestellt. Unter Verwendung von menschlicher Testis-Marathon-Ready-cDNA (CLONTECH Laboratories, Inc.) als Matrize wurde PCR unter Verwendung von Primern ZAQL-CF und ZQAL-XR1 durchgeführt.

ZAQL-CF: 5'-CCACCATGAGAGGTGCCACG-3' (SEQ ID Nr.: 16)

ZAQL-XR1: 5'-CTCGAGCTCAGGAAAAGGATGGTG-3' (SEQ ID Nr.: 17)

[0293] Die Reaktionslösung wurde durch Mischen von 1 µl PfuTurbo-DNA-Polymerase (Stratagene, Inc.), 5 µl 10 × PCR Puffer angelagert, 4 µl 2,5 mM dNTP-Gemisch, jeweils 2,5 µl 10 µM Primer ZAQL-CF und ZAQL-XR1, 5 µl Matrizen-DNA und 30 µl destilliertem Wasser hergestellt. Die Reaktion wurde unter den Bedingungen durchgeführt: nach der primären Denaturierung bei 95 °C für 1 Minute wurde eine Zyklusgruppe bei 95 °C für 1 Minute und dann bei 72 °C für 1 Minute 40 Mal wiederholt, und eine Endextensionsreaktion wurde bei 72 °C für 10 Minuten durchgeführt. Das erhaltene DNA-Fragment wurde unter Verwendung von TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) gemäß dem Protokoll, das in dem beiliegenden Handbuch beschrieben ist, geklont. Infolge der Dekodierung der Basensequenzen der geklonten DNA-Fragmente unter Verwendung des ABI377DNA-Sequenzers wurde herausgefunden, daß die Fragmente Sequenzen mit 371 Basenpaaren aufwiesen, die durch SEQ ID NR. 18 bzw. SEQ ID NR. 19 dargestellt sind. Das Plasmid, das das DNA-Fragment trägt, das die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 18 dargestellt ist, wurde pHMITA genannt, und das Plasmid, das das DNA-Fragment trägt, das die Basensequenz enthält, die durch SEQ ID NR. 19 dargestellt ist, wurde pHMITG genannt.

[0294] Escherichia coli wurde unter Verwendung der Plasmide pHMITA und pHMITG transfektiert, und die erhaltenen Transformanten wurden Escherichia coli TOP10/pHMITA bzw. Escherichia coli TOP 10/pHMITG genannt.

[0295] Die Analyse der Basensequenzen der DNA-Fragmente offenbarten, daß das DNA-Fragment, das durch SEQ ID NR. 18 dargestellt ist, die DNA aufwies (SEQ ID NR. 28), die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert (Typ A, 105 Aminosäurereste), dargestellt durch SEQ ID NR. 22, und daß das DNA-Fragment, das durch SEQ ID NR. 19 dargestellt ist, die DNA aufwies (SEQ ID NR. 29), die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert (Typ G, 105 Aminosäurerest), dargestellt durch SEQ ID NR. 23.

[0296] Es wurde außerdem herausgefunden, daß die Basensequenzen, die durch SEQ ID NR. 28 dargestellt sind und durch SEQ ID NR. 29 dargestellt sind, eine typische Signalsequenz aufwiesen; die DNA mit der Basensequenz, die durch SEQ ID NR. 28 dargestellt ist, die DNA aufwies (SEQ ID NR. 26), die aus 258 Basenpaaren besteht und die das menschentypische reife ZAQ-Ligandenpeptid kodiert (Typ A, 86 Aminosäurereste), dargestellt durch SEQ ID NR. 20; die DNA mit der Basensequenz, die durch SEQ ID NR. 29 dargestellt ist, die DNA aufwies (SEQ ID NR. 27), die aus 258 Basenpaaren besteht und die das menschentypische reife ZAQ-Ligandenpeptid kodiert (Typ G, 86 Aminosäurereste), dargestellt durch SEQ ID NR. 21.

BEISPIEL 5

Produktion von menschentypischem ZAQ-Ligandenpeptid in Säugerzellen (1)

(5-1) Konstruktion des Säugerexpressionsvektors für menschentypisches ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid

[0297] Das Plasmid pHMITG, erhalten in BEISPIEL 4, wurde mit Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI digeriert, wodurch das DNA-Fragment 382 Basenpaaren (SEQ ID NR. 30), enthaltend cDNA, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert, exzidiert wurde.

[0298] Das heißt, Plasmid pHMITG wurde mit EcoRI und XhoI digeriert, und das erhaltene DNA-Fragment wurde auf 1,5 % Agarosegel der Elektrophorese unterworfen. Das Gelsegment der Bande mit 382 Basenpaaren, eingefärbt mit Cybergreen, wurde mit einer Rasierklinge herausgeschnitten. Aus dem obigen Gelsegment

wurde das DNA-Fragment unter Verwendung von Gene Clean Spin DNA Extraction Kit (BIO 101, Inc.) gewonnen. Gemäß dem Standardverfahren wurde das erhaltene DNA-Fragment in den Säugerzellenexpressionsvektor pCAN618 (Fig. 11), der CMV-IE-Enhancer und Huhn-beta-Actin-Promotor als Expressionspromotor an der Spaltungsstelle trägt, durch Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI geklont. Die Basensequenz des geklonten DNA-Fragmentes wurde durch das obige Verfahren dekodiert. Daher wurde das DNA-Fragment identifiziert und wies die Basensequenz auf, die durch SEQ ID NR. 30 dargestellt ist. Dieser Säugerzellenexpressionsvektor mit der DNA, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid kodiert, wurde pCANZAQLg2 genannt.

(5-2) Einführung von Expressionsvektor in COS7-Zellen

[0299] COS7-Zellen wurden von ATCC bezogen, und die Zellen, die durch DMEM-Medium (ergänzt mit 10 % FBS) in Subkultur angelegt wurden, wurden verwendet. Unter Verwendung des DMEM-Mediums wurden die COS7-Zellen bei einer Population von $1,5 \times 10^6$ Zellen/Schale auf einer 10-cm-Petrischale inokuliert, gefolgt von Inkubation bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht. Zu 2 µg des Expressionsplasmids von menschentypischem ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid (gelöst in 2 µl TE-Puffer) (pCANZAQLg2) wurden 298 µl Puffer EC (Effectene-Transfektionsreagens, QIAGEN) zugegeben, und 16 µl Enhancer wurden außerdem zu dem Gemisch zugegeben. Nach dem Mischen für eine Sekunde wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 3 Minuten stehengelassen. Dann wurden 60 µl Effectene-Transfektionsreagens weiterhin zu dem Gemisch zugegeben. Nach dem Mischen für 10 Sekunden wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehengelassen. Nachdem der Überstand aus den Zellen, die am Tag zuvor inokuliert wurden, entfernt wurde, wurden die Zellen einmal mit 10 ml DMEM-Medium gewaschen, und 9 ml DMEM-Medium wurden zugegeben. Ein Milliliter des DMEM-Mediums wurde zu der Plasmidlösung zugegeben, und nach dem Mischen wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen zugegeben. Nach dem Mischen des gesamten Gemisches wurden die Zellen bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml DMEM-Medium gewaschen, und 10 ml des DMEM-Mediums wurden zugegeben. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht kultiviert. Nach 2 Tagen wurde der Kulturüberstand gewonnen.

(5-3) Teilreinigung von menschentypischem ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid aus dem Kulturüberstand von Expressions-COS7-Zellen

(5-3-1) Herstellung des Kulturüberstandes von menschentypisches ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid-exprimierenden COS7-Zellen

[0300] Der Kulturüberstand von menschentypisches ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid-exprimierenden COS7-Zellen wurde gewonnen, und das Extrakt wurde durch die folgende Verfahrensweise hergestellt. Zunächst wurden 1,1 ml Essigsäure tropfenweise zu dem Zellkulturüberstand (etwa 18,5 ml) zugegeben, wodurch die Endkonzentration auf 1 M eingestellt wurde, und das Gemisch wurde für eine Stunde gerührt. Aceton wurde in 2fachem Volumen des Gemisches zugegeben, welches dann für 30 Minuten bei 4 °C gerührt wurde. Als nächstes wurde das Gemisch bei 15.000 U/min für 30 Minuten unter Verwendung einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert (CR26H, Model 23 Rotor: Hitachi, Ltd), wodurch der Überstand erhalten wurde. Der erhaltene Überstand wurde in einem Verdampfer gegeben, um Aceton zu entfernen, und dann mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis).

(5-3-2) Sephadex-G50-Gelchromatographie und SepPak-Säulenchromatographie des Kulturüberstandes von menschentypisches ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid-exprimierenden COS7-Zellen

[0301] Die lyophilisierten Pulver, erhalten in (5-3-1) oben, wurden in 2 ml 1 M Essigsäure gelöst, und die Lösung wurde auf Sephadex-G15-Säule (3 cm × 35 ml, Pharmacia Biotech) adsorbiert, die mit 1 M Essigsäure äquilibriert wurde. Dann wurden 1 M Essigsäure durch die Säule geführt, und jeweils 5 ml des Eluats wurden entnommen, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Jede Fraktion wurde mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis).

[0302] Eine SepPak-C18-Sg-Säule (10 ml) wurde mit Methanol gequollen und mit 0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertem Wasser äquilibriert. Die lyophilisierten Produkte von Fraktion Nr. 1 bis 16, entnommen aus den Fraktionen, erhalten durch Sephadex-G50-Gelchromatographie, wurden zusammengefaßt und in 3 ml Trifluoressigsäure/destilliertem Wasser gelöst, und die Lösung wurde auf die SepPak-C18-Sg-Säule geladen. Nach dem Waschen mit 24 ml 0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertem Wasser wurde die Säule gewaschen und mit 20 ml 0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril eluiert. Das erhaltene Eluat wurde auf Savant aufgebracht.

(5-3-3) Reinigung von Super ODS Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0303] Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser) wurde durch die Säule zur TSKgel Super ODS Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso, 0,46 cm × 10 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 40 °C geführt, um die Säule zu äquilibrieren. Nachdem die SepPak-C18-5g-Säulenfraktion, erhalten in (5-3-2), auf Savant aufgebracht wurde, wurde die Fraktion auf Super-ODS-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie geladen. Dann wurde die Elution durch Erhöhen mit einem linearen Gradienten von 100 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser)/0 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/100 % Acetonitril) auf 0 Vol.-% Elutionsmittel A/100 Vol.-% Elutionsmittel B bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über 60 Minuten durchgeführt, wodurch das Eluat gewonnen wurde.

[0304] Das Eluat wurde mit jeweils 1 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Die Gesamtmenge der fraktionierten Fraktionen wurde mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis). Die lyophilisierten Produkte wurden in 150 µl H/HBSS, ergänzt mit 2,5 mM Probenecid und 0,2 % BSA, gelöst. Unter Verwendung dieser Lösung wurde die Wirkung des Aktivierens des Rezeptors für ZAQC-B1-Zellen durch das nachstehend beschriebene Verfahren (5-3-4) analysiert.

(5-3-4) Messung der die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration erhöhenden Aktivität durch FLIPR

[0305] Unter Verwendung von FLIPR wurden die Proben, die oben in (5-3-4) erhalten wurden, hinsichtlich der die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration erhöhenden Aktivität in ZAQC-Expressionszellen (ZAQC-B1), erhalten in BEISPIEL 3 (3-5), analysiert. Zur Kontrolle wurden hOT7T175-Expressionszellen (hOT7T175-16; beschrieben in WO 00/24890) verwendet.

[0306] Die ZAQC-B1-Zellen und hOT7T175-Zellen wurden in DMEM, ergänzt mit 10 % dialysiertem fetalem Rinderserum (hierin nachstehend als dFBS bezeichnet), in Subkultur angelegt und zur Verwendung bereitgestellt. Die ZAQC-B1-Zellen und hOT7T175-Zellen wurden jeweils in dem Medium (10 % dFBS-DMEM) suspendiert, wodurch ihre Konzentration auf 15×10^4 Zellen/ml eingestellt wurde. Unter Verwendung einer Dispensierpipette wurden jeweils 200 µl der Zellsuspension ($3,0 \times 10^4$ Zellen/200 µl/Loch) in jedem Loch inokuliert (Black Plate Clear Bottom, Coster). Nach der Inkubation bei 37 °C unter 5 % CO_2 für einen Tag wurden die Zellen verwendet (hierin nachstehend als die Zellplatte bezeichnet). Einundzwanzig Milliliter von H/HBSS (9,8 g HANKS', 0,35 g Natriumhydrogencarbonat und 4,77 g HEPES; eingestellt auf pH 7,4 mit Natriumhydroxid, gefolgt von Sterilisation durch einen Sterilisationsfilter), 210 µl 250 mM Probenecid und 210 µl fetales Rinderserum (FBS) wurden gemischt. Ebenso wurden 2 Phiole (50 µg) Fluo 3-AM in 42 µl Dimethylsulfoxid und 42 µl 20%ige Pluronsäure gelöst, und die resultierende Lösung wurde zu dem obigen H/HBSS-Probenecid-FBS-Gemisch zugegeben. Nach dem Mischen wurde das Medium von der Zellplatte entfernt, und jeweils 100 µl des Gemisches wurden in jedes Loch der Zellplatte unter Verwendung einer 8-Kanalpipette dispensiert. Die Zellplatte wurde dann bei 37 °C unter 5 % CO_2 für eine Stunde inkubiert (Farbstoffladung). Für die Assaysproben, erhalten in dem oben beschriebenen BEISPIEL (5-3-3), wurden 150 µl H/HBSS, enthaltend 2,5 mM Probenecid und 0,2 % FBS, zu jeder Fraktion zur Auflösung zugegeben. Die Lösung wurde dann zu einer 96-Lochplatte (V-Bottom Plate, Coster) für FLIPR übertragen (hierin nachstehend als Probenplatte bezeichnet). Nach Beendigung der Farbstoffladung wurde die Zellplatte viermal mit dem Waschpuffer oder H/HBSS, ergänzt mit 2,5 mM Probenecid, unter Verwendung eines Plattenwäschers (Molecular Devices) gewaschen. Nach dem Waschen wurden 100 µl des Waschpuffers gesichert. Diese Zellplatte und die Probenplatte wurden auf FLIPR geladen, um den Assay durchzuführen (0,05 ml der Probe wurden von der Probenplatte zu der Zellplatte durch FLIPR übertragen). Die die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration erhöhende Aktivität, die für ZAQC-B1-Zellen spezifisch ist, wurde in Fraktion Nr. 48 bis 68 beobachtet. Daraus wurde herausgefunden, daß die Zielkomponente mit der Funktion zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQC-B1-Zellen, d. h., die ZAQ-aktivierende Komponente, in Fraktion Nr. 48 bis 68 eluiert wurde.

BEISPIEL 6

Produktion von menschentypischem ZAQ-Ligandenpeptid in Säugerzellen (2)

(6-1) Herstellung des Kulturüberstandes

[0307] Wie in BEISPIEL 5 beschrieben, wurde das Expressionsplasmid von menschentypischem ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid (pCANZAQLg2) in COS7-Zellen eingeführt. Das heißt, COS7-Zellen wurden bei einer Population von $3,0 \times 10^6$ Zellen/Schale auf einer 15-cm-Petrischale inokuliert, gefolgt von Inkubation bei 37 °C

unter 5 % CO₂ über Nacht. Nachdem 600 µl Puffer EC (Effectene-Transfektionsreagens, QIAGEN) zu 4 µg des menschentypischen ZAQ-Ligandenpräkursorpeptid-Expressionsplasmids (pCANZAQLg2) (gelöst in 4 µl TE-Puffer) zugegeben wurde, wurden 32 µl Enhancer weiter zugegeben. Nach dem Mischen für eine Sekunde wurde das Gemisch für 3 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Außerdem wurden 120 µl Effectene-Transfektionsreagens zu dem Gemisch zugegeben. Nach dem Mischen für 10 Sekunden wurde das Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Überstand wurde aus den Zellen, die am Tag zuvor inokuliert wurden, entfernt, und die Zellen wurden einmal mit 10 ml DMEM gewaschen, und 30 ml DMEM wurden zugegeben. Zu der Plasmidlösung wurde 1 ml DMEM zugegeben, und nach dem Mischen wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen zugegeben. Nach dem Mischen des gesamten Gemisches wurden die Zellen bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml DMEM gewaschen, und 20 ml DMEM wurden zugegeben. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Kulturüberstand gesammelt, und 20 ml DMEM wurden zu dem System zugegeben. Das Gemisch wurde in einem Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO₂ über Nacht kultiviert, wodurch der Kulturüberstand gewonnen wurde.

(6-2) Reinigung von menschentypischem ZAQ-Ligandenpeptid aus dem Kulturüberstand

[0308] Unter Verwendung der in (6-1) oben beschriebenen Verfahrensweise wurde das Kulturmedium aus 80 Petrischalen von 15 cm gewonnen. Essigsäure wurde zu dem Medium zugegeben, wodurch die Endkonzentration 1 M betrug. Nach 1 Stunde Rühren wurde Aceton in einem zweifachen Volumen der Lösung zugegeben, wodurch Proteine ausfielen. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Dann wurde die Lösung bei 10.000 U/min für 30 Minuten mit einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert (CR26H RR10A-Typ Rotor: Hitachi System Engineering Co., Ltd.), wodurch ein Überstand erhalten wurde. Der erhaltene Überstand wurde auf einen Verdampfer aufgebracht, um Aceton zu entfernen, und durch eine Umkehrphasensäule (Waters C18, 100 g) geführt, die zuvor mit 0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser äquilibriert wurde. Nach dem die Säule mit 1.000 ml 0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertem Wasser und dann mit 1.000 ml 0,1 % Trifluoressigsäure/20 % Acetonitril gewaschen wurde, wurde das Peptid mit 1.000 ml 0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril eluiert. Das erhaltene Eluat wurde auf einen Verdampfer aufgebracht, und mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis).

[0309] Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser) wurde durch die Säule zur TSKgel-ODS80TM-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso, 21,5 min × 30 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 4 ml/min bei 40 °C geführt, wodurch die Säule äquilibriert wurde. Nachdem die erhaltenen lyophilisierten Pulver in Elutionsmittel A gelöst wurden, wurde die Lösung auf die ODS80TM-Säule geladen, wurde das Peptid durch Erhöhen mit einem linearen Gradienten von 60 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser)/40 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) auf 0 Vol.-% Elutionsmittel A/100 Vol.-% Elutionsmittel B bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über 120 Minuten eluiert.

