

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4639052号  
(P4639052)

(45) 発行日 平成23年2月23日(2011.2.23)

(24) 登録日 平成22年12月3日(2010.12.3)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 61 K 38/00	(2006.01)	A 61 K 37/02 Z N A
A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K 31/7088
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00
A 61 P 15/08	(2006.01)	A 61 P 15/08
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00

請求項の数 14 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-68255 (P2004-68255)	(73) 特許権者 000002934
(22) 出願日	平成16年3月11日 (2004.3.11)	武田薬品工業株式会社
(65) 公開番号	特開2005-97237 (P2005-97237A)	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(43) 公開日	平成17年4月14日 (2005.4.14)	(74) 代理人 100092783
審査請求日	平成19年3月2日 (2007.3.2)	弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	特願2003-67283 (P2003-67283)	(74) 代理人 100095360
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003.3.12)	弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人 100104282
(31) 優先権主張番号	特願2003-311892 (P2003-311892)	弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成15年9月3日 (2003.9.3)	(72) 発明者 大瀧 徹也
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	茨城県つくば市吾妻3丁目14-32
前置審査		(72) 発明者 松井 久典
		茨城県牛久市田宮2丁目37-7-B-2
		O 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】性腺機能改善剤

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (a) ~ (c) からなる群から選択されるポリペプチドもしくはその塩、または以下の (d) ~ (f) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる不妊症の予防・治療剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1~3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；ならびに

(f) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1~3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細

10

20

胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2】

以下の (a) ~ (c) からなる群から選択されるポリペプチドもしくはその塩、または以下の (d) ~ (f) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる排卵誘発または促進剤：

(a) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

10

(c) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 3 個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；ならびに

(f) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 3 個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

20

【請求項 3】

以下の (a) ~ (c) からなる群から選択されるポリペプチドもしくはその塩、または以下の (d) ~ (f) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる性腺刺激ホルモン分泌促進剤：

(a) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

30

(c) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 3 個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；ならびに

40

(f) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 3 個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

以下の (a) ~ (c) からなる群から選択されるポリペプチドもしくはその塩、または以下の (d) ~ (f) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる性腺刺激ホルモン分泌抑制剤：

(a) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有するアミノ

50

酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；ならびに

(f) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

#### 【請求項5】

以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリペプチドもしくはその塩、または以下の(d)～(f)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる性ホルモン分泌促進剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；ならびに

(f) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

#### 【請求項6】

以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリペプチドもしくはその塩、または以下の(d)～(f)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる性ホルモン分泌抑制剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；ならびに

(f) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

【請求項7】

持続投与または連続投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリペプチドまたはその塩を含有してなる性腺刺激ホルモン分泌抑制剤および/または性ホルモン分泌抑制剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；および

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド。

【請求項8】

持続投与または連続投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる性腺刺激ホルモン分泌抑制剤および/または性ホルモン分泌抑制剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

【請求項9】

持続投与または連続投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリペプチドまたはその塩を含有してなる卵胞成熟阻害剤および/または性周期停止剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；および

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド。

【請求項10】

持続投与または連続投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる卵胞成熟阻害剤および/または性周期停止剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作

10

20

30

40

50

用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

【請求項11】

単回投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリペプチドまたはその塩を含有してなる性腺刺激ホルモン分泌促進剤および／または性ホルモン分泌促進剤：

10

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；および

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド。

【請求項12】

単回投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる性腺刺激ホルモン分泌促進剤および／または性ホルモン分泌促進剤：

20

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

30

【請求項13】

単回投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリペプチドまたはその塩を含有してなる排卵誘発または促進剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド；および

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチド。

40

【請求項14】

単回投与されることを特徴とする、以下の(a)～(c)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含有してなる排卵誘発または促進剤：

(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド；および

50

(c) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～3個のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換されたアミノ酸配列を含有し、かつ受容体との結合活性、受容体発現細胞の細胞刺激活性、排卵促進作用または性腺刺激ホルモン分泌促進活性を有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、性腺機能改善剤に関する。詳しくは、不妊症の予防・治療剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進または阻害剤、性ホルモン分泌促進または阻害剤、ホルモン感受性癌の予防・治療剤およびこれら剤のスクリーニング、不妊症の診断などに関する。

