

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/705

C07K 16/28 G01N 33/68

G01N 33/53 C12Q 1/68

C12N 5/10 C07K 14/72



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01806636.4

[43] 公开日 2003 年 6 月 4 日

[11] 公开号 CN 1422281A

[22] 申请日 2001.3.13 [21] 申请号 01806636.4

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 14 [33] US [31] 09/524,730

[32] 2000. 4. 11 [33] US [31] 09/546,986

[86] 国际申请 PCT/US01/08020 2001.3.13

[87] 国际公布 WO01/68704 英 2001.9.20

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.16

[71] 申请人 图拉莱克公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 斯科特·鲍尔斯 杨建新

吉恩·库尔特

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 5 页 说明书 55 页 序列表 3 页
附图 3 页

[54] 发明名称 新型 G 蛋白偶联受体

[57] 摘要

本发明提供了在乳腺癌细胞中扩增的四种新型 G 蛋白偶联受体的分离的核酸和氨基酸序列、针对这些受体的抗体、检测这些核酸和受体的方法以及筛选 G 蛋白偶联受体的调节剂的方法。

样品		DNA拷贝
DUKE乳腺癌		GPCR3
d47	90-325	10.2
d45	90-183	8.2
d99	96-194	7.8
d152	93-627	7
d164	90-282	7
d88	89-173	6.6
d25	88-595	5.9
d140	89-892	5
d113	95-246	5
d39	89-754	4.7
d27	88-647	4.4
d58	90-964	3.7
d80	94-804	2.7
发生次数		15%
乳腺癌细胞系		
bre1	ala 8	2.2
bre3	8T474	3.4
bre25	MDA-MB-453	3
bre31	ZR-75-1	6.3
发生次数		14%

1. 编码 G 蛋白偶联受体多肽的分离的核酸，由所述核酸编码的所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 有 70% 以上的氨基酸同一性。

2. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸编码了与多克隆抗体特异性结合的多肽，所述多克隆抗体针对氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 而产生。

3. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸编码具有 G 蛋白偶联受体活性的多肽。

4. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸编码含有氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 的多肽。

5. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸含有核苷酸序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:7。

6. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸是来自人、小鼠或大鼠。

7. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸通过在严格杂交条件下与和选自下组引物对相同序列特异性杂交的引物扩增：

ATGTTGGGGAACGTCGCCATC (SEQ ID NO:9) 和
TCATCCACAGAGCCTCCAGAT (SEQ ID NO:10)；

ATGGGAAAGGACAATCCAGTT (SEQ ID NO:11) 和
CTAAGAGAGTAACTCCAGCAA (SEQ ID NO:12)；

ATGGAAATAGCCAATGTGAGTTC (SEQ ID NO:13) 和
TAAATTTGCGCCAGCTTGCCTG (SEQ ID NO:14) ;
和

5 ATGGTGAGACATACCAATGAGAG (SEQ ID NO:15) 和
CATAAAATATTTACTCCCAGAGCC (SEQ ID NO:16) 。

8. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸编码约介于 25-
35kDa 或约介于 32-42kDa 分子量的多肽。

10

9. 编码 G 蛋白偶联受体多肽的分离的核酸，其中所述核酸在严
格杂交条件下与具有核苷酸序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID
NO:5 或 SEQ ID NO:7 的核酸特异性杂交。

15

10. 编码 G 蛋白偶联受体多肽的分离的核酸，由所述核酸编码的
所述多肽与具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6
或 SEQ ID NO:8 的多肽有约 70% 以上的氨基酸同一性，其中所述核酸
在适度严格杂交条件下与核苷酸序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ
ID NO:5 或 SEQ ID NO:7 选择性杂交。

20

11. 分离 G 蛋白偶联受体多肽，所述多肽包含与氨基酸序列 SEQ
ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 有约 70% 以
上的氨基酸序列同一性。

25

12. 权利要求 11 所述的分离多肽，其中所述多肽与针对 SEQ ID
NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 产生的多克隆抗
体特异性结合。

30

13. 权利要求 11 所述的分离多肽，其中所述多肽具有 G 蛋白偶
联受体活性。

14. 权利要求 11 所述的分离多肽，其中所述多肽具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8。
- 5 15. 权利要求 11 所述的分离多肽，其中所述多肽来自人、大鼠或小鼠。
16. 与权利要求 11 所述的多肽选择性结合的抗体。
- 10 17. 含有权利要求 1 所述的核酸的表达载体。
18. 用权利要求 17 所述的载体转染的宿主细胞。
19. 鉴定调节信号转导的化合物的方法，所述方法包括下列步骤：
15 (i) 将化合物与和氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 有 70% 以上氨基酸序列同一性的多肽接触；和
 (ii) 确定化合物对多肽的功能效应。
- 20 20. 权利要求 19 所述的方法，其中所述多肽具有 G 蛋白偶联受体的活性。
21. 权利要求 19 所述的方法，其中所述多肽与固相连接。
- 25 22. 权利要求 21 所述的方法，其中所述多肽与固相共价连接。
23. 权利要求 19 所述的方法，其中所述功能效应的确定是测定胞内 cAMP、IP3 或 Ca²⁺ 的变化。
- 30 24. 权利要求 19 所述的方法，其中所述功能效应是化学效应。

25. 权利要求 19 所述的方法，其中所述功能效应是物理效应。

5 26. 权利要求 19 所述的方法，其中所述功能效应的确定是检测化合物与多肽的结合。

27. 权利要求 19 所述的方法，其中所述多肽是重组的。

10 28. 权利要求 19 所述的方法，其中所述多肽来自大鼠、小鼠或人。

29. 权利要求 19 所述的方法，其中所述多肽含有氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8。

15 30. 权利要求 19 所述的方法，其中所述多肽在细胞或细胞膜中表达。

31. 权利要求 30 所述的方法，其中所述细胞是真核细胞。

20 32. 治疗癌症的方法，所述方法包括将癌细胞与治疗有效量的抗体接触的步骤，所述抗体与和氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 有 70% 以上氨基酸同一性的多肽特异性结合。

25 33. 权利要求 34 所述的方法，其中所述抗体与和氨基酸序列 SEQ ID NO:6 有 70% 以上氨基酸同一性的多肽特异性结合。

30 34. 治疗癌症的方法，所述方法包括将含有 G 蛋白偶联受体的癌细胞与治疗有效量化合物接触的步骤，所述化合物采用权利要求 19 所述的方法鉴定。

35. 权利要求 34 所述的方法，其中所述癌是乳腺癌。

36. 权利要求 34 所述的方法，其中所述化合物是多肽拮抗剂，
5 所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO:6 有 70% 以上的氨基酸同一性。

37. 检测人组织中存在 BCA-GPCR 核酸或多肽的方法，所述方法包括下列步骤：

(i) 分离生物样品；

10 (ii) 将生物样品与和 BCA-GPCR 核酸或多肽选择性相关的 BCA-GPCR 特异试剂接触； 和

(iii) 检测与样品选择性相关的 BCA-GPCR 特异试剂的水平。

15 38. 权利要求 37 所述的方法，其中所述 BCA-GPCR 特异试剂选自：BCA-GPCR 特异抗体、BCA-GPCR 特异寡核苷酸引物和 BCA-GPCR 特异核酸探针。

39. 权利要求 37 所述的方法，其中所述组织是乳腺癌组织。

20

40. 制备 G 蛋白偶联受体多肽的方法，所述方法包括从含有编码所述多肽的核酸的重组表达载体中表达所述多肽的步骤，其中所述多肽的氨基酸序列包含与具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 的多肽有约 70% 以上的氨基酸同一性。

25

41. 制备包含 G 蛋白偶联受体多肽的重组细胞的方法，所述方法包括用含有编码多肽的核酸的表达载体转导细胞的步骤，其中所述多肽的氨基酸序列与具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 的多肽有约 70% 以上的氨基酸同一性。

30

新型 G 蛋白偶联受体

5 相关申请参考

本申请要求 2000 年 3 月 14 日递交的 USSN09/524, 730 的权益，在此以其全文引作参考。

关于根据联邦政府资助的研发项目提出的发明权的声明

10 非适用

发明领域

本发明提供了在乳腺癌细胞中扩增的四种新型 G 蛋白偶联受体的分离的核酸和氨基酸序列、针对这些受体的抗体、检测这些核酸和受体的方法以及筛选 G 蛋白偶联受体的调节剂的方法。

发明背景

G 蛋白偶联受体是间接地将胞外信号转导给下游效应物的细胞表面受体，这些效应物可以是胞内的信号蛋白、酶或通道，然后，这些效应物活性的变化介导了随后的细胞事件。受体和下游效应物的相互作用是 G 蛋白介导的，G 蛋白是结合 GTP 的异源三体蛋白。G 蛋白偶联受体(“GPCR”)通常具有七个跨膜区以及胞外区和 C 末端的胞质尾区。这些受体形成了相关受体分子大的超家族，这些受体分子在许多信号过程，如感觉传导和激素信号转导中起关键作用。例如，嗅觉 GPCR 的大家族已经得到鉴定(参见，例如 Buck 和 Axel, Cell 65: 175-187 (1991)。进一步鉴定 GPCR 对于理解正常的信号转导过程以及它参与的病理过程是重要的。例如，GPCR 可以用于疾病的诊断和药物的发现。所以进一步鉴定新型 GPCR 是非常有趣的。

30 发明概述

本发明首次提供了编码 G 蛋白偶联受体的四种新型核酸，所述 G 蛋白偶联受体在乳腺癌细胞中扩增和/或过度表达。这些核酸和它们编码的多肽称为“乳腺癌扩增 G 蛋白偶联受体”或“BCA-GPCR”，即“BCA-GPCR-1”、“BCA-GPCR-2”、“BCA-GPCR-3”和“BCA-GPCR-4”。这些 BCA-GPCR 是细胞中信号转导途径成分，可以用于诊断癌症，特别是乳腺癌，以及用于治疗化合物的筛选分析，例如用于治疗癌症。例如，针对 BCA-GPCR-3 的抗体和拮抗物可以用于癌症的治疗。

10 在一个方面，本发明提供了编码 G 蛋白偶联受体多肽的分离的核酸，由所述核酸编码的所述多肽含有与氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 有 70% 以上的氨基酸同一性。

15 在另一方面，本发明提供了编码 G 蛋白偶联受体多肽的分离的核酸，其中该核酸在严格杂交条件下与具有核苷酸序列 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 的核酸特异性杂交。

20 在另一方面，本发明提供了编码 G 蛋白偶联受体多肽的分离的核酸，由所述核酸编码的所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 的多肽有约 70% 以上的氨基酸同一性，其中该核酸在适度严格杂交条件下与核苷酸序列 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 选择性杂交。

25 在另一方面，本发明提供了含有编码本发明 G 蛋白偶联受体的分离的核酸的表达载体以及含有该表达载体的宿主细胞。

30 在一个实施方案中，核酸含有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 的核苷酸序列。在另一实施方案中，该核酸来自人、小鼠或大鼠。在另一个实施方案中，该核酸通过在严格杂

交条件下与和选自下组的引物对相同的序列特异性杂交的引物扩增：

ATGTTGGGGAACGTCGCCATC (SEQ ID NO: 9) 和

TCATCCACAGAGCCTCCAGAT (SEQ ID NO: 10) ；

ATGGGAAAGGACAATCCAGTT (SEQ ID NO: 11) 和

5 CTAAGAGAGTAACTCCAGCAA (SEQ ID NO: 12) ；

ATGGAAATAGCCAATGTGAGTTC (SEQ ID NO: 13) 和

TAAATTTGCGCCAGCTTGCCTG (SEQ ID NO: 14) ；

和

ATGGTGAGACATACCAATGAGAG (SEQ ID NO: 15) 和

10 CATAAAATATTTACTCCCAGAGCC (SEQ ID NO: 16)

在另一方面，本发明提供了分离 G 蛋白偶联受体多肽，该多肽含有与氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 有约 70% 以上的氨基酸序列同一性。

15

在一个实施方案中，该多肽与针对 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 或它们的免疫原部分所产生的多克隆抗体特异性结合。在另一个实施方案中，多肽是来自人、大鼠或小鼠。在另一个实施方案中，多肽具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 或它们的免疫原部分。

20

在一个实施方案中，多肽具有 G 蛋白偶联受体的活性。

在另一方面，本发明提供了与分离 G 蛋白偶联受体多肽结合的抗体，该多肽包含与氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 有约 70% 以上的氨基酸序列同一性。

25

在另一方面，本发明提供鉴定调节 BCA-PCR 的信号转导的化合物的方法，该方法包括如下步骤：(i)将化合物与多肽接触，所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID

30

NO: 8 有 70% 以上的氨基酸序列同一性；和(ii)在多肽的基础上确定化合物的功能效应。

5 在一个实施方案中，多肽与固相连接。在另一个实施方案中，多肽与固相共价连接。

10 在一个实施方案中，通过检测胞内 cAMP、IP3 或 Ca^{2+} 的变化确定功能效应。在另一个实施方案中，功能效应是化学效应或物理效应。在另一个实施方案中，功能效应是通过检测化合物和多肽的结合来确定的。

在一个实施方案中，多肽是重组的。在另一个实施方案中，多肽是在细胞或细胞膜例如真核细胞或细胞膜中表达的。

15 在另一个方面中，本发明提供了治疗癌症的方法，所述方法包括下列步骤：将癌细胞与治疗有效量的经如上所述的方法鉴定的化合物接触。

在一个实施方案中，癌是乳腺癌。

20

在另一个实施方案中，化合物是多肽的拮抗剂，所述多肽具有与氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 有 70% 以上的氨基酸同一性。

25 在另一个方面中，本发明提供了治疗癌症的方法，该方法包括下列步骤：将癌细胞与治疗有效量的抗体接触，所述抗体与多肽特异性结合，所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 有 70% 以上的氨基酸同一性。

30 在一个实施方案中，抗体与多肽特异性结合，所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 有 70% 以上的氨基酸同一性。

在另一方面中，本发明提供了在人组织中检测 BCA-GPCR 核酸或多肽存在的方法，该方法包括下列步骤：(i)分离生物样品，(ii)将生物样品与选择性结合 BCA-GPCR 核酸或多肽的 BCA-GPCR 特异试剂接触；和(iii)检测选择性结合样品的 BCA-GPCR 特异试剂的水平。

在一个实施方案中，BCA-GPCR 特异试剂选自下组：BCA-GPCR 特异抗体、BCA-GPCR 特异寡核苷酸引物和 BCA-GPCR 特异核酸探针。

在另一个实施方案中，组织是乳腺癌组织。

在另一方面，本发明提供了制备 G 蛋白偶联受体多肽的方法，该方法包括下列步骤：从含有编码该多肽的核酸的重组表达载体中表达多肽，其中多肽的氨基酸序列与具有氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 的多肽有约 70% 以上的氨基酸同一性。

在另一方面，本发明提供了制备含有 G 蛋白偶联受体多肽的重组细胞的方法，该方法包括下列步骤：用含有编码多肽核酸的表达载体转导细胞，其中多肽的氨基酸序列与具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 的多肽有约 70% 以上的氨基酸同一性。

附图简述

图 1：BCA-GPCR-3 基因拷贝扩增的乳腺癌肿瘤和细胞系；

图 2：在乳腺癌细胞系中 BCA-GPCR-3 mRNA 过度表达；

图 3：在乳腺癌细胞系中 BCA-GPCR-3 mRNA 过度表达的定量数据。

30

发明详述

前言

本发明第一次提供了编码四种新型 G 蛋白偶联受体的核酸。这些核酸和他们编码的受体分别命名为 BCA-GPCR-1、2、3 和 4。这些 BCA-GPCR 是信号转导途径的成分，并且与乳腺癌细胞中扩增的基因组区域相关。这些核酸对于鉴定乳腺癌细胞提供了有价值的探针，因为这些核酸在某些乳腺癌细胞中特异性扩增，或是非常靠近(在 100kb 内)或是在乳腺癌细胞中特异性扩增和/或过度表达的区域。可以用如逆转录和 mRNA 扩增、总 RNA 或 poly A⁺ RNA 的分离、RNA 印迹法、斑点印迹法、原位杂交、核糖核酸酶保护、SI 消化、探测 DNA 微芯片阵列等技术来鉴定编码本发明 BCA-GPCR 的核酸。

这些基因在染色体上的座位已经确定，所有四个基因都定位在染色体 1q44 上，方向如下：从着丝粒端开始，5'到 3'链：BCA-GPCR-1(3'-5'方向)；约 40kb；BCA-GPCR-2(5'-3'方向)；约 40kb；BCA-GPCR-3,(3'-5'方向)；约 60kb；BCA-GPCR-4(5'-3'方向)，在端粒端结束。这些编码人 BCR-GPCR 的基因可以用于鉴定由 BCA-GPCR 引起并相关的疾病、突变和特征，如癌症，例如乳腺癌。本发明的 BCA-GPCR 也用于癌症的诊断，尤其是乳腺癌的诊断。