[0310] Das Eluat wurde mit jeweils 8 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Aus den erhaltenen Fraktionen wurden jeweils 50 µl entnommen und mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis). Die lyophilisierten Produkte wurden in 200 µl H/HBSS, ergänzt mit 2,5 mM Probenecid und 0,2 % BSA, gelöst. Unter Verwendung dieser Lösung wurde die Wirkung zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQ-B1-Zellen durch das nachstehend beschriebene Testverfahren (5-3-4) analysiert. Die Ergebnisse offenbarten, daß die Zielkomponente mit der Wirkung zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQ-B1-Zellen, d. h., die ZAQ-aktivierende Komponente, in Fraktion Nr. 32 eluiert wurde.

[0311] Elutionsmittel A (10 mM Ammoniumformiat/10 % Acetonitril) wurde durch die Säule zur TSKgel-CM-2SW-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso, 4,6 mm × 25 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 25 °C geführt, wodurch die Säule äquilibriert wurde. Die oben beschriebene Fraktion Nr. 32 wurde auf die CM-2SW-Säule geladen, und das Peptid wurde mit einem linearen Gradienten durch Erhöhen von 100 Vol.-% Elutionsmittel A (10 mM Ammoniumformiat/10 % Acetonitril)/0 Vol.-% Elutionsmittel B (1000 mM Ammoniumformiat/10 % Acetonitril) auf 0 Vol.-% Elutionsmittel A/100 Vol.-% Elutionsmittel B bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über 60 Minuten eluiert.

[0312] Das Eluat wurde mit jeweils 1 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Aus den erhaltenen Fraktionen wurden 1,5 µl entnommen und mit 200 µl H/HBSS, ergänzt mit 2,5 mM Probenecid und 0,2 % BSA, verdünnt. Diese Lösung wurde verwendet, um die Funktion zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQ-B1-Zellen durch das oben beschriebene Testverfahren (5-3-4) zu analysieren. Die Ergebnisse offenbarten, daß die Zielkomponente mit der Funktion zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQ-B1-Zel-

len, d. h., die ZAQ-aktivierende Komponente, in Fraktion Nr. 56 und 57 eluiert wurde.

[0313] Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser) wurde durch die Säule zur TSKgel-Super-Phenyl-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso, 4,6 mm × 10 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 40 °C geführt, um die Säule zu äquilibrieren. Die obigen Fraktionen Nr. 56 und 57 wurden auf die Super-Phenyl-Säule geladen, und das Peptid wurde durch Erhöhen mit einem linearen Gradienten von 70 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertem Wasser)/30 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) auf 50 Vol.-% Elutionsmittel A/50 Vol.-% Elutionsmittel B über 60 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert.

[0314] Das Eluat wurde mit jeweils 1 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde, und 1,5 µl des Eluats wurden aus den erhaltenen Fraktionen entnommen.

[0315] Das Eluat wurde mit 200 µl H/HBSS, ergänzt mit 2,5 mM Probenecid und 0,2 % BSA, verdünnt. Diese Lösung wurde verwendet, um die Funktion zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQ-B1-Zellen durch das oben beschriebene Testverfahren (5-3-4) zu analysieren. Die Ergebnisse offenbarten, daß die Zielkomponenten mit Funktion zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQ-B1-Zellen, nämlich die ZAQ-aktivierende Komponente, in Fraktion Nr. 54, 55 und 56 eluiert wurde. Die Aktivität stimmte mit dem einzelnen UV-Absorptionspeak überein, was so interpretiert wurde, daß die aktivierende Komponente genug zur Homogenität gereinigt wurde.

[0316] Die gereinigte ZAQ-aktivierende Komponente wurde lyophilisiert, und das lyophilisierte Produkt wurde in Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Ein aliquoter Teil der Lösung wurde für das N-terminale Aminosäuresequenzieren unter Verwendung eines Proteinsequenzers bereitgestellt (Perkin-Elmer, Inc., PE Biosystems Procise 491cLC). Infolgedessen konnten 9 Reste von den Aminosäureresten von dem N-Terminus bis zu dem 10. Aminosäurerest identifiziert werden (Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp (SEQ ID NR. 31; Xaa ist ein nicht-identifizierter Rest)). Die erhaltene Aminosäuresequenz stimmte mit der N-terminalen Aminosäuresequenz des vorhergesehenen menschentypischen reifen ZAQ-Ligandenpeptids überein. Ebenso wurde die Massenspektrometrie für die gereinigte Probe der ZAQ-aktivierenden Komponente unter Verwendung einer Finnigan LCQ LC/MC-Vorrichtung (Thermoquest, San Jose, CA) gemäß dem Elektrosprayionisationsverfahren durchgeführt, wobei das Molekulargewicht 9657,6 betrug. Dieses Ergebnis stimmte mit dem berechneten Wert von 9657,3 für menschentypisches reifes ZAQ-Ligandenpeptid mit 86 Resten überein, bei denen alle 10 Cysteinreste Disulfidbindungen bildeten. Es wurde bestätigt, daß die gereinigte Probe der ZAQ-aktivierenden Komponente reifes menschentypisches ZAQ-Ligandenpeptid mit der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 21 dargestellt, aufwies.

(6-3) Assay für die ZAQ-aktivierende Funktion von gereinigtem menschentypischen ZAQ-Ligandenpeptid

[0317] Die Funktion zum Aktivieren des Rezeptors für ZAQ-B1-Zellen durch das menschentypische reife ZAQ-Ligandenpeptid, gereinigt in (6-2) oben, wurde durch das oben in (5-3-4) beschriebene Testverfahren analysiert. Die Ergebnisse offenbarten, daß das menschentypische reife ZAQ-Ligandenpeptid eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in den ZAQ-exprimierten CHO-Zellen (ZAQ-B1-Zellen) konzentrationsabhängig induzierte. Der EC₅₀-Wert betrug 96 pM, und es wurde entdeckt, daß menschentypisches reifes ZAQ-Ligandenpeptid eine sehr wirksame Agonistenaktivität zeigte. Die Ergebnisse werden in [Fig. 10](#) gezeigt.

BEISPIEL 7

Produktion von menschentypischen ZAQ-Ligandenpeptid in Säugerzellen (3)

(7-1) Herstellung einer CHO-Zelllinie, die das menschentypische ZAQ-Ligandenpeptid stabil exprimieren kann

[0318] Unter Verwendung von Plasmid pHMITG als eine Matrize, beschrieben in BEISPIEL 4, wurde menschentypische ZAQ-Liganden-cDNA durch PCR unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

5' GTCGACCACCATGAGAGGTGCCACGC 3' (SEQ ID Nr.: 32)

5' ACTAGTCGCAGAACTGGTAGGTATGG 3' (SEQ ID Nr.: 33)

und zu pCR-Blunt-II-Vektor (Invitrogen, Inc.) geklont. Die Insert-cDNA wurde aus dem erhaltenen Klon mit einer korrekten Sequenz unter Verwendung von Restriktionsenzymen Sall und SpeI exzidiert, und in pAKKO1.1H-Expressionsvektor eingeführt. Das Plasmid wurde zu CHO/dhFr-Zellen (American Type Culture Collection) durch die in (3-5) oben beschriebene Verfahrensweise unter Verwendung von CellPfect Transfection Kit transfektiert (Amersham Pharmacia Biotech). Der Kulturüberstand wurde aus mehreren Klonen des

transfektierten Stamms gewonnen, und die ZAQ-Ligandenaktivität, die die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration in den ZAQ-B1-Zellen erhöhen kann, wurde durch das in (3-5) beschriebene Testverfahren analysiert. Daher wurde ZAQL-exprimierter CHO-Zellenklon Nr. 4, der den ZAQ-Liganden stark exprimieren kann, gescreent.

(7-2) Herstellung von serumfreiem Kulturüberstand von menschentypischem ZAQ-Ligand ZAOL-1

[0319] In Dulbecco's Modifizierten Eagle-Medium (DMEM) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), ergänzt mit 10 % dialysiertem fetalem Rinderserum (JRH BIOSCIENCES), 1 mM MEM nicht-essentieller Aminosäurelösung, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, wurde ZAQL-1-exprimierter CHO-Zellenklon Nr. 4 kultiviert, um unter Verwendung von 4 Single Trays (Nunc) konfluierend zu werden, und mit Trypsin zur Dispersion behandelt. Die Dispersion wurde zentrifugiert, wodurch der Klon gewonnen wurde. Die Zellen, die einer der obigen Single Trays entsprechen, wurden in 1,5 l des Mediums suspendiert, und in Cell Factories 10 (Nunc) inokuliert, gefolgt von Inkubieren von 4 Cell Factories 10 bei 37 °C für 3 Tage unter 5 % CO_2 . Nach dem der Kulturüberstand entfernt wurde, wurden die Zellen in einer der Cell Factories 10 mit 1 l oben beschriebenen H/HBSS gewaschen. Nachdem H/HBSS entfernt wurde, wurde serumfreies Medium (Dulbecco's Modifiziertes Eagle-Medium, ergänzt mit 1 mM nicht-essentieller Aminosäurelösung, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) in 2 l pro Cell Factory 10 zugegeben, gefolgt von Inkubation für weitere 2 Tage. Der gewonnene Kulturüberstand wurde bei 1.000 U/min für 10 Minuten unter Verwendung einer Hitachi-Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert und durch Gaze filtriert, wodurch ein klarer Überstand erhalten wurde. Essigsäure wurde zu dem Überstand in einer Endkonzentration von 1 M zugegeben.

(7-3) Grobfraktionierung von ZAQL-1-Expressions-CHO-Zellen-Serum-freiem Kulturüberstand durch Wakosil-II 5C 18HG Prep Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0320] PrepC18 (Waters), gepackt mit Octadecyl-fixiertem Kieselgel, quoll in Methanol und wurde in eine Säule aus Glas gepackt (50 mm × 100 mm). Dann wurde das Extrakt, hergestellt in (6-2), auf eine Säule geladen, die mit 1 M Essigsäure äquilibriert wurde. Dann wurde die Säule mit 800 ml von 1 M Essigsäure gewaschen. Dann wurden 1000 ml von 60 % Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure durch die Säule geführt, um die rohe Zielpeptidkomponente zu eluieren. Das erhaltene Eluat wurde unter Verwendung eines Verdampfers konzentriert und mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis).

(7-4) Trennung durch Wakosil-II 5C18HG Prep Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0321] Mittels Führen von 91,7 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser)/8,3 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) durch eine Säule zur Wakosil-II 5C18HG Prep Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Wako Pure Chemical Industries, 20 mm × 250 mm) bei 40 °C bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min wurde die Säule äquilibriert. Das oben in (7-3) erhaltene lyophilisierte Produkt wurde dem Chromatographieverfahren unterzogen. Das heißt, 36 ml von 1 M Essigsäure wurden zugegeben, wodurch das lyophilisierte Produkt gelöst wurde. Nachdem die Lösung zentrifugiert wurde, wurde ein aliquoter Teil von einem Drittel auf die Säule geladen, und die Konzentration an Elutionsmittel B wurde auf 66,7 Vol.-% Elutionsmittel A/33,3 Vol.-% Elutionsmittel B über eine Minute erhöht und dann mit einem linearen Gradienten auf 16,7 Vol.-% Elutionsmittel A/83,3 Vol.-% Elutionsmittel B über die nächsten 120 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min erhöht. Das Eluat wurde mit jeweils 5 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde, und jeweils 3 µl aus den erhaltenen Fraktionen wurden mit 150 µl von 0,2 % BSA gemischt, gefolgt von Lyophilisierung mit einem Gefriertrockner (12EL; VirTis). Das lyophilisierte Produkt wurde mit 150 µl Assaypuffer zugegeben [H/HBSS (9,8 g Nissui HANKS 2 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,35 g Natriumhydrogencarbonat und 4,77 g HEPES; eingestellt auf pH 7,4 mit Natriumhydroxid, gefolgt von Sterilisation durch einen Sterilisationsfilter), ergänzt mit 2,5 mM Probenecid und 0,1 % CHAPS], wodurch das lyophilisierte Produkt gelöst wurde. Unter Verwendung von 50 µl der Lösung wurde die ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierende Funktion durch das in (3-5) oben beschriebene Testverfahren analysiert. Die Ergebnisse offenbarten, daß die Komponente mit der jeweiligen ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierenden Funktion hauptsächlich in den Fraktionen Nr. 73 bis 75 eluiert wurde.

(7-5) Trennung durch TSKgel-CM-2SW-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0322] Mittels Führen von 100 Vol.-% Elutionsmittel A (4 M Ammoniumformiat : destilliertem Wasser : Acetonitril = 1 : 299 : 100) und 0 Vol.-% Elutionsmittel B (4 M Ammoniumformiat : destilliertem Wasser : Acetonitril = 1 : 2 : 1) durch eine Säule zur TSKgel-CM-2SW-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso, 7,8 mm × 300 mm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min bei 25 °C wurde die Säule äquilibriert. In den

Fraktionen, erhalten in (7-4) durch Wakosil-II 5C18HG Prep Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie, wurden die Fraktionen Nr. 73 bis 75 lyophilisiert, und das lyophilisierte Produkt wurde in 4 ml Elutionsmittel A gelöst. Nachdem die Lösung auf die TSKgel-CM-2SW-Ionenaustauschssäule geladen wurde, wurde das Eluat durch Erhöhen mit einem linearen Gradienten auf 25 Vol.-% Elutionsmittel A/75 Vol.-% Elutionsmittel B über 120 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewonnen. Das Eluat wurde mit jeweils 2 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde, und jeweils 10 µl aus den erhaltenen Fraktionen wurden mit 100 µl von 0,2 % BSA gemischt, gefolgt von Lyophilisierung mit einem Gefriertrockner (12EL; VirTis). Das lyophilisierte Produkt wurde mit 100 µl des oben beschriebenen Assaypuffers zum Lösen zugegeben.

[0323] Nachdem die Lösung auf das 100fache mit demselben Puffer verdünnt wurde, wurde die ZAQ-Rezeptor-aktivierende Funktion durch das in (3-5) oben beschriebene Testverfahren analysiert. Die Ergebnisse offenbarten, daß die Komponente mit der Ziel-ZAQ-Rezeptoraktivierenden Funktion hauptsächlich in den Fraktionen Nr. 95 bis 100 eluiert wurde.

(7-6) Reinigung durch TSKgel-ODS-80Ts-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0324] Mittels Führen von 91,7 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser) und 8,3 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) durch die Säule zur TSKgel-ODS-80Ts-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso Co., Ltd., 4,6 mm × 25 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 40 °C wurde die Säule äquilibriert. Die lyophilisierten Produkte der Fraktion Nr. 95 bis 100, erhalten in (7-5) oben, wurden der Chromatographiebehandlung unterzogen. Das heißt, die lyophilisierten Produkte wurden in 4 ml von 1 M Essigsäure gelöst, und die Lösung wurde auf die Säule geladen. Die Konzentration an Elutionsmittel B wurde auf 75 Vol.-% Elutionsmittel A/25 Vol.-% Elutionsmittel B über 1 Minute erhöht und dann mit einem linearen Gradienten auf 25 Vol.-% Elutionsmittel A/75 Vol.-% Elutionsmittel B über die nächsten 60 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min erhöht, wodurch das Eluat gewonnen wurde. Das Eluat wurde mit jeweils 1 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Die ZAQ-Ligandenaktivität wurde gemäß dem in (3-5) beschriebenen Testverfahren analysiert, und es wurde bestätigt, daß die Aktivität in der Fraktion eluiert wurde, die mit dem einzelnen UV-Absorptionspeak übereinstimmt. Daraus wurde geschlossen, daß der ZAQ-Ligand genug zur Homogenität gereinigt wurde.

(7-7) Analyse der Struktur von gereinigtem ZAQ-Ligandenpeptid

[0325] Die folgende Verfahrensweise wurde verwendet, um die Struktur des ZAQ-Ligandenpeptids, das in dem oben beschriebenen (7-6) erhalten wurde, zu bestimmen. Die gereinigte hauptsächlich ZAQ-aktivierende Komponente wurde mit einem Gefriertrockner lyophilisiert (12EL; VirTis). Das lyophilisierte Produkt wurde in Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Ein aliquoter Teil der Lösung wurde für das N-terminale Aminosäuresequenzieren unter Verwendung eines Proteinsequenzers bereitgestellt (Perkin-Elmer, Inc., PE Biosystems Procise 491cLC). Infolgedessen wurde die N-terminale Aminosäuresequenz, die mit der vorhergesehenen menschentypischen reifen ZAQ-Ligandenpeptidform (SEQ ID NR. 21) übereinstimmt, erhalten. Ebenso wurde die Massenspektrometrie gemäß dem Elektronensprühionisationsverfahren unter Verwendung einer Finnigan LCQ LC/MC-Vorrichtung durchgeführt, und das Molekulargewicht betrug 9658,0. Dieser gefundene Wert stimmte gut mit dem berechneten Wert von 9657,3 für menschentypisches reifes ZAQ-Ligandenpeptid (SEQ ID NR. 21) überein. Es wurde daher bestätigt, daß das Zielpolypeptid mit der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist, erhalten wurde.

BEISPIEL 8

Reaktivität von Schlangengift MIT1 und menschentypischen ZAQ-Ligand mit ZAQ und I5E

(8-1) Isolation von Schlangengift MIT1

(8-1-1) Trennung durch Wakosil-II 5C18HG Prep Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0326] Mittels Führen von 91,7 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser)/8,3 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) durch eine Säule zur Wakosil-II 5C18HG Prep Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Wako Pure Chemical Industries, 20 mm × 250 mm) bei 40 °C bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min wurde die Säule äquilibriert. Zu 50 mg des lyophilisierten Produktes vom Gift der Schwarzen Mamba (Sigma) wurden 4 ml von 1 M Essigsäure zugegeben, wodurch das lyophilisierte Produkt gelöst wurde. Die Lösung wurde bei 15.000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert,

und der Überstand wurde der Chromatographie unterzogen. Nachdem die Probe auf die Säule geladen wurde, wurde die Konzentration an Elutionsmittel B auf 91,7 Vol.-% Elutionsmittel A/8,3 Vol.-% Elutionsmittel B über 1 Minute erhöht und dann mit einem linearen Gradienten auf 33,4 Vol.-% Elutionsmittel A und 66,6 Vol.-% Elutionsmittel B über 120 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min erhöht. Das Eluat wurde mit jeweils 10 ml 20 Minuten später fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Aus jeder Fraktion wurde 1 µl entnommen, und nach dem Verdünnen auf das 10.000fache mit dem oben beschriebenen Assaypuffer wurde die ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierende Funktion gemäß dem in (3-5) oben beschriebenen Testverfahren analysiert. Die Ergebnisse offenbaren, daß die Komponente mit der ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierenden Zielfunktion hauptsächlich in den Fraktionen Nr. 21 bis 23 eluiert wurde.