【背景技術】

【0002】

結婚年齢の遅延に伴う不妊率の上昇や少子化は、今日の先進国において世界的な問題であり、不妊症治療に対する関心は、今後ますます高まるものと考えられる。

女性の排卵障害に起因する不妊症に対しては、レコンビナントFSH（卵胞刺激ホルモン）やヒト下垂体性性腺刺激ホルモン（hMG製剤）による卵胞の発育刺激、およびヒト胎盤性性腺刺激ホルモン（hCG）による排卵の誘発などが挙げられる。また、人工授精も最近では頻繁に行われるようになり、hMG-hCG療法による過排卵処理は、より広く適用されるようになった。排卵は、正常な性周期においては、脳下垂体から黄体ホルモン（LH）が大量に放出され、これが成熟した卵胞顆粒膜細胞のLH受容体に受容されることで誘発される。上記のhCGは、この内因性のLHサージを模倣することを基盤としており、hCGがLHに代わってLH受容体を刺激することが、排卵誘発機序である。また最近、レコンビナントヒトLH（rhLH）の産生技術が開発され、rhLHによる排卵誘発療法も始まっている（J. Clin. Endocrinol. Metab. 86巻, 2607-2618頁, 2001年）。LHを受容した卵巣内では、数多くの遺伝子の発現が誘導され、その後の排卵へと続く。排卵現象に直接関与しているのは、LHそのものと言うよりむしろ、LHによって誘導される遺伝子産物である。例えばプロゲステロン受容体やシクロオキシゲナーゼ-2など、LHの下流遺伝子をノックアウトすると、排卵が阻害されることが報告されている（総説、Steroids、65巻、559-570頁、2000年；Endocrinology、143巻、2823-2835頁、2002年）。hMG-hCG療法の拡大に伴い、合併症を発症する患者が増加し、臨床上の大きな問題となっている。最も発生頻度の高い合併症の一つに、卵巣過剰刺激症候群（OHSS）が挙げられる。OHSSは医原性疾患であり、hMG、hCGの投与、またはその後の妊娠の成立に伴う母体でのhCG産生の亢進が発症の原因となる。重症例では卵巣腫大や腹水貯留を来たし、患者の生命に危険が及ぶことすらある。そのため臨床では、OHSSを予防する様々な診断方法が存在し、血中エストロゲン濃度が高値を示した場合や、超音波診断により卵巣に多くの嚢胞を認めた場合などには、排卵誘発を中止するなどの策がとられている（Acta Obstet. Gynecol. Scand. 80巻、878-882頁、2001年）。

男性側に起因する不妊症に対しては、精索静脈瘤や精路の閉塞などの物理的要因が存在する場合には、内科的または外科的治療が施されるが、造精機能異常や射精障害などの生殖機能に原因が存在する場合には、有効な治療法はほとんど確立されていない。

卵子や精子の成熟には、脳下垂体から放出されるFSH、LHなどのゴナドトロピン（性腺刺激ホルモン）が大きく関与している。これらゴナドトロピンの放出は、視床下部から放出されるGnRH（ゴナドトロピン放出ホルモン）によって誘発される。通常GnRHの放出は、ある一定の間隔ごとに行われ、その結果、FSHおよびLHは一定の間隔で放出される。GnRHのパルス状放出は、ある一定レベルの血中ゴナドトロピンを維持するのに重要であり、GnRHの持続的投与は、逆に血中ゴナドトロピン濃度の低下を引き起こす（Science、202巻、631-633頁、1978年）。パルス状に放出されたFSHおよびLHは、卵巣や精巣において、それぞれ卵子や精子の成熟、性ホルモンの合成などを促す。また、幼少期における生殖器官の発達や、思春期における生殖器官の成熟にも、GnRHおよびゴナドトロピンのパルス状放出が関与している。また、排卵は、排卵直前にLHおよびFSHが大量に放出されることで誘発

10

20

30

40

50

され、この際にもGnRHの大量分泌が起こるとされている。このように、GnRH、ゴナドトロピンは、雌雄いずれの個体においても生殖機能を支える重要な因子であり、これらの機能異常は、不妊を主調とした生殖機能の異常として反映される(Endocrinology、143巻、2823-2835頁、2002年)。

一方、ヒトメタスチン(ヒトKiSS-1ペプチド)は、ヒト胎盤から精製された54アミノ酸を有するペプチドであり、Gタンパク質共役受容体ヒトOT7T175に対するリガンドである(特許文献1 WO 00/24890号公報)。ヒトメタスチンのラット型(ラットメタスチン)およびマウス型(マウスマタスチン)も報告されている(特許文献2 WO 01/75104号公報)。メタスチンは、癌転移抑制活性を有し、癌(例、肺癌、胃癌、肝癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、脳腫瘍等)の予防・治療に、膵臓機能調節作用を有し、膵臓疾患(例えは、急性または慢性膵炎、膵癌等)の予防・治療に、胎盤機能調節作用を有し、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩異常の予防・治療に有用である(WO 00/24890号公報、WO 01/75104号公報等)。さらに、メタスチンを含有する徐放製剤も報告されている(WO 02/85399号公報)。また最近、妊婦の血中メタスチン濃度が、妊娠の開始と共に急激に上昇し、出産まで高い発現が維持されることが示された(J. Clin. Endocrinol Metab.、88巻、914-919頁、2003年)。