20

新型 BCA-GPCR 的分离提供了测试和鉴定 G 蛋白偶联受体信号转导的调节剂的方法，这些调节剂例如激活剂、抑制剂、刺激剂、增强子、激动剂和拮抗剂。这些信号转导的调节剂可以用于信号途径的药物调节，例如，在癌细胞如乳腺癌中。用 BCA-GPCR 鉴定的激活剂和抑制剂也可以用于进一步研究信号转导。所以，本发明提供了信号转导调节的分析，其中 BCA-GPCR 在调节剂对信号转导的效应中充当直接或间接的报道分子。BCA-GPCR 可以用于体外和体内的分析，例如用于检测 GPCR 转录激活的变化、配体结合、磷酸化和脱磷酸化、GPCR 与 G 蛋白的结合、G 蛋白的激活、调节分子结合、电压、膜位和电导变化、离子流通量、细胞内第二信使如 cAMP 和肌醇三磷

30

酸的变化、细胞内钙水平的变化和神经递质的释放。

5 分析信号转导的调节剂的方法包括体外配体结合分析，该分析利用了 BCA-GPCR、其部分如胞外结构域或含有一种或多种 GPCR 结构域的嵌合蛋白、天然存在的或重组的卵母细胞 GPCR 的表达或组织培养细胞 GPCR 表达、天然存在或重组的 GPCR 的膜表达、GPCR 的组织表达、转基因动物中的 GPCR 的表达等。

10 从功能上来说，BCA-GPCR 代表了 G 蛋白偶联受体家族的七个跨膜的 G 蛋白偶联受体，他们与 G 蛋白相互作用以介导信号转导(参见，例如 Fong, Cell Signal 8: 217(1996); Baldwin, Curr. Opin. Cell Biol. 6: 180(1994))。编码 BCA-GPCR 的基因是在染色体 1q44 上，并且与在乳腺癌细胞中扩增的区域相关。

15 从结构上来说，人 BCA-GPCR-1 的核苷酸序列(参见，例如 SEQ ID NO: 1)编码分子量预测约为 31kDa 和预测范围为 26-36kDa 的多肽(参见，例如 SEQ ID NO: 2)。来自其他种类的相关 GPCR-1 基因在至少 25 个氨基酸长度，或者 50-100 个氨基酸长度的氨基酸区域应该享有至少约 70%的氨基酸同一性。

20

本发明也提供了在 SEQ ID NO: 1 中描述的 BCA-GPCR-1 的多态变体：变体#1，其中在从甲硫氨酸开始的氨基酸位置 7，用亮氨酸取代亮氨酸残基；变体#2，其中在从甲硫氨酸开始的氨基酸位置 142，用天冬氨酸残基取代谷氨酸残基；和变体#3，其中在从甲硫氨酸开
25 始的氨基酸位置 6，用甘氨酸残基取代丙氨酸残基。

从结构上来说，人 BCA-GPCR-2 的核苷酸序列(参见，例如 SEQ ID NO: 3)编码了分子量预测约 37kDa 和预测范围为 32-42kDa 的多肽(参见，例如 SEQ ID NO: 4)。来自其他种类的相关 BCA-GPCR-2 基因在
30 至少约 25 个氨基酸长度或者 50-100 个氨基酸长度的氨基酸区域应该

享有至少约 70%的氨基酸同一性。BCA-GPCR-2 在 15%的原发性乳腺癌和肿瘤细胞系中扩增了至少约 2-3 倍。

5 本发明也提供了 SEQ ID NO: 4 中描述的 BCA-GPCR-2 的多态变体：变体 #1，其中在氨基酸位置 9 用异亮氨酸残基取代亮氨酸残基；变体 #2，其中在氨基酸位置 19 用谷氨酸残基取代天冬氨酸残基；和变体 #3，其中在氨基酸位置 6 用甘氨酸残基取代丙氨酸残基。

10 从结构上来看，人 BCA-GPCR-3 的核苷酸序列(参见，例如在胎盘和睾丸中表达的 SEQ ID NO: 5)编码了分子量预测约为 37kDa 和预测范围为 32-42kDa 的多肽(参见，例如 SEQ ID NO: 6)。来自其他种类的相关 BCA-GPCR-3 基因在至少约 25 个氨基酸长度或者 50-100 个氨基酸长度的氨基酸区域应该享有至少约 70%的氨基酸同一性。BCA-GPCR-3 在约 15%的原发性乳腺癌和肿瘤细胞系中扩增至少约 3-7 倍
15 (参见图 1)。另外，在两个已扩增和未扩增肿瘤的乳腺癌细胞系中 BCA-GPCR-3 mRNA 的水平提高了(参见图 2-3)。

20 本发明也提供了 SEQ ID NO: 6 中描述的 BCA-GPCR-3 的多态变体：变体 #1，其中在氨基酸位置 8 用异亮氨酸残基取代亮氨酸残基；变体 #2，其中在氨基酸位置 73 用谷氨酸残基取代天冬氨酸残基；和变体 #3，其中在氨基酸位置 7 用甘氨酸残基取代丙氨酸残基。

25 从结构上来看，人 BCA-GPCR-4 的核苷酸序列(参见，例如 SEQ ID NO: 7)编码了分子量预测约 37kDa 和预测范围为 32-42kDa 的多肽(参见，例如 SEQ ID NO: 8)。来自其他种类的相关 BCA-GPCR-4 基因在至少约 25 个氨基酸长度或者 50-100 个氨基酸长度的氨基酸区域应该享有至少约 70%的氨基酸同一性。BCA-GPCR-4 在 15%的原发性乳腺癌和肿瘤细胞系中扩增了至少约 2-3 倍。

30 本发明也提供了 SEQ ID NO: 8 描述的 BCA-GPCR-4 的多态变体：

变体#1, 其中在氨基酸位置 7 用异亮氨酸残基取代亮氨酸残基; 变体#2, 其中在氨基酸位置 13 用天冬氨酸残基取代谷氨酸残基; 和变体#3, 其中在氨基酸位置 10 用甘氨酸残基取代丝氨酸残基。

5 可以用 BCA-GPCR 核苷酸和氨基酸序列的特异区域鉴定多态变体、种间同系物和 BCA-GPCR 的等位基因。鉴定可以在体外进行, 例如在严格杂交条件下或 PCR(利用与 SEQ ID NO: 1、3、5 和 7 杂交的引物, 例如 SEQ ID NO: 9-16)和测序, 或利用计算机系统将序列信息和其他核苷酸序列进行比较。通常, BCA-GPCR 的多态变体和等位
10 基因的鉴定是通过比较约 25 个氨基酸或更多, 例如 50-100 个氨基酸的氨基酸序列来进行的。氨基酸的同一性至少约为 70%或以上, 或者 75%、80%、85%或 90-95%或以上通常可证明蛋白是 BCA-GPCR 的多态变体、种间同系物或等位基因。序列比较可以利用如下所述的 BLAST 和 BLAST2.0 序列比较算法和缺省参数来进行。与 BCA-GPCR
15 或其保守区特异性结合的抗体也可以用于鉴定等位基因, 种间同系物和多态变体。多态变体、等位基因和种间同系物预料保留七个 G 蛋白偶联受体的跨膜结构。

20 BCA-GPCR 核苷酸和氨基酸序列的信息也可用于计算机系统中构建 BCA-GPCR 模型。这些模型随后用于鉴定可以激活和抑制 BCA-GPCR 的化合物。这些调节 BCA-GPCR 活性的化合物可用于研究 BCA-GPCR 在信号转导中的作用。

定义

25 “BCA-GPCR”和“BCA-GPCR-1、2、3 或 4”指新型 G 蛋白偶联受体, 定位于染色体 1q44 并且与在乳腺癌细胞中扩增的染色体区域相关的基因。本发明的 BCA-GPCR 具有七个跨膜区并具有“G 蛋白偶联受体活性”, 例如, 它们应答胞外刺激而结合 G 蛋白和通过刺激下游效应物如磷脂酶 C 和腺苷酸环化酶来促进第二信使如 IP₃、cAMP
30 和 Ca²⁺的生产(GPCR 结构和功能的描述参见, 例如 Fong,同上和

Baldwin, 同上)。

5 从拓扑学上看, BCA-GPCR 具有 N 末端“胞外结构域”、含有 7 个跨膜区和对应胞质和胞外环的“跨膜结构域”以及 C 末端的“胞质结构域”(参见, 例如 Buck 和 Axel, Cell 65: 175-187(1991))。这些结构域可以用本领域技术人员已知的方法, 如鉴定疏水和亲水区域的序列分析程序来鉴定(参见, 例如 Kyte 和 Doolittle, J. Mol. Biol. 157: 105-132(1982))。这些结构域可以用于制备嵌合蛋白和本发明的体外分析。

10 “胞外结构域”是指从细胞膜中突出并且经常与细胞外配体结合的 BCA-GPCR 结构域。该结构域经常用于可溶和固相的体外配体结合鉴定。

15 “跨膜结构域”包括七个跨膜区, 外加对应的胞质和胞外环。跨膜结构域的某些区域也可能参与配体的结合。

“胞质结构域”指在第 7 个跨膜区后突入细胞质并且连续到多肽 C 末端 BCA-GPCR 中的结构域。

20 “GPCR 活性”是指 GPCR 转导信号的能力。此活性可以例如在异源细胞中通过将 GPCR(或嵌合 GPCR)与 G 蛋白和下游效应物如 PLC 偶联, 然后检测胞内钙水平的增加来检测(参见, 例如 Offermans 和 Simon, J. Biol. Chem. 270: 15175-15180(1995))。利用荧光 Ca^{2+} 指示染料和荧光计成象, 通过记录 $[Ca^{2+}]$ 中配体诱导的变化可有效检测受体的活性。

25 术语“BCA-GPCR”和“BCA-GPCR-1、2、3 或 4”是指多态变体、等位基因、突变体和种间同系物及其 BCA-GPCR 结构域, 它们(1)与 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8, 在约 25 个氨基酸优选 50-100 个氨基酸的窗口上约有 70% 的氨基酸序列同一性, 优选约 75、80、85、90 或

95%或更高的氨基酸序列的同一性；(2)与针对免疫原产生的抗体结构，所述免疫原含有 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 的氨基酸序列及其保守修饰变体；或(3)在严格杂交条件下与序列 SEQ ID NO: 1、3、5 或 7 及其保守修饰变体特异性杂交(大小至少为 100, 优选至少约 500 或 1000 个核苷酸)。该术语也称为如上所述的 BCA-GPCR 结构域，或含有与异源蛋白连接的 BCA-GPCR 结构域的融合蛋白。

“宿主细胞”是含有表达载体并且支持表达载体复制或表达的天然存在的细胞或转化细胞。宿主细胞可以是培养细胞、外植体、体内细胞等。宿主细胞可以是原核细胞如大肠杆菌，或真核细胞如酵母、昆虫、两栖动物或哺乳动物细胞如 CHO、Hela 等。

本发明所用的“生物样品”是指含有新型 BCA-GPCR 核酸或多肽的生物组织或流体的样品。这些样品包括但不限于从人、小鼠和大鼠中分离的组织。生物样品也可包括组织切片如为组织学目的而取出的冷冻切片。生物样品通常获自真核生物，如昆虫、原生动、鸟类、鱼类、爬行动物，和优选哺乳动物如大鼠、小鼠、牛、狗、豚鼠或兔，以及最优选灵长类动物如黑猩猩或人。优选的组织包括例如正常的前列腺上皮组织、胎盘和睾丸组织。

短语“功能效应”在测试调节 BCA-GPCR 介导的信号转导的化合物实验中包括确定间接或直接受到 BCA-GPCR 影响的任何参数，例如功能性、物理或化学效应。其包括配体结合、离子流通量的变化、膜电位、电流、转录、G 蛋白结合、基因扩增、癌细胞中的表达、GPCR 的磷酸化或脱磷酸化、信号转导、受体-配体的相互作用、体外、体内和离体的第二信使浓度(例如 cAMP、cGMP、IP₃ 或胞内 Ca²⁺)，也可以包括其他生理效应如神经递质或激素释放的增加或降低。

“确定功能效应”是指分析化合物的效应，所述化合物增加或减少直接或间接受到 BCA-GPCR 影响的参数，如功能效应、物理效

应和化学效应。这些功能性效应可以用本领域技术人员已知的方法测定，如利用光谱特征的变化(如荧光、吸光率、折射率)、流体动力学(如形态)、色谱或溶解特性、膜片钳、电压敏感染料、全细胞电流、放射性同位素流、可诱导标记、BCA-GPCR 转录激活、配体结合分析、电压、膜电位和电导率变化、离子流通量分析、胞内第二信使如 cAMP 和肌醇三磷酸(IP3)的变化、胞内钙水平的变化、神经递质的释放等。

BCA-GPCR 的“抑制剂”、“激活剂”和“调节剂”交互使用，意指经过对信号转导采用体外和体内测定所鉴定的抑制、激活或调节的分子，例如配体、激动剂、拮抗剂和它们的同系物和模拟物。抑制剂是例如结合、部分或全部阻断刺激、降低、预防、延迟活化、失活、脱敏或负调节信号转导的化合物，如拮抗剂。激活剂是例如结合、刺激、增加、打开、激活、促进、增强活化、致敏或上调节信号转导的化合物，如兴奋剂。调节剂包括例如改变多肽与胞外蛋白相互作用的化合物，所述胞外蛋白结合激活剂或抑制剂、G 蛋白、G 蛋白 α 、 β 和 γ 亚基以及激酶。调节剂也包括经遗传修饰的 BCA-GPCR 版本，例如具有活性改变以及天然发生和合成配体、拮抗剂、激动剂、抗体、化学小分子等的 BCA-GPCR。对抑制剂和激活剂的这些分析包括例如，在细胞或细胞膜中体外表达 BCA-GPCR，利用公认的调节剂化合物，然后如上所述确定对信号转导的功能效应。

含有 BCA-GPCR 的样品或分析，经潜在激活剂、抑制剂或调节剂处理后，与没有抑制剂、激活剂或调节剂的对照样品比较，从而检测抑制程度。将对照样品（未用抑制剂处理）的相对 BCA-GPCR 活性值赋值 100%。当 BCA-GPCR 活性值相对于对照约为 80%，优选 50%，更优选 25-0%时，实现 BCA-GPCR 的抑制。当 BCA-GPCR 活性值相对于对照（未用激活剂处理）为 110%，更优选 150%，更优选 200-500%（即相对于对照高出 2-5 倍）或更优选 1000-3000%以上时，实现 BCA-GPCR 的活化。

30

术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯”是指实质上或基本上没有如天然状态所发现的通常相伴的成分的物质。纯度和同质性的确定通常采用分析化学技术，如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高压液相色谱。存在于制剂中的优势种类蛋白是基本纯的。具体而言，分离的 BCA-GPCR 核酸从位于 BCA-GPCR 基因侧翼并编码除 BCA-GPCR 以外的蛋白的可读框中分离。术语“纯化的”表示核酸或蛋白在电泳凝胶中基本产生一条带。具体地，其表示核酸或蛋白的纯度至少 85%，优选至少 95% 以及最优选至少 99%。

“生物活性的” BCA-GPCR 指如上所述的具有信号转导活性和 G 蛋白偶联受体活性的 BCA-GPCR。

“核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸或核糖核酸及其多聚体。该术语包括含有已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或键的核酸，其可以是合成、天然存在和非天然存在，与标准核酸具有相似的结合特性，并且以与标准核苷酸相似的方式代谢。这些类似物的例子包括但不限于硫代磷酸酯、磷酸酰胺、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸盐、2-O-甲基核糖核苷酸、肽核酸（PNA）。

除非另有所指，特定核酸序列也暗含其保守修饰的变体（如简并密码子替换）和互补序列，以及明示的序列。具体而言，通过生成序列可实现简并密码子替换，在所述序列中，一个或多个选定的（或全部）密码子的第 3 个位置用混合的碱基和/或脱氧肌苷残基替换（Batzer 等，*Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991)；Ohtsuka 等，*J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985)；Rossolini 等，*Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)）。术语核酸可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸交互使用。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本发明中可交互使用，用来指氨基酸残基的多聚体。这些术语适用于这样的氨基酸多聚体，即其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟

物，以及适用于天然存在的氨基酸多聚体和非天然存在的氨基酸多聚体。

5 术语“氨基酸”指天然存在和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来经修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构的一些化合物，即与氢结合的 α 碳、羧基基团、氨基基团和 R 基团，如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这些类似物具有修饰的 R 基团（如正亮氨酸）或修饰的肽主链，但保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指其结构与氨基酸一般化学结构不同，但其作用方式类似于天然存在的氨基酸的一些化合物。