(8-1-2) Trennung durch TSKgel-CM-2SW-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0327] Mittels Führen von 100 Vol.-% Elutionsmittel A (4 M Ammoniumformiat : destilliertem Wasser : Acetonitril = 1 : 299 : 100) und 0 Vol.-% Elutionsmittel B (4 M Ammoniumformiat : destilliertem Wasser : Acetonitril = 1 : 2 : 1) durch eine Säule zur TSKgel-CM-2SW-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso, 4,6 mm × 250 mm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 25 °C wurde die Säule äquilibriert. Von den durch Wakosil-II 5C18HG Prep Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie in (7-1) erhaltenen Fraktionen wurden die Fraktionen Nr. 21 bis 23 lyophilisiert, und die lyophilisierten Produkte wurden in 4 ml Elutionsmittel A gelöst. Nachdem die Lösung auf die TSKgel-CM-2SW-Ionenaustauschsäule geladen wurde, wurde das Eluat durch Erhöhen mit einem linearen Gradienten auf 0 Vol.-% Elutionsmittel A/100 Vol.-% Elutionsmittel B über 90 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewonnen. Das Eluat wurde mit jeweils 1 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Aus jeder Fraktion wurde 1 µl entnommen, und nach dem Verdünnen auf das 10.000fache mit dem oben beschriebenen Assaypuffer wurde die ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierende Funktion gemäß dem in (3-5) oben beschriebenen Testverfahren analysiert. Die Ergebnisse offenbaren, daß die Komponente mit der ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierenden Zielfunktion hauptsächlich in den Fraktionen Nr. 50 bis 51 eluiert wurde.

(8-1-3) Trennung durch Vydac238TP3410-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie

[0328] Mittels Führen von 91,7 Vol.-% Elutionsmittel A (0,1 % Trifluoressigsäure/destilliertes Wasser)/8,3 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/60 % Acetonitril) durch eine Säule zur Vydac238TP3410-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie (Toso, 4,6 mm × 100 mm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 40 °C wurde die Säule äquilibriert. Von den Fraktionen, erhalten in (8-1-2) durch TSKgel-CM-2SW-Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigchromatographie, wurden die Fraktionen Nr. 50 bis 51 direkt auf die Säule geladen, die Konzentration an Elutionsmittel B wurde auf 75 Vol.-% Elutionsmittel A/25 Vol.-% Elutionsmittel B über 1 Minute erhöht und dann mit einem linearen Gradienten auf 41,7 Vol.-% Elutionsmittel A und 58,3 Vol.-% Elutionsmittel B über 75 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min erhöht. Das Eluat wurde mit jeweils 0,5 ml fraktioniert, wobei jeder Fraktion eine Fraktionsnummer verliehen wurde. Aus jeder Fraktion wurde 1 µl entnommen, und nach dem Verdünnen auf das 10.000fache mit dem oben beschriebenen Assaypuffer wurde die ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierende Funktion gemäß dem in (3-5) oben beschriebenen Testverfahren analysiert. Die Ergebnisse offenbaren, daß die Komponente mit der ZAQ-B1-Rezeptor-aktivierenden Zielfunktion hauptsächlich in den Fraktionen Nr. 108 bis 115 eluiert wurde.

(8-1-4) Analyse der Struktur von gereinigtem Schlangengift MIT1

[0329] Die folgende Verfahrensweise wurde verwendet, um die Struktur vom Schlangengift MIT1, erhalten in dem oben beschriebenen (8-1-3), zu bestimmen. Das gereinigte Haupt-MIT1 wurde mit einem Gefriertrockner (12EL; VirTis) lyophilisiert. Das lyophilisierte Produkt wurde in Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Ein aliquoter Teil der Lösung wurde für das N-terminale Aminosäuresequenzieren unter Verwendung eines Proteinsequenzers bereitgestellt (Perkin-Elmer, Inc., PE Biosystems Procise 491cLC). Infolgedessen wurde die N-terminale Aminosäuresequenz, die mit dem vorhergesehenen Schlangengift MIT1 (SEQ ID NR. 34) übereinstimmt, erhalten. Ebenso wurde Massenspektrometrie gemäß dem Elektronensprühionisationsverfahren unter Verwendung der Finnigan LCQ LC/MC-Vorrichtung durchgeführt, und das Molekulargewicht betrug 8506,8. Dieser gefundene Wert stimmte gut mit dem berechneten Wert von 8506,4 für Schlangengift MIT1 überein. Es wurde daher bestätigt, daß das Zielpeptid mit der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 34 dargestellt ist, erhalten wurde.

(8-2) Herstellung der Zelllinie, die I5E stabil exprimieren kann

[0330] Menschentypische I5E-Rezeptor-cDNA (SEQ ID NR. 35) wurde durch bekanntes PCR geklont, und in

pAKKO1.1H-Expressionsvektor eingeführt. Der Expressionsvektor wurde zu CHO/dhFr-Zellen (American Type Culture Collection) durch das in (3-5) oben beschriebenen Verfahren transfektiert. Etwa 20 Kolonien der Transformanten-CHO-Zellen, die 10 bis 14 Tage nach der Initiierung der Inkubation wuchsen, wurden ausgewählt. Die ausgewählten Transformanten wurden in eine 96-Lochplatte mit 3×10^4 Zellen/Loch inokuliert, und die Reaktivität mit MIT1 wurde gemäß dem in (3-5) beschriebenen Testverfahren untersucht. Der I5E-exprimierte CHO-Zellen-Klon Nr. 4 (bezeichnet als I5E-4-Zelle) mit einer guten Reaktivität wurden gescreent. Die Aminosäuresequenz, die durch die Basensequenz kodiert wird, die durch SEQ ID NR. 35 dargestellt ist, wird durch SEQ ID NR. 36 gezeigt.

(8-3) Assay für die den ZAQ-Rezeptor und den I5E-Rezeptor aktivierende Funktion von menschentypischen ZAQ-Ligandenpeptid und MIT1

[0331] Das menschentypische ZAQ-Ligandenpeptid, gereinigt durch das in BEISPIEL 7 beschriebene Verfahren, und das Schlangengift MIT1, gereinigt durch das in (8-1) oben beschriebene Verfahren, wurden hinsichtlich der ZAQ-Rezeptor-aktivierenden Funktion und der I5E-Rezeptor-aktivierenden Funktion durch die in (3-5) beschriebenen Testverfahren analysiert. Die Ergebnisse werden in [Fig. 12](#) und [Fig. 13](#) gezeigt.

[0332] Infolgedessen induzierten das menschentypische ZAQ-Ligandenpeptid und Schlangengift MIT1 konzentrationsabhängig eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Die ZAQ-Rezeptor-aktivierende Funktion von Schlangengift MIT1 war zehnmal wirksamer als die von menschentypischem ZAQ-Ligandenpeptid. Ebenso war die menschentypische I5E-Rezeptor-aktivierende Funktion von Schlangengift MIT1 etwa 100 Mal wirksamer als die von menschentypischem ZAQ-Ligandenpeptid.

BEISPIEL 9

Klonen der cDNA die das Rattengehirn-abgeleitete neue G-Protein-gekoppelten Rezeptorprotein (rZAQ1) kodiert, und Bestimmung der Basensequenz

[0333] Unter Verwendung der gesamten Rattengehirn-cDNA-Bibliothek (CLONTECH Laboratories, Inc.) als eine Matrize und zwei Primern (SEQ ID NR. 37 und SEQ ID NR. 38) wurde PCR durchgeführt. Die Reaktionslösung in der obigen Reaktion bestand aus der obigen cDNA, verwendet als eine 1/10 Volumen Matrize, 1/50 Volumen von Advantage 2 cDNA Polymerase Mix (CLONTECH Laboratories, Inc.), jeweils 0,2 μ M der jeweiligen Primer, 200 μ M dNTPs und einen Puffer, zugeführt mit dem Enzym, um das Endvolumen von 25 μ l zu erreichen. Bei der PCR wurde (1) nach dem Umsetzen bei 94 °C für 2 Minuten (2) eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 20 Sekunden, gefolgt von 72 °C für 1 Minute und 30 Sekunden dreimal wiederholt, wurde (3) eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 20 Sekunden und bei 68 °C für 1 Minute und 30 Sekunden dreimal wiederholt, wurde (4) eine Zyklusgruppe bei 94 °C für 20 Sekunden, bei 62 °C für 20 Sekunden und bei 68 °C für 1 Minute 36 Mal wiederholt, und schließlich wurde eine Extensionsreaktion bei 68 °C für 7 Minuten durchgeführt. Nach der Beendigung der PCR wurde das Reaktionsprodukt zu dem Plasmidvektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Inc.) gemäß den Instruktionen, die dem TA-Klonierungskit beiliegen (Invitrogen, Inc.), subkloniert, der dann in Escherichia coli DH5 α eingeführt wurde, und die Klone, die die cDNA trugen, wurden in LB-Agarmedium, das Ampicillin enthielt, selektiert. Die Sequenz von jedem Klon wurde analysiert, wodurch cDNA erhalten wurde, die das neue G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein (SEQ ID NR. 39) kodiert. In der Aminosäuresequenz, abgeleitet von der Basensequenz dieser cDNA, wurde eine Homologie von 83,7 % zu der Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 1 dargestellt ist, beobachtet. Das neue G-Proteingekoppelte Rezeptorprotein, enthaltend diese Aminosäuresequenz, wurde rZAQ1 genannt. Die Transformante (E. coli), die die DNA trägt, die die Basensequenz enthält, welche durch SEQ ID NR. 39 dargestellt ist, wurde Escherichia coli DH5 α /pCR2.1-rZAQ1 genannt.

BEISPIEL 10

Klonen der cDNA, die Rattengehirn-abgeleitetes neues G-Protein-gekoppeltes Rezeptorprotein (rZAQ2) kodiert, und Bestimmung der Basensequenz

[0334] Der Klon, der rZAQ2 kodiert, wurde durch das Gen-Trapper-Verfahren erhalten. Das heißt, Sonden (SEQ ID NR. 41 und SEQ ID NR. 42) wurden biotiniert, und zur einsträngigen Gesamt-Rattenhirn-cDNA-Bibliothek (GIBCO-BRL) hybridisiert. Das erhaltene einsträngige Gen wurde zum Doppelstrang wiederhergestellt. Dieses Gen wurde zu Escherichia coli DH10B elektroporiert, und Transformanten wurden unter Verwendung von Ampicillinresistenz als ein Indikator erhalten. Gemäß dem Kolonie-PCR unter Verwendung einer Sonde (SEQ ID NR. 41) und einem Primer (SEQ ID NR. 45) wurde ein Klon, der die Zielbasensequenz kodiert, selektiert. Die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR. 47), abgeleitet von der Basensequenz (SEQ ID NR. 46) von ORF

(offenes Leseraster), vorhergesehen aus der Basensequenz dieses Klons, wies eine Homologie von 80,6 % zu rZAQ1 auf. Das neue G-Proteingekoppelte Rezeptorprotein, enthaltend diese Aminosäuresequenz, wurde rZAQ2 genannt. Die Transformante (*E. coli*), die durch das Gen-Trapper-V erfahren erhalten wurde, wurde *Escherichia coli* DH10B/pCMV-rZAQ2 genannt.

BEISPIEL 11

Kontraktionstest unter Verwendung eines Probenpräparats des Krummdarms, extrahiert aus dem Meer-schweinchen

[0335] Meerschweinchen (Std: Hartley, 7–8 Wochen alt, männlich, wiegen etwa 450 g) verbluteten mittels Durchschneiden der Halsschlagader mit Scheren, und der Bauch wurde geöffnet, um den Krummdarm zu entfernen. Der Krummdarm wurde in eine Glaspetrischale gelegt, mit Tyrode-Lösung versetzt (Zusammensetzung: 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 1,1 mM NaH_2PO_4 , 11,9 mM NaHCO_3 , 5,6 mM Glukose), und Fettgewebe und Bindegewebe, die am Krummdarm hafteten, wurden mit chirurgischen Scheren und Pinzetten beschnitten. Der Krummdarm wurde dann in Stücke mit etwa 1,5 cm Länge geschnitten und als ein Probenpräparat bereitgestellt. Dieses Präparat wurde in einem Organbad (20 ml) suspendiert, das mit der Tyrode-Lösung, erwärmt auf 37 °C, gefüllt war, und eine Last von 0,5 g wurde zur Stabilisierung über 30 Minuten oder mehr aufgebracht.

[0336] Eine Kontraktionsreaktion des Krummdarmpräparats wurde unter Verwendung von AMPLIFIER CASE 7747, hergestellt von NEC San-Ei Co., Ltd., gemessen.

[0337] Nachdem 1 μM Acetylcholin zugegeben wurde, um die maximale Kontraktionsreaktion zu bestimmen, wurde das menschentypische ZAQ-Ligandenpeptid (ZAQL-1), erhalten gemäß der Verfahrensweise von REFERENZBEISPIEL 1, oder Schlangengift MIT1, erhalten in (8-1-3) oben, kumulativ verabreicht, um die Kontraktionsreaktion zu analysieren. Zur Verdünnung von ZAQL-1 und MIT1 wurde physiologische Kochsalzlösung, die 0,05 % Rinderserumalbumin enthält, verwendet.

[0338] Die Ergebnisse werden in [Fig. 14](#) gezeigt. Die Kontraktionsreaktion, induziert durch ZAQL-1 und MIT1, wird in Prozent dargestellt, wenn die Kontraktionsreaktion, induziert durch 1 μM Acetylcholin, 100 % ausmachte.

[0339] Im Ergebnis induzierten ZAQL-1 und MIT1 eine wirksame dosisabhängige Kontraktionsreaktion. Die EC_{50} -Werte von ZAQL-1 und MIT1, berechnet aus der Dosis-Wirkungs-Kurve, betrugen 1,79 nM bzw. 0,40 nM.

BEISPIEL 12

Bindingsassay unter Verwendung der ZAQ- und I5E-exprimierten CHO-Zellmembran-Fraktionen

(12-1) Herstellung von ^{125}I -MIT1

[0340] Benzol, enthaltend in [^{125}I]-Bolton-Hunter Reagent (monoiodiert, 37 MBq, NEN Co., NEX 120), wurde durch Stickstoffgas entfernt, 20 μl DMSO wurden zugegeben, und die eingedampften Stoffe wurden durch Pipettieren gelöst. Zu der Lösung wurden 80 μl der Lösung, enthaltend 4 nmol MIT1, verdünnt mit Boratpuffer (Zusammensetzung: 100 mM H_3BO_3 , pH 8,5), zugegeben, und direkt danach wurden sie gemischt, gefolgt von Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Danach wurden 200 μl 10 % Acetonitril-0,1 % Trifluoressigsäure zugegeben und das Gemisch wurde als eine Probe für die HPLC-Fraktionierung bereitgestellt. Die Probe wurde auf eine Säule (Toso, Co., Ltd., 0,46 cm \times 10 cm) zur TSKgel-Super-ODS-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie geladen, die mittels Führen von 100 Vol.-% Elutionsmittel A (10 % Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure)/0 Vol.-% Elutionsmittel B (0,1 % Trifluoressigsäure/40 % Acetonitril) bei Raumtemperatur bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min äquilibriert wurde. Danach wurde die Konzentration an Elutionsmittel B auf 60 Vol.-% Elutionsmittel A/40 Vol.-% Elutionsmittel B über 1 Minute erhöht und dann mit einem linearen Gradienten auf 40 Vol.-% Elutionsmittel A/60 Vol.-% Elutionsmittel B über 60 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min erhöht. Das eluierte [^{125}I]-Bolton-Hunter Reagent-eingeführte MIT1 wurde manuell fraktioniert und mit einem Puffer verdünnt (Zusammensetzung: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2 % BSA, 0,1 % CHAPS, 0,03 % NaN_3 , pH 7,4). Die Verdünnung wurde dispensiert und bei –80 °C gelagert.

(12-2) Herstellung von Zellmembranfraktionen

[0341] Zellmembranfraktionen wurden gemäß dem Verfahren, das in Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279, 675–685, 1996 beschrieben ist, hergestellt. In Dulbecco's Modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), ergänzt mit 10 % dialysiertem fetalem Rinderserum (JRH BIOSCIENCES), 1 mM MEM nichtessentieller Aminosäurelösung, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, wurden die Rezeptor-exprimierten CHO-Zellen, nämlich ZAQC-B1-Zellen oder I5E-4-Zellen, in Single Trays (Nunc) kultiviert. Wenn die Zellen eine Zelldichte von 80–90 % erreichten, wurde der Kulturüberstand verworfen, und 30 ml PBS (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.), enthaltend 1 g/l EDTA, wurden zu der Schale („Tray“) zugegeben, um die Zellen zu waschen. Dann wurde der Kulturüberstand verworfen, und 30 ml des oben beschriebenen PBS-EDTA wurden zugegeben, wobei er bei Raumtemperatur stehengelassen wurde. Die Schale wurde geschüttelt, um die Zellen abzulösen, und die Zellsuspension wurde gewonnen. Erneut wurden 10 ml des oben beschriebenen PBS-EDTA zu der Schale zum Waschen zugegeben und die Zellen, die auf der Schale verblieben, wurden abgelöst und mit den Zellen in der zuvor gewonnenen Zellsuspension gemischt. Die gemischte Zellsuspension wurde bei 1.000 U/min für 5 Minuten unter Verwendung einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge (TOMY RL601) zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen, und die ausgefällten Zellen wurden bei –80 °C gelagert. Nachdem 4 ml eines Homogenatpuffers (Zusammensetzung: 10 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 10 µg/ml Pepstatin-A, 20 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml E-64) zu den Niederschlägen zugegeben wurden (entsprechend einer Single Tray), wurden die Niederschläge durch Pipettieren suspendiert und die Suspension wurde unter Bedingungen bei Bewertungspunkt 4 für 20 Sekunden unter Verwendung von Polytron (Schaufeltyp PTA7) homogenisiert, was dreimal wiederholt wurde. Dann wurde das Homogenat bei 2.500 U/min für 10 Minuten unter Verwendung von Nr. 26 Rotor von Hitachi Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge CR26H zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde bei 35.000 U/min für eine Stunde unter Verwendung von SRP70AT Rotor der Ultrazentrifuge (Hitachi Koki, SCP70H) zentrifugiert. Zu den erhaltenen Niederschlägen wurden 5 ml eines Bindungsassaypuffers zugegeben (Zusammensetzung: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 10 µg/ml Pepstatin-A, 40 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml E-64, 0,03 % NaN₃, pH 7,4), um sie zu suspendieren. Die Suspension wurde durch Cell Strainer (FALCON 2350) filtriert, wodurch die ZAQC-B1-Zellmembranfraktion (d. h. die ZAQC-Membranfraktion) oder I5E-4-Zellmembranfraktion (d. h. die I5E-Membranfraktion) erhalten wurde. Jede der Membranfraktionen wurde hinsichtlich ihres Proteinniveaus unter Verwendung von Coomassie-Proteinassayreagens (PIERCE) analysiert, und jeweils 100 µl wurden dispensiert und bei –80 °C gelagert.