【特許文献1】WO 00/24890号公報

【特許文献2】WO 01/75104号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

上記のOHSS発症機構そのものが未解明であること、また重症の不妊女性にはhMG-hCG療法を施さざるを得ないことなどから、現在の不妊治療においてOHSSは避けることのできない疾患であると言える。hCGを代表とする従来の排卵誘発剤と同程度の排卵促進効果を有し、かつOHSSを誘発しない排卵誘発剤の開発が望まれている。さらには、男性の不妊症に有効な薬剤も望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、このような現状に鑑み、鋭意検討した結果、ヒトメタスチンがゴナドトロピン放出促進作用、性腺機能改善作用、排卵促進作用などを有することを見出した。また、メタスチンによる排卵は、エストロゲン産生性顆粒膜細胞からプロゲステロン産生性黄体細胞への正常な分化を介した排卵現象であること、更に、メタスチンを持続投与することにより、ゴナドトロピンの放出および精巣におけるテストステロンの産生が低下することも明らかにし、更に研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる性腺機能改善剤、

(2) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩を含有してなる上記(1)記載の性腺機能改善剤、

(2a) 配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13または配列番号：15で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩を含有してなる上記(1)記載の性腺機能改善剤、

(3) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：2で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載の性腺機能改善剤、

(3a) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩を含有してなる上記(1)記載の性腺機能改善剤、

(3b) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩を含有してなる上記(1)記載の性腺機能改善剤、

10

20

30

40

50

(4) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有してなる性腺機能改善剤、

(4a) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有してなる性腺機能改善剤、

(5) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる性腺機能改善剤、

(5a) 化合物が、配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物である上記(5)記載の性腺機能改善剤、

(6) 配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる性腺機能改善剤、

(7) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を含有してなる性腺機能改善剤、

(8) 不妊症の予防・治療剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

(9) 排卵誘発または促進剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

(10) 性腺刺激ホルモン分泌促進剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

、

(11) 性腺刺激ホルモン分泌抑制剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

、

(12) 性ホルモン分泌促進剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

(12a) 性ホルモンが、アンドロゲン(テストステロン、アンドロステンジオンなど)、エストロゲン(エストラジオール、エストロンなど)またはプロゲステロンである上記(12)記載の性腺機能改善剤、

(13) 性ホルモン分泌抑制剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

(13a) 性ホルモンが、アンドロゲン(テストステロン、アンドロステンジオンなど)、エストロゲン(エストラジオール、エストロンなど)またはプロゲステロンである上記(13)記載の性腺機能改善剤、

(14) ホルモン感受性癌の予防・治療剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

(15) 子宮内膜症の予防・治療剤である上記(1)～(7)記載の性腺機能改善剤、

(16) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、または配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有してなる不妊症の診断薬、

(17) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に対する抗体、または配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる不妊症の診断薬、

(18) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、および/または配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする性腺機能改善剤のスクリーニング方法、

(19) 性腺機能改善剤が、性ホルモン分泌抑制剤または性ホルモン分泌促進剤である

10

20

30

40

50

上記(18)記載のスクリーニング方法、

(20) 性腺機能改善剤が、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤または性腺刺激ホルモン分泌促進剤である上記(18)記載のスクリーニング方法、

(21) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、および／または配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする性腺機能改善剤のスクリーニング用キット、

(22) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、および／または配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする性腺機能改善剤のスクリーニング方法、

(23) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、および／または配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする性腺機能改善剤のスクリーニング用キット、

(23a) 上記(18)もしくは上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(21)もしくは上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる性腺機能改善剤、

(23b) 不妊症の予防・治療剤である上記(23a)記載の性腺機能改善剤、

(23c) 排卵誘発または促進剤である上記(23a)記載の性腺機能改善剤、

(23d) 性腺刺激ホルモン分泌促進または阻害剤である上記(23a)記載の性腺機能改善剤、

(23e) 性ホルモン分泌促進または阻害剤である上記(23a)記載の性腺機能改善剤、

(24) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする、性腺機能改善法、

(25) (i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進する、(ii)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する、または(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進することを特徴とする、性腺機能改善法、

(26) 性腺機能改善剤を製造するための(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩の使用、

(27) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしく

10

20

30

40

50

は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩の有効量を持続投与または連続投与することを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌抑制法および/または性ホルモン分泌抑制法、

(27a) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、性腺刺激ホルモン分泌が抑制されるに十分な有効量を投与することを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌抑制法、

(27b) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、性ホルモン分泌が抑制されるに十分な有効量を投与することを特徴とする、性ホルモン分泌抑制法、

(27c) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、性腺刺激ホルモン分泌が抑制されるに十分な有効量を投与することを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌抑制法、