15 氨基酸在本发明中可参照共知的三字母符号或参照用 IUPAC-IUB 生化命名委员会建议的单字母符号。同样，核苷酸也可以参照普遍接受的单字母密码表示。

20 “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定核酸序列，保守性修饰变体是指那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸，或者指基本相同的核酸序列，如果该核酸不编码氨基酸序列。由于遗传密码简并，很多功能性相同的核酸编码任何给定的多肽。例如，密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码丙氨酸。因此，在每个由密码子所规定的丙氨酸的位置上，可将密码子改变成任何所述的对应密码子，而不改变所编码的多肽。这些核酸变化称为“沉默替换”或“沉默变异”，其是一类“保守性修饰变异”。本发明所述的每个编码多肽的多核苷酸序列也描述每种可能的沉默变异，除了另有标注以外。因此，沉默替换是每个编码氨基酸的核酸序列暗含的特征。专业技术人员将认识到通过标准技术将核酸中各个密码子（除了通常是甲硫氨酸的唯一密码子 AUG 和色氨酸的唯一密码子 TGG 以外）可经

25

30

修饰产生功能性相同的分子。因此，编码多肽的核酸的各个沉默变异在各个描述的序列中是暗含的。

5 至于氨基酸序列，专业技术人员将认识到核酸、肽、多肽或蛋白质序列中个别替换、缺少或添加，可变更、添加或缺失编码序列中单一氨基酸或小百分比的氨基酸，是保守性修饰变体，其中变更导致用化学相似的氨基酸替换某种氨基酸。保守替换表提供了功能相似的氨基酸，为本领域所熟知。这些保守修饰变体除上述之外，不排除本发明的多态变体、种内同系物以及等位基因。

10

下列 8 组中每组都含有对另一氨基酸是保守替换的氨基酸：

- 1) 丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)；
 - 2) 天门冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)；
 - 3) 天门冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)；
 - 15 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)；
 - 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V)；
 - 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)；
 - 7) 丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)；以及
 - 8) 半胱氨酸 (C)、甲硫氨酸 (M)
- 20 (参见，如 Creighton, Proteins (1984))。

根据各层次结构，可描述如多肽结构的大分子结构。对此结构的综述，参见，如 Alberts 等，Molecular Biology of the Cell (第 3 版，1994) 以及 Cantor 和 Schimmel，Biophysical Chemistry Part I: The
25 Conformation of Biological Macromolecules (1980)。“一级结构”指特定肽的氨基酸序列。“二级结构”指多肽内局部有序的三维结构。这些结构通常被认作结构域。结构域是形成多肽的紧密单元多肽部分，长度通常有 25—约 500 个氨基酸。典型的结构域由次级结构如 β -折叠和 α -螺旋部分组成。“三级结构”指多肽单体完整的三维结构。
30 “四级结构”指由独立的三级单元非共价缔合组成的三维结构。各向

异性术语也称为能量术语。

5 “标记”或“可检测部分”是可通过分光镜、光化学、生物化学、免疫化学或化学方法检测的组合物。例如，有用的标记包括 ^{32}P 、荧光染料、电子密试剂、酶（如在 ELISA 中通常所用的酶）、生物素、地高辛配基或肝素和可检测 ant 或 7 的蛋白，如将放射性标记掺入所述肽，并用于检测与所述肽特异性反应的抗体。

“标记核酸探针或寡核苷酸”是一种通过接头或化学键共价结合，或通过离子、范德华、静电或氢键非共价与标记结合的核酸或寡核苷酸，这样通过检测与探针结合的标记的存在就可检测探针的存在。

15 如本发明所用的“核酸探针或寡核苷酸”定义为通过一种或多种类型的化学键，通常互补碱基配对或形成氢键，能够与互补序列的靶核酸结合的核酸。如本发明所用的探针可包括天然碱基（即 A、G、C 或 T）或修饰碱基（7-脱氮鸟苷、肌苷等）。此外，探针中的碱基可通过除磷酸二酯键以外的键连接，只要其不干扰杂交。因此，例如，探针可以是肽核酸，其中组成型碱基通过肽键连接而非以磷酸二酯键连接。本领域专业技术人员将会理解，探针可与探针序列缺乏完全互补性的靶序列结合，取决于杂交条件的严格性。探针任选直接标记，如用同位素、生色团、发光团、色原标记，或间接标记，如采用后来可与链亲和素复合体结合的生物素标记。通过对探针存在与否的分析，人们可检测选择序列或亚序列的存在与否。

25

术语“重组”当用于涉及例如细胞或核酸、蛋白或载体时表示细胞、核酸、蛋白或载体已被异源核酸或蛋白的导入或天然核酸或蛋白的变更所修饰，或表示细胞是经过如此修饰的细胞衍生来的。因此，例如重组细胞表达细胞的天然（非重组）形式中未发现的基因，或者表达那些异常表达、低水平表达或根本不表达的天然基因。

30

术语“异源”当用于有关核酸部分时表示核酸包含两种或更多种自然界中相互之间未发现关系相同的亚序列。例如，通常核酸经重组产生，具有两种或更多种来自不相关基因的序列，这些不相关基因排列成新的功能性核酸，例如来自一种源的启动子和来自另一种源的编码区。同样，异源蛋白表示蛋白包含自然界中相互之间未发现关系相同的两种或多种亚序列（如融合蛋白）。

“启动子”定义为指导核酸转录的核酸控制序列的排列。如本发明所用的启动子包括在靠近转录起始位点的必需核酸序列，例如在聚合酶 II 启动子情况下的 TATA 元件。启动子也任选包括远端的增强子或阻遏元件，其可位于距离转录起始位点多达数千个碱基对。“组成型”启动子在大多数环境和发育条件下是活泼的。“可诱导”启动子在环境或发育调节下是活泼的。术语“可操作连接”是指介于核酸表达控制序列（如启动子或转录因子结合位点的排列）和第二核酸序列之间的功能键合，其中表达控制序列指导与第二序列相对应的核酸转录。

“表达载体”是核酸构建体，由重组或合成产生，具有一系列指定核酸元件，这些元件允许特定核酸在宿主细胞中的转录。表达载体可以是质粒、病毒或核酸片段的部分。表达载体通常包括与启动子可操作连接、有待转录的核酸。

术语“相同的”或百分数的“同一性”在两种或更多种核酸或多肽序列的情况下，指两种或更多种序列或亚序列是相同的，或具有规定百分数的相同氨基酸残基或核苷酸（即当在比较窗口和指定区域上对最大对应性进行比较和序列对比时，在指定区域上有约 70%同一性，优选 75%、80%、85%、90%或 95%同一性，正如利用 BLAST 或 BLAST2.0 序列比较算法和下述的缺省参数或通过手工对比和肉眼观察所测定。这些序列可以说是“基本相同的”。该定义也指测试序

列的补码 (compliment)。此定义还包括具有缺失和/或添加的序列，以及那些具有替换的序列。如下所述，优选算法可说明间隙等。同一性优选存在于长度至少约 25 个氨基酸或核苷酸的区域，更优选在长度为 50-100 个氨基酸或核苷酸的区域上。

5

对于序列比较，通常把一种序列充当标准序列来比较测试序列。当利用序列比较算法时，将测试和标准序列都输入计算机，如果需要，设定亚序列座标，然后设定序列算法程序参数。可采用缺省的程序参数，或者设定选择参数。然后，序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于标准序列的序列同一性百分数。

10

如本发明所用，“比较窗口”包括涉及任何一个数目的邻接位置的区段，数目选自 20-600，通常约 50-约 200，更通常是约 100-约 150，其中在两个序列最佳对比后，可将一个序列与相同数目邻接位置的标准序列比较。序列对比比较方法是本领域熟知的。通过 Smith 和 Waterman 在 *Adv. Appl. Math.* 2: 482(1981)中的局部同源性算法、Needleman 和 Wunsch 在 *J. Mol. Biol.* 48: 443(1970)中的同源性序列对比算法、Pearson 和 Lipman 在 *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444(1988)中的相似性方法的研究、这些算法的计算机化实施(威斯康星遗传基因软件包 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)或通过手工对比和肉眼观察(参见，例如 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 等编, 1995 年增刊)，可以进行最佳序列对比比较。

15

20

25

适于确定序列同一性和序列相似性百分数的算法的优选例子是 BLAST 和 BLAST2.0 算法，其在 Altschul 等, *Nuc. Acids Res.* 25: 2389-3402 (1977)和 Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)中分别有描述。采用 BLAST 和 BLAST 2.0 以及本发明所述的参数对本发明的核酸和蛋白的序列同一性百分数进行确定。BLAST 分析的软件可以公开地从国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology

30

Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到。该算法包括通过鉴定欲查询序列中的短长度 W 字码首先鉴定高得分序列对(HSP), 与数据库序列中相同长度的字码进行对比时, 它们可匹配或满足一些正的阈值分 T 。 T 称为邻近字码得分阈值 (Altschul 等, 同上)。这些初始邻近字码命中作为起始检索的种子以发现含有它们的更长的 HSP。字码命中可沿着各个序列在两个方向上延伸, 直到累积对比得分增加。对于核苷酸序列, 累积得分可以利用参数 M (匹配残基对的奖分; 总是大于 0) 和 N (错配残基的罚分; 总是小于 0) 来计算。对于氨基酸序列, 采用得分矩阵计算累积得分。当累积对比得分以数量 X 从其最大获得值下降时; 当由于积累了一个或多个负的得分残基对比, 累积得分趋向零或以下时; 或当每个序列达到终点时, 各方向的字码命中就暂时终止。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 决定了序列对比的敏感性和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 采用字码长度 (W) 11、期望值 (E) 10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 作为缺省参数, 并比较两条链。对于氨基酸序列, BLASTP 程序采用字码长度 3 和期望值 (E) 10 作为缺省参数, 以及 BLOSUM62 得分矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)) 采用对比 (B) 50、期望值 (E)、10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 作为参数, 并比较两条链。

BLAST 算法也进行两个序列之间相似性的统计分析 (参见, 例如 Karlin 和 Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993))。由 BLAST 算法提供的相似性的一个测量值是最小概率和 ($P(N)$), 其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间匹配偶然出现的概率的指征。例如, 如果在测试核酸和标准核酸的比较中, 最小概率和小于约 0.2, 更优选小于约 0.01, 最优选小于约 0.001, 那么该核酸就可视为与标准序列相似。

有用算法的另一个例子是 PILEUP。PILEUP 利用了渐进式成对的序列对比, 从一组相关序列产生多个序列对比以表明相互的关系和序列同一性百分数。PILEUP 还绘出了世系图或树状图 (dendogram),

表示用于产生序列对比的成簇关系。PILEUP 简化了 Feng 和 Doolittle 在 *J. Mol. Evol.*, 35: 351-360(1987)中所述的渐进式序列对比方法。该方法与 Higgins 和 Sharp 在 *CABIOS* 5: 151-153(1989)中所述的方法相似。该程序可以对比多至 300 个序列，每个序列最大长度为 5000 个核苷酸或氨基酸。多重序列对比程序是从两个最相似的序列成对对比开始的，产生了两个已对比序列的簇。然后将这簇与下一个最相关序列或已对比序列的簇进行对比。通过两个单个序列成对对比的简单延伸可以对比两个序列簇。通过一系列渐进式成对序列对比可以完成最后的对比。通过设定序列比较区域指定的序列和它们的氨基酸或核苷酸座标和设定程序参数可以运行程序。利用 PILEUP，将标准序列和其他测试序列比较，可以确定序列同一性关系百分数，其中利用了下面的参数：缺省间距权值(3.00)、缺省间距长度权值(0.10)和权值末端间距。PILEUP 可以从 GCG 序列分析软件包例如 7.0 版本得到 (Devereaux 等, *Nuc. Acids Res.*, 12: 387-395(1984))。

15

两个核酸序列或多肽基本相同的指征如下文所述是由第一核酸编码的多肽可以与针对由第二核酸编码的多肽所产生的抗体发生免疫交叉反应。所以，这个多肽通常与第二多肽基本相同，例如两个肽只有靠保守取代来区别。两个核酸序列基本相同的另一个指征是两个分子或它们的互补分子在严格条件下相互杂交，如下文所述。两个核酸序列基本同源的另一个指征是可以利用相同的引物扩增序列。

20

短语“选择性（或特异性）杂交”指分子在严格杂交条件下只与特定核苷酸序列结合、转接或杂交，当该序列以复合体混合物（如总细胞或文库 DNA 或 RNA）存在时。

25

短语“严格杂交条件”通常是指在核酸复合体混合物中，探针与其靶亚序列杂交而不与其他序列杂交的条件。严格条件取决于序列，并且在不同环境下有所区别。序列越长，特异性杂交的温度越高。在 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization*

30

with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993) 中可以找到核酸杂交的详尽的指南。一般而言, 在规定的离子强度和 pH 下, 所选择的严格条件比特异序列的热熔点 (T_m) 低约 5-10°C。 T_m 是指在探针与靶序列杂交平衡时有 50% 的探针与靶互补 (在规定离子强度、pH 和核酸浓度下) 的温度 (靶序列过量存在, 在 T_m 杂交平衡时, 有 50% 的探针被占用)。严格条件是在 pH7.0-8.3 时, 盐浓度小于约 1.0M 钠离子, 通常约 0.01 到 1.0M 钠离子浓度 (或其他盐), 以及对于短探针 (例如 10-50 个核苷酸) 温度至少约 30°C, 对于长探针 (例如大于 50 个核苷酸) 至少约 60°C。严格条件也可加入去稳定试剂如甲醛来达到。对于选择性或特异性杂交, 阳性信号至少两倍于背景, 任选 10 倍于背景杂交。严格杂交条件的例子如下: 50% 甲醛、5×SSC 和 1% SDS, 42°C 温育, 或 5×SSC、1% SDS, 65°C 温育, 并用 0.2×SSC 和 0.1% SDS, 65°C 洗涤。

15

如果核酸所编码的多肽基本相同, 那么在严格条件下该核酸仍然是基本同源的, 它们相互不发生杂交。例如, 当采用遗传密码允许的最大密码子简并性创建核酸拷贝时, 就会出现这种情形。在这些情况中, 核酸通常在适度严格杂交条件下杂交。“适度严格杂交条件”的例子包括在 40% 甲醛、1M NaCl、1% SDS 的缓冲液中 37°C 杂交, 以及用 1×SSC 45°C 洗涤。阳性杂交至少两倍于背景。普通技术人员将容易地认识到选择性杂交和洗涤条件可用于提供相似严格性的条件。

20

“抗体”是指含有来自免疫球蛋白基因或其片段的框架区的多肽, 该多肽可特异性结合和识别抗原。识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区的基因以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链可分类为 κ 或 λ 。重链可分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 它们依次分别定义免疫球蛋白类别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

25

免疫球蛋白 (抗体) 结构单元的例子包括四聚体。各个四聚体由

30

两对相同的多肽链组成，每对都具有一个“轻”链（约 25kDa）和一个“重”链（约 50-70kDa）。各链的 N 末端限定了一个主要负责抗原识别的约 100-110 或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链（ V_L ）和可变重链（ V_H ）分别指这些轻链和重链。

5

抗体例如可作为完整的免疫球蛋白存在，或作为用各种肽酶消化产生的特征清晰的许多片段存在。所以，例如胃蛋白酶在绞链区中二硫键以下消化抗体以产生 $F(ab)'_2$ ， $F(ab)'_2$ 是 Fab 的二聚体，其本身是通过二硫键与 V_H-C_{H1} 连接的轻链。在温和条件下可断裂绞链区中的二硫键，还原 $F(ab)'_2$ ，从而将 $F(ab)'_2$ 二聚体转变成 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是带有部分绞链区的 Fab（参见 *Fundamental Immunology*（Paul 编，第三版，1993 年）。当各种抗体片段依据完整抗体的消化来限时，技术人员将懂得这些片段可用化学方法或采用重组 DNA 方法重新合成。因此，如本文所用的术语抗体也包括由修饰整个抗体所产生的抗体片段，或采用重组 DNA 方法重新合成的那些抗体片段（例如单链 Fv），或采用噬菌体展示文库鉴定的那些抗体片段（参见，例如 McCafferty 等，*Nature* 348: 552-554 (1990)）。

对于单克隆或多克隆抗体的制备，可以利用本领域已知的任何技术（参见，例如 Kohler 和 Milstein，*Nature* 256: 495-497 (1975)；Kozbor 等，*Immunology Today* 4: 72 (1983)；Cole 等，第 77-96 页，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)）。生产单链抗体的技术（美国专利 4,946,778）可适用于生产本发明多肽的抗体。同样，转基因小鼠或其他生物体如其他哺乳动物可用于表达人源化抗体。或者，噬菌体展示技术可用于鉴定与选定抗原特异性结合的抗体和异数的 Fab 片段（参见，例如 McCafferty 等，*Nature* 348: 552-554 (1990)；Marks 等，*Biotechnology* 10: 779-783 (1992)）。