(12-3) Bindungsassay

[0342] Die ZAQC-Membranfraktion und die I5E-Membranfraktion wurden mit 0,1 % BSA-enthaltendem Bindungsassaypuffer, der in (12-2) oben beschrieben wurde, auf 10 µg/ml bzw. 20 µg/l verdünnt, und jeweils 200 µl wurden in Röhrchen dispensiert (FALCON 2053). Zu jeder Verdünnung der Membranfraktionen wurden 2 µl einer Testverbindung bzw. 2 µl 10 nM ¹²⁵I-MIT1 zugegeben, gefolgt von Inkubation bei 25 °C für eine Stunde. Als die Testverbindung wurde menschentypisches ZAQC-Ligandenpeptid (ZAQL-1), erhalten gemäß der Verfahrensweise von REFERENZBEISPIEL 1, oder Schlangengift MIT1 (nicht-markiertes MIT1), erhalten in (8-1-3) oben, verwendet.

[0343] Dann wurden 1,5 ml eines filtrierenden Puffers (Zusammensetzung: 20 mM Tris, EDTA, 0,1 % BSA, 0,05 % CHAPS, 0,03 % NaN₃, pH 7,4) zur der Reaktionslösung zugegeben. Das Gemisch wurde direkt durch ein Glasfaserfilterpapier GF/F (Whatman) filtriert, der zuvor mit einem Puffer behandelt wurde (Zusammensetzung: 20 mM Tris, 0,3 % Polyethylenimin, pH 7,4), 1,5 ml des filtrierenden Puffers wurden erneut zu den Reaktionsröhrchen zugegeben, und das Gemisch wurde ebenso filtriert. Die Radioaktivität auf dem Glasfaserfilterpapier wurde unter Verwendung eines γ-Zählers gemessen (COBRA, Packard), wodurch die Bindungsmenge von ¹²⁵I-MIT1 bestimmt wurde. Die ¹²⁵I-MIT1-Bindungsmenge, wenn nicht-markiertes MIT1 (Endkonzentration von 1 µM) als eine Testverbindung verwendet wurde, wurde als nicht-spezifische Bindungsmenge (NSB) verwendet, die ¹²⁵I-MIT1-Bindungsmenge, wenn keine Testverbindung verwendet wurde, wurde als Gesamtbindungs-menge (TB) verwendet, und die maximale Bindungsmenge (TB – NSB) wurde berechnet. Ebenso wurde in bezug auf die Bindungsmenge (B), die erhalten wurde, wenn eine Testverbindung zugegeben wurde, die Bindungsmenge in Gegenwart einer Testverbindung durch den Prozentsatz einer spezifischen Bindungsmenge (B – NSB), berechnet auf die gesamte spezifische Bindung $\{\%SPB = (B - NSB)/(TB - NSB) \times 100\}$, ausgedrückt.

[0344] Die Ergebnisse, die unter Verwendung der ZAQC-Membranfraktion und der I5E-Membranfraktion erhalten wurden, werden in [Fig. 15](#) bzw. [Fig. 16](#) gezeigt.

[0345] Die IC_{50} -Werte des nicht-markierten MIT1, berechnet durch dieses Bindungsassaysystem, betrugen 38 pM (ZAQ-Membranfraktion) und 32 pM (I5E-Membranfraktion). Die IC_{50} -Werte von ZAQL-1 betrugen 35 pM (ZAQ-Membranfraktion) und 93 pM (I5E-Membranfraktion).

REFERENZBEISPIEL 1

Herstellung von menschentypischem ZAQ-Ligand (SEQ ID NR. 21) in Escherichia coli

(REFERENZBEISPIEL 1-1)

Konstruktion von menschentypischem ZAQ-Ligand-exprimierenden Plasmid in Escherichia coli

(a) Unter Verwendung der folgenden sechs DNA-Fragmente #1 bis #6 wurde die Struktur-DNA des ZAQ-Liganden hergestellt.

#1:

5'-TATGGCGGTGATTACCGGTGCGTGC GAACGTGA^{TT}GTGCAGTGCGGTGCG
GGTACCTGCTGCGCGATTAGCCTGTGGCTGCGTGGTCTG-3' (SEQ ID Nr.: 52)

#2:

5'-CGTATGTGCACCCCGCTGGGTGCTGAAGGTGAAGAATGCCATCCGGGTA
GCCATAAAGTGCCGTTCTTCCGTAAACGTAAACATCATACTG-3' (SEQ ID Nr.: 53)

#3:

5'-CCCGTGCCTGCCGAACCTGCTGTGCAGCCGTTTCCCGGATGGTCTGTTAT
CGTTGCAGCATGGATCTGAAAAACATTAACCTTTAGG-3' (SEQ ID Nr.: 54)

#4:

5'-CACATACGCAGACCACGCAGCCACAGGCTAATCGCGCAGCAGGTACC
CGCACCCGCACTGCACATCACGTTCCGACGCACCGGTAATCACCGCCA-3'
(SEQ ID Nr.: 55)

#5:

5'-AGGCACGGGCAGGTATGATGTTTACGTTTACGGAAGAACGGCACTTTAT
GGCTACCCGGATGGCATTCTTCACCTTACGACCCAGCGGGGTG-3' (SEQ
ID Nr.: 56)

#6:

5'-GATCCCTAAAAGTTAATGTTTTTCAGATCCATGCTGCAACGATAACGACC
ATCCGGGAAACGGCTGCACAGCAGGTTCCGGC-3' (SEQ ID Nr.: 57)

(b) Phosphorylierung von DNA-Oligomer

[0346] Jeder der vier DNA-Oligomere (#2 bis #5), außer #1 und #6, die das 5'-Ende bilden sollten, wurde bei 37 °C für eine Stunde in 25 µl Reaktionslösung zur Phosphorylierung umgesetzt [10 µg DNA-Oligomer, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM Sperimidin, 10 mM Dithiothreitol (hierin nachstehend als DTT abgekürzt), 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin (hierin nachstehend als BSA abgekürzt), 1 mM ATP, 10 Einheiten von T4-Polynukleotidkinase (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.)], um das 5'-Ende von jedem Oligomer zu phosphorylieren. Nach der Phenolbehandlung, gefolgt von der Zugabe vom 2fachen Volumen an Ethanol wurde das Gemisch auf -70 °C abgekühlt und zentrifugiert, wodurch DNA ausfiel.

(c) Ligation des DNA-Fragments

[0347] Das oben in (b) erhaltene DNA-Fragment wurde mit #1 und #6 oben kombiniert, um das Volumen von 120 µl zu erhalten. Das Gemisch wurde zum Annealing bei 90 °C für 10 Minuten gehalten und allmählich auf Raumtemperatur abgekühlt. Unter Verwendung von TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) wurde die Ligation durchgeführt. Nachdem 30 µl der Lösung II, zugeführt mit dem Kit, zu 30 µl der Annea-

ling-Lösung zugegeben wurden, um es gründlich zu mischen, wurden 60 µl der Lösung I, zugeführt mit dem Kit, zu dem Gemisch zugegeben, und das Gemisch wurde bei 37 °C für eine Stunde zur Ligation umgesetzt, gefolgt von Phenolbehandlung. Die wässrige Phase wurde gewonnen und 2 Volumen an Ethanol wurden dazugegeben. Das Gemisch wurde auf -70 °C abgekühlt und dann zentrifugiert, wodurch die DNA ausfiel. Das so erhaltene DNA-Fragment wurde unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.), und dann für den folgenden Schritt (d) bereitgestellt.

(d) Konstruktion des ZAQ-Ligandenexpressionsvektors

[0348] Nachdem pTCII (beschrieben in der japanischen offengelegten Patentanmeldung Nr. 2000-178297) mit NdeI und BamHI (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) bei 37 °C für 2 Stunden digeriert wurde, wurde das DNA-Fragment von 4,3 kb, das durch 1 % Agarosegelelektrophorese getrennt wurde, unter Verwendung von QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) extrahiert und in 25 µl TE-Puffer gelöst. Die NdeI- und BamHI-Fractionen von diesem pTCII wurden mit dem Strukturgen (SEQ ID NR. 58) vom oben hergestellten ZAQ-Liganden unter Verwendung von TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) ligiert, wodurch der Expressionsvektor hergestellt wurde. Unter Verwendung von 10 µl der Reaktionslösung wurden E. coli JM109 kompetente Zellen (TOYOBO) transformiert und auf LB-Agarmedium, enthaltend 10 µg/ml Tetracyclin, inokuliert, gefolgt von Inkubation bei 37 °C über Nacht. Die gebildete Tetracyclin-resistente Kolonie wurde ausgewählt. Die Transformante wurde in LB-Medium über Nacht inkubiert, und Plasmid pTCh1ZAQ wurde unter Verwendung von QIAprep8 Miniprep Kit (QIAGEN) hergestellt. Die Basensequenz von dieser ZAQ-Liganden-DNA wurde unter Verwendung von Model 377 DNA Sequenzer von Applied Biosystems, Inc. identifiziert. Plasmid pTCh1ZAQ wurde zu Escherichia coli MM294 (DE3) transfektiert, um den ZAQ-Ligandenexpressionstamm, Escherichia coli MM294 (DE3)/pTCh1ZAQ, zu erhalten.

(REFERENZBEISPIEL 1-2)

Herstellung des ZAQ-Liganden

[0349] In einem 2-Liter-Kolben wurde oben beschriebenes Escherichia coli MM294 (DE3)/pTCh1ZAQ unter Schütteln in 1 Liter des LB-Mediums (1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % Natriumchlorid), ergänzt mit 5,0 mg/l Tetracyclin, bei 37 °C für 8 Stunden kultiviert. Das erhaltene kultivierte Medium wurde zu einem Fermentationsbehälter mit 50 l Volumen übertragen, der mit 19 l Hauptfermentationsmedium beschickt ist (1,68 % Natriummonohydrogenphosphat, 0,3 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,1 % Ammoniumchlorid, 0,05 % Natriumchlorid, 0,05 % Magnesiumsulfat, 0,02 % Antischaummittel, 0,00025 % Eisen(II)-sulfat, 0,0005 % Thiaminhydrochlorid, 1,5 % Glukose, 1,5 % Hy-Case Amino), und das Rühren an der Luft wurde bei 30 °C initiiert. Wenn die Trübheit des kultivierten Mediums 500 Klett erreichte, wurde Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in einer Endkonzentration von 12 mg/l zugegeben, und die Inkubation wurde für weitere 4 Stunden fortgesetzt. Nach der Beendigung der Kultur wurde das Kulturmedium zentrifugiert, wodurch etwa 200 g nasse Zellen erhalten wurden. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

[0350] Diese Transformante Escherichia coli MM294 (DE3)/pTCh1ZAQ ist im Institute for Fermentation, Osaka (IFO) unter der Zugangsnummer IFO 16527 hinterlegt.

(REFERENZBEISPIEL 1-3)

Aktivierung des ZAQ-Liganden

[0351] Mittels Zugeben von 400 ml eines Gemisches aus 200 mM Tris/HCl und 7 M Guanidinhydrochlorid (pH 8,0) zu 200 g der in REFERENZBEISPIEL (1-2) erhaltenen Zellen wurden die Zellen darin gelöst, und die Lösung wurde zentrifugiert (10.000 U/min, 1 Stunde). Zu dem Überstand wurden 10 l eines Gemisches aus 0,4 M Arginin, 50 mM Tris/HCl, 0,2 mM GSSG und 1 mM GSH (pH 8,0) zugegeben, und das Gemisch wurde bei 4 °C über Nacht zur Aktivierung gehalten.

(REFERENZBEISPIEL 1-4)

Reinigung des ZAQ-Liganden

[0352] Die regenerierende Lösung nach der Aktivierung in REFERENZBEISPIEL (1-3) wurde auf pH 6,0 eingestellt und auf einer SP-Sepharose-Säule (11,3 cm × 15 cm), äquilibriert mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), adsorbiert. Die Säule wurde mit 600 mM NaCl/50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) eluiert, und die Fraktionen, ent-

haltend den ZAQ-Liganden, wurden zusammengefaßt. Die Fraktion wurde durch CM-5PW (21,5 mm × 150 mm Länge), äquilibriert mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), geführt und darauf adsorbiert. Nach dem Waschen wurde die Elution mit einem schrittweisen Gradienten (60 Minuten) von 0 bis 100 % B (B = 50 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl, pH 6,05) durchgeführt, wodurch die ZAQ-Ligandenfraktion (Elutionszeit: ca. 40 Minuten) erhalten wurde. Diese Fraktion wurde weiter durch C4P-50 (21,5 mm Innendurchmesser × 300 mm Länge, Showa Denko), äquilibriert mit 0,1 % Trifluoressigsäure, geführt und darauf adsorbiert. Nach dem Waschen wurde die Elution mit einem schrittweisen Gradienten (60 Minuten) von 25 bis 50 % B (B = 80 % Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure) durchgeführt. Die ZAQ-Ligandenfraktionen (Elutionszeit: ca. 40 Minuten) wurden zusammengefaßt und lyophilisiert, wodurch 80 mg des lyophilisierten ZAQ-Ligandenpulvers erhalten wurden.

(REFERENZBEISPIEL 1-5)

Charakterisierung des ZAQ-Liganden

(a) Analyse unter Verwendung von SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

[0353] Der ZAQ-Ligand, erhalten in dem REFERENZBEISPIEL (1-4), wurde in Probenpuffer [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)], ergänzt mit 100 mM DTT, suspendiert. Die Suspension wurde bei 95 °C für 1 Minute erhitzt, gefolgt von Elektrophorese auf Multigel 15/25 (Daiichi Kagaku Yakuhin). Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Brilliantblau eingefärbt, und eine einzelne Proteinbande wurde an derselben Stelle als die des COS7-Zellenabgeleiteten rekombinanten ZAQ-Ligandenpräparats, erhalten in BEISPIEL 5, nachgewiesen. Basierend darauf wurde offenbart, daß das E. coli-abgeleitete rekombinante ZAQ-Ligandenpräparat, erhalten in REFERENZBEISPIEL (1-4), eine sehr hohe Reinheit aufwies und dasselbe Molekulargewicht wie das des rekombinanten ZAQ-Liganden, hergestellt aus COS7-Zellen, aufwies.

(b) Analyse der Aminosäurezusammensetzung

[0354] Die Aminosäurezusammensetzung wurde unter Verwendung eines Aminosäureanalysators bestimmt (Hitachi L-8500A Amino Acid Analyzer). Die Ergebnisse offenbaren, daß die Aminosäurezusammensetzung mit der Aminosäurezusammensetzung übereinstimmte, die aus der Basensequenz der DNA von ZAQ-Ligand abgeleitet wurde (Peptid, umfassend die Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist) (Tabelle 2).

TABELLE 2

Aminosäure	Anzahl an Resten pro mol	Anzahl an Resten pro mol, vorhergesehen aus der Basensequenz von ZAQ-Ligand
Asx	5,7	6
Thr ¹⁾	3,3	4
Ser ¹⁾	3,4	4
Glx	5,0	5
Pro	5,6	6
Gly	7,7	8
Ala	3,9	4
Cys ²⁾	N.D.	10
Val	2,9	3
Met	1,9	2
Ile	2,6	3
Leu	8	8
Tyr	1,0	1
Phe	3,7	4
His	3,8	4
Lys	3,8	4
Arg	8,5	9
Trp	0,9	1

Säurehydrolyse (Mittelwert in Hydrolyse mit 6N HCl-1 % Phenol bei 110 °C für 24 und 48 Stunden)

¹⁾Wert, extrapoliert bei 0 Stunden

²⁾nicht nachgewiesen

(c) Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz

[0355] Die N-terminale Aminosäuresequenz wurde unter Verwendung eines Gasphasen-Proteinsequenzers bestimmt (PE Applied Biosystems, Model 492). Im Ergebnis stimmte die Aminosäuresequenz mit der N-terminalen Aminosäuresequenz des ZAQ-Liganden überein, der von der Basensequenz der erhaltenen ZAQ-Liganden-DNA abgeleitet wurde (Tabelle 3).

TABELLE 3

Rest Nr.	nachgewiesene PTH-Aminosäure ¹⁾ (pmol)	Aminosäure, vorhergesehen aus der Basensequenz von ZAQ-Ligand
1	Ala (99)	Ala
2	Val (100)	Val
3	Ile (91)	Ile
4	Thr (57)	Thr
5	Gly (70)	Gly
6	Ala (89)	Ala
7	N.D.	Cys
8	Glu (60)	Glu
9	Arg (49)	Arg
10	Asp (54)	Asp
11	Val (79)	Val
12	Gln (67)	Gln
13	N.D.	Cys
14	Gly (54)	Gly
15	Ala (65)	Ala
16	Gly (47)	Gly
17	Thr (32)	Thr
18	N.D.	Cys
19	N.D.	Cys
20	Ala (36)	Ala

¹⁾Analyse wurde unter Verwendung von 150 pmol Phenylthiohydantoin durchgeführt. N.D. nicht nachgewiesen

(d) Analyse der C-terminalen Aminosäure

[0356] Die C-terminale Aminosäuresequenz wurde unter Verwendung einer Aminosäure bestimmt (Hitachi L-8500A Amino Acid Analyzer). Der erhaltene ZAQ-Ligand stimmte mit der C-terminalen Aminosäuresequenz überein, die aus der Basensequenz von DNA abgeleitet ist (Tabelle 4).

TABELLE 4

C-terminale Aminosäure	Rückgewinnungsrate (%)
Phe	49,8

Gasphasenhydrazinolyseverfahren (100 °C, 3,5 Stunden)

(e) Massenspektrometrie

[0357] Massenspektrometrie wurde unter Verwendung von LCQ-Ion-Trap-Massenspektrometer (hergestellt von ThermoQuest, Inc.), ausgestattet mit Nano-ESI-Ionenquellen, durchgeführt. Im Ergebnis wurde das Molekulargewicht von $9657,55 \pm 0,89$ gefunden und stimmte gut mit dem berechneten Molekulargewicht (9657,3) des ZAQ-Liganden, der durch SEQ ID NR. 21 dargestellt ist, überein, worin 10 Cys-Reste, die in SEQ ID NR. 21 enthalten sind, 5 Paare von Disulfidbindungen bildeten.

(REFERENZBEISPIEL 1-6)

Assay für ZAQ-Liganden (Assay für die die intrazelluläre Ca-Ionenkonzentration erhöhende Aktivität unter Verwendung von FLIPR)

[0358] Das gereinigte rekombinante ZAQ-Ligandenpräparat, abgeleitet von Escherichia coli, das in REFERENZBEISPIEL (1-4) hergestellt wurde, wurde hinsichtlich der Aktivität (Assay für die die intrazelluläre Ca-Ionenkonzentration erhöhende Aktivität unter Verwendung von FLIPR) durch das Verfahren in BEISPIEL 5 analysiert. Im Ergebnis wies es eine Aktivität auf, äquivalent zu der des COS7-abgeleiteten rekombinanten Präparats (gereinigter ZAQ-Ligand), erhalten in BEISPIEL 5.

INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

[0359] Das Peptid der Erfindung, die DNA, die das Peptid der Erfindung kodiert (hierin nachstehend manchmal nur als die erfindungsgemäße DNA bezeichnet), und der Antikörper zu dem Peptid der Erfindung (hierin nachstehend manchmal nur als der erfindungsgemäße Antikörper bezeichnet) sind zum Implementieren (1) von Mitteln zur Vorbeugung/Behandlung von verschiedenen Krankheiten, die mit dem Peptid der Erfindung verbunden sind; (2) Screenen einer Verbindung oder seines Salzes, die die Bindungseigenschaft zwischen dem Peptid der Erfindung und dem Protein der Erfindung verändert; (3) Quantifikation des Peptids der Erfindung oder seines Salzes; (4) ein Mittel zur Gendiagnose; (5) Arzneimittel, die die Antisense-DNA umfassen; (6) Arzneimittel, die den erfindungsgemäßen Antikörper umfassen; (7) Präparieren von nicht-menschlichen Tieren, die die erfindungsgemäße DNA tragen; (8) Arzneimitteldesign, basierend auf dem Vergleich zwischen Liganden und Rezeptoren, die strukturell analog sind, usw. nützlich

[SEQUENZPROTOKOLL]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Physiological Active Peptide and Its Use

<130> P2001-174PCT

<150> JP 2000-217442

<151> 2000-07-18

<150> JP 2001-26779

<151> 2001-02-02

<160> 58

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Mensch

<400> 1

```

Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser
      5              10              15
Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser
      20              25              30
Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
      35              40              45
Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
      50              55              60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
      65              70              75              80
Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
      85              90              95
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
      100             105             110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu

```

115	120	125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg		
130	135	140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile		
145	150	155
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys		160
165	170	175
Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu		
180	185	190
Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile		
195	200	205
Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp		
210	215	220
Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu		
225	230	235
Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser		
245	250	255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile		
260	265	270
Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys		
275	280	285
Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr		
290	295	300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr		
305	310	315
Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met		
325	330	335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr		
340	345	350
Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly		
355	360	365
Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr		
370	375	380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys		
385	390	

<210> 2

<211> 1179

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 2

```

atggagacca ccatgggggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt   60
tctgtgtctca accctcatgg agcccatgcc acttctctcc catlcaactt cagctacagc  120
gactatgata tgccttttga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttcttttgc  180
gccaagattg tcattgggat ggcccttggtg ggcacatgc tggctctcgg cattggaaac  240
ttcatcttta tcgttgcctt ggtccgtac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc  300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcttg gttgcatatg tctgttccc ctltgagatg  360
gactactatg tggctgcgca gctctcttgg gagcacggcc acgtctcttg cacctctgtc  420
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccttgcctgg catcgccatt  480
gacaggatgc tggctattgt ccatccgtg agaccacgga tgaagtgcc aacagccact  540
ggcctgattg ccttgggtgtg gacggtgtcc atctgatcg ccatcccttc cgcctacttc  600
accaccgaga cggctctctg cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc  660
tggcctgttg accagcagc clactacaag tcttacttcc tctttatctt tggcatagaa  720
ttcgtgggcc ccgttggtcac catgacctg tgcatagcca ggcctctccg ggagctcttg  780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg  840
aagacggtcc tggctgtcat gtgcacctc accgcctacg tgcatagtc ggcgcccttc  900
tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt tctgaagga gaagcactac  960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttctgta ccgtcaagaa cgacaccgtc aagttctca aaaagatcat gttgtctcac 1080
tgggaaggctt cttacaatgg cggtaagtc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcc cccaagaggt ggactgcac agactaaaa 1179

```

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 3

```

atggagacca ccatgggggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt   60
tctgtgtctca accctcatgg agcccatgcc acttctctcc catlcaactt cagctacagc  120
gactatgata tgccttttga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttcttttgc  180

```



```

gccaaagattg tcatigggat ggccctgggtg ggcaicatgc tggctgcgg cattggaaac 240
tcatcttta tgcctgccc ggctcgctac aagaaactgc gcaaccacac caacctgctc 300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gggccattg tctgctgcc ctttgagatg 360
gactactatg tggtcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtccctg caccctctgc 420
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg cctgctggc catcgccatt 480
gacaggtatc tggctatgt ccatccgtg agaccacgga tgaagtcca aacagccact 540
ggcctgatig ccttgggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600
accaccgaga cggctcctgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgttg accagcagct ctactacaag tctacttcc tctttactt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc cgttgggtac catgacctg tgcctatgcca gcatctccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
aagacggtec tggctgctat gtgcatectc accgcctacg tgcctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgctgcg cgacttcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatgt cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080
tggaaggctt ctacaatgg cgttaagtc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcttgcca ccgaagaggt ggactgcac agactaaaa 1179

```

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 4

gtcgacatgg agaccacat ggggttcattg g 31

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 5

actagtttat tttagtcctga tgcagtcac ctcttc 36

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 6

tcatgttgct ccactggaag g 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 7

ccaattgtct tgaggtccag g 21

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 8

ttcttacaat ggcggtaagt ccagtcag 39

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 9

gtcgacatgg agaccacat ggggttcatg g 31

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 10

actagittat tttagtctga tgcagtcac ctcttc 36

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Rind

<400> 11

Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Xaa	Glu	Arg	Asp	Val	Gln	Xaa	Arg	Ala	Gly

5

10

15

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 12

ggtgccacgc gagtcicaat catgcicc

28

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 13

ggggcctgtg agcggaagt ccagtgtg

28

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 14

cttcttcagg aaacgcaagc accacacc

28

<210> 15

<211> 409

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 15

cttcttcagg aaacgcaagc accacacctg tcttgcctg cccaacctgc tgtgtccag 60

gttcccgac ggcaggtacc gctgctccat ggactigaag aacatcaatt tttaggcgct 120
 tgccctggct caggatcccc accatccitt tctgagcac agcctggatt ttatttctg 180
 ccatgaaacc cagctcccat gactctccca gtccctacac tgactaccct gatctctctt 240
 gcttagtacg cacataigca cacaggcaga catacctccc atcatgacat ggtccccagg 300
 ctggcctgag gatgtcacag ctgaggctg tgggtgaaa ggtggccagc ctggttctct 360
 tccctgtca ggtgccaga gaggtggtaa atggcagaaa ggacattcc 409

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 16

ccaccatgag aggtgccacg 20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 17

ctcgagctca ggaaaaggat ggtg 24

<210> 18

<211> 371

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 18

ccaccatgag aggtgccacg cgagctcaa tcatgtcct cctagtaact gtgtctgact 60

gtgctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120
 ccattcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
 agtgccaccc cggcagccac aagatccctt tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
 ctgtcttgcc caacctgtg tgtccaggt tcccgacgg caggtaccgc tgtccatgg 300
 acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctggcttca ggataccac catccttttc 360
 ctgagctcga g 371

<210> 19

<211> 371

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 19

ccaccatgag aggtgccacg cgagctcaa tcatgctcct cctagtaact gtgtctgact 60
 gtgctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120
 ccattcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
 agtgccaccc cggcagccac aaggtccctt tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
 ctgtcttgcc caacctgtg tgtccaggt tcccgacgg caggtaccgc tgtccatgg 300
 acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctggcttca ggataccac catccttttc 360
 ctgagctcga g 371

<210> 20

<211> 86

<212> PRT

<213> Mensch

<400> 20

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

65 70 75 80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
 85

<210> 21
<211> 86
<212> PRT
<213> Mensch

```

<400> 21
Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
      5              10              15
Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
      20              25              30
Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val
      35              40              45
Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
      50              55              60
Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
      65              70              75              80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
      85

```

<210> 22
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Mensch

<400> 22
Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
 5 10 15
Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
 20 25 30
Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
 35 40 45
Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

50 55 60
 His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
 65 70 75 80
 Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
 85 90 95
 Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
 100 105

<210> 23
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Mensch

<400> 23
 Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
 5 10 15
 Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
 20 25 30
 Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
 35 40 45
 Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
 50 55 60
 His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
 65 70 75 80
 Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
 85 90 95
 Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
 100 105

<210> 24
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> Mensch

<400> 24
 aaggctgagc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttcaccccaa 60

gtgacc: tga gaggtgccac gcgagtcctca atcaltgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
 tgtgtcttga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgtctgt 180
 gccatc: gcc tgtggcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
 gagtgc: acc ccggcagcca caagatcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
 ccttgc: ttgc ccaacctgct gtgtccagg ttcccggacg gcaggtaccg ctgtcccatg 360
 gacttga: aga acatcaattt ttaggcgctt gcctggcttc aggataccca ccatcctttt 420
 cctgag: caca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctcccag 480
 tcctta: cact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
 atacct: ccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600
 ggtgtga: aag gtggccagcc tggttctctt ccctgtctcag gctgccagag aggtggtaaa 660
 tggcaga: aag gacattcc 678

<210> 2;

<211> 6'8

<212> D I A

<213> Mensch

<400> 2'.

aaggct: gc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttacccccaa 60
 gtgacca ga gaggtgccac gcgagtcctca atcaltgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
 tgtgtcttga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgtctgt 180
 gccatc: gcc tgtggcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
 gagtgc: acc ccggcagcca caaggcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
 ccttgc: ttgc ccaacctgct gtgtccagg ttcccggacg gcaggtaccg ctgtcccatg 360
 gacttga: aga acatcaattt ttaggcgctt gcctggcttc aggataccca ccatcctttt 420
 cctgag: caca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctcccag 480
 tcctta: cact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
 atacct: ccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600
 ggtgtga: aag gtggccagcc tggttctctt ccctgtctcag gctgccagag aggtggtaaa 660
 tggcaga: aag gacattcc 678

<210> 26

<211> 25:

<212> DN

<213> Mensch

<400> 26

```

gcctgtgatca cagggggccctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60
atcagccctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccg c tggggcggga aggcgaggag 120
tgccaccccg gcagccacaa gatcccttc ttcaggaaac gcaagcacca cactgtcct 180
tgcttgccca acctgtgtgt ctccaggttc ccggacggca ggtaccgtg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt 258

```

<210> 27

<211> 258

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 27

```

gcctgtgatca cagggggccctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60
atcagccctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccg c tggggcggga aggcgaggag 120
tgccaccccg gcagccacaa ggctcccttc ttcaggaaac gcaagcacca cactgtcct 180
tgcttgccca acctgtgtgt ctccaggttc ccggacggca ggtaccgtg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt 258

```

<210> 28

<211> 315

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 28

```

atgagagggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctctcctag taactgtgtc tgactgtgt 60
gtgatcacag gggccctgtga gcgggatgtc cagtgtggg caggcacctg ctgtgccatc 120
agcctgtggc ttcgagggt gcggatgtgc accccgtgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
caccgccgca gccacaagat ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
ttgcccacc tgcgtgtgtc caggttcccg gacggcaggt accgtgtgtc catggacttg 300
aagaacatca atttt 315

```

<210> 29

<211> 315

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 29

atgagaggig ccacgcgagc ctcaatcatg ctcttcctag taactgtgtc tgactgtgct 60
 glgaltcacag gggccctgtga gcgggatgtc cagigtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120
 agcctgtggc ttcgagggtc gcggatgtgc accccgtgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
 cccccggca gccacaaggt ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
 ttgcccacc tgctgtgtc caggttcccg gacggcaggt accgtgtctc catggacttg 300
 aagaacatca atttt 315

<210> 30

<211> 382

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 30

gaattcgccc ttccaccaatg agaggigcca cgcgagtctc aatcatgtct ctcttagtaa 60
 ctgtgtctga ctgtgtgtg atcacagggg cctgtgagcg ggaatgtccag tgtggggcag 120
 gcacctgtgt tgccatcagc ctgtggcttc gagggctgcg gatgtgcacc ccgtggggc 180
 gggaaggcga ggagtccac cccggcagcc acaagggtcc ctcttccagg aaacgcaagc 240
 accacacctg tcttgtgtg cccaacctgc tgtgtccag gtccccggac ggcaggtacc 300
 gctgtccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgt tgcctggctc caggatacc 360
 accatccttt cctgagctcg ag 382

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Mensch

<400> 31

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp

5

10

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 32

gtcgaccacc atgagaggtg ccacgc

26

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 33

actagtcgca gaactggtag gtaggg

26

<210> 34

<211> 80

<212> PRT

<213> Dendroaspis polylepis

<400> 34

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Leu Gln Cys Gly Lys Gly

5

10

15

Thr Cys Cys Ala Val Ser Leu Trp Ile Lys Ser Val Arg Val Cys Thr

20

25

30

Pro Val Gly Thr Ser Gly Glu Asp Cys His Pro Ala Ser His Lys Ile

35

40

45

Pro Phe Ser Gly Gln Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Ala Pro Asn

50

55

60

Leu Ala Cys Val Gln Thr Ser Pro Lys Lys Phe Lys Cys Leu Ser Lys

65

70

75

80

<210> 35

<211> 1152

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 35

```

atggcagccc agaalgaaa caccagtttc acacccaact ttaatccacc ccaagaccat 60
gcctcctccc tctcctttaa cttcagttat ggtagattat acctccctat ggatgaggat 120
gaggacaatga ccaagacccg gaccttcttc gcagccaaga tcgtcattgg cattgcactg 180
gcaggcatca tgcctggctg cggcatcggc aactttgtct ttatcgtgc cctcaccgc 240
tataagaagt tgcgcaacct caccaatctg ctcatigcca acctggccat ctccgacttc 300
ctggtaggcca tcatctgtg ccccttcgag atggactact acgtggtagc gcagctctcc 360
tgggagcatg gccacgtgct ctgtgcctcc gtcaactacc tgcgcaccgt ctccctctac 420
gtctccacca atgacctgct ggccattgcc attgacagat atctcgccat cgttcacccc 480
ttgaaaccac ggatgaatta tcaaacggcc tccttcctga tcgcttggc ctggatggcg 540
tccattctca ttgccatccc atcggtctac ttgcaacag aaaccgtcct ctttattgtc 600
aagagccagg agaagatctt ctgtggccag atctggcctg tggatcagca gctctactac 660
aagtcctact tcctcttcat ctttgggtgc gagtctgtgg gccctgtggc caccatgacc 720
ctgtgctatg ccaggatctc ccgggagctc tggttcaagg cagtccttgg gticcagacg 780
gagcagattc gcaagcggct gcgctgccgc aggaagacgg tcctgggtgt catgtgcatt 840
ctcaccggct atgtgctgtg ctgggcaccc ttctacggtt tcaccatcgt tcgtgacttc 900
ttccccactg tgttcgtgaa ggaaaagcac tacctcactg ccttctactg ggtcagagtc 960
atcgccaatg gcaacagcat gatcaacacc ggtgtcttcg tgacgggtca gaacaacacc 1020
atgaagtact tcaagaagat gatgtgtgtg cactggcgct cctcccagcg ggggagcaag 1080
tccagtgctg accttgacct cagaaccaac ggggtgcccc ccacagaaga agtggactgt 1140
atcaggctga ag
1152

```

<210> 36

<211> 384

<212> PRT

<213> Mensch

<400> 36

```

Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro
      5              10              15
Pro Gln Asp His Ala Ser Ser Leu Ser Phe Asn Phe Ser Tyr Gly Asp
      20              25              30
Tyr Asp Leu Pro Met Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Arg Thr

```

35	40	45
Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Ile Ala Leu Ala Gly Ile Met		
50	55	60
Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Thr Arg		
65	70	75
Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala		
85	90	95
Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp		
100	105	110
Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys		
115	120	125
Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn		
130	135	140
Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro		
145	150	155
Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu		
165	170	175
Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Ala		
180	185	190
Thr Glu Thr Val Leu Phe Ile Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys		
195	200	205
Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe		
210	215	220
Leu Phe Ile Phe Gly Val Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr		
225	230	235
Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro		
245	250	255
Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys		
260	265	270
Thr Val Leu Val Leu Met Cys Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp		
275	280	285
Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val		
290	295	300
Phe Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys		
305	310	315
Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val		

				325				330				335					
Lys	Asn	Asn	Thr	Met	Lys	Tyr	Phe	Lys	Lys	Met	Met	Leu	Leu	His	Trp		
				340				345				350					
Arg	Pro	Ser	Gln	Arg	Gly	Ser	Lys	Ser	Ser	Ala	Asp	Leu	Asp	Leu	Arg		
				355				360				365					
Thr	Asn	Gly	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Glu	Val	Asp	Cys	Ile	Arg	Leu	Lys		
				370				375				380				384	

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

〈213〉 künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 37

gtcgacatgg agaccactgt ggggaccctg 30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

〈213〉 künstliche Sequenz

 $\langle 220 \rangle$

<223>

<400> 38

actagtttat ttcagtcgga tgcagtcac 30

<210> 39

<211> 1179

<212> DNA

<213> Ratte

<400> 39

```

atggagacca ctgtggggac cctgggcgag aataccacaa acactttcac cgacttcttt 60
tctgcacgtg atggcagtgg agccgaaacc tcccccttgc ctttactttt cagctatggt 120
gactatgaca tgccttcgga tgaagaggag gatgtgacca actctcggac ttcttttgc 180
gccaaagattg tcaatggcat ggcttttggtg ggcatcatgc tgggtgtgtg catcggcaac 240
ttcatcttca tcaatgcgtt ggcccgttac aaaaagcttc gcaacctcac caacctgctt 300
atcgccaacc tggccatttc ggacttcctg gtagccatcg tgtgtgtccc ctltgagatg 360
gactactatg tggtagcca gctctcctgg gagcacggcc atgtcctgtg cgcctccgtc 420
aactacttgc gcaccgtctc cctctacgtg tccactaacg ccttactggc cattgccatt 480
gacaggtatc tggccattgt gcaccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacggctgca 540
ggcctgatct tcctgggtgt gtctgtgtcc atctcatcg ccatcccagc cgcctacttc 600
accactgaga cgggtgttgg catcgtggaa agccaggaga agatcttctg cggccagatc 660
tggccgggtg atcagcagtt ctactacagg tcttatttcc ttttggcttt cggcctcgag 720
ttcgtgggtc ctgtaatcgc catgacctg tctatgcca ggggtgtccg agagctctgg 780
ttcaaggcgg tggccggctt ccagacagag cagatccgcc ggaggctgct ctgtcggcga 840
cggacggtac tggggctcgt gtgcgtcctt tccgcctatg tctgtgtctg ggctcccttc 900
tatggcttca ccatcgtgct tgaattcttc ccttccgtgt ttgtgaaaga gaagcactac 960
ctcaccgctt ttatgttgt ggagtgcac gccatgagca acagtatgat caatagctg 1020
tgcttttgtg ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggctccag 1080
tggagggcct ctctagcgg gagcaaggcc agcgtgacc tgcacctcag gaccacgggg 1140
attcctgcca cggaggaggt ggactgcac cgactgaaa 1179