(27d) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、性ホルモン分泌が抑制されるに十分な有効量を投与することを特徴とする、性ホルモン分泌抑制法、

(27e) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌抑制法、

(27f) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進す

10

20

30

40

50

る化合物またはその塩を、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、性ホルモン分泌抑制法、

(27g) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌抑制法、

(27h) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、性ホルモン分泌抑制法、

(28) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩の有効量を持続投与または連続投与することを特徴とする、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療法、

(28a) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療効果が得られるに十分な有効量を投与することを特徴とする、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療法、

(28b) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療効果が得られるに十分な有効量を投与することを特徴とする、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療法、

(28c) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療法、

(28d) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療法、

(29) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはそ

10

20

30

40

50

の塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩の有効量を持続投与または連続投与することを特徴とする、卵胞成熟阻害法および/または性周期停止法、

(29a) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、卵胞成熟を阻害させるに、および/または性周期を停止させるに十分な有効量を投与することを特徴とする、卵胞成熟阻害法および/または性周期停止法、

(29b) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、卵胞成熟を阻害させるに、および/または性周期を停止させるに十分な有効量を投与することを特徴とする、卵胞成熟阻害法および/または性周期停止法、

(29c) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、卵胞成熟阻害法および/または性周期停止法、

(29d) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストを、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、卵胞成熟阻害法および/または性周期停止法、

(30) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩の有効量を単回投与することを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌促進法および/または性ホルモン分泌促進法、

(30a) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、性腺刺激ホルモン分泌を促進させる、および/または性ホルモ

10

20

30

40

50

ン分泌を促進させるに十分な有効量を投与することを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌促進法および／または性ホルモン分泌促進法、

(30b) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、性腺刺激ホルモン分泌促進法および／または性ホルモン分泌促進法、

(31) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩の有効量を単回投与することを特徴とする、排卵誘発または促進法、

(31a) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、排卵を誘発または促進させるに十分な有効量を投与することを特徴とする、排卵誘発または促進法、

(31b) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、または(v)上記ポリペプチドまたはその塩の、上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩への活性化を促進する化合物またはその塩を、薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることを特徴とする、排卵誘発または促進法、

(32) 哺乳動物に対して、(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、(ii)上記ポリペプチドまたはその塩に対する抗体、(iii)上記ポリペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンスヌクレオチド、(iv)配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、(v)上記ポリペプチドまたはその塩に対する抗体、または(vi)上記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする、排卵抑制法、卵巣機能調節法、ホルモン感受性癌の予防・治療法、または子宮内膜症の予防・治療法、

(32a) 哺乳動物に対して、配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の

10

20

30

40

50

アンタゴニストの有効量を投与することを特徴とする、排卵抑制法、卵巣機能調節法、ホルモン感受性癌の予防・治療法、または子宮内膜症の予防・治療法などに関する。

【発明の効果】

【0006】

本発明のポリペプチド（配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド）および受容体（配列番号：20で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号：24で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質）、本発明のDNAなどは、例えば、性腺機能改善剤、不妊症の予防・治療剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤などのスクリーニングに有用である。10

本発明のポリペプチドおよび受容体、本発明のDNA、本発明のポリペプチドまたは受容体の機能・活性を促進する化合物またはその塩は、優れた性腺刺激ホルモン分泌促進活性、性ホルモン分泌促進活性、排卵誘発または促進作用等を有し、低毒性で安全な、例えば、性腺機能改善剤、不妊症の予防・治療剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤などとして有用である。さらに、本発明のポリペプチドおよび受容体、本発明のDNA、本発明のポリペプチドまたは受容体の機能・活性を促進する化合物またはその塩は、性腺刺激ホルモンや、性ホルモンの分泌が抑制されるに十分な有効量を対象に投与（例、連続投与、持続投与など）、あるいは薬効を発揮させたい部位または組織において必要量以上存在させることにより、性腺刺激ホルモン抑制剤、性ホルモン分泌抑制剤、ホルモン感受性癌や子宮内膜症の予防・治療剤などとして有用である。20

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臍細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ラングルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、单球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、臍臍、腎臍、肝臍、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臍、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL、M1、CTL L-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、HE L、JK-1、CMK、KO-812、MEG-01など）に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。30

【0008】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と例えば約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1～3個（好ましくは1～2個、好ましくは1個40

10

20

30

40

50

) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1～3個（好ましくは1～2個、好ましくは1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1～3個（好ましくは1～2個、好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1～3個（好ましくは1～2個、好ましくは1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

#### 【0009】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。10

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性（例、受容体との結合活性または細胞刺激活性、排卵促進作用、性腺刺激ホルモン分泌促進活性、性腺刺激ホルモン分泌抑制活性、性ホルモン分泌促進活性、性ホルモン分泌抑制活性など）などがあげられる。実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