“嵌合抗体”是抗体分子，其中(a)恒定区或其部分被改变、替代或交换，从而使抗原结合位点（可变区）连接到不同类别或改变类

30

别的恒定区、效应物官能团和/或物种上，或连接到给嵌合抗体赋予新特性的完全不同的分子上，如酶、毒素、激素、生长因子、药物等；或(b)可变区或其部分被具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替代或交换。

5

“抗-BCA-GPCR”抗体是与由 BCA-GPCR 基因、cDNA 或其亚序列编码的多肽特异性结合的抗体或抗体片段。

10

术语“免疫测定”是利用抗体特异性结合抗原的分析。免疫测定是利用特定抗体的特异性结合特性为特征来分离、靶击和/或定量抗原。

15

20

短语“特异性（或选择性）结合”抗体或“特异性（或选择性）免疫反应”当涉及蛋白或肽时，指在异源蛋白群体和其他生物制品中确定蛋白存在的结合反应。因此，在设定的免疫测定条件下，指定抗体与特定蛋白结合至少两倍于背景，并基本上不与样品中存在的其他蛋白有显著量的结合。在这些条件下，与抗体的特异性结合可要求选择对特定蛋白有特异性的抗体。例如，对特定 BCA-GPCR 产生的多克隆抗体可被选择获得只与 BCA-GPCR 而不与其他蛋白发生特异性免疫反应，除了 BCA-GPCR 的多态变体、直向同源物和等位基因之外。减去与 BCA-GPCR 分子发生交叉反应的抗体可完成这种选择。各种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白特异性免疫反应的抗体。例如，固相 ELISA 免疫测定通常用于选择与蛋白特异性免疫反应的抗体（参见，例如 Harlow 和 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), 描述了可用于确定特异免疫反应性的免疫测定形式和条件)。特异性或选择性反应通常至少两倍于背景信号或噪声，更通常是背景的 10 倍到 100 倍以上。如上所述，通过减去与来自另一物种相同的 BCA-GPCR 结合的抗体，也可制备只与特定 BCA-GPCR 直向同源物反应的抗体，所述直向同源物来自特异物种，如大鼠、小鼠或人。

30

术语“选择性相关”指核酸与如上定义的另一核酸“选择性杂交”的能力，或指抗体“选择性（或特异性）结合”蛋白的能力，如上定义。

5 编码 BCA-GPCR 核酸的分离

A. 一般重组 DNA 方法

本发明依赖于重组遗传学领域中的常规技术。基础版本公开了本发明采用的一般方法，包括 Sambrook 等，*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*（第二版，1989）；Kriegler，*Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual*（1990）；和 *Current Protocols in Molecular Biology*（Ausubel 等编，1994 年）。

对于核酸，其大小以千碱基（kb）或碱基对（bp）表示。这些大小的估计来自于琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳、测序核酸或公布的 DNA 序列。对于蛋白，大小是以千道尔顿（kDa）或氨基酸残基数表示。蛋白大小的估计来自凝胶电泳、测序蛋白、衍生的氨基酸序列或公布的蛋白序列。

根据 Beaucage 和 Caruthers 在 *Tetrahedron Letts.* 22: 1859-1862 (1981)中首先描述的固相亚磷酸胺三酯方法，采用自动合成仪可化学合成市场上不能得到的寡核苷酸，正如 Van Devanter 等在 *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984 年)中所述。通过纯聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过如 Pearson 和 Reanier 在 *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983)中所述的离子交换 HPLC 可进行寡核苷酸的纯化。

25

采用例如 Wallace 等在 *Gene* 16: 21-26 (1981)中所述的对双链模板测序的链终止方法，在克隆后可证实克隆基因和合成寡核苷酸的序列。

30 B. 分离编码 BCA-GPCR 的核苷酸序列的克隆方法

一般而言，编码 BCA-GPCR 的核酸序列和相关核酸序列同系物可通过与探针杂交从 cDNA 和基因组 DNA 文库中克隆，或采用带有寡核苷酸引物的扩增技术分离。例如，BCA-GPCR 序列通常通过与核酸探针杂交从哺乳动物核酸（基因组或 cDNA）文库中分离，所述核酸探针的序列可衍生自 SEQ ID NO: 1、3、5 或 7。BCA-GPCR 的 RNA 和 cDNA 可从中分离的合适组织包括如乳腺癌细胞、正常前列腺上皮细胞、胎盘或睾丸。

利用引物的扩增技术也可以用于从 DNA 或 RNA 中扩增和分离 BCA-GPCR 核酸。编码下面氨基酸序列的简并引物也可以用于扩增 BCA-GPCR 序列: SEQ ID NO: 9-16(参见, 例如 Dieffenbach 和 Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995))。这些引物可以用于例如扩增全长序列或一个到数百个核苷酸探针, 然后用于筛选全长 BCA-GPCR 的哺乳动物文库。

15

也可以抗体作为探针从表达文库中分离编码 BCA-GPCR 的核酸。使用序列 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 可产生这些多克隆或单克隆抗体。

使用 BCA-GPCR 核酸探针和寡核苷酸, 在严格杂交条件下, 通过筛选文库可分离与 BCA-GPCR 基因基本相同的多态变体、等位基因和种间同系物。或者, 通过采用抗 BCA-GPCR 的抗血清或纯化抗体免疫检测表达的同系物, 所述抗血清或纯化抗体也识别和选择性结合 BCA-GPCR 同系物, 利用表达文库来克隆 BCA-GPCR 多态变体、等位基因和种间同系物。

25

为了制备 cDNA 文库, 应选择富含 BCA-GPCR mRNA 的源, 例如从大脑, 或乳腺癌或肺癌细胞中分离的细胞。然后使用逆转录酶将 mRNA 制成 cDNA, 连接到重组载体上, 并转染入重组宿主中用于繁殖、筛选和克隆。制备和筛选 cDNA 文库的方法是众所周知的(参见, 例如 Gubler 和 Hoffman, Gene 25: 263-269 (1983); Sambrook 等, 同

30

上; Ausubel 等, 同上)。

5 对于基因组文库, 将 DNA 从组织或细胞中抽提出来, 通过机械剪切或酶消化产生约 12-20kb 的片段。然后梯度离心, 从不需要的大小片段中分离出所需的片段, 并且构建在 λ 噬菌体载体中。这些载体和噬菌体在体外包装。通过如 Benton 和 Davis 在 *Science* 196: 180-182 (1977)中所述的噬菌斑杂交可分析重组噬菌体。如 Grunstein 等在 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3961-3965 (1975)中通常描述的进行菌落杂交。

10

分离 BCA-GPCR 核酸及其同系物的另一种方法是将合成的寡核苷酸引物的利用和 RNA 或 DNA 模板的扩增相结合(参见, 美国专利 4,683,195 和 4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis 等编, 1990))。聚合酶链式反应(PCR)和连接酶链式反应(LCR)的方法可用于直接从 mRNA、cDNA、基因组文库或 cDNA 文库中扩增 BCA-GPCR 基因的核酸序列。使用本文提供的序列可设计简并寡核苷酸来扩增 BCA-GPCR 同系物。引物中能掺入限制性内切酶位点。聚合酶链式反应或其他体外扩增方法也可用于例如克隆编码待表达蛋白的核酸序列, 制备核酸探针, 用于检测生理样品中编码 BCA-GPCR mRNA 的存在、核酸测序或其他目的。通过 PCR 反应扩增的基因可从琼脂糖凝胶中纯化并克隆到适当的载体中。

20

BCA-GPCR 的基因表达可通过本领域已知的技术分析, 例如 mRNA 的逆转录和 PCR 扩增、总 RNA 或 poly A⁺ RNA 的分离、RNA 印迹、斑点印迹、原位杂交、核糖核酸酶保护、探针 DNA 微芯片阵列等。在一个实施方案中, 高密度的寡核苷酸分析技术(例如 GeneChipTM)用于鉴定本发明 GPCR 的同系物和多态变体。在 BCA-GPCR 与已知疾病例如癌症相连的情况下, 它们可采用 GeneChipTM 作为诊断工具以检测生物样品中的疾病, 参见, 例如 Gunthand 等, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14: 869-876 (1998); Kozal 等, *Nat. Med.* 2:

30

753-759 (1996); Matson 等, *Anal. Biochem.* 224: 110-106 (1995); Lockhart 等, *Nat. Biotechnol.* 14: 1675-1680 (1996); Gingeras 等, *Genome Res.* 8: 435-448 (1998); Hacia 等, *Nucleic Acids Res.* 26: 3865-3866 (1998)。

5 可采用合成的寡核苷酸构建重组 BCA-GPCR 基因, 用作探针或用于蛋白表达。该方法的操作采用一系列长度通常为 40-120bp 的表示基因有义和无义链的重叠寡核苷酸进行。然后将这些 DNA 片段退火、连接和克隆。或者, 利用扩增技术和精确引物扩增 BCA-GPCR 核酸的特异亚序列。然后将特异亚序列连接到表达载体中。

10

通常将编码 BCA-GPCR 的核酸在转化到原核或真核细胞用于复制和/或表达之前先克隆到中间载体上。这些中间载体通常是原核载体, 例如质粒或穿梭载体。

15

根据标准技术, 可任选制备编码包含 BCA-GPCR 或其结构域的嵌合蛋白的核酸。例如, 如配体结合结构域、胞外结构域、跨膜结构域(例如包含 7 个跨膜结构域和对应的胞外和胞质环的一种结构域)、跨膜结构域和胞质结构域、活性位点、亚基缔合区域等的结构域可共价于异源蛋白连接。例如, 胞外结构域可连接到异源 GPCR 跨膜结构域, 或异源 GPCR 胞外结构域可连接到跨膜结构域。其他选择的异源蛋白包括例如, 绿色荧光蛋白、荧光酶或 β -gal。

20

C. 原核和真核生物中表达

25

为了获得高水平表达的克隆基因或核酸, 如编码 BCA-GPCR 的 cDNA, 通常将 BCA-GPCR 序列亚克隆到表达载体中, 所述表达载体含有指导转录的强启动子、转录/翻译终止子, 以及如果核酸编码蛋白还含有用于翻译起始的核糖体结合位点。合适的细菌启动子是本领域熟知的, 并例如在 Sambrook 等和 Ausubel 等中有描述。表达 BCA-GPCR 的细菌表达系统可利用例如大肠杆菌、芽孢杆菌和沙门氏菌 (Palva 等, *Gene* 22: 229-235 (1983); Mosbach 等, *Nature* 302: 543-545 (1983))。

30

这些表达系统的试剂盒可以从市场上得到。哺乳动物细胞、酵母和昆虫细胞的真核表达系统是本领域熟知的，并且也可以从市场上得到。在一个实施方案中，真核表达载体是腺病毒载体、腺病毒相关载体或逆转录病毒载体。

5

用于指导异源核酸表达的启动子取决于特定应用。启动子任选定位在距离异源转录起始位点与其天然座位中距离转录起始位点大约相同的位置上。然而，正如本领域已知，这种距离可允许有一些变化而无需丧失启动子的功能。

10

除启动子以外，表达载体通常含有转录单位或表达盒，所述表达盒在宿主细胞中含有编码 BCA-GPCR 核酸的表达所需的所有其他元件。因此，表达盒通常含有与编码 BCA-GPCR 的核酸序列可操作连接的启动子以及含有转录物有效聚腺苷酸化、核糖体结合位点和翻译终止所需的信号。编码 BCA-GPCR 的核酸序列能与可切割的信号肽序列连接，以促进转染细胞中编码蛋白的分泌。这些信号肽还包括来自组织溶酶原激活剂的信号肽、胰岛素和神经元生长因子以及绿夜蛾 (*Heliothis virescens*) 的保幼激素酯酶。表达盒的其他元件可包括增强子，以及如果基因组 DNA 被用作结构基因，还包括带有功能拼接供体的内含子和受体位点。

15

除启动子序列以外，表达盒也应含有结构基因下游的转录终止区，以提供有效的终止。终止区可从与启动子序列相同的基因中获得，或可从不同的基因中获得。

25

用于将遗传信息输入细胞中的特定表达载体不是特别关键。可以利用在真核和原核细胞中表达的任何常规载体。标准的细菌表达载体包括质粒如以 pBR322 为基础的质粒、pSKF、pET23D，还包括融合表达系统如 GST 和 LacZ。在重组蛋白中也可以加入表位标记，以提供分离常规方法，如 c-myc。

30

通常将含有来自真核生物病毒的调节元件的表达载体用于真核表达载体中，如 SV40 载体、乳头状瘤病毒载体和衍生自 EB 病毒的载体。真核载体的其他例子包括 pMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、
5 pMAMneo-5、杆状病毒 pDSVE 和任何其他载体，所述其他载体允许在 CMV 启动子、SV40 早期启动子、SV40 晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠类乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或其他在真核细胞中显示有效表达的启动子的指导下表达蛋白。

.10

一些表达系统具有提供基因扩增的标记，如新霉素、胸腺嘧啶核苷激酶、潮霉素 B 磷酸转移酶和二氢叶酸还原酶。或者，不参与基因扩增的高产表达系统也是合适的，如在昆虫细胞中使用杆状病毒载体，其带有在多角体蛋白启动子或其他强杆状病毒启动子指导下的编码 BCA-GPCR 的序列。
15

通常包括在表达载体中的元件也包括大肠杆菌中发挥功能的复制子、编码抗生素抗性的基因以允许选择含有重组质粒的细菌，和质粒非必需区域中独特的限制位点允许插入真核序列。特定抗生素抗性基因的选择并非关键，本领域已知的许多抗性基因任何一个都合适。如果
20 需要，可以任选原核序列，这样它们就不干扰真核细胞中 DNA 的复制。

可使用标准转染方法生产细菌、哺乳动物、酵母或昆虫细胞系，所述细胞系可表达大量的 BCA-GPCR，然后采用标准技术纯化蛋白（参见，例如 Colley 等，*J. Biol. Chem.* 264: 17619-17622(1989); *Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, Vol.182* (Deutscher 编，1990 年)）。根据标准技术操作真核和原核细胞的转化（参见，例如 Morrison, *J. Bact.* 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss 和 Curtiss, *Methods in Enzymology* 101: 347-362 (Wu 等编，1983 年)）。
25
30

任何用于在宿主细胞中导入外源核苷酸序列的熟知方法都可被采用。这些方法包括使用的试剂如 Superfect (Qiagen)、脂质体、磷酸钙转染、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物、原生质体融合、电穿孔、微注射、质粒载体、病毒载体和任何其他熟知的在宿主细胞中导入克隆的基因组 DNA、cDNA、合成 DNA 或其他外源遗传物质的方法 (参见, 例如 Sambrook 等, 同上)。所用的特定遗传工程方法只需要能在表达 BCA-GPCR 的宿主细胞中成功导入至少一种基因。

在表达载体导入细胞后, 在有利于 BCA-GPCR 表达的条件下培养转染细胞, 再使用下文所鉴定的标准技术从培养物中回收 BCA-GPCR。

BCA-GPCR 的纯化

天然存在或重组的 BCA-GPCR 纯化后可用于功能分析、结合分析、诊断分析和其他应用中。天然存在的 BCA-GPCR 例如从哺乳动物组织, 如血液和淋巴组织, 或从任何其他来源的 BCA-GPCR 同系物中纯化出来。重组 BCA-GPCR 从任何适当的细菌或真核表达系统例如 CHO 细胞或昆虫细胞中纯化出来。

20

通过标准技术可将 BCA-GPCR 纯化至基本纯, 这些标准技术包括但不限于用如硫酸铵这样的物质进行选择性的沉淀、柱层析、免疫纯化方法和其他方法 (参见, 例如 Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); 美国专利 4,673,641; Ausubel 等, 同上; 和 Sambrook 等, 同上)。

25

当重组 BCA-GPCR 正被纯化时, 可使用许多方法。例如, 可将具有分子粘着特性的蛋白与 BCA-GPCR 可逆性融合。利用适当的配体, 可将 BCA-GPCR 选择性地吸附到纯化柱上, 从柱中再以相对纯的形式分离出来。然后用酶除去融合蛋白。最后使用免疫亲和柱可纯

30

化 BCA-GPCR。

A. 来自重组细胞的 BCA-GPCR 的纯化

5 通常在启动子诱导后,重组蛋白被转化的细菌或真核细胞,如 CHO 细胞或昆虫细胞,大量表达,但表达可能是组成型的。用 IPTG 诱导启动子是可诱导启动子系统的一个例子。根据本领域标准方法可使细胞生长。新鲜或冷冻细胞用于蛋白分离。

10 细菌中表达的蛋白可形成不溶的团聚体(“包含体”)。有若干方案适用于纯化 BCA-GPCR 包含体。例如,包含体的纯化通常包括细菌细胞破裂,例如在 50mM Tris/HCl pH7.5、50mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT、0.1mM ATP 和 1mM PMSF 的缓冲液中温育,然后抽提、分离和/或纯化包含体。细胞悬浮液可通过 French Press 采用 2-3 个通道裂解,用 Polytron (Brinkman Instruments) 匀浆或在冰上超声处理。
15 对本领域技术人员来说,采用任一个方法裂解细菌都是显而易见的(参见,例如 Sambrook 等,同上; Ausubel 等,同上)。