```

<210> 40

<211> 393

<212> PRT

<213> Ratte

<400> 40

```

Met Glu Thr Thr Val Gly Thr Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asn Thr Phe
      5              10              15
Thr Asp Phe Phe Ser Ala Arg Asp Gly Ser Gly Ala Glu Thr Ser Pro
      20              25              30
Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Ser Asp Glu
      35              40              45
Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
      50              55              60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn

```


65	70	75	80
Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu			
85	90	95	
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala			
100	105	110	
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu			
115	120	125	
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg			
130	135	140	
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile			
145	150	155	160
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys			
165	170	175	
Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu			
180	185	190	
Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile			
195	200	205	
Val Glu Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp			
210	215	220	
Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu			
225	230	235	240
Phe Val Gly Pro Val Ile Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser			
245	250	255	
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile			
260	265	270	
Arg Arg Arg Leu Arg Cys Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys			
275	280	285	
Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr			
290	295	300	
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr			
305	310	315	320
Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met			
325	330	335	
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr			
340	345	350	
Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser			

355	360	365
Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr		
370	375	380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys		
385	390	

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 41

cctcaccaay ctgctyatyg ccaacctggc c 31

<210> 42

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 42

gtggtircgsc agctctcctg ggagca 26

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 43

tcccgggagc lctgggttcaa ggc 23

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 44

gagtgcacgc ccatgagcaa cagcatg 27

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 45

ggcttgaacc agagctcccg gga 23

<210> 46

<211> 1266

<212> DNA

<213> Ratte

<400> 46

atggtatcag ttctgtccaa cagggaacctc cacacactgg cccagctga agtgctgaac	60
tccacgtggg cctatctccc tgacacatac cagcctacct gccacatcat caacatggga	120
gaccagaacg gaaacacaag ctttgcacca gacttgaacc caccccaaga ccacgtctcc	180
ttgctcccct taaactacag ttatggagat tatgacatcc ccctggatga cgatgaggat	240
glgaccaaga cacagacctt ctttgcagcc aaaatcgtca ttggcgtagc cctggcaggc	300

```

atcaltgctag tctgcggcgt tggcaacttt gtcttcattg ctgccctcgc ccgtacaaag 360
aagctgcgca accttaccac cctctctalc gctaacctgg ccatctctga ctctctgggtg 420
gcgatcgtct gctgccccct tgagatggac tactacgtag tacgtcagct ttctctgggag 480
catggtcacg tgccttctgc ctccgtcaac taccttcgtc cagtctccct gtacgtctcc 540
accaatgctc tgcctggccat cgtattgac agatctctcg ctattgtcca ccccttaaaa 600
cggatgaatt accagaccgc ctcttctctg atcgtcttgg tctggatggt ctccatcttc 660
atgccatcc catctgccia ctccaccaca gaaaccatcc ttgttatcgt caagaalcag 720
gaaaagctct tctgtgggtc gatctggccc gttgaccagc agctctacta caaatctac 780
ttctcttctg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccggtg tcaatatgac cctgtgctat 840
gccaggatct cccaggagct ctgggttcaag gctgtacctg gtttccagac ggagcagatc 900
cgcaagcgac tgcgtctccg ccgaaagaca gtgctattgc tcatgggtat cctcacagcc 960
tacgtgctgt gctgggcgcc ttctatggc ttaccatag tgcgagactt ctccccacg 1020
ctgggttcta aggagaagca ctacctcacc gccttctatg tctctgagtg catcgccatg 1080
agcaacagca tgatcaatac tataatgctc gtgacgttca agaacaacac catgaaatac 1140
ttcaagaaga tgctgctgct gcactggcgg cctctcact acgggagtaa gtccagcgcg 1200
gacctcgacc tcaaaaccag tggggttctt gccaccgaag aggtggactg taccaggcta 1260
aagtag

```

<210> 47

<211> 421

<212> PRT

<213> Ratte

<400> 47

```

Met Val Ser Val Leu Ser Asn Arg Asp Leu His Thr Leu Ala Pro Ala
      5              10              15
Glu Val Leu Asn Ser Thr Trp Ala Tyr Leu Pro Asp Thr Tyr Gln Pro
      20              25              30
Thr Cys His Ile Ile Asn Met Gly Asp Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe
      35              40              45
Ala Pro Asp Leu Asn Pro Pro Gln Asp His Val Ser Leu Leu Pro Leu
      50              55              60
Asn Tyr Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Ile Pro Leu Asp Asp Asp Glu Asp
      65              70              75              80
Val Thr Lys Thr Gln Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Val
      85              90              95

```

Ala Leu Ala Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Val Gly Asn Phe Val Phe
 100 105 110
 Ile Ala Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu
 115 120 125
 Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Val Cys
 130 135 140
 Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu
 145 150 155 160
 His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser
 165 170 175
 Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr
 180 185 190
 Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser
 195 200 205
 Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro
 210 215 220
 Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln
 225 230 235 240
 Glu Lys Leu Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr
 245 250 255
 Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro
 260 265 270
 Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp
 275 280 285
 Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu
 290 295 300
 Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala
 305 310 315 320
 Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp
 325 330 335
 Phe Phe Pro Thr Leu Val Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe
 340 345 350
 Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile
 355 360 365
 Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met
 370 375 380

Leu Leu Leu His Trp Arg Pro Ser His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala
 385 390 395 400
 Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp
 405 410 415
 Cys Ile Arg Leu Lys
 420

<210> 48

<211> 393

<212> PRT

<213> Maus

<400> 48

Met Glu Thr Thr Val Gly Ala Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asp Thr Phe
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Phe Ser Ala Leu Asp Gly His Glu Ala Gln Thr Gly Ser
 20 25 30
 Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
 35 40 45
 Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
 50 55 60
 Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
 65 70 75 80
 Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
 85 90 95
 Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
 100 105 110
 Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
 115 120 125
 Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg
 130 135 140
 Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 145 150 155 160
 Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
 165 170 175
 Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu

180	185	190
Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile		
195	200	205
Val Glu Arg Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp		
210	215	220
Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu		
225	230	235
Phe Val Gly Pro Val Val Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser		
245	250	255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile		
260	265	270
Arg Arg Thr Val Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys		
275	280	285
Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr		
290	295	300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr		
305	310	315
Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met		
325	330	335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr		
340	345	350
Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser		
355	360	365
Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr		
370	375	380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys		
385	390	393

<210> 49
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Maus

<400> 49
 Met Gly Pro Gln Asn Arg Asn Thr Ser Phe Ala Pro Asp Leu Asn Pro
 1 5 10 15

Pro Gln Asp His Val Ser Leu Asn Tyr Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Leu
 20 25 30
 Pro Leu Gly Glu Asp Glu Asp Val Thr Lys Thr Gln Thr Phe Phe Ala
 35 40 45
 Ala Lys Ile Val Ile Gly Val Ala Leu Ala Gly Ile Met Leu Val Cys
 50 55 60
 Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys
 65 70 75 80
 Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp
 85 90 95
 Phe Leu Val Ala Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val
 100 105 110
 Val Arg Gln Leu Ser Trp Ala His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val
 115 120 125
 Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu
 130 135 140
 Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met
 165 170 175
 Val Ser Ile Leu Ile Ala Val Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr
 180 185 190
 Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile
 195 200 205
 Trp Ser Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val
 210 215 220
 Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr
 225 230 235 240
 Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln
 245 250 255
 Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu
 260 265 270
 Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe
 275 280 285
 Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Val Val Lys
 290 295 300

Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met
 305 310 315 320
 Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn
 325 330 335
 Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Leu Arg Leu His Trp Arg Pro Ser
 340 345 350
 His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly
 355 360 365
 Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
 370 375 380

<210> 50

<211> 1179

<212> DNA

<213> Maus

<400> 50

atggagacca ctgtcggggc tctgggtgag aataccacag acaccttcac cgacttcttt 60
 tctgcactcg atggccatga agcccaaacc ggctcgttac cattcacttt cagctacggg 120
 gactatgaca tgcctctgga tgaagaggaa gaigtgacca attctcggac ttctcttgct 180
 gccaaagtgt tcattggcat ggccttgggt ggatcatgc tagtgtgtgg catcggaac 240
 ttcatcttta tcactgccct ggcccgtac aaaaagctcc gcaacctcac caacctgctt 300
 atcgccaacc tggccatttc agacttcctc gtggccatcg tgtgtgccc ctttgagatg 360
 gactactatg tggcgcgcca gctctcctgg gagcatggc atgtcctgtg cgctctgtc 420
 aactacttgc gtaccgtctc cctctacgtc tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480
 gacaggtatc tggccattgt gcacccgtg agaccgcgga tgaagtgtca aacagccgcc 540
 ggctgatct tcttggtgtg gtcagtatcc atctcatcg ccattccagc tgcctacttc 600
 accactgaga ccgtgtggt catcgtggag agacaggaga agatcttctg tggtcagatc 660
 tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttltggtttt cggcctcgag 720
 ttctgtggcc ccgtagtgc catgacctg tgcctatgca ggggtgccg ggagctctgg 780
 ttcaaggcgg tggcaggctt ccagacagag cagatccgcc ggacggtgcg ctgccgccgc 840
 aggacggtgc tggggctcgt gtgcgtcctc tctgcctatg tgcgtgtgtg ggctcccttc 900
 tatggcttca ctatcgtgcg tgacttcttc cctccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
 ctaccgcct tctatgttgt ggagtcacg gccatgagca acagcatgat caatcgtc 1020
 tgccttctga ctgtcaggaa taacaccagt aagtaacctc agaggatccg gcggcttcag 1080
 tggagggcct ctcccagcg gagcaaggcc agcgtgacc tcgacctcag gaccacggga 1140

atacctgccca ccgaggaggt ggactgcatc cgactgaaa

1179

<210> 51

<211> 1143

<212> DNA

<213> Maus

<400> 51

```

atgggacccc agaacagaaa cactagcttt gcaccagact tgaatccacc ccaagaccat 60
gtctcccttaa actacagtta tggtagattat gacctcccc tgggtgagga tgaggatgtg 120
accaagacac agaccttctt tgcagccaaa attgtcatlg gcgtggcact ggcaggcatc 180
atgctggctc gcggcattgg caactttgtc ttcatlgtg ccctcgcccg ctacaagaag 240
ctgcgcaacc ttaccaacct cctcattgct aacctggcca tctctgactt cctggtagcg 300
atcgtctgtc gcccttttga gatggactat tatgtaglac ggcagctttc ctgggcgcat 360
ggtaacgtgc ttgttgccct cgtcaactac ctctgtacgg tctccctgta cgtctccacc 420
aacgtctgct tggccatcgc tattgacaga tacctcgcta ttgtccacc ttgaaacca 480
cggatgaatt atcagaccgc ttctttcctg atcgcttgg tctggatggt ctccatctc 540
atcgctgccc catctgccta ctaccaccaca gaaaccatcc tcgttatcgt caagaatcaa 600
gaaaaaatct tctgtggtca gatctggctc gtggaccagc agctctacta caaatcctac 660
ttctcttctg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccgagg tcatatgac cctgtgctat 720
gccaggatct cccaagagct ctggttcaag gctgtaccig gcttccagac ggagcaaalc 780
cgcaagcggc tgcgttgccc ccgcaagaca gtgctactgc tcatgggcat cctcacagcc 840
tacgtgctgt gctgggcgcc gttctatggc ttaccatag tgcgagactt ctccccacg 900
gtagtttga aggagaagca ctacctacc gccttctacg tcgtggagtg catlgccatg 960
agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacgtca agaacaacac catgaaatac 1020
ttcaagaaga tcttgcggct ccaactggcg ccctctcact acgggagtaa gtccagcgct 1080
gacctcgacc tcaaaaccag cggggtagct gccactgaag aggtggattg tatcagacta 1140
aag

```

1143

<210> 52

<211> 88

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 52

tatggcggtg attaccggig cgtgcgaacg tgaatgacag tgcggigcgg gtacctgctg 60
 cgcgattagc ctgtggctgc gtggctctg 88

<210> 53

<211> 92

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 53

cgtatgtgca ccccgctggg tctgaaggt gaagaatgcc atccgggtac ccataaagtg 60
 ccgttcttcc gtaaactgaa acatcatacc tg 92

<210> 54

<211> 86

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 54

cccgctcctg ccgaacctgc tgtgcagccg tttcccgat ggtcgttacc gttgcagcat 60
 ggalctgaaa aacattaact tttagg 86

<210> 55

<211> 94

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 55

cacatacgca gaccacgcag ccacaggcta atcgcgagc aggtacccgc accgcactgc 60
 acatcacgtt cgcacgcacc ggtaatcacc gccca 94

<210> 56

<211> 93

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 56

aggcacgggc aggtatgatg ttacgttta cggaagaacg gcactttatg gctacccgga 60
 tggcattcct caccctcag acccagcggg gtg 93

<210> 57

<211> 81

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 57

gatccctaaa agttaatgtt ttccagatcc atgctgcaac gataacgacc atccgggaaa 60
 cggctgcaca gcaggttcgg c 81

<210> 58

<211> 258

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223>

<400> 58

gcggtgatta ccggtgcgtg cgaacgtgat gtgcagtgcg gtgcgggtac ctgctgcgcg 60
 attagccigt ggctgcgtgg tctgcgtatg tgcaccccg c tgggtcgtga aggtgaagaa 120
 tgccatccgg gtagccataa agtgccgttc ttccgtaaac gtaaacaatca tacctgcccg 180
 tgcttgccga acctgctgtg cagccgtttc ccggtgggtc gttatcgttg cagcatggat 240
 ctgaaaaaca ttaacttt 258

[SEQUENZPROTOKOLL]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Physiological Active Peptide and Its Use

<130> P2001-174PCT

<150> JP 2000-217442

<151> 2000-07-18

<150> JP 2001-26779

<151> 2001-02-02

<160> 58

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser
      5              10              15
Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser
      20              25              30
Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
      35              40              45
Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
      50              55              60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
      65              70              75              80
Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
      85              90              95
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
      100             105             110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
      115             120             125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg
      130             135             140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
      145             150             155             160

```

```

Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
      165              170              175
Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
      180              185              190
Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
      195              200              205
Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
      210              215              220
Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu
      225              230              235              240
Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser
      245              250              255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
      260              265              270
Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys
      275              280              285
Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
      290              295              300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
      305              310              315              320
Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
      325              330              335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr
      340              345              350
Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly
      355              360              365
Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr
      370              375              380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
      385              390

```

<210> 2

<211> 1179

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atggagacca ccatgggggtt catgggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt 60
tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120
gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct 180
gccaaagattg tcattgggat ggccctggtg ggcacatgc tggctcgcgg cattggaaac 240

```

```

ttcatcttta tcgctgccct ggcccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tgggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420
aactacctgc gcaactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480
gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtgcc aacagccact 540
ggcctgattg ccttggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600
accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc cgttggtcac catgacctg tctatgcc aagatctccc ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgag ctgccgcagg 840
aagacggtec tgggtgctcat gtgcactctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgctgc cgacttcttc cccaccgtgt tctgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080
tggaaggctt cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcac agactaaaa 1179

```

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

atggagacca ccatgggggt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt 60
tctgtgtcga accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120
gactatgata tgccttttga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttcttttgc 180
gccaaagatt tcattgggat ggccctggtg ggcacatgc tgggtctgag cattggaaac 240
ttcatcttta tcgctgccct ggcccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tgggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420
aactacctgc gcaactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480
gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtgcc aacagccact 540
ggcctgattg ccttggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600
accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc cgttggtcac catgacctg tctatgcc aagatctccc ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgag ctgccgcagg 840
aagacggtec tgggtgctcat gtgcactctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgctgc cgacttcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080

```

tggaaggctt cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgccca ccgaagaggt ggactgcatc agactaaaa 1179

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 4

gtcgacatgg agaccaccat ggggttcatg g 31

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 5

actagtttat tttagtctga tgcagtccac ctcttc 36

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 6

tcatgttgct ccactggaag g 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 7

ccaattgtct tgagggtccag g 21

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> ZAQ-Sonde

<400> 8

ttctttacaat ggcggttaagt ccagtgcag 39

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 9

gtcgacatgg agaccaccat ggggttcatg g 31

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 10

actagtttat tttagtctga tgcagtcac ctcttc 36

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 11

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly

5

10

15

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 12

ggtgccacgc gagtctcaat catgctcc

28

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 13

ggggcctgtg agcgggatgt ccagtgtg

28

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 14

cttcttcagg aaacgcaagc accacacc

28

<210> 15

<211> 409

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

cttcttcagg aaacgcaagc accacacctg tcttgcttg cccaacctgc tgtgctccag 60
gttcccggac ggcaggtagc gctgctccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgct 120
tgcctgggtct caggataccc accatccttt tcttgagcac agcctggatt tttatttctg 180
ccatgaaacc cagctcccat gactctccca gtccctacac tgactaccct gatctctctt 240
gtctagtacg cacatatgca cacaggcaga catacctccc atcatgacat ggtccccagg 300
ctggcctgag gatgtcacag cttgaggctg tgggtgtgaaa ggtggccagc ctggttctct 360
tccctgctca ggctgccaga gaggtggtaa atggcagaaa ggacattcc 409

```

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 16

```

ccaccatgag aggtgccacg 20

```

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 17

```

ctcgagctca ggaaaaggat ggtg 24

```

<210> 18

<211> 371

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

ccaccatgag aggtgccacg cgagtctcaa tcatgtctcct cctagtaact gtgtctgact 60
gtgtctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120
ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
agtgccaccc cggcagccac aagatcccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
cttgcttgcc caacctgtg tgcctcaggt tcccggacgg caggtaccgc tgctccatgg 300
acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctgggtctca ggataccac catccttttc 360
ctgagctcga g 371

```

<210> 19

<211> 371

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

```

ccaccatgag aggtgccacg cgagtctcaa tcatgtctcct cctagtaact gtgtctgact 60
gtgtctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120
ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
agtgccaccc cggcagccac aagatcccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
cttgcttgcc caacctgtg tgcctcaggt tcccggacgg caggtaccgc tgctccatgg 300
acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctgggtctca ggataccac catccttttc 360
ctgagctcga g 371

```

<210> 20

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

```

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
      5              10              15
Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
      20              25              30
Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Ile
      35              40              45
Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
      50              55              60
Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
      65              70              75              80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
      85

```

<210> 21
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
      5                      10                      15
Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
      20                      25                      30
Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val
      35                      40                      45
Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
      50                      55                      60
Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
      65                      70                      75                      80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
                        85

```

<210> 22
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

```

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
      5                      10                      15
Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
      20                      25                      30
Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
      35                      40                      45
Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
      50                      55                      60
His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
      65                      70                      75                      80
Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
      85                      90                      95
Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
      100                      105

```

<210> 23

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
      5              10              15
Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
      20              25              30
Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
      35              40              45
Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
      50              55              60
His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
      65              70              75              80
Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
      85              90              95
Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
      100              105

```

<210> 24

<211> 678

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