受容体との結合活性または細胞刺激活性の測定は、公知の方法に準じて行う。

排卵促進作用の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えば、European Journal of Endocrinology、第138巻、594-600頁、1998年に記載の方法またはそれに準じた方法、後述の実施例に記載の方法などに従って測定することができる。20

性腺刺激ホルモン分泌促進活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えば、Toxicology、第147巻、15-22頁、2000年に記載の方法またはそれに準じた方法、後述の実施例に記載の方法などに従って測定することができる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：2、配列番号：11、配列番号：13、または配列番号：15で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1または配列番号：9で表されるアミノ酸配列などがあげられる。30

#### 【0010】

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、ヒトメタスチン(45-54)と称する場合もある〕、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、マウスマタスチン(43-52)またはラットメタスチン(43-52)と称する場合もある〕、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、ヒトメタスチンまたはヒトメタスチン(1-54)と称する場合もある〕、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、マウスマタスチンと称する場合もある〕、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、ラットメタスチンと称する場合もある〕、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、ヒトメタスチン(40-54)と称する場合もある〕、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、ヒトメタスチン(46-54)と称する場合もある〕、配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、ヒトメタスチン(47-54)と称する場合もある〕、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド〔以下、ヒトメタスチン(48-54)と称する場合もある〕などがあげられる。40

#### 【0011】

本発明のポリペプチドに対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明のポリペプチドと結合活性を有し、本発明のポリペプチドにより該受容体発現細胞の細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成 / 抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋

白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP-S結合活性などを促進する活性等)が観察されるものなどがあげられる。例えば、配列番号:20で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号:22で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号:24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質などがあげられる。

【0012】

配列番号:20で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号:22で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号:24で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質(以下、これらを本発明の受容体と称する場合がある)は、ヒトや温血動物(例、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臍細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、臍臍、腎臍、肝臍、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臍、胸腺、脾臍、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、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など)に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

【0013】

配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドとの結合活性などがあげられる。実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬理学的に)同質であることを示す。

配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i)配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表されるアミノ酸配列中の例えば1~100個(好ましくは1~50個、好ましくは1~10個、好ましくは1~5個、好ましくは1~3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表されるアミノ酸配列に例えば1~100個(好ましくは1~50個、好ましくは1~10個、好ましくは1~5個、好ましくは1~3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表されるアミノ酸配列に例えば1~100個(好ましくは1~50個、好ましくは1~10個、好ましくは1~5個、好ましくは1~3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)配列番号:20、配列番号:22または配列番号:24で表されるアミノ酸配列中の例えば1~100個(好ましく

10

20

30

40

50

は1～50個、好ましくは1～10個、好ましくは1～5個、好ましくは1～3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v)上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の受容体の具体例としては、例えば、配列番号：20で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質(以下、ヒトOT7T175と称する場合もある)、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質(以下、ラットOT7T175と称する場合もある)、配列番号：24で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質(以下、マウスOT7T175と称する場合もある)などが用いられる。

#### 【0014】

本発明の受容体の部分ペプチド(以下、本発明の部分ペプチドと称する場合がある)としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分ペプチドであれば、いかなるものであってもよいが、好ましくは、本発明のポリペプチドに対する結合能を有する部分ペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含有する部分ペプチド等が用いられる。本発明の受容体の構成アミノ酸配列のうち20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。(i)上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個(1～5個))のアミノ酸が欠失し、(ii)上記アミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(1～5個))のアミノ酸が付加し、または(iii)上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

#### 【0015】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)、アミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソブロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくは-ナフチルメチルなどの-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドには、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイルなどのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保護されているもの、または糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

#### 【0016】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、苔酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられ

10

20

30

40

50

る。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによつても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。例えば、WO 00/24890号公報、WO 01/75104号公報、WO 02/072816号公報などに記載の方法に準じて製造することができる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。10

#### 【0017】

本発明のポリペプチド、受容体、その部分ペプチド、もしくはそれらの塩の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、-アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、受容体、部分ペプチドを取得する。20

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBT、HOOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。30

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20~50の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。40

#### 【0018】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペニチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなど

が用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t* - ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2 - アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4 - ニトロベンジルエステル、4 - メトキシベンジルエステル、4 - クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t* - ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C<sub>1-6</sub>）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t* - ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、C1<sub>2</sub> - Bz1、2 - ニトロベンジル、Br - Z、*t* - ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4 - メトキシ - 2,3,6 - トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

#### 【0019】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5 - トリクロロフェノール、2,4 - ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N - ヒドロキシスクシミド、N - ヒドロキシタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd - 黒あるいはPd - 炭素などの触媒の存在下での水素気流中の接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 - 20 ~ 40 の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4 - ブタンジチオール、1,2 - エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4 - ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2 - エタンジチオール、1,4 - ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