20 如果需要,包含体可被溶解,通常将裂解细胞悬浮液离心,以除去不需要的不溶物质。用配伍的缓冲液稀释或透析后可将形成包含体的蛋白复性。适当的溶剂包括但不限于脲(从约 4M 到约 8M)、甲醛(至少约 80%v/v)和盐酸胍(从约 4M 到约 8M)。由于蛋白可能不可逆变性,并伴随出现免疫原性和/或活性缺乏,因此,能溶解团聚体形成的蛋白的一些溶剂,例如 SDS(十二烷基硫酸钠)和 70%甲酸在本方法中是不适用的。虽然盐酸胍和类似试剂是变性剂,但是这种
25 变性也不是不可逆的,在去除(例如通过透析)或稀释变性剂后可发生复性,允许重新形成免疫原性和/或生物活性的蛋白。其他合适的缓冲液是本领域技术人员已知的。使用标准分离技术,例如采用 Ni-NTA 琼脂糖树脂,能将 BCA-GPCR 从其他细菌蛋白中分离出来。

30 或者,从细菌周质中纯化 BCA-GPCR 是可能的。细菌裂解后,

当把 BCA-GPCR 排出到细菌的周质中时，除了本领域技术人员已知的其他方法以外，通过冷渗透休克可分离细菌周质部分。为了从周质中分离重组蛋白，细菌细胞离心形成沉淀。在含有 20% 蔗糖的缓冲液中重悬浮沉淀。为了裂解细胞，细菌离心后将沉淀再悬浮于冰冷的 5mM MgSO₄ 并在冰浴中保持约 10 分钟。离心细胞悬浮液，倾析上清液并保存。通过本领域技术人员熟知的标准分离技术可从宿主蛋白中分离上清液中存在的重组蛋白。

B. 纯化 BCA-GPCR 的标准蛋白分离技术

10 可溶性分级分离

通常作为起始步骤，特别是如果蛋白混合物是复合体时，初始盐分级分离可从目的重组蛋白中分离出许多不需要的宿主细胞蛋白（或来源于细胞培养基的蛋白）。优选盐是硫酸铵。硫酸铵通过有效减少蛋白混合物中的水量沉淀蛋白。然后根据它们的溶解度，蛋白沉淀。蛋白越疏水，越有可能在较低的硫酸铵浓度下沉淀。方案通常包括在蛋白溶液中加入饱和硫酸铵，以使硫酸铵浓度介于 20-30% 之间。该浓度将沉淀大多数疏水蛋白。丢弃沉淀（除非目的蛋白是疏水的），再在上清液中加入硫酸铵至目的蛋白沉淀已知的浓度。然后以缓冲液溶解沉淀，如果需要，通过透析或渗滤除去过量的盐。依赖蛋白溶解度的其他方法如冷乙醇沉淀，是本领域技术人员熟知的，也可用于分级分离复合蛋白混合物。

大小差别过滤

使用超滤方法，通过孔径大小不同的膜（例如 Amicon 或 Millipore 膜），依据 BCA-GPCR 的分子量，可将其从更大和更小的蛋白中分离出来。作为第一步，将蛋白混合物通过一定孔径大小的膜超滤，此膜的截留分子量小于目的蛋白的分子量。将超滤存留液再次对膜超滤，此膜的截留分子量大于目的蛋白的分子量。重组蛋白将通过膜进入滤出液中。然后如下所述层析分离滤出液。

30

柱层析

BCA-GPCR 也可根据大小、表面静电荷、疏水性和对异源分子的亲和性从其他蛋白中分离。另外，针对蛋白所产生的抗体可以与柱基质结合，然后免疫纯化蛋白。所有这些方法都是本领域熟知的。对专业技术人员来说，层析技术可在任何规模并使用来自许多不同制造商的设备来进行是显而易见的（例如 Pharmacia Biotech）。

BCA-GPCR 的免疫检测

除了利用核酸杂交技术检测 BCA-GPCR 基因和基因表达外，技术人员也可以利用免疫测定检测 BCA-GPCR，例如，鉴定细胞，如癌细胞，特别是乳腺癌细胞，和 BCA-GPCR 的变体。免疫测定可用于定性或定量分析 BCA-GPCR。此实用技术的综述可在 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988)中找到。

A. 针对 BCA-GPCR 的抗体

与 BCA-GPCR 特异性反应的多克隆和单克隆抗体的生产方法对本领域技术人员来说是已知的（参见，例如 Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow 和 Lane, 同上; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (第二版, 1986); 以及 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975)）。这些技术包括通过从噬菌体或类似载体中的重组抗体文库中筛选抗体来制备抗体，以及通过免疫兔或小鼠来制备多克隆和单克隆抗体（参见，例如 Huse 等, *Science* 246: 1275-1281 (1989); Ward 等, *Nature* 341: 544-546 (1989)）。这些抗体可用于治疗和诊断应用，例如用于乳腺癌的治疗和/或检测中。

25

许多包含 BCA-GPCR 的免疫原可用于生产与 BCA-GPCR 特异性反应的抗体。例如，如本发明所述分离重组 BCA-GPCR 或其抗原片段。如上文所述，重组蛋白可在真核或原核细胞中表达和纯化。重组蛋白是生产单克隆或多克隆抗体的优选免疫原。或者，从本发明公开的序列衍生并与载体蛋白结合的合成肽可用作免疫原。天然存在的蛋

30

白也可以纯的或不纯的形式采用。然后将产物注射到能产生抗体的动物体内。可生成单克隆或多克隆抗体，随后用于免疫测定以检测蛋白。

5 多克隆抗体的生产方法是本领域技术人员已知的。使用标准佐剂如弗氏佐剂和标准免疫方案将蛋白免疫纯种品系的小鼠（例如 BALB/C 小鼠）或兔子。动物对免疫原制剂的免疫应答通过采集测试血并测定 BCA-GPCR 的反应性效价来监控。当所获得的针对免疫原的抗体效价适当高时，从动物中收集血液，并制备抗血清。如果需要，可进一步进行抗血清的分级分离以富集与蛋白反应的抗体（参见 Harlow 和
10 Lane，同上）。

通过各种本领域技术人员熟悉的技术可获得单克隆抗体。简而言之，从以所需抗原免疫的动物中产生的脾细胞通常与骨髓瘤细胞的融合而永生化（参见 Kohler 和 Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519
15 (1976)）。永生化的其他方法包括用 EB 病毒、致癌基因或逆转录病毒转化或其他本领域熟知的方法。为了生产对抗原所需的特异性和亲和性的抗体，筛选来自单个永生化细胞的菌落，并且由这些细胞产生的单克隆抗体的产量可通过各种技术包括给脊椎动物宿主的腹膜腔注射来提高。或者，根据 Huse 等在 *Science* 246: 1275-1281 (1989) 中概括的一般方案，通过从人 B 细胞中筛选 DNA 文库可分离编码单克隆
20 抗体或其结合片段的 DNA 序列。

收集单克隆抗体和多克隆血清，并在免疫测定中滴定免疫原蛋白，例如采用固定在固相支持物上的免疫原进行的固相免疫测定。通常，选择效价为 10^4 或更高的多克隆抗血清，采用竞争性结合免疫测定方法，测试它们针对非 BCA-GPCR 或甚至针对来自其他生物体的相关蛋白的交叉反应性。特异性多克隆抗血清和单克隆抗体通常以一定的 K_d 结合， K_d 至少约 0.1mM，更常见至少约 1 μ M，或者至少约 0.1 μ M 或更少，和任选 0.01 μ M 或更少。

30

一旦得到 BCA-GPCR 特异抗体，单个 BCA-GPCR 就可通过各种免疫测定方法进行检测。对于一般免疫测定的综述，也参见 *Methods in Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai 编 1993)；*Basic and Clinical Immunology* (Stites 和 Terr 编，第 7 版，1991 年)。另外，
5 本发明的免疫测定可用于若干结构的任一结构的检测。这些在 *Enzyme Immunoassay* (Maggio 编，1980)；以及 Harlow 和 Lane，同上中有广泛综述。

B. 免疫结合测定

10 利用众多熟知的免疫结合测定法中的任一种，可检测和/或定量 BCA-GPCR (参见，例如美国专利 4,366,241；4,376,110；4,517,288 和 4,837,168)。对于一般免疫测定的综述可以参见 *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, 第 37 卷(Asai 编, 1993 年); *Basic and Clinical Immunology* (Stites 和 Terr 编, 第 7 版, 1991 年)。免疫学结合
15 测定(或免疫测定)通常利用与选择的蛋白或抗原特异性结合的抗体(在此情况下是 BCA-GPCR 或其抗原亚序列)。抗体(例如抗-BCA-GPCR)可采用本领域技术人员许多已知方法的任一种和如上所述方法生产。

免疫测定也经常利用标记介质来特异性结合和标记由抗体和抗原形成的复合体。标记介质本身可以是含有抗体/抗原复合体的一个部分。因此，标记介质可以是标记的 BCA-GPCR 或标记的抗-BCA-GPCR
20 抗体。或者，标记介质可以是第三部分，如与抗体/BCA-GPCR 复合体特异性结合的第二抗体 (第二抗体通常是特异于衍生第一抗体的物种的抗体)。能特异性结合免疫球蛋白恒定区的其他蛋白如蛋白 A 或
25 蛋白 G 也可用作标记介质。这些蛋白与来自各种物种的免疫球蛋白恒定区表现出强的非免疫原反应性 (参见，例如 Kronval 等, *J. Immunol.* 111: 1401-1406 (1973); Akerstrom 等, *J. Immunol.* 135: 2589-2542 (1985))。标记介质可用可检测部分如生物素进行修饰，生物素可特异性结合另一分子如链亲和素。各种可检测部分是本领域技术人员熟
30 知的。

测定全程中，在试剂各个结合后，都需要温育和/或洗涤步骤。温育步骤的时间可从约 5 秒到几小时内变化，任选从约 5 分钟到约 24 小时。然而，温育时间将根据测定形式、抗原、溶液体积、浓度等发生变化。测定一般在室温下进行，尽管它们可在如 10℃到 40℃的温度范围进行。

非竞争测定形式

检测样品中 BCA-GPCR 的免疫测定可以是竞争性的也可以是非竞争性的。非竞争免疫测定是直接测定抗原量的测定。在一个优选“三明治”的测定中，例如抗-BCA-GPCR 抗体可直接与固体底物结合，并固定在其上。这些固定的抗体捕获测试样品中存在的 BCA-GPCR。因此，固定的 BCA-GPCR 被如携有标记的第二 BCA-GPCR 抗体的标记介质结合。或者，第二抗体可缺少标记，但它可依次被标记的第三抗体结合，所述第三抗体特异于衍生第二抗体物种的抗体。第二或第三抗体通常用可检测部分如生物素修饰，而生物素又与另一分子如链亲和素特异性结合从而提供可检测部分。

竞争测定形式

在竞争测定中，通过测定已知的加入（外源）BCA-GPCR 与抗-BCA-GPCR 抗体的结合被样品中存在的未知 BCA-GPCR 所取代（竞争占用）的量，可间接检测样品中存在的 BCA-GPCR 量。在一个竞争测定中，样品中加入已知量的 BCA-GPCR，然后将样品与和 BCA-GPCR 特异性结合的抗体接触。与抗体结合的外源 BCA-GPCR 量与样品中存在的 BCA-GPCR 浓度成反比。在特定的优选实施方案中，抗体固定于固相底物上。通过测定 BCA-GPCR/抗体复合体中存在的 BCA-GPCR 量，或者通过测定剩余未复合的蛋白量可以确定与抗体结合的 BCA-GPCR 量。通过提供标记 BCA-GPCR 分子可检测 BCA-GPCR 量。

30

半抗原抑制测定是另一优选的竞争测定。在此测定中，将已知 BCA-GPCR 固定在固相基质上。样品中加入已知量的抗-BCA-GPCR 抗体，然后将样品与固定的 BCA-GPCR 接触。与已知固定的 BCA-GPCR 结合的抗-BCA-GPCR 抗体量与样品中存在的 BCA-GPCR 量成反比。

5 通过检测抗体的固定部分或溶液中剩余的抗体部分可再次检测固定抗体的量。如果抗体是标记的，可直接检测，或者通过如上文所述的随后加入与抗体特异性结合的标记部分进行间接检测。

交叉反应性的确定

10 以竞争结合形式的免疫测定也可用于交叉反应性的确定。例如，可将至少部分由 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 编码的蛋白固定于固相支持物上。将与固定抗原竞争结合抗血清的蛋白（例如 BCA-GPCR 和同系物）加入到测定中。把外加蛋白与固定化蛋白竞争结合抗血清的能力和由 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 编码的 BCA-GPCR 与自身竞争的能力比较。

15 利用标准算法计算上面蛋白的交叉反应性的百分数。选择与上面列出的各个外加蛋白交叉反应性小于 10% 的抗血清并合并。通过用外加假定的蛋白例如远缘相关的同系物进行免疫吸附可从合并的抗血清中任选除去交叉反应的抗体。

20 然后将免疫吸附和合并的抗血清用于如上所述竞争结合的免疫测定中，从而把认为也许是 BCA-GPCR 的等位基因或多态变体的第二蛋白与免疫原蛋白（即 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 的 BCA-GPCR）进行比较。为了进行此比较，在宽范围的浓度下分别测定两个蛋白，并确定抑制 50% 的抗血清与固定蛋白结合所需的各个蛋白量。如果抑制

25 50% 的结合所需的第二蛋白量比抑制 50% 的结合所需的由 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 编码的蛋白量小 10 倍，那么就说第二蛋白与针对 BCA-GPCR 免疫原所产生的多克隆抗体特异性结合。

其他测定形式

30 蛋白质印迹(免疫印迹)分析可用于检测和定量样品中 BCA-GPCR

有些测定形式不需要使用标记成分。例如凝集测定可用于检测靶抗体的存在。在此情况下，抗原包被的颗粒为包含靶抗体的样品所凝集。以此形式，没有成分需要标记，靶抗体的存在通过简单的肉眼观察进行检测。

5

对 BCA-GPCR 调节剂的测定

A. 对 BCA-GPCR 活性的测定

BCA-GPCR 和它们的等位基因和多态变体是参与信号转导并且与乳腺癌细胞中扩增的区域相关的 G 蛋白偶联受体。BCA-GPCR 多肽的活性可以利用各种体外和体内试验来评估，以确定功能性、化学和物理效应，例如测定配体结合(例如放射性配体结合)、第二信使(例如 cAMP、cGMP、IP₃、DAG、或 Ca²⁺)、离子流通量、磷酸化水平、转录水平、神经递质水平等。另外，这些测定可用于测试 BCA-GPCR 的抑制剂和激活剂。调节剂还可以是 BCA-GPCR 遗传上改变的版本。本发明用于鉴定调节剂的筛选测定可用作治疗化合物，例如针对 BCA-GPCR 的抗体和 BCA-GPCR 活性的拮抗剂。

15

20

25

该测定中的 BCA-GPCR 选自具有序列 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 的多肽或其保守修饰的变体。或者，该测定的 BCA-GPCR 将从真核生物中衍生并且包括与 SEQ ID NO: 1-2 或 7 具有氨基酸序列同一性的氨基酸亚序列。通常，氨基酸序列同一性至少是 70%，任选至少是 85%，任选至少是 90-95%。或者，该测定的多肽任选包括 BCA-GPCR 的结构域，如胞外结构域、跨膜结构域、胞质结构域、配体结合结构域、亚基结合结构域、活性位点等。BCA-GPCR 或其结构域可以与异源蛋白共价连接，产生用于如本发明所述测定中的嵌合蛋白。

30

采用如上所述的 BCA-GPCR 多肽测试 BCA-GPCR 活性的调节剂，BCA-GPCR 多肽或是重组或是天然存在的。蛋白可被分离并在细胞、从细胞衍生的膜、组织或动物中表达，所述蛋白或是重组或是天然存在的。例如，可以利用乳腺癌细胞、正常前列腺上皮细胞、胎盘、

色标记，如胶体金或有色玻璃或塑料珠（例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等）。

5 根据本领域熟知的方法，标记可直接或间接与测定所需的成分偶联。如上所示，可使用多种标记，标记选择依据所要求的灵敏度、与化合物结合容易程度、稳定性要求、可用仪器和防护条件。

10 非放射性标记通常用间接方法附着。配体分子（例如生物素）一般与分子共价结合。然后配体与另一分子（例如链亲和素）结合，此分子或是固有可检测的，或与信号系统如可检测酶、荧光化合物或化学发光化合物共价结合。配体及其靶可与识别 BCA-GPCR 的抗体或识别抗-BCA-GPCR 的第二抗体以任意适当组合方式使用。