```

aaggctgagc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttcaccccaa 60
gtgaccatga gaggtgccac gcgagtctca atcatgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
tgtgtctgtga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgctgt 180
gccatcagcc tgtggcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
gagtgccacc ccggcagcca caagatcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
ccttgcttgc ccaacctgct gtgctccagg ttcccgacg gcaggtaccg ctgctccatg 360
gacttgaaga acatcaattt ttaggcgctt gcctggtctc aggataccca ccatcctttt 420
cctgagcaca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctccag 480
tcctacact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
atacctccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600
gggtgtgaaag gtggccagcc tggttctctt ccctgctcag gctgccagag aggttggtaaa 660
tggcagaaaag gacattcc

```

<210> 25

<211> 678

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

```

aaggctgagc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttcaccccaa 60
gtgaccatga gaggtgccac gcgagtctca atcatgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
tgtgctgtga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgctgt 180
gccatcagcc tgttgcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
gagtgccacc cgggcagcca caaggtcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
ccttgcttgc ccaacctgct gtgtccagg ttcccggacg gcaggtagcg ctgtccatg 360
gacttgaaga acatcaattt ttaggcgctt gcctgggtctc aggataccca ccatcctttt 420
cctgagcaca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctccag 480
tcctacact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
atacctccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600
gggtgtgaaag gtggccagcc tggttctctt cctgtctcag gctgccagag aggtggtaaa 660
tggcagaaag gacattcc                                     678

```

<210> 26

<211> 258

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

```

gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60
atcagcctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccg tggggcggga aggcgaggag 120
tgccaccccg gcagccacaa gatccccttc ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180
tgcttgccca acctgctgtg ctccaggctc ccggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt                                     258

```

<210> 27

<211> 258

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

```

gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60
atcagcctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccg tggggcggga aggcgaggag 120
tgccaccccg gcagccacaa ggtccccttc ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180
tgcttgccca acctgctgtg ctccaggctc ccggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt                                     258

```

<210> 28

<211> 315

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

```

atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctctctctag taactgtgtc tgactgtgct 60
gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120
agcctgtggc ttcgagggct gcggatgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
caccocggca gccacaagat ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
ttgccaacc tgctgtgttc caggttcccg gacggcaggt accgctgttc catggacttg 300
aagaacatca atttt 315

```

<210> 29

<211> 315

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctctctctag taactgtgtc tgactgtgct 60
gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120
agcctgtggc ttcgagggct gcggatgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
caccocggca gccacaaggt ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
ttgccaacc tgctgtgttc caggttcccg gacggcaggt accgctgttc catggacttg 300
aagaacatca atttt 315

```

<210> 30

<211> 382

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

```

gaattcgccc ttccaccatg agaggtgcca cgcgagtctc aatcatgttc ctctagtaa 60
ctgtgtctga ctgtgtgtg atcacagggg cctgtgagcg ggatgtccag tgtggggcag 120
gcacctgctg tgccatcagc ctgtggcttc gagggctgcg gatgtgcacc ccgctggggc 180
gggaaggcga ggagtgcac cccggcagcc acaaggctcc ctcttcagg aaacgcaagc 240
accacacctg tccttgcttg cccaacctgc tgtgtccag gttcccgac ggcaggtacc 300
gctgtccat ggacttgaag aacatcaatt ttaggcgct tgctgggtct caggatacc 360
accatecttt cctgagctcg ag 382

```

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp

5

10

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 32

gtcgaccacc atgagaggtg ccacgc

26

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 33

actagtcgca gaactggtag gtatgg

26

<210> 34

<211> 80

<212> PRT

<213> Dendroaspis polylepis

<400> 34

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Leu Gln Cys Gly Lys Gly

5

10

15

Thr Cys Cys Ala Val Ser Leu Trp Ile Lys Ser Val Arg Val Cys Thr

20

25

30

Pro Val Gly Thr Ser Gly Glu Asp Cys His Pro Ala Ser His Lys Ile

35

40

45

Pro Phe Ser Gly Gln Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Ala Pro Asn
 50 55 60
 Leu Ala Cys Val Gln Thr Ser Pro Lys Lys Phe Lys Cys Leu Ser Lys
 65 70 75 80

<210> 35

<211> 1152

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

```

atggcagccc agaatggaaa caccagtttc acaccaact ttaatccacc ccaagaccat 60
gcctcctccc tctcctttaa cttcagttat ggtgattatg acctccctat ggatgaggat 120
gaggacatga ccaagacccg gaccttcttc gcagccaaga tcgtcattgg cattgcactg 180
gcaggcatca tgctggctcg cggcatcggt aactttgtct ttatcgctgc cctcaccgcg 240
tataagaagt tgcgcaacct caccaatctg ctcattgcca acctggccat ctccgacttc 300
ctggtggcca tcatctgctg ccccttcgag atggactact acgtggtagc gcagctctcc 360
tgggagcatg gccacgtgct ctgtgcctcc gtcaactacc tgcgcaccgt ctccctctac 420
gtctccacca atgccttgct ggccattgcc attgacagat atctcgccat cgttcacccc 480
ttgaaaccac ggatgaatta tcaaacggcc tccttcctga tcgccttggg ctggatgggt 540
tccatttctc ttgccatccc atcggttac tttgcaacag aaaccgtcct ctttattgtc 600
aagagccagg agaagatctt ctgtggccag atctggcctg tggatcagca gctctactac 660
aagtctact tcctcttcat ctttgggtgc gagttcgtgg gccctgtggg caccatgacc 720
ctgtgctatg ccaggatctc ccgggagctc tggttcaagg cagtccctgg gttccagacg 780
gagcagattc gcaagcggct gcgctgccgc aggaagacgg tcctgggtgct catgtgcatt 840
ctcacggcct atgtgctgtg ctgggcaccc ttctacggtt tcaccatcgt tcgtgacttc 900
ttccccactg tgttcgtgaa ggaaaagcac tacctcactg ctttctacgt ggtcgagtgc 960
atcgccatga gcaacagcat gatcaacacc gtgtgcttcg tgacgggtcaa gaacaacacc 1020
atgaagtact tcaagaagat gatgctgctg cactggcgtc cctcccagcg ggggagcaag 1080
tccagtgtg accttgacct cagaaccaac ggggtgccca ccacagaaga agtggactgt 1140
atcaggctga ag 1152

```

<210> 36

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro
 5 10 15
 Pro Gln Asp His Ala Ser Ser Leu Ser Phe Asn Phe Ser Tyr Gly Asp

20	25	30
Tyr Asp Leu Pro Met Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Arg Thr		
35	40	45
Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Ile Ala Leu Ala Gly Ile Met		
50	55	60
Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Thr Arg		
65	70	75
80		
Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala		
85	90	95
Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp		
100	105	110
Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys		
115	120	125
Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn		
130	135	140
Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro		
145	150	155
160		
Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu		
165	170	175
Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Ala		
180	185	190
Thr Glu Thr Val Leu Phe Ile Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys		
195	200	205
Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe		
210	215	220
Leu Phe Ile Phe Gly Val Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr		
225	230	235
240		
Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro		
245	250	255
Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys		
260	265	270
Thr Val Leu Val Leu Met Cys Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp		
275	280	285
Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val		
290	295	300
Phe Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys		
305	310	315
320		
Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val		
325	330	335
Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Met Leu Leu His Trp		
340	345	350

Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg
 355 360 365
 Thr Asn Gly Val Pro Thr Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
 370 375 380 384

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 37

gtcgcacatgg agaccactgt ggggaccctg 30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 38

actagtttat ttcagtcgga tgcagtcac 30

<210> 39

<211> 1179

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 39

atggagacca ctgtggggac cctgggagag aataccacaa acactttcac cgacttcttt 60
 tctgcacgtg atggcagtgg agccgaaacc tcccccttgc cattcacttt cagctatggg 120
 gactatgaca tgccctcgga tgaagaggag gatgtgacca actctcggac tttctttgct 180
 gccaaagattg tcattggcat ggctttggtg ggcacatgc tgggtgtgtgg catcggcaac 240
 ttcattcttca tcaactgcgt ggcccgtac aaaaagcttc gcaacctcac caacctgctt 300
 atcgccaacc tggccatttc ggacttcctg gtagccatcg tgtgctgccc ctttgagatg 360
 gactactatg tggtagcca gctctcctgg gagcacggcc atgtcctgtg cgcctcctgc 420
 aactacttgc gcaccgtctc cctctacgtg tccactaacg cctactggc cattgccatt 480

```

gacaggatc tggccattgt gcacccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacggctgca 540
ggcctgatct tcctgggtgtg gtctgtgtcc atctcatcgc ccatcccagc cgcctacttc 600
accactgaga cgggtgttggc catcgtggaa agccaggaga agatcttctg cggccagatc 660
tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggctct cggcctcgag 720
ttcgtgggtc ctgtaatcgc catgaccctg tgctatgccg ggggtgtccc agagctctgg 780
ttcaaggcgg tgcccggcct ccagacagag cagatccgcc ggaggctgcg ctgtcgccga 840
cggacggtac tggggctcgt gtgcgtcctt tccgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900
tatggcttca ccatcgtgcg tgacttcttc ccctccgtgt ttgtgaaaga gaagcactac 960
ctcaccgcct tttatgtggg ggagtgcac gccatgagca acagtatgat caatacgtg 1020
tgctttgtga ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggctccag 1080
tggagggcct ctctagcgg gagcaaggcc agcgtgacc tcgacctcag gaccacgggg 1140
attcctgccg cggaggagggt ggactgcac cgactgaaa 1179

```

<210> 40

<211> 393

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 40

```

Met Glu Thr Thr Val Gly Thr Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asn Thr Phe
      5                      10                      15
Thr Asp Phe Phe Ser Ala Arg Asp Gly Ser Gly Ala Glu Thr Ser Pro
      20                      25                      30
Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Ser Asp Glu
      35                      40                      45
Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
      50                      55                      60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
      65                      70                      75                      80
Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
      85                      90                      95
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
      100                     105                     110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
      115                     120                     125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg
      130                     135                     140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
      145                     150                     155                     160
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
      165                     170                     175

```

Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu
 180 185 190
 Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
 195 200 205
 Val Glu Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
 210 215 220
 Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu
 225 230 235 240
 Phe Val Gly Pro Val Ile Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser
 245 250 255
 Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
 260 265 270
 Arg Arg Arg Leu Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys
 275 280 285
 Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
 290 295 300
 Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
 305 310 315 320
 Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
 325 330 335
 Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr
 340 345 350
 Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser
 355 360 365
 Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr
 370 375 380
 Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
 385 390

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 41

cctcaccaay ctgctyatyg ccaacctggc c 31

<210> 42

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 42

gtggtrcgsc agctctcctg ggagca 26

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 43

tcccgggagc tctggttcaa ggc 23

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<224> Primer

<400> 44

gagtgcacg ccatgagcaa cagcatg 27

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 45

ggcttgaacc agagctcccg gga 23

<210> 46

<211> 1266

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 46

```

atggtatcag ttctgtccaa cagggacctc cacacactgg cccagctga agtgctgaac 60
tccacgtggg cctatctccc tgacacatac cagcctacct gccacatcat caacatggga 120
gaccagaacg gaaacacaag ctttgcacca gacttgaacc caccccaaga ccacgtctcc 180
ttgctccctt taaactacag ttatggagat tatgacatcc ccctggatga cgatgaggat 240
gtgaccaaga cacagacctt ctttgcagcc aaaatcgtca ttggcgtagc cctggcaggc 300
atcatgctag tctgcggcgt tggcaacttt gtcttcattg ctgccctcgc ccgctacaag 360
aagctgcgca accttaccaa cctcctcatc gctaacctgg ccatctctga ctccctggtg 420
gcgatcgtct gctgccctt tgagatggac tactacgtag tacgtcagct ttccctgggag 480
catggtcacg tgctttgtgc ctccgtcaac taccttcgta cagtctccct gtacgtctcc 540
accaatgctc tgctggccat cgctattgac agatatctcg ctattgtcca ccccttaaaa 600
cggatgaatt accagaccgc ctccctcctg atcgctttgg tctggatggg ctccatcctc 660
atcgccatcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc ttggtatcgt caagaatcag 720
gaaaagctct tctgtggtca gatctggccc gtggaccagc agctctacta caaatcctac 780
ttcctcttcg tcttcgggct tgagttcgtg ggccccgtgg tcactatgac cctgtgctat 840
gccaggatct cccaggagct ctggttcaag gctgtacctg gtttccagac ggagcagatc 900
cgcaagcgac tgcgtgccg ccgaaagaca gtgctattgc tcatgggtat cctcacagcc 960
tacgtgctgt gctgggcgcc tttctatggc ttaccatag tgcgagactt cttccccacg 1020
ctggttgtga aggagaagca ctacctacc gccttctatg tcgtcgagtg catcgccatg 1080
agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacgggtca agaacaacac catgaaatac 1140
ttcaagaaga tgctgctgct gcactggcgg ccctctcact acgggagtaa gtccagcgcg 1200
gacctcgacc tcaaaaccag tggggttcct gccaccgaag aggtggactg tatcaggcta 1260
aagtag 1266

```

<210> 47

<211> 421

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 47

```

Met Val Ser Val Leu Ser Asn Arg Asp Leu His Thr Leu Ala Pro Ala
      5              10              15
Glu Val Leu Asn Ser Thr Trp Ala Tyr Leu Pro Asp Thr Tyr Gln Pro
      20              25              30

```


Thr Cys His Ile Ile Asn Met Gly Asp Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe
 35 40 45
 Ala Pro Asp Leu Asn Pro Pro Gln Asp His Val Ser Leu Leu Pro Leu
 50 55 60
 Asn Tyr Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Ile Pro Leu Asp Asp Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 Val Thr Lys Thr Gln Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Val
 85 90 95
 Ala Leu Ala Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Val Gly Asn Phe Val Phe
 100 105 110
 Ile Ala Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu
 115 120 125
 Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Val Cys
 130 135 140
 Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu
 145 150 155 160
 His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser
 165 170 175
 Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr
 180 185 190
 Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser
 195 200 205
 Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro
 210 215 220
 Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln
 225 230 235 240
 Glu Lys Leu Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr
 245 250 255
 Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro
 260 265 270
 Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp
 275 280 285
 Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu
 290 295 300
 Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala
 305 310 315 320
 Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp
 325 330 335
 Phe Phe Pro Thr Leu Val Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe
 340 345 350
 Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile

355 360 365
 Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met
 370 375 380
 Leu Leu Leu His Trp Arg Pro Ser His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala
 385 390 395 400
 Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp
 405 410 415
 Cys Ile Arg Leu Lys
 420

<210> 48
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 48
 Met Glu Thr Thr Val Gly Ala Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asp Thr Phe
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Phe Ser Ala Leu Asp Gly His Glu Ala Gln Thr Gly Ser
 20 25 30
 Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
 35 40 45
 Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
 50 55 60
 Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
 65 70 75 80
 Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
 85 90 95
 Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
 100 105 110
 Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
 115 120 125
 Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg
 130 135 140
 Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 145 150 155 160
 Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
 165 170 175
 Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu
 180 185 190
 Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile

```

195          200          205
Val Glu Arg Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
210          215          220
Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu
225          230          235          240
Phe Val Gly Pro Val Val Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser
245          250          255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
260          265          270
Arg Arg Thr Val Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys
275          280          285
Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
290          295          300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305          310          315          320
Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
325          330          335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr
340          345          350
Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser
355          360          365
Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr
370          375          380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385          390          393

```

<210> 49

<211> 381

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 49

```

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

```

65	70	75	80
Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp			
	85	90	95
Phe Leu Val Ala Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val			
	100	105	110
Val Arg Gln Leu Ser Trp Ala His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val			
	115	120	125
Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu			
	130	135	140
Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Pro			
145	150	155	160
Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met			
	165	170	175
Val Ser Ile Leu Ile Ala Val Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr			
	180	185	190
Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile			
	195	200	205
Trp Ser Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val			
	210	215	220
Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr			
225	230	235	240
Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln			
	245	250	255
Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu			
	260	265	270
Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe			
	275	280	285
Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Val Val Lys			
	290	295	300
Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met			
305	310	315	320
Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn			
	325	330	335
Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Leu Arg Leu His Trp Arg Pro Ser			
	340	345	350
His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly			
	355	360	365
Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys			
	370	375	380

<210> 50

<211> 1179

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 50

```

atggagacca ctgtcggggc tctgggtgag aataccacag acaccttcac cgacttcttt 60
tctgactctg atggccatga agcccaaacc ggctcgttac cattcacttt cagctacggt 120
gactatgaca tgcccctgga tgaagaggaa gatgtgacca attctcggac tttctttgct 180
gccaagattg tcattggcat ggcttttggtg ggtatcatgc tagtgtgtgg catcggaac 240
ttcatcttta tcaactgccct ggcccgcctac aaaaagctcc gcaacctcac caacctgctt 300
atcgccaacc tggccatttc agacttcctc gtggccatcg tgtgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggcgccca gctctcctgg gagcatggtc atgtcctgtg cgctctgtc 420
aactacttgc gtaccgtctc cctctacgtc tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480
gacaggatct tggccattgt gcacccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacagccgcc 540
ggcctgatct tcctgggtgtg gtcagtatcc atcctcatcg ccattccagc tgcctacttc 600
accactgaga ccgtgctggt catcgtggag agacaggaga agatcttctg tggtcagatc 660
tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggtttt cggcctcgag 720
ttcgtgggccc ccgtagtcgc catgaccttg tgctatgcca ggggtgtccc ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tgccaggctt ccagacagag cagatccgcc ggacgggtgcg ctgccgccgc 840
aggacgggtgc tggggctcgt gtgcgtcctc tctgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900
tatggcttca ctatcgtgcg tgacttcttc ccctccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcaccgcct tctatgtggt ggagtgcac gccatgagca acagcatgat caatacgtc 1020
tgctttgtga ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggcttcag 1080
tggagggcct ctcccagcgg gagcaaggcc agcgtgacc tcgacctcag gaccacggga 1140
atacctgcca ccgaggaggt ggactgcatc cgactgaaa 1179

```

<210> 51

<211> 1143

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 51

```

atgggacccc agaacagaaa cactagcttt gcaccagact tgaatccacc ccaagaccat 60
gtctccttaa actacagtta tggtgattat gacctcccc tgggtgagga tgaggatgtg 120
accaagacac agaccttctt tgcagccaaa attgtcattg gcgtggcact ggcaggcatc 180
atgctggtct gcggcattgg caactttgtc ttcattgctg cctcgcctcg ctacaagaag 240
ctgcgcaacc ttaccaacct cctcattgct aacctggcca tctctgactt cctgggtggcg 300
atcgtctgct gcccttttga gatggactat tatgtagtac ggcagcttcc ctgggcgcat 360
ggtcacgtgc tttgtgcctc cgtcaactac cttcgtacgg tctccctgta cgtctccacc 420
aacgctctgc tggccatcgc tattgacaga tacctcgcta ttgtccacc tttgaaacca 480
cggatgaatt atcagaccgc ttccttctcg atcgctttgg tctggatggt ctccatcctc 540