#### 【0020】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の - アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチド、受容体またはその部分

10

20

30

40

50

ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

#### 【0021】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは受容体の部分ペプチドについては、受容体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a)～(e)に記載された方法があげられる。

(a) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

(e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

#### 【0022】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。なかでもDNAが好ましい。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

#### 【0023】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例、DNA)としては、例えば(a)配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19で表わされる塩基配列を含有するDNA、(b)配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列

10

20

30

40

50

番号：14、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

#### 【0024】

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70、好ましくは約60~65の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65の場合が最も好ましい。

より具体的には、(i) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：17で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(ii) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：19で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(iii) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(iv) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(v) 配列番号：7で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：8で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(vi) 配列番号：9で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：10で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(vii) 配列番号：11で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：12で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(viii) 配列番号：13で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：14で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、

(ix) 配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：16で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

#### 【0025】

本発明の受容体をコードするDNAとしては、例えば、(i) 配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNA、または(ii) 配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNAで表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、(ii) 配列番号：20、配列番号：22または配列番号：24で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

10

20

30

40

50

## 【0026】

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジエントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70、好ましくは約60～65 の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65 の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：20で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：21で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：23で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：24で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：25で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

## 【0027】

本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：20、配列番号：22または配列番号：24で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジエントな条件は前記と同様のものが用いられる。

## 【0028】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAは、公知の方法で標識化されていてもよい。標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>32</sup>P]、[<sup>33</sup>P]、[<sup>35</sup>S]など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど）、酵素（例、-ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）、ビオチン、ラントニド元素などが用いられる。好ましくは放射性同位元素が用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチド（以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の

10

20

30

40

50

方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0029】

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km(宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0030】

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRプロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリア付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子(以下、AmpRと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、NeoRと略称する場合がある、G418耐性)等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFP・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクタ

10

20

30

40

50

ーを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

#### 【0031】

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 · D H 1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)] , J M 1 0 3 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)] , J A 2 2 1 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)] , H B 1 0 1 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)] , C 6 0 0 [Genetics, 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [Gene, 24巻, 255(1983)] , 2 0 7 - 2 1 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2 , A H 2 2 R<sup>-</sup> , N A 8 7 - 1 1 A , D K D - 5 D , 2 0 B - 1 2 、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3 , N C Y C 2 0 3 6 、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) K M 7 1 などが用いられる。

#### 【0032】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; S f 細胞) 、*Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five<sup>TM</sup> 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmene acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞 ; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711) 、S f 2 1 細胞 (以上、In Vivo, 13, 213-217, (1977) ) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [Nature, 315巻, 592(1985)] 。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7 , Vero , チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記) , d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r<sup>-</sup>) 細胞と略記) , マウス L 細胞 , マウス A t T - 2 0 , マウスミエローマ細胞 , ラット G H 3 , ヒト F L 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110(1972) や Gene, 17巻, 107(1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 1 11(1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

#### 【0033】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール . 263-267(1995) (秀潤社発行) 、Virology, 52巻, 456(1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードする D N A を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカーリー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ

抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

#### 【0034】

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー(Burkholder)最小培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330(1984)〕があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20～35で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium(Nature, 195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔Science, 122巻, 501(1952)〕、D MEM培地〔Virology, 8巻, 396(1959)〕、RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association 199巻, 519(1967)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

#### 【0035】

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれ

10

20

30

40

50

に準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が產生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

#### 【0036】

本発明のポリペプチドまたは受容体に対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明のポリペプチドまたは受容体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチドまたは受容体に対する抗体は、本発明のポリペプチドまたは受容体を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体產生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたは受容体は、温血動物に対して投与により抗体產生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体產生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体產生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体產生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体產生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔Nature、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレンギリコール（PEG）やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体產生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40、好ましくは30～37で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体產生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（蛋白質）抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識された抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識されたポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40、好ましくは約37である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうこ

10

20

30

40

50

とができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0037】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(ポリペプチド抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアー蛋白質とハプテンとの混合比は、キャリアー蛋白質に架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアー蛋白質のカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0038】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある)に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスポリヌクレオチド(好ましくはDNA)(以下、アンチセンスDNAと略記する場合がある)としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列(すなわち、本発明のDNAの相補鎖)の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列(例えば、開始コドン付近の塩基配列など)の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明のアンチセンスDNAは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含

10

20

30

40

50

有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレンギリコール、テトラエチレンギリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンスDNAの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のペプチドまたは受容体の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

### 【0039】

以下に、(a)本発明のポリペプチド、(b)本発明の受容体（以下、その部分ペプチドも含む）、(c)本発明のDNA、(d)本発明の抗体および(e)本発明のアンチセンスDNAなどの用途を説明する。