15 这些分子也可以例如通过与酶或荧光团结合直接与产生信号的化合物结合。作为标记的目的酶主要是水解酶，具体是磷酸酶、酯酶和糖苷酶，或氧化酶，尤其是过氧化物酶。荧光化合物包括荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮等。化学发光化合物包括荧光素和 2,3-二氢二氮杂萘酮（dihydrophthalazinediones），例如发光氨。可利用的各种标记或信号产生系统的综述参见美国专利
20 4,391,904。

检测标记的方法是本领域技术人员熟知的。因此，例如当标记是放射性标记时，检测的方法包括闪烁计数器或放射自显影中的光学胶片。当标记是荧光标记时，可通过用适当波长的光激发荧光染料并检测产生的荧光。荧光检测可通过肉眼、照相胶片方法、电子检测器如
25 电荷偶联装置(CCD)或光电倍增管等进行。通过给酶提供合适的底物并检测形成的反应产物可相似地检测酶标记。最后，通过观察与标记相关的颜色可容易地检测简单的比色标记。因此，在各种量尺的测定中，结合金经常显示粉红色，而不同的结合珠显示不同的珠的颜色。

30

的存在。此技术一般包括通过凝胶电泳根据分子量分离样品蛋白，将分离的蛋白转移到适当的固相支持物上（如硝酸纤维素滤膜、尼龙滤膜或衍生的尼龙滤膜），和把样品和特异性结合 BCA-GPCR 的抗体一起温育。抗-BCA-GPCR 抗体在固相支持物上与 BCA-GPCR 特异性结合。这些抗体可直接标记，或者可随后采用与抗-BCA-GPCR 抗体特异性结合的标记抗体（例如，标记的羊抗小鼠抗体）进行检测。

其他测定形式包括脂质体免疫测定（LIA），其采用设计成结合特异分子（例如抗体）并释放胶囊化的试剂或标记的脂质体。然后根据标准技术检测释放的化学成分（参见 Monroe 等，*Amer. Clin. Prod. Rev.* 5: 34-41(1986)）。

非特异性结合的减少

本领域技术人员懂得通常理想的是使免疫测定中的非特异结合最小化。具体而言，当测定包括固定于固相基质上的抗原或抗体时，需要使与基质非特异结合的量最小化。减少这种非特异结合的方法是本领域技术人员熟知的。该技术通常包括用蛋白组合物包被基质。具体而言，广泛使用蛋白组合物，如牛血清白蛋白（BSA）、无脂奶粉和明胶，以奶粉最优选。

20

标记

只要不显著干扰测定中所用的抗体的特异性结合，测定中所用的特定标记或可检测基团不是本发明的关键方面。可检测基团可以是具有可检测物理或化学特性的任何物质。这些可检测标记已在免疫测定领域发展成熟，一般而言，这些方法中有用的大多数标记都可适用于本发明。因此，标记是通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电、光或化学方法可检测的任何组合物。本发明中有用的标记包括磁珠（例如 DYNABEADS™）、荧光染料（例如异硫氰酸荧光素、Texas 红、罗丹明等）、放射性标记（例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）、酶（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其他 ELISA 中常用的酶），以及比

30

5 睾丸组织、转化细胞或膜。利用一种如本文所述的体外或体内测定可以测试调节。利用嵌合分子，如与异源信号转导结构域共价连接的受体胞外结构域、或与受体的跨膜和/或胞质结构域共价连接的异源胞外结构域，也可在体外用可溶性或固态反应检测信号转导。还可以检测基因扩增。另外，目的蛋白的配体结合结构域可以在体外用于可溶或固态反应中，从而测定配体结合。

10 在溶液、双层膜、附着于固相、脂单层或小泡中可以测试与BCA-GPCR、结构域或嵌合蛋白的配体结合。利用例如光谱特性(例如荧光、吸光率、折射率)、流体动力学(例如形态)、色谱或可溶性特性中的变化可测试调节剂的结合情况。

15 也可以检测受体-G-蛋白的相互作用。例如，可以检测 G 蛋白和受体的结合或该蛋白从受体中的释放。例如，在没有 GTP 时，激活剂将导致形成 G 蛋白(都是 3 个亚基)与受体的紧密复合体。这个复合体可以用如上所示的各种方法来检测。这种试验可以改变成搜寻抑制剂。没有 GTP 时，在受体和 G 蛋白中加入激活剂形成了紧密的复合体，然后通过观察受体-G 蛋白复合体的解离筛选抑制剂。有 GTP 时，从其他两个 G 蛋白亚基中释放 G 蛋白的 α 亚基作为激活标准。

20 激活或抑制的 G 蛋白将依次改变下游效应物如蛋白、酶和通道的特性。典型的例子是可见系统中转导素对 cGMP 磷酸二酯酶的激活、刺激性 G 蛋白对腺苷酸环化酶的激活、Gq 和其他同源 G 蛋白对磷酸酯酶 C 的激活，以及 Gi 和其他 G 蛋白对不同通道的调节。也可以检测下游的结果，如通过磷酸酯酶 C 产生二酰基甘油和 IP3，和依次检测由 IP3 引起的钙转移。

30 活化的 GPCR 受体变成激酶的底物，所述激酶使受体的 C 末端尾(以及可能的其他位点)磷酸化。所以，激活剂将能促进 ^{32}P 从 γ 标记的 GTP 转移到受体，这可以用闪烁计数器测定。C 末端尾的磷酸化将

能促进类似抑制蛋白的蛋白结合，并将干扰 G 蛋白的结合。激酶/抑制蛋白途径在许多 GPCR 受体的脱敏中起关键作用。对 GPCR 信号的转导和测试信号转导的方法的综述参见，例如 *Methods in Enzymology*, 第 237 卷和 238 卷(1994)和第 96 卷(1983); Bourne 等, *Nature* 10: 349: 117-27(1991); Bourne 等, *Nature* 348: 125-32(1990); Pitcher 等, *Annu. Rev. Biochem.* 67: 653-92(1998)。

把用潜在 BCA-GPCR 抑制剂或激活剂处理的样品或测定与没有测试化合物的对照样品比较，以便检验调节程度。对照样品（未用激活剂或抑制剂处理）的相对 BCA-GPCR 活性值设定为 100。当 BCA-GPCR 的活性值相对于对照是约 90%，任选 50%，任选 25-0%时，就达到了 BCA-GPCR 的抑制。当 BCA-GPCR 的活性值相对于对照是 110%，任选 150%、200-500%或 1000-2000%时，就达到了 BCA-GPCR 的激活。

通过确定表达 BCA-GPCR 细胞或膜的极化(即电位)的变化可以评估离子流通量的变化。确定细胞极化变化的一个方法是用电压钳和膜片钳技术测定电流变化(从而测量极化的变化)，例如“细胞附着”方式，“内翻外”方式和“全细胞”方式(参见，例如 Ackerman 等, *New Engl. J. Med.* 336: 1575-1595(1997))。全细胞电流利用标准方法可方便地确定(参见，例如 Hamil 等, *Pflugers. Archiv.* 391: 85(1981))。其他已知的测定包括：放射性标记的离子流通量测定和用电压敏感染料的荧光测定(参见，例如 Vestergarrd-Bogind 等, *J. Membrane Biol.* 88: 67-75(1988); Gonazales 和 Tsien, *Chem. Biol.* 4: 269-277(1997); Daniel 等, *J. Pharmacol. Meth.*, 25: 185-193(1991); Holevinsky 等, *J. Membrane Biology* 137: 59-70(1994))。通常，待测化合物存在的范围从 1pM 到 100mM。

通过检验如上所述的任何参数可测定测试化合物对多肽功能的影响。任何影响 BCA-GPCR 活性的适当生理变化都可用于评估测试化

合物对本发明的多肽的影响。当利用完整细胞或动物确定其功能效果时，人们也可测定各种效应，例如递质释放，激素释放，已知和未鉴别遗传标记（如 RNA 印迹）的转录变化，细胞代谢的变化如细胞生长或 pH 变化，以及胞内第二信使如 Ca^{2+} 、IP₃ 或 cAMP 的变化。

5

对 G 蛋白偶联受体的优选测定方法包括用离子或电压敏感染料加载细胞，以便报道受体活性。确定这些受体的测定也可以用其他 G 蛋白偶联受体的激动剂和拮抗剂作为阴性或阳性对照，以便评估测试化合物的活性。在鉴定调节性化合物(例如激动剂、拮抗剂)的测定中，
10 利用离子敏感性或膜电压荧光的指示剂分别监控细胞质中的离子水平或膜电压的变化。可用的离子敏感性指示剂和电压探针在 Molecular Probes 1997 年目录中公开。对于 G 蛋白偶联受体，混栖 G 蛋白如 G α 15 和 G α 16 可用于选择测定中(Wilkie 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88: 10049-10053(1991))。这些混栖 G 蛋白允许将大范围的受体与信号转
15 导途径在异源细胞中偶联。

受体激活通常启动随后的胞内事件如第二信使如 IP₃ 的增加，其释放胞内储藏的钙离子。对一些 G 蛋白偶联受体的激活刺激了通过磷酸酯酶 C 介导的磷脂酰肌醇水解形成肌醇三磷酸酯(IP₃)(Berridge 和
-20 Irvine, Nature, 312: 315-21(1984))。然后 IP₃ 刺激胞内储藏的钙离子的释放。所以，细胞质钙离子水平的变化或第二信使如 IP₃ 水平的变化可用于评估 G 蛋白偶联受体的功能。表达这些 G 蛋白偶联受体的细胞可表现出细胞质钙水平的提高，这是胞内储藏和通过离子通道激活共同作用的结果，在这种情况下，虽然无需在任选补充有螯合剂如 EGTA
25 的无钙缓冲液中进行这些测定，但需要区分从内部储藏释放钙而产生的荧光应答信号。

其他测定可包括确定受体的活性，当受体受激时，通过激活或抑制下游效应物如腺苷酸环化酶，导致细胞内环核苷酸如 cAMP 或 cGMP
30 水平的变化。环核苷酸门控的离子通道是存在的，例如棒光受体细胞

通道和嗅觉神经元通道，这些通道通过结合 cAMP 或 cGMP 受激后可渗透阳离子(参见，例如 Altenhofen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 9868-9872(1991)和 Dhallan 等, Nature. 347: 184-187(1990))。在受体激活导致环核苷酸水平下降的情况下，测定中激活受体的化合物加入细胞之前，将细胞暴露给与提高胞内环核苷酸水平的试剂例如毛喉素是优选的。对这种类型测定的细胞可以用编码环核苷酸门控的离子通道、GPCR 磷酸酶的 DNA 和编码受体的 DNA 共转染宿主细胞进行制备，所述受体(例如某些谷氨酸受体、毒蝇碱性乙酰胆碱受体、多巴胺受体、羟色胺酸受体等)激活时引起细胞质中环核苷酸水平变化。

10

在一个实施方案中，利用免疫测定可测定胞内 cAMP 或 cGMP 的变化。Offermanns 和 Simon 在 J. Biol. Chem., 270: 15175-15180(1995)中描述的方法可用于确定 cAMP 的水平。同样，Felley-Bosco 等在 Am. J. Resp. Cell 和 Mol. Biol. 11: 159-164(1994)中描述的方法可用于确定 cGMP 的水平。另外，引入本文作为参考的美国专利 4,115,538 描述了检测 cAMP 和/或 cGMP 的测定试剂盒。

15

在另一个实施方案中，根据引入本文作为参考的美国专利 5,436,128 可以分析磷脂酰肌醇(PI)。简而言之，该测定包括用 ³H-肌醇标记细胞 48 小时或更多。用测试化合物处理标记细胞 1 小时。裂解处理细胞，并在氯仿-甲醇-水中萃取，然后用离子交换层析分离肌醇磷酸，并且用闪烁计数器定量。通过计算存在激动剂时的 cpm 和存在缓冲液对照时的 cpm 的比例来确定刺激倍数。同样，通过计算存在拮抗剂时的 cpm 和存在缓冲液对照(可以含有或不含有激动剂)时的 cpm 的比例来确定抑制倍数。

20

25

在另一个实施方案中，可以测定转录水平来评估测试化合物对信号转导的影响。将含有目的蛋白的宿主细胞与测试化合物接触足够的时间以便发生相互作用，然后检测基因表达的水平。凭经验确定发生这些相互作用的时间，如经过一个时间过程然后测定作为时间函数的

30

转录水平。利用本领域技术人员已知的任何适当方法可以检测转录量。例如，利用 RNA 印迹可以检测目的蛋白的 mRNA 表达，或利用免疫测定鉴定它们的多肽产物。或者，利用报道基因可使用基于转录的测定，如美国专利 5,436,128 所述，文献引入本文作为参考。报道基因可以是如氯霉素乙酰转移酶、萤火虫荧光素酶、细菌荧光素酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。另外，目的蛋白通过附着于第二报道分子如绿荧光蛋白可用作间接的报道分子(参见，例如 Mistili 和 Spector, Nature Biotechnology 15: 961-964(1997))。

然后，将转录量与相同细胞中没有测试化合物的转录量比较，或者将它与基本相同缺乏目的蛋白的细胞中的转录量比较。基本相同的细胞可以从相同细胞中衍生，由此制备了没有经过导入异源 DNA 而修饰的重组细胞。转录量中的任何差异指示测试化合物以某种方式已经改变了目的蛋白的活性。

15

B. 调节剂

作为 BCA-GPCR 调节剂，测试化合物可以是任何小的有机或无机化学化合物或生物学实体，例如蛋白、糖、核酸或脂。测试化合物通常是小化学分子和肽。尽管可用的大多数化合物常常溶解在水或有机（特别是基于 DMSO）溶液中，但基本上任何化合物都可用作本发明测定中潜在的调节剂或结合化合物。通过使测定步骤自动化并给测定方法提供任何方便来源的化合物，设计测定方法对大的化学品文库进行筛选，通常测定平行进行（例如以自动化测定中微量滴定板上的微滴形式）。人们可意识到有许多化学化合物的供应商，包括 Sigma (St. Louis, MO)、Aldrich (St. Louis, MO)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Switzerland) 等。

25

在一个优选的实施方案中，高通量的筛选方法包括提供含有大量潜在治疗化合物（潜在调节剂或结合化合物）的组合化学品或肽文库。然后如本发明所述，在一个或多个测定中，筛选这些“组合化学品文

30

库”或“配体文库”，以便对展示所需特征活性的那些文库成员（特别是化学物种或亚类）进行鉴定。经鉴定的化合物可充当常规的“引导化合物”或自身可用作潜在或真正的治疗剂。

5 组合化学品文库是各种各样的化学化合物的集合，所述化合物由化学合成或生物合成通过组合许多化学“构件”如试剂产生。例如，多肽文库的线性组合化学品文库是通过对给定化合物长度（即多肽化合物中氨基酸的数目）以各种可能的方式组合一系列化学构件（氨基酸）而形成的。通过化学构件的如此组合混合可合成数百万的化合物。

-10

组合化学品文库的制备和筛选是本领域技术人员熟知的。这些组合化学品文库包括但不限于肽文库（参见，例如美国专利 5,010,175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37: 487-493 (1991)和 Houghton 等, *Nature* 354: 84-88 (1991)）。也可使用产生化学多样性文库的其他化学物质。

15 这些化学物质包括但不限于类肽（例如 PCT 公开号 WO 91/19735）、编码肽（例如 PCT 公开号 WO 93/20242）、无规则的生物寡聚体（例如 PCT 公开号 WO 92/00091）、苯二氮平（benzodiazepines）（例如美国专利号 5,288,514）、如海因、苯二氮平（benzodiazepines）和二肽的多变聚体（diversomers）（Hobbs 等, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 90: 6909-6913 (1993)）、联乙烯多肽（Hagihara 等, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568 (1992)）、带有葡萄糖支架的非肽的肽模拟物（Hirschmann 等, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218 (1992)）、小化合物文库的类似有机合成物（Chen 等, *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661 (1994)）、寡聚氨基甲酸酯（Cho 等, *Science* 261: 1303 (1993)），和/或肽基磷酸酯

25 （Campbell 等, *J. Org. Chem.* 59: 658 (1994)）、核酸文库（参见 Ausubel、Berger 和 Sambrook, 全部同上）、肽核酸文库（参见，例如美国专利号 5,539,083）、抗体文库（参见，例如 Vaughn 等, *Nature Biotechnology* 14(3): 309-314 (1996)和 PCT/US96/10287）、碳水化合物文库（参见，例如 Liang 等, *Science* 274: 1520-1522 (1996)和美国专利号 5,593,853）、

30 有机小分子文库（参见，例如苯二氮平（benzodiazepines），Baum C

和 EN, 1 月 18 日, 第 33 页(1993); 类异戊二烯, 美国专利号 5,569,588; 噻唑烷酮 (thiazolidinones) 和间噻唑烷酮 (metathiazanones), 美国专利号 5,549,974; 吡咯烷, 美国专利号 5,525,735 和 5,519,134; 吗啉化合物, 美国专利号 5,506,337; 苯二氮平 (benzodiazepines), 美国专利号 5,288,514 等)。