```

```

atcgctgtcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc tcgttatcgt caagaatcaa 600
gaaaaaatct tctgtgggtca gatctgggtcg gtggaccagc agctctacta caaatcctac 660
ttcctcttcg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccgtgg tcactatgac cctgtgctat 720
gccaggatct cccaagagct ctggttcaag gctgtacctg gcttccagac ggagcaaatc 780
cgcaagcggc tgcgttgccg ccgcaagaca gtgctactgc tcatgggcat cctcacagcc 840
tacgtgctgt gctgggccc gttctatggc tttaccatag tgcgagactt cttccccacg 900
gtagttgtga aggagaagca ctacctacc gccttctacg tcgtggagtg cattgccatg 960
agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacggtca agaacaacac catgaaatac 1020
ttcaagaaga tgctgcggt ccaactggcg ccctctcact acgggagtaa gtccagcgct 1080
gacctcgacc taaaaccag cgggggtgcct gccactgaag aggtggattg tatcagacta 1140
aag 1143

```

<210> 52

<211> 88

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Fragment #1, verwendet in Referenzbeispiel 1

<400> 52

```

tatggcggtg attaccggtg cgtgcgaacg tgatgtgcag tgcgggtcgg gtacctgctg 60
cgcgattagc ctgtggctgc gtggtctg 88

```

<210> 53

<211> 92

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Fragment #2, verwendet in Referenzbeispiel 1

<400> 53

```

cgtatgtgca ccccgctggg tcgtgaaggt gaagaatgcc atccgggtag ccataaagtg 60
ccgttcttcc gtaaacgtaa acatcatacc tg 92

```

<210> 54

<211> 86

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Fragment #3, verwendet in Referenzbeispiel 1

<400> 54

```
cccgtgcctg ccgaacctgc tgtgcagccg tttcccggat ggtcgttatc gttgcagcat 60
ggatctgaaa aacattaact tttagg                                     86
```

<210> 55

<211> 94

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Fragment #4, verwendet in Referenzbeispiel 1

<400> 55

```
cacatacgca gaccacgcag ccacaggcta atcgcgagc aggtacccgc accgcactgc 60
acatcacgtt cgcacgcacc ggtaatcacc gcca                               94
```

<210> 56

<211> 93

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Fragment #5, verwendet in Referenzbeispiel 1

<400> 56

```
aggcacgggc aggtatgatg tttacgttta cggaagaacg gcactttatg gctacccgga 60
tggcattctt caccttcacg acccagcggg gtg                               93
```

<210> 57

<211> 81

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Fragment #6, verwendet in Referenzbeispiel 1

<400> 57

```
gatccctaaa agttaatggt tttcagatcc atgctgcaac gataacgacc atccgggaaa 60
```

cggctgcaca gcaggttcgg c

81

<210> 58

<211> 258

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Synthetische DNA, die menschentypischen ZAQ-Liganden kodiert

<400> 58

```

gcgggtgatta ccggtgcgtg cgaacgtgat gtgcagtgcg gtgcgggtac ctgctgcgcg    60
attagcctgt ggctgcgtgg tctgcgtatg tgcacccgcg tgggtcgtga aggtgaagaa    120
tgccatccgg gtagccataa agtgccgttc ttccgtaaac gtaaacatca tacctgcccg    180
tgccctgccg acctgctgtg cagccgtttc ccggatggtc gttatcgttg cagcatggat    240
ctgaaaaaca ttaacttt                                     258

```

Patentansprüche

1. Peptid bestehend aus der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 20 oder SEQ ID NO: 21 dargestellt ist, oder ein Salz davon.
2. Peptid oder sein Salz nach Anspruch 1, das aus der in SEQ ID NO: 20 dargestellten Aminosäuresequenz besteht.
3. Peptid oder sein Salz nach Anspruch 1, das aus der in SEQ ID NO: 21 dargestellten Aminosäuresequenz besteht.
4. Polynukleotid bestehend aus einem Polynukleotid, das für das Peptid nach Anspruch 1 kodiert.
5. Polynukleotid nach Anspruch 4, das eine DNA ist.
6. DNA nach Anspruch 5, enthaltend die Basensequenz, die in SEQ ID NO: 26 oder SEQ ID NO: 27 dargestellt ist.
7. Rekombinanter Vektor enthaltend das Polynukleotid nach Anspruch 4.
8. Transformant, transformiert mit dem rekombinanten Vektor nach Anspruch 7.
9. Verfahren zur Herstellung des Peptids oder seines Salzes nach Anspruch 1, das umfasst, dass man den Transformanten von Anspruch 8 kultiviert und das Peptid nach Anspruch 1 produziert/akkumuliert.
10. Antikörper gegen das Peptid oder sein Salz nach Anspruch 1.
11. Arzneimittel umfassend das Peptid oder sein Salz nach Anspruch 1.
12. Arzneimittel nach Anspruch 11, das ein Mittel zur Vorbeugung/Behandlung einer Verdauungserkrankung ist.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1

```
      10      20      30      40      50      60
ATGGAGACCACCATGGGTTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT
M E T T M G F M D D N A T N T S T S F L

      70      80      90     100     110     120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCATTCAACTTCAGCTACAGC
S V L N P H G A H A T S F P F N F S Y S

      130     140     150     160     170     180
GACTATGATATGCCTTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATTCAGGACGTTCTTTGCT
D Y D M P L D E D E D V T N S R T F F A

      190     200     210     220     230     240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAC
A K I V I G M A L V G I M L V C G I G N

      250     260     270     280     290     300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC
F I F I A A L V R Y K K L R N L T N L L

      310     320     330     340     350     360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGTCTGCTGCCCTTTGAGATG
I A N L A I S D F L V A I V C C P F E M

      370     380     390     400     410     420
GACTACTATGTGGTGGCCAGCTCTCCTGGGAGCAGGCCACGTCCTGTGCACCTCTGTC
D Y Y V V R Q L S W E H G H V L C T S V
```

Fig.2

```

      430      440      450      460      470      480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N Y L R T V S L Y V S T N A L L A I A I

      490      500      510      520      530      540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTCCCAAACAGCCACT
D R Y L A I V H P L R P R M K C Q T A T

      550      560      570      580      590      600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCCTACTTC
G L I A L V W T V S I L I A I P S A Y F

      610      620      630      640      650      660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTCGGCCAGATC
T T E T V L V I V K S Q E K I F C G Q I

      670      680      690      700      710      720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W P V D Q Q L Y Y K S Y F L F I F G I E

      730      740      750      760      770      780
TTCGTGGGCCCCGTGGTCACCATGACCCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCGGGAGCTCTGG
F V G P V V T M T L C Y A R I S R E L W

      790      800      810      820      830      840
TTCAAGGCGGTCCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F K A V P G F Q T E Q I R K R L R C R R

      850      860      870      880      890      900
AAGACGGTCCTGCTGCTCATGTGCATCCTCACCCTACGTGCTATGCTGGCGGCCCTTC
K T V L V L M C I L T A Y V L C W A P F

```

Fig.3

```

      910      920      930      940      950      960
TACGGCTTCACCATCGTCCGCGACTTCTTCCCCACCGTGTTCGTGAAGGAGAAGCACTAC
Y G F T I V R D F F P T V F V K E K H Y

      970      980      990      1000      1010      1020
CTCACTGCCCTTCTACATCGTCGAGTGCATCGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
L T A F Y I V E C I A M S N S M I N T L

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
C F V T V K N D T V K Y F K K I M L L H

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
W K A S Y N G G K S S A D L D L K T I G

      1150      1160      1170      1180      1190
ATGCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
M P A T E E V D C I R L K *
```

Fig.4

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT
M E T T M G F M D D N A T N T S T S F L

      70      80      90      100     110     120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCCATTCAACTTCAGCTACAGC
S V L N P H G A H A T S F P F N F S Y S

      130     140     150     160     170     180
GACTATGATATGCCCTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATCCAGGACGTTCTTTGCT
D Y D M P L D E D E D V T N S R T F F A

      190     200     210     220     230     240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAC
A K I V I G M A L V G I M L V C G I G N

      250     260     270     280     290     300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC
F I F I A A L V R Y K K L R N L T N L L

      310     320     330     340     350     360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGCTGCTGCCCCCTTTGAGATG
I A N L A I S D F L V A I V C C P F E M

      370     380     390     400     410     420
GACTACTATGTGGTGGCCAGCTCTCCTGGGAGCACGGCCAGTCCTGTGCACCTCTGTC
D Y Y V V R Q L S W E H G H V L C T S V

```

Fig.5

```

      430      440      450      460      470      480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N Y L R T V S L Y V S T N A L L A I A I

      490      500      510      520      530      540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTGCCAAACAGCCACT
D R Y L A I V H P L R P R M K C Q T A T

      550      560      570      580      590      600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCTACTTC
G L I A L V W T V S I L I A I P S A Y F

      610      620      630      640      650      660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTGCGGCCAGATC
T T E T V L V I V K S Q E K I F C G Q I

      670      680      690      700      710      720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W P V D Q Q L Y Y K S Y F L F I F G I E

      730      740      750      760      770      780
TTCGTGGGCCCCGTGCTCACCATGACCCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCCGGGAGCTCTGG
F V G P V V T M T L C Y A R I S R E L W

      790      800      810      820      830      840
TTCAAGGCGGTCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F K A V P G F Q T E Q I R K R L R C R R

      850      860      870      880      890      900
AAGACGGTCCTGGTGCTCATGTGCATCCTCACCGCCTACGTGCTATGCTGGCGGCCCTTC
K T V L V L M C I L T A Y V L C W A P F

```

Fig.6

```
          910          920          930          940          950          960
TACGGCTTCACCATCGTGGCGGACTTCTTCCCCACCGTGTGTTGTGAAGGAGAAGCACTAC
Y G F T I V R D F F P T V F V K E K H Y

          970          980          990          1000          1010          1020
CTCACTGCCTTCTACATCGTCGAGTGCATCGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
L T A F Y I V E C I A M S N S M I N T L

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
C F V T V K N D T V K Y F K K I M L L H

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
W K A S Y N G G K S S A D L D L K T I G

          1150          1160          1170          1180          1190
ATGCCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
M P A T E E V D C I R L K *
```

Fig.7

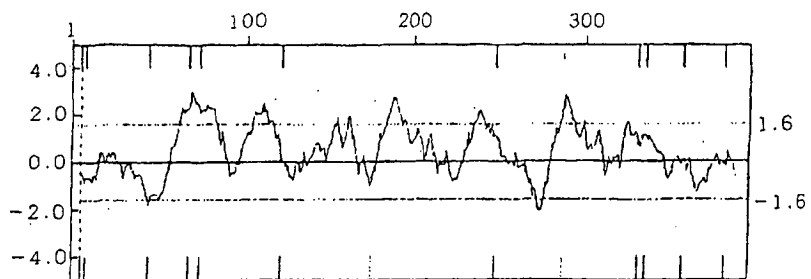


Fig.8

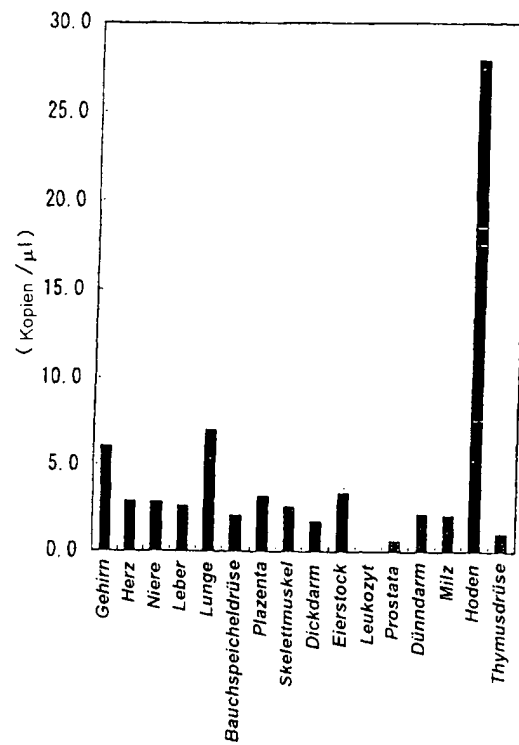


Fig.9

MIT1	AVITGACERD	LQCGKGTCCA	VSLWIKSVRV	CTPVGTSGED	CHPASHKIPF
Mensch (A-Typ)	AVITGACERD	VQCGAGTCCA	ISLWLRGLRM	CTPLGRECEE	CHPGSHKIPF
Mensch (G-Typ)	AVITGACERD	VQCGAGTCCA	ISLWLRGLRM	CTPLGRECEE	CHPGSHKVPF
MIT1	SGQRMHHTCP	CAPNLACVQT	SPKKFKCLSK		
Mensch (A-Typ)	FRKRKHHTCP	CLPNLLCSRF	PDGRYRCSMD	LKNINF	
Mensch (G-Typ)	FRKRKHHTCP	CLPNLLCSRF	PDGRYRCSMD	LKNINF	

Fig.10

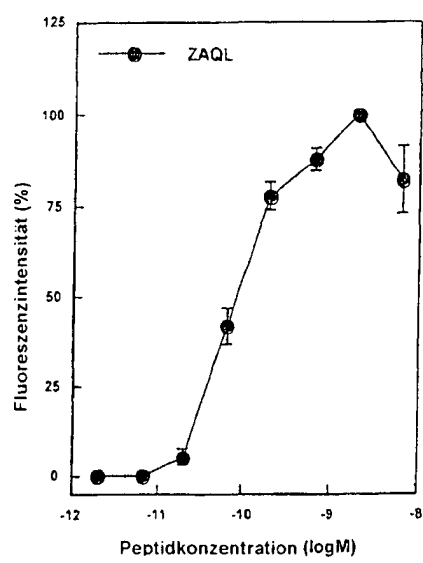


Fig.11

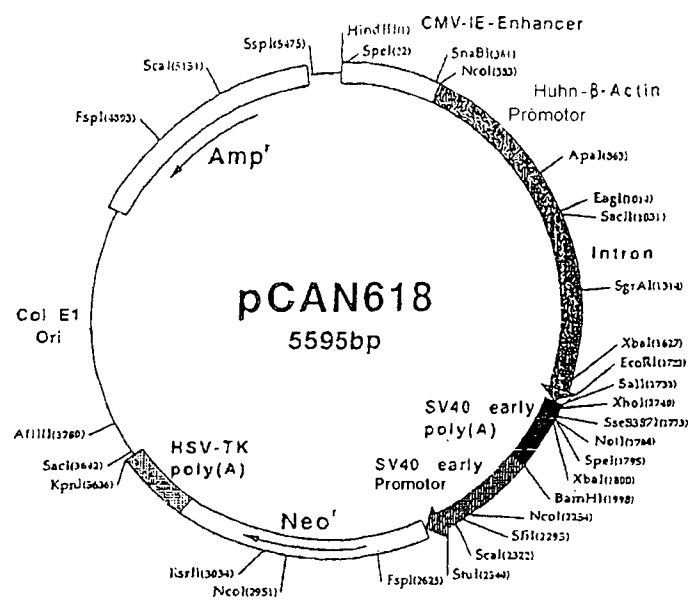


Fig.12

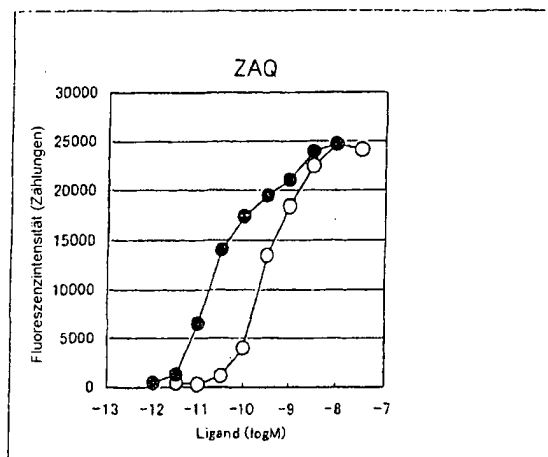


Fig.13

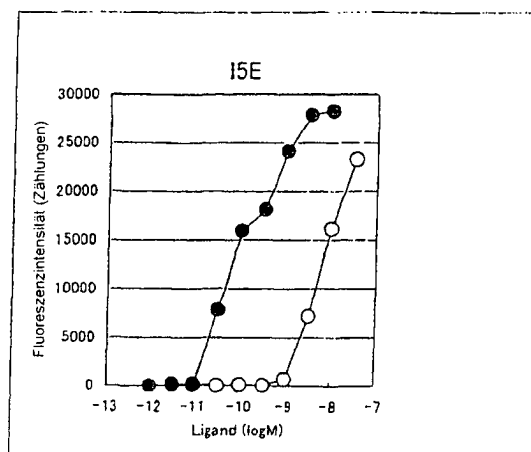


Fig.14

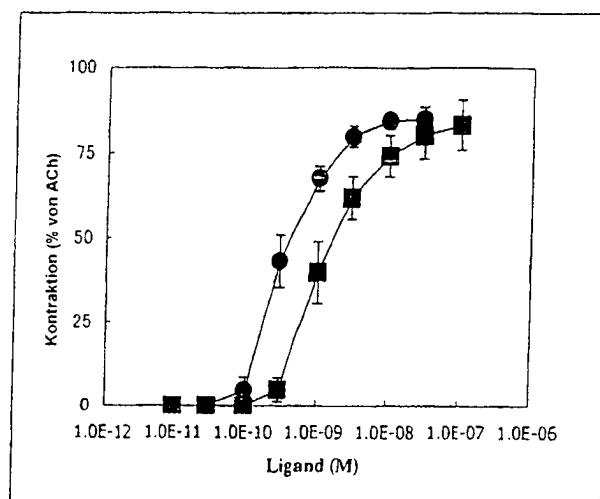


Fig.15

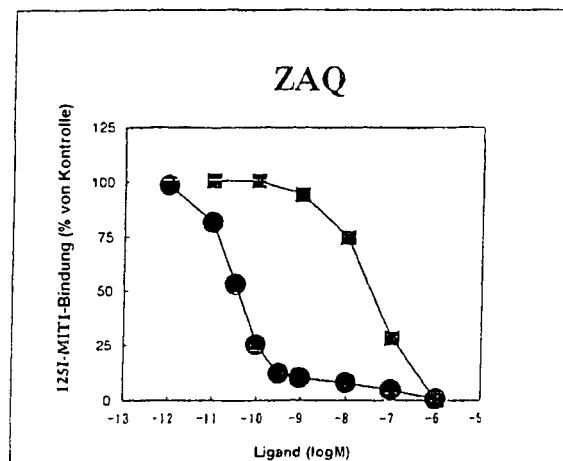


Fig.16