#### (1) 本発明のポリペプチドが関与する疾患の予防・治療剤

本発明のポリペプチドは、本発明の受容体の発現細胞の細胞刺激活性を有し、本発明の受容体の内因性リガンドであり、性腺刺激ホルモン（例、FSH、LHなど）分泌促進または抑制作用、性ホルモン〔例、アンドロゲン（例、テストステロン、アンドロステンジオンなど）、エストロゲン（例、エストラジオール、エストロンなど）、プロゲステロンなど〕分泌促進または抑制作用、性腺機能改善作用、排卵誘発または促進作用、性成熟作用などを有する。

本発明のポリペプチドまたは本発明のDNAに異常があつたり、欠損している場合、または本発明の受容体または該受容体をコードするDNAに異常があつたり、欠損している場合には、例えば、性腺機能不全・機能低下、不妊症〔例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など〕、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、人工授精治療などとなる可能性が高い。

従つて、本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、性腺機能改善剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤、性ホルモン分泌促進剤、性ホルモン分泌抑制剤などとして、例えば、不妊症〔例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など〕、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用することができる。また、本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、薬効を発揮させたい部位、組織などにおいて必要量以上存在させた場合（例、好ましくは、連続投与、持続投与等）、性腺刺激ホルモン分泌抑制（阻害）剤および（または）性ホルモン分泌抑制剤として、例えば、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用できる。また、例えば単回投与することにより、性腺刺激ホルモン分泌促進剤および（または）性ホルモン分泌促進剤として、例えば、排卵誘発または促進剤などとして用いられる。上記連続投与、持続投与には、単回投与で薬効成分を徐放させる投与方法も含まれる。

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドを発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のポリペプチドを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。10

本発明のポリペプチドを上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のポリペプチドは、例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的(好ましくは皮下または静脈内投与に、または(必要に応じて糖衣を施した)錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようになるものである。さらに、本発明のポリペプチドは、WO 02/85399号公報記載のように、徐放製剤としても使用できる。20

#### 【0040】

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。30

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターーチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターーチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。40

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、50

ネコ、イヌ、サル、など)に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、不妊症の治療の目的で本発明のポリペプチドを皮下投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該ポリペプチドを約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

また、本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、他の薬剤、例えばアルキル化剤(例、サイクロフォスファミド、イフオスファミド等)、代謝拮抗剤(例、メソトレキセート、5-フルオロウラシル等)、抗腫瘍性抗生物質(例、マイトマイシン、アドリアマイシン等)、植物由来抗腫瘍剤(例、ビンクリスチシン、ビンデシン、タキソール等)、シスプラチニン、カルボプラチニン、エトポキシドなどと併用してもよい。本発明のポリペプチドまたは本発明のDNAおよび上記薬剤は、同時または異なった時間に、患者に投与すればよい。

#### 【0041】

(2)性腺機能改善作用、不妊症の予防・治療作用、排卵誘発または促進作用、性腺刺激ホルモン分泌促進または抑制作用、性ホルモン分泌促進または抑制作用を有する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドは、性腺刺激ホルモン(例、FSH、LHなど)分泌促進または抑制作用、性ホルモン(例、アンドロゲン(例、テストステロン、アンドロステンジオンなど)、エストロゲン(例、エストラジオール、エストロンなど)、プロゲステロンなど)分泌促進または抑制作用、性腺機能改善作用、排卵誘発または促進作用、性成熟作用などを有するため、本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、性腺機能改善剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤、性ホルモン分泌促進剤、性ホルモン分泌抑制剤などとして有用であり、例えば、性腺機能不全・機能低下の改善剤、不妊症(例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症(例、インポテンスなど)、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など)、ホルモン感受性癌(例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など)、子宮内膜症などの予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用できる。また、本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物またはその塩は、薬効を発揮させたい部位、組織などにおいて必要量以上存在させた場合(例、好ましくは、連続投与、持続投与等)、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤および(または)性ホルモン分泌抑制剤として、例えば、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用できる。また、例えば単回投与することにより、性腺刺激ホルモン分泌促進剤および(または)性ホルモン分泌促進剤として、例えば、排卵誘発または促進剤などとして用いられる。上記連続投与、持続投与には、単回投与で薬効成分を徐放させる投与方法も含まれる。

一方、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物またはその塩は、例えば排卵抑制剤、卵巣機能調節剤などとして、例えば避妊剤、思春期早発症、ホルモン感受性癌(例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など)、子宮内膜症などの予防・治療剤として使用できる。