制备组合文库的设备可从市场上得到 (参见, 例如 357MPS、390MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA)。另外, 许多组合文库本身也可从市场得到 (参见, 例如 ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD 等)。

C. 固态和溶性高通量测定

在一个实施方案中, 本发明提供了溶性测定, 利用如 N 末端或 C 末端结构域分子, 所述分子是单独的或与异源蛋白共价连接产生的嵌合分子。在另一实施方案中, 本发明提供以高通量形式基于固相的体外测定, 其中结构域、嵌合分子、BCA-GPCR, 或表达 BCA-GPCR 的细胞或组织附着到固相基质上。

20

在本发明的高通量测定中, 一天筛选多达数千个不同的调节剂是可能的。具体而言, 各个微量滴定板的孔都可用于针对选定的潜在调节剂进行单独测定, 或者如果需要观察浓度或温育时间的作用, 那么每 5-10 个孔可测试一个调节剂。因此, 一个标准微量滴定板可分析约 100 个 (即 96 个) 调节剂。如果使用 1536 个孔的平板, 那么一个平板可容易地测定约 100 至约 1500 个不同的化合物。每天测定若干个不同的平板是可能的, 利用本发明的综合系统, 可对多达 6000-20000 个不同的化合物进行测定筛选。最近, 已开发出试剂操作的显微流体方法。

30

5 通过共价或非共价键例如通过标记，可将目的分子与固态成分直接或间接结合。标记可以是各种成分的任一种。一般而言，结合标记的分子（标记结合物）固定于固相支持物上，目的标记分子（例如目的信号转导分子）通过标记和标记结合物的相互作用而附着于固相支持物上。

10 根据文献中清楚描述的已知分子的相互作用，可使用许多标记和标记结合物。例如，当标记具有天然结合物时，例如生物素、蛋白 A 或蛋白 G，其可与适当标记结合物（抗生物素蛋白、链亲和素、中性抗生物素蛋白、免疫球蛋白的 Fc 区域等）结合使用。针对带有如生物素的天然结合物的分子的抗体和适合的标记结合物也是广泛得到的（参见 SIGMA Immunochemicals 1998 目录，SIGMA, St. Louis MO）。

15 任意半抗原性或抗原性化合物相似地可与适当抗体结合使用，以形成标记/标记结合物对。成千上万的特异抗体都可从市场上得到，并且其他许多抗体在文献中都有描述。例如，在一个共同的构型中，标记是第一抗体，标记结合物是识别第一抗体的第二抗体。除了抗体-抗原相互作用，受体-配体相互作用也适于作为标记和标记-结合物对。例如，细胞膜受体的激动剂和拮抗剂(例如细胞受体-配体的相互作用，
20 如铁传递蛋白、c-试剂盒、病毒受体配体、细胞因子受体、趋化因子受体、白介素受体、免疫球蛋白受体和抗体、钙粘着蛋白家族、整合蛋白家族、选择蛋白家族等；参见，例如 Pigott 和 Power, The Adhesion Molecule Facts Book I (1993)。同样，毒素和毒液、病毒表位、激素(例如阿片剂、类固醇等)、胞内受体(例如介导各种小配体的作用，包括
25 类固醇、甲状腺激素、视黄素和维生素 D；肽)、药物、凝集素、蔗糖、核酸(线性和环多聚体构型)、寡糖、蛋白、磷脂和抗体都可以与各种细胞受体相互作用。

30 如聚氨基甲酸酯、聚酯、聚碳酸酯、聚脲、聚酰胺、聚乙酰亚胺、聚亚芳基硫、聚硅氧烷、聚酰亚胺和聚乙酸的合成多聚体也可形

成适当的标记或标记结合物。许多其他的标记/标记结合物对在本发明所述的测定系统中也是有用的，正如专业技术人员在参阅本发明内容后将是清楚的。

5 如肽、聚醚等的常见接头也可用作标记，包括如介于约 5-200 个氨基酸的聚甘氨酸序列的多肽序列。这些活接头是本领域技术人员已知的。例如，聚乙二醇接头可从 Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama 得到。这些接头任选具有酰胺键、硫氢键或杂官能团键。

10 利用目前任意可得的各种方法，将标记结合物固定于固相基质上。固相基质通常通过将全部或部分基质暴露给化学试剂而被衍生或功能化，所述化学试剂是将化学基团固定于与部分标记结合物反应的表面上。例如，适于附着较长链部分的基团包括胺、羟基、硫醇和羧基基团。氨烷基硅烷和羟烷基硅烷可用于使各种表面功能化，如玻璃
15 表面。构建这些固相生物多聚体阵列在文献中已有清楚描述，参见，例如 Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963) (描述了例如肽的固相合成)；Geysen 等, J. Immun. Meth. 102: 259-274 (1987) (描述了在针状物上固相成分的合成)；Frank 和 Doring, Tetrahedron 44: 60316040 (1988) (描述了在纤维素圆形物上各种肽序列的合成)；Fodor
-20 等, Science, 251: 767-777 (1991)；Sheldon 等, Clinical Chemistry 39(4): 718-719 (1993)；和 Kozal 等, Nature Medicine 2(7): 753759 (1996) (全部描述了固定于固相基质的生物多聚体阵列)。将标记结合物固定于底物的非化学途径包括其他常用方法，如热、紫外辐射交联等。

25 D. 基于计算机分析

 对调节 BCA-GPCR 活性的化合物的另一测定包括计算机辅助药物设计，其中根据由氨基酸序列编码的结构信息，计算机系统用于生成 BCA-GPCR 的三维结构。输入的氨基酸序列与计算机程序中预先设立的算法直接和主动地相互作用，产生蛋白的二级、三级和四级结构模型。然后检验蛋白结构的模型以便鉴定具有结合能力的结构区。
30

将这些区域再用于鉴定与蛋白结合的配体。

将至少 10 个氨基酸残基的蛋白氨基酸序列或编码 BCA-GPCR 的
对应核酸序列输入计算机系统，产生蛋白的三维结构模型。编码多肽
5 的核苷酸序列或其氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 1-8 及其保守修饰版
本。氨基酸序列表示蛋白的一级序列或亚序列，其编码蛋白的结构信
息。至少 10 个残基的氨基酸序列（或编码 10 个氨基酸的核苷酸序列）
通过计算机键盘和计算机可读介质输入到计算机系统中，所述计算机
10 可读介质包括但不限于电子存储介质（例如磁盘、磁带、胶卷和芯片）、
光介质（例如 CDROM）、通过互联网和 RAM 传播的信息。然后通过
氨基酸序列和计算机系统的相互作用，使用本领域技术人员已知的
软件，生成蛋白的三维结构模型。

氨基酸序列表示编码信息的一级结构，所述信息对形成目的蛋白
15 的二级、三级和四级结构是必须的。软件能阅读由一级序列编码的某
些参数以生成结构模型。这些参数称为“能量术语”，其主要包括静
电电位、疏水性电位、溶剂可达的表面和氢键。二级能量术语包括范
德华电位。生物分子以累积方式形成使能量术语最小化的结构。所以
计算机程序利用由一级结构或氨基酸序列编码的这些术语来产生二级
20 结构模型。

然后，在二级结构能量术语基础上形成由二级结构编码的蛋白的
三级结构。此时用户可以输入其他变量，如蛋白是否是膜结合的或可
溶性的、其在体内和细胞内的定位，如细胞质、表面或核中。这些变
25 量和二级结构的能量术语一起用于形成三级结构模型。在制作三级结
构模型中，计算机程序匹配同样的二级结构疏水表面和同样的二级结
构亲水表面。

一旦结构已生成，由计算机系统来鉴定潜在的调节剂结合区。如
30 上所述，通过输入氨基酸或核苷酸序列或化合物的化学式，可生成潜

在调节剂的三维结构。再将潜在调节剂的三维结构与 BCA-GPCR 的三维结构比较，以鉴定结合 BCA-GPCR 的配体。采用能量术语确定蛋白和化合物之间的结合亲和性，从而确定哪些化合物具有提高的与蛋白结合的可能性。

5

计算机系统也用于筛选 BCA-GPCR 基因的突变、多肽变体、等位基因和种间同系物。这些突变可与疾状况态或遗传特征相关。如上所述，GeneChip™ 和相关技术也可用于筛选突变、多态变体、等位基因和种间同系物。一旦变体得到鉴定，诊断测定就可用于鉴定具有这些突变基因的患者。鉴定突变的 BCA-GPCR 基因包括分别接受选自 SEQ ID NO: 1-8 及其保守修饰版本、编码 BCA-GPCR 的第一核酸或氨基酸序列输入。如上所述，将序列输入到计算机系统。再将第一核酸或氨基酸序列同与第一序列基本相同的第二核酸或氨基酸序列比较。以上述方式将第二序列输入到计算机系统中。一旦将第一和第二序列比较后，就可鉴定序列间核苷酸或氨基酸的差异。这些序列可表示 BCA-GPCR 基因中等位基因差异以及与疾状况态和遗传特性相关的突变。

10

15

试剂盒

20

BCA-GPCR 及其同系物是鉴定细胞如癌细胞、法医和亲子鉴定，诊断如癌症的疾病，例如乳腺癌，以及测定信号转导的有用工具。与 BCA-GPCR 核酸，如 BCA-GPCR 探针和引物，特异性杂交的 BCA-GPCR 特异试剂以及与 BCA-GPCR 蛋白如 BCA-GPCR 抗体特异性结合的 BCA-GPCR 特异试剂可用于测定信号转导的调节。

25

用于检测样品中 BCA-GPCR DNA 和 RNA 存在的核酸测定方法包括许多本领域专业技术人员已知的技术，如 Southern 分析、Northern 分析、斑点印迹、核糖核酸酶保护、S1 分析、如 PCR 和 LCR 的扩增技术和原位杂交。在原位杂交中，例如将靶核酸从其细胞环境中释放出来，以用于细胞内杂交，而保存细胞形态用于随后的说明和分析。

30

下列文献提供了原位杂交的技术综述：Singer 等，*Biotechniques* 4: 230-250 (1986)；Haase 等，*Methods in Virology*，第 VII 卷，第 189-226 页(1984)；和 *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Hames 等编，1987)。另外，使用上述的各种免疫测定技术可检测 BCA-GPCR。

5 通常将测试样品与阳性对照（例如表达重组 BCA-GPCR 的样品）和阴性对照比较。

本发明还提供了筛选 BCA-GPCR 或核酸的调节剂的试剂盒。这些试剂盒可从容易得到的材料和试剂中制备。例如，这些试剂盒可包含下列任何一个或多个材料：BCA-GPCR 核酸或蛋白、反应管和测试 BCA-GPCR 活性的说明书。试剂盒任选含有生物活性的 BCA-GPCR。

10 根据本发明，根据试剂盒的目的用途和用户的特定要求，可制备各种试剂盒和成分。

15 给药和药物组合物

BCA-GPCR 调节剂可直接给哺乳动物受试对象施用，用于调节体内信号转导，例如用于癌症如乳腺癌的治疗。给药可通过任意途径实现，所述途径正常用于将调节剂化合物导入与待治疗组织的最终接触。BCA-GPCR 调节剂以任何适当方式施用，任选与可药用载体一起

20 施用。施用这些调节剂的合适方法是可用的并且是本领域技术人员熟知的，虽然有一个以上途径可用于施用特定组合物，但特定途径经常能比其他途径提供更直接和更有效的反应。

由即将施用的特定组合物以及施用组合物所用的特定方法可部分

25 确定可药用载体。因此有许许多多各种各样的本发明药物组合物的适合的配方（参见，例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*，第 17 版，1985））。

BCA-GPCR 调节剂单独或与其他适当成分组合可制成通过吸入给

30 药的汽雾剂（即它们可被“汽雾化”）。汽雾剂能放置于可加压的推

进剂中，如二氯二氟甲烷、丙烷和氮等。

5 适于给药的制剂包括水溶液和非水溶液、等渗无菌溶液，其可含有抗氧化剂、缓冲液、细菌抑制剂和让制剂等渗的溶质，和可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的
10 非水无菌悬浮液。在本发明的实践中，例如通过口服、局部、静脉内、腹膜内、膀胱内、鞘内可施用组合物。组合物任选口服或鼻内施用。化合物制剂可以单剂量或多剂量的密封容器呈现，如安瓿和小瓶。溶液和悬浮液可从前述种类的无菌粉末、颗粒和片剂中制备。调节剂也可作为部分制备的食物或药物被施用。

15 在本发明情况下，给患者施用的剂量应足以在一段时间中给受试对象产生有益的应答。这些剂量可以预防性地施用或给已患病的个体施用。给患者施用组合物的量应足以在患者中引发有效的保护或治疗应答。足够实现此目的的量定义为“治疗有效量”。剂量将由所使用的特定 BCA-GPCR 调节剂(例如 GPCR 拮抗剂和抗 GPCR 抗体)的
20 功效和受试对象的状况以及体重或待治疗区的表面积来确定。剂量的大小也将由伴随特定受试对象中特定化合物或载体的施用而带来的状况、性质和任何副作用程度来确定。

25 在确定待施用调节剂的有效量时，医生可评估调节剂的血浆循环水平、调节剂的毒性和抗调节剂抗体的产生。一般而言，调节剂剂量对通常的受试对象是约 1ng/kg-10mg/kg。

30 对于给药，如同适合受试对象的体重和整体健康程度一样，本发明调节剂的施用可由调节剂的 LD-50 和各种浓度下抑制剂的副作用所确定的速度进行。给药剂量可以一次或分次完成。

本说明书引用的所有出版物和专利申请都引入本文作为参考，如同各个出版物或专利申请是特异和单个地引作参考一样。

5 尽管为了清楚理解目的，上述发明通过说明和例子已在一定程度上进行了详细描述，但对本领域普通专业技术人员来说，按照本发明的教导，在不脱离本发明权利要求书的实质和范围内，可以很明显做出某些变化和修饰。

实施例

10 下列实施例仅以说明而非限制方式提供。本领域的那些专业技术人员可容易识别能产生基本相似结果的各种被改变或修饰的非关键参数。

实施例 I：鉴定和克隆新型 BCA-GPCR

15 克隆了四种人 BCA-GPCR，它们的核酸序列提供在 SEQ ID NO: 1、3、5 和 7 中。推导的氨基酸序列提供在 SEQ ID NO: 2、4、6 和 8 中。将新型 BCA-GPCR 分别命名为 BCA-GPCR-1、-2、-3 和-4。

这些序列可利用下列 PCR 引物和标准的 PCR 条件从 cDNA 或基因组 DNA 中进行扩增：

20 ATGTTGGGGAACGTCGCCATC (SEQ ID NO: 9) 和
TCATCCACAGAGCCTCCAGAT (SEQ ID NO: 10) (BCA-GPCR-1)
ATGGGAAAGGACAATCCAGTT (SEQ ID NO: 11) 和
CTAAGAGAGTAACTCCAGCAA (SEQ ID NO: 12)；(BCA-GPCR-2)
ATGGAAATAGCCAATGTGAGTTC (SEQ ID NO: 13) 和
TAAATTTGCGCCAGCTTGCCTG (SEQ ID NO: 14)；(BCA-GPCR-3)
25 和
ATGGTGAGACATACCAATGAGAG (SEQ ID NO: 15) 和
CATAAAATATTTACTCCCAGAGCC (SEQ ID NO: 16) (BCA-GPCR-4)。

30 实施例 II：在乳腺癌细胞和肿瘤中 BCA-GPCR-3 的 mRNA 表达和基因扩增

根据标准方法学测定乳腺癌细胞系和肿瘤中 BCA-GPCR-3 的基因扩增(参见图 1)。

5 根据标准方法学，利用 RT-PCR 测定在乳腺癌细胞系中表达的 BCA-GPCR-3 mRNA。在来自扩增和非扩增肿瘤的癌细胞系中，BCA-GPCR-3 的 mRNA 水平即致癌基因标记提高了。

BCA-GPCR-1 核酸序列: SEQ ID NO:1

AGTGCCAGAAAATGCCGCAACATGAAAAGTGACAACCATAGCTCTTAGGGGACTCCCCTAAAGCCTTCATCC
 5 TTCTGGGTGTGTCTGACAGGCCGTGGCTGGAACCCCTCTCTTTGTGGTCCTCTGCTGTCTATGTGCTGG
 CCATGTTGGGGAACGTCGCCATCATCCTGGCATCCCGGGTGGATCCTCAACTCCACAGCCCCATGTACATCT
 TCCTCAGTCACCTGTCTTCTGACCTCTGCTACACCACCACGACAGTCCCTCAGATGCTGGTCAACATGG
 GCAGTCCCAGAAGACCATCAGCTATGGAGGCTGCACTGTGCAATATGCAGTCTTCCACTGGCTGGGATGCA
 CGGAGTGCATCGTCTGGCCGCCATGGCCCTGGACCGCTACGTGGCCAGCTGCAAGCCCTGCACTATGCCG
 10 TTCTCATGCACCGTGTCTCTGTGTCAGCAGCTCGTGGCTCTGGCCTGGCTCAGTGGCTTCGGCAACTCCTTCG
 TGCAGGTGGTCTGACGGTGAATTGCCATTCTGCGGGCGGCAGGTGCTGAACAACCTTTTCTGTGAGGTGC
 CGGCCGTGATCAAGCTGTCTGTGCTGACACCGCTATGAATGACACCATACTGGCTGTGCTGGTGGCCTTCT
 TCGTGTGGTGCCCTGGCTCTCATCCTTCTCTCTATGGCTTTATGCCCAGGAGTGTCTCAGGATCCAGT
 CCTCCAAGGACGACACAAGGCCTTTGGGACGTGTTCTCCACCTGATGATCGTCTCCCTCTTCTACCTAC
 15 CTGCGATTTACATGTATCTGCAGCCCCCTTCCAGTACTCCAAGAGCAGGGCAAATTTATTTCTCTCTTCT
 ATTCCATAATCACCCCACTCTCAATCCCTTCCACTACACCCTGAGAAATAAAGATATGAAGGGGGCTCTGA
 GGAGACTTCTGGCCAGGATCTGGAGGCTCTGTGGATGATGAGGACATGAGATGTAGCATCTCCATCAATTA
 AGAACACAGCACAAGTCTATTGTGCAC

20 BCA-GPCR-1 氨基酸序列: SEQ ID NO:2

(LLGDSPKAFILLVSDRPWLELPLFVVLVLLSYVLA) MLGNVAIILASRVDPQLHSPMYIFLSHLSFLDLCY
 TTTTVPQMLVMNGSSQKTIISYGGCTVQYAVFHWLGCETECIVLAAMALDRYVASCKPLHYAVLMHRALCQQLV
 ALAWLSGFGNSFVQVVLTVQLPFCGRQVLNFFCEVPAVIKLSCADTAMNDTILAVLVAFFVLVPLALILLS
 YGFIARAVLRIQSSKGRHKAFGTCSHLMIVSLFYLPAIYMYLQPPSSYSQEQKFISLFYSIITPTLNPFT
 25 YTLRNKDMKDALRRLRLARIWRLCG

BCA-GPCR-2 核酸序列: SEQ ID NO:3

GGCAAATGGCTCTCTTAACTTCACAGACCTGTAATGGAAATTGGAGAGTGCCAGATCATCTGCATGTGCCC
 CCTTATCTAATCTTTGGTGTCTCTGTAATAGCTGGTGGATTATGGGAAAGGACAATGCCAGTTACCTA
 30 CAGGCATTTCATCCTGGTGGGCTCTCTGATCGGCTGGACTGGAGAAAATTCTCTTTGCTGTATCTTGATC
 TTCTGCATCCTGACCCTGGTGGGCAACACTGCCATCATCCTCTTGTGGTTCATGGATGTCAGGCTCCACACA
 CCCATGTACTTCTTTCTTGGGAATCTGTCTTTCTTAGATCTCTGCTTTACAGCAAGCATTGCCCCCTCAGCTG
 CTGTGGAACCTGGGGGTCCAGAGAAGACCATCACCTACCACGGCTGTGTGGCCAACTCTACATCTACATG
 ATGCTGGGCTCCACCGAGTGCCTCCTCTGGTGTGATGTCATGCCCATGACCGCTATGTGGCCGTCTGCCGGTCC
 35 CTGCACTACATGGCAGTCATGCGCCACATCTCTGCTGTCAGCTGGTGGTACTGTGGCCTGGTGTGTGGCTTC
 CTAAACTCCTTCATCATGTGTCTCAGACGATGCAGCTCTCCCGGTGTGGACGTGCGAGGGTGGACCCTTC
 CTGTGTGAGATGCCTGCTTATTGCCATGTCTTGTGAGGAAACCATGCTGGTAGAAGCGATTACCTTTGC
 CCTGGGGTGGCTCTCCTCTGGTGGCGCTCTCCCTCATCCTCATCTATGGCGTGATGTCAGCCGCGGTG
 CTGAGGATGAAGTCAGCAGCAGGGCGAAAGAAAGCCTTCCACACCTGCTCTTCTCACCTCACAGTGGTCTCT
 40 CTCTTCTACGGAACCATCATCTACGTGTACCTGAAGCCGGCCAACAGTACTCCAAGATCAGGGGAAGTTC

CTGACTCTCTTCTACACCATCGTCATTCCAGCATCAACCCCTCATCTACACTTTGAGGAACAAGGATGTG
 AAGGGGACCATGAAGAACTTCTGGGGTGGGAGAAAGGGGCTGGGGAGCCTCAACGAGGGGAACACTCTAGT
 AATGTAGACAGTTTGCTGGAGTTACTCTCTTAGATGTGTCTGTGGCCATGTGGAGAACTAATATTCAAGGAG
 TAGAGTGAACCGGGTGGGAAAATGCTTTCGAGTTTGACCCCGTCCCTCTGCCCTCTGGATGTGAAGTGGTTT
 5 CCTTCTGTTTGAAGTTGCCTGCTTCAAGATATCTCTGCTGTATCTTGCACTTCTCTTGTCTTTTTGATTAT
 CCACAACCTGCTGGGGACTTACAAAATAATTCAATCACCCAAAGGCACTGGGCAGTCTGCAGATTATGTCAT
 GGATGTCAAATAAAAATTGAGACAACATGaaaaaaaaaaaaa

BCA-GPCR-2 氨基酸序列: SEQ ID NO:4

10 MGKDNASYLQAFILVGS SDRPGLEKILFAVILIFCILTLVGNTAII LLLVMDVRLHTPMYFFLGNLSFLDLG
 FTASIA PQLLWNLGGPEKTIYHGCV AQLYIYMLGSTE CVLLVVM SHDRYVAVCRSLHYMAVMRPHLCQLQ
 VTVAWCCGFLNSFIMCPQTMQLSRCRRRVDHFLCEMPALIAMSC EETMLVEA IHLCPGGGSPPGAALPHPH
 LYGVIAAAVLRMKSAAGRKKAFTCSHLTVVSLFYGTIIYVYLKPANSYSQDQKFLTLFYTTIVIP SINPL
 IYTLRNKDVKGMTMKLLGW EKGAGEPQRGEHSSNVDSLLELLS

15

BCA-GPCR-3 核酸序列: SEQ ID NO:5

GATTGTGTCTCTAAAAAGAATAACATAAAATGAACTAAAATACACTTTTAATGTTTGCTAACTGATGTAAT
 TGCTTCATGTCTCATGCCCTGTATGCCCTGTGCTCTTCCCACAGGTGGCCTTTTGCCCCACCCCAGCATA
 AATGATGGAAATAGCCAATGTGAGTTCTCCAGAAGTCTTTGTCTCCTGGGCTTCTCCGCACGACCCCTACT
 20 AGAAACTGTCTCTTCATAGTTGTCTTGAGTTTTTACATGGTATCGATCTTGGGCAATGGCATCATCATCTT
 GGTCTCCCATACAGATGTGCACCTCCACACACCTATGTA CTCTTTCTTGCCAACCTCTCCTTCTGGACAT
 GAGCTTACCACGAGCATTGTCCCACAGCTCCTGGCTAACCTCTGGGGACCACAGAAAACCATAAGCTATGG
 AGGGTGTGTGGTCCAGTTCTATATCTCCCATGGCTGGGGGCAACCGAGTGTGTCTGTGGCCACCATGTC
 CTATGACCGCTACGCTGCCATCTGCAGGCCACTCCATTACACTGT CATTATGCATCCACAGCTTTGCCTTGG
 25 GCTAGCTTTGGCCTCCTGGCTGGGGGCTGACCACCAGCATGGTGGGCTCCACGCTCACCATGCTCCTACC
 GCTGTGTGGGAACAATTGCATCGACCACTTCTTTTGCGAGATGCCCTCATTATGCAACTGGCTTGTGTGGA
 TACCAGCCTCAATGAGATGGAGATGTACCTGGCCAGCTTTGTCTTTGTGTCTGCCTCTGGGGCTCATCTT
 GGTCTCTTACGGCCACATTGCCCGGCCGTGTTGAAGATCAGGTCAGCAGAAGGGCGGAGAAAGGCATTCAA
 CACCTGTTCTTCCCACGTGGCTGTGGTGTCTCTGTTTTACGGGAGCATCATCTTCATGTATCTCCAGCCAGC
 30 CAAGAGCACCTCCCATGAGCAGGGCAAGTT CATAGCTCTGTTCTACACCGTAGTCACTCTGCGTTGAACCC
 ACTTATTTACACCCTGAGGAACACGGAGGTGAAGAGCGCCCTCCGGCACATGGTATTAGAGA ACTGCTGTGG
 CTCTGCAGGCAAGCTGGCGCAAATTTAGAGACTCCAGTGCCTTCTGAGAAGGAAGATCAAGTTTACATCGAG
 CAAAGTGACCTTGGGAAGACAGGGCACTTGGGATGTCGTTTTTCTTCTAATATTGTTGAGCTCAAGGTAGAT
 GGAAATCTGAAAGGAGTGTGCTCATGCCATTTCCAGACCAAGAAAACACATTTATTATTTGCTAATTATCAT
 35 AGTTTTGTTCAATTGCGTTGTTGGTTTTTGCTATATATACACATGTTGACTGTCA

BCA-GPCR-3 氨基酸序列: SEQ ID NO:6

MPCMPALPTGGLLPH PQHTMMEIANVSSPEVFVLLGFSARPSLETVLFIVVLSFYMVSILNGNIIILVSHT
 DVHLHTPMYFFLANLSFLDMSFTTSIVPQLLANLWGPQKTI SYGGCVVQFYISHWLGATECVLLATMSYDRY
 40 AAICRPLHYTVIMHPQLCLGLALASWLGLTTSVMV GSTLTMLLPLCGNNCIDHFFCEMPLIMQLACVDTSLN

EMEMYLASFVFFVVLPLGLLILVSYGHIARAVLKIRSAEGRRKAFNTCSSHVAVVSLFYGSIIIFMYLQPAKSTS
HEQGKFIALFYTVVTPALNPLIYTLRNTEVKSALRHMVLENC CGSAGKLAQI

BCA-GPCR-4 核酸序列: SEQ ID NO:7

5 ATTGTCACCTCATTAAACCCTATGTGATGTGTTATCTTTCTCAGCTATGCCTCAGCCTTGGGGAACACACTTT
ACATATGGGGATGGTGAGACATACCAATGAGAGCAACCTAGCAGGTTTCATCCTTTTAGGGTTTTCTGATTA
TGCTCAGTTACAGAAGGTTCTATTTGTGCTCATATTGATTCTGTATTTACTAACTATTTTGGGGAATACCAC
CATCATCTGGTTTCTCGTCTGGAACCCAAGCTTCATATGCCGATGTATTTCTTCCTTTCTCATCTCTCCTT
CCTGTACCCTGCTTCACCAGCAGTGTTATTCCCCAGCTCCTGGTAAACCTGTGGGAACCCATGAAAATAT
10 CGCCTATGGTGGCTGTTTGGTTACCTTTACAACCTCCCATGCCCTGGGATCCACTGAGTGCGTCTCCCGGC
TCTGATGTCTGTGACCGCTATGTGGCTGTCTGCCGTCCTCTCCATTACACTGTCTTAATGCATATCCATCT
CTGCATGGCCTTGGCATCTATGGCATGGCTCAGTGGAAATAGCCACCACCCTGGTACAGTCCACCCTCACCT
GCAGCTGCCCTTCTGTGGGCATCGCCAAGTGGATCATTTTCATCTGCGAGGTCCCTGTGCTCATCAAGCTGGC
TTGTGTGGGCACCACGTTTAAACGAGGCTGAGCTTTTGTGGCTAGTATCCTTTTCTTATAGTGCTGTCTC
15 ATTCATCCTGGTCTCCTCTGGCTACATTGCCACGCAGTGTGAGGATTAAGTCAGCTACCGGGAGACAGAA
AGCATTCCGGACCTGCTTCTCCACCTGACAGTGGTACCATCTTTTATGGAACCATCATCTTCATGTATCT
GCAGCCAGCCAAGAGTAGATCCAGGGACCAGGGCAAGTTTGTCTCTCTTCTACACTGTGGTAACCCGCAT
GCTTAACCCTCTTATTTATACCTTGAGGATCAAGGAGGTGAAAGGGGCATTAAAGAAAGTTCTAGCAAAGGC
TCTGGGAGTAAATATTTTATGATTATTAATAAAAAAATTTAAGTGACACTGTGATGAA

20

BCA-GPCR-4 氨基酸序列: SEQ ID NO:8

MCYLSQLCLSLGHEHTLHMGMVRHTNESNLAGFILLGFSDYAQLQKVLVFLILILYLLTILGNNTIILVSRLE
PKLHMPMYFFLSHLSFLYRCFTSSVIPQLLVNLWPEPKTIAYGGCLVHLYNSHALGSTECVLPALMSCDRYV
AVCRPLHYTVLMHIHLCMALASMANWLSGIATTLVQSTLTLQLPFCGHRQVDHFICEVPVLIKLACVGTTFNE
25 AELFVASILFLIVPVSFILVSSGYIAHAVLRIKSATGRQKAFGTCSHLLTVVTIIFYGTIIFMYLQPAKSRSR
DQGKVFVSLFYTVVTRMLNPLIYTLRIKEVKGALKKVLAKALGVNLL

样品		DNA拷贝
DUKE乳腺癌		GPCR3
d47	90-325	10.2
d45	90-183	8.2
d99	96-194	7.8
d152	93-627	7
d164	90-282	7
d88	89-173	6.6
d25	88-595	5.9
d140	89-892	5
d113	95-246	5
d39	89-754	4.7
d27	88-647	4.4
d58	90-864	3.7
d80	94-804	2.7
发生次数		15%
乳腺癌细胞系		
bre1	ala 8	2.2
bre3	8T474	3.4
bre25	MDA-MB-453	3
bre31	ZR-75-1	6.3
发生次数		14%

图1

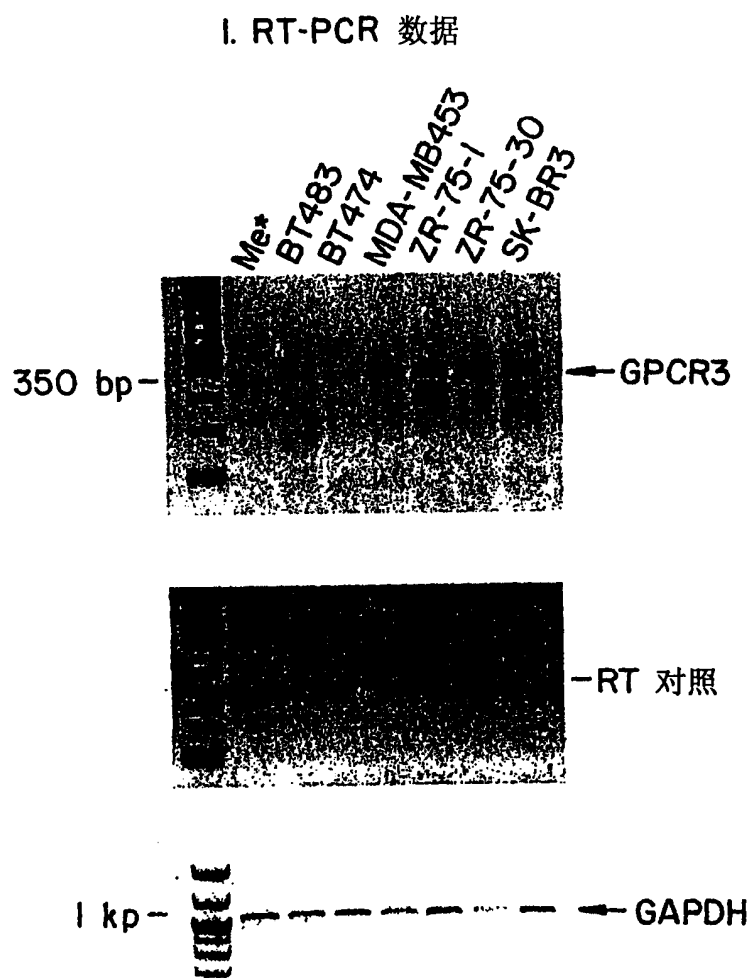


图2

2.RT-QPCR 数据

样品	基因表达	基因组扩增
Me*	1	1
BT483	2.5	1
ZR-75-30	3	1
SK-BR3	6	1
BT474	3	3
MDA-MD453	5	3
ZR-75-1	9	6
MG*	1	1
91-845	7	5

*正常乳腺上皮细胞(ME)和正常乳腺组织(MG)

图3