該スクリーニングは、本発明のポリペプチドを用いるか、または組換え型本発明のポリペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いた受容体結合アッセイ系を用いることによって、本発明のポリペプチドとその受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、本発明の受容体を介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成 / 抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP-S 結合活性などを促進する活性など)を有する化合

10

20

30

40

50

物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニスト）などが含まれる。「本発明のポリペプチドとの結合性を変化させる」とは、本発明のポリペプチドとの結合を阻害する場合と本発明のポリペプチドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

#### 【0042】

本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法の具体例としては、(i) 本発明の受容体またはその部分ペプチド（以下、これらを単に本発明の受容体と略称する場合がある）に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と(ii) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体の結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法が挙げられる。10

上記スクリーニング方法においては、(i) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と(ii) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明の受容体に対する該ポリペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

#### 【0043】

上記スクリーニング方法のさらなる具体例としては、20  
(a) 標識された本発明のポリペプチドを、上記した本発明の受容体に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

(b) 標識された本発明のポリペプチドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、30

(c) 標識された本発明のポリペプチドを、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、40

#### 【0044】

(d) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチド）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成/抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP-S結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、および50

(e) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドなど）を本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成／抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP-S結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法などである。

標識された本発明のポリペプチドの好ましい具体例は、[<sup>125</sup>I]でそれぞれ標識された配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13または配列番号：15で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。

#### 【0045】

上記スクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の受容体としては、本発明のポリペプチドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明の受容体などが適している。

本発明の受容体を製造するには、前述の製造方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。また、本発明の受容体を発現した宿主細胞は、前述の本発明のポリペプチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、1細胞当たり10<sup>3</sup>～10<sup>8</sup>分子であるのが好ましく、10<sup>5</sup>～10<sup>7</sup>分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

#### 【0046】

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）をスクリーニングする前記の(a)～(c)を実施するためには、適当な本発明の受容体画分と、標識された本発明のポリペプチドな

10

20

30

40

50

どが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識されたポリペプチドとしては、例えば [<sup>3</sup>H]、 [<sup>125</sup>I]、 [<sup>14</sup>C]、 [<sup>35</sup>S] などで標識されたポリペプチドなどを利用することができる。このうち好ましくは、 [<sup>125</sup>I] で標識されたポリペプチドである。

具体的には、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明の受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより受容体標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス・塩酸バッファーなどのポリペプチドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>(花王・アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体や本発明のポリペプチドの分解を抑える目的でPM SF、ロイペプチド、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10mLの該受容体溶液に、一定量(5000~500000cpm)の標識された本発明のポリペプチドを添加し、同時に10<sup>-10</sup>~10<sup>-7</sup>Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0~50、望ましくは4~37 で20分~24時間、望ましくは30分~3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント( $B_0$ )から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント( $B_0$ -NSB)を100%とした時、特異的結合量(B-NSB)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

#### 【0047】

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)をスクリーニングする前記の(d)~(e)の方法を実施するためには、本発明の受容体を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内 cAMP 生成/抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP-S 結合活性などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なつてもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

#### 【0048】

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の受容体またはその塩、本発明の受容体の部分ペプチドまたはその塩、本発明の受容体を含有する細胞、あるいは本発明の受容体を含有する細胞の膜画分、および本発明

10

20

30

40

50

のポリペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

### 1. スクリーニング用試薬

#### (a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

#### (b) 本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5% CO<sub>2</sub>、95% airで2日間培養したもの。

#### (c) 標識リガンド

[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識された本発明のポリペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃または-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。

#### (d) リガンド標準液

本発明のポリペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

### 【0049】

### 2. 測定法

(a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

(b)  $10^{-3}$  ~  $10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μl加えた後、標識された本発明のペプチドを5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るために試験化合物の代わりに $10^{-3}$ Mの本発明のポリペプチドを5 μl加えておく。

(c) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のポリペプチドを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

(d) 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

### 【0050】

上記スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合を変化させる (結合を阻害あるいは促進する) 化合物 (本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物) であり、具体的には本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩 (いわゆる本発明の受容体アゴニスト) 、あるいは該刺激活性を有しない化合物 (いわゆる本発明の受容体アンタゴニスト) である。該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記本発明の受容体アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(i)または(ii)に従えばよい。

(i) 前記(a) ~ (c)のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる (特に、結合を阻害する) 化合物を得た後、該化合物が上記した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体ア

10

20

30

40

50

ゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、上記本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

(b) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体アゴニストなど）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

上記本発明の受容体アゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のポリペプチドと同様に、性腺機能改善剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤、性ホルモン分泌促進剤、性ホルモン分泌抑制剤などとして有用であり、安全で低毒性な、例えば不妊症〔例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など〕、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用することができる。人工授精治療に用いる排卵誘発剤などとしても使用することができる。また、受容体アゴニストは、薬効を発揮させたい部位、組織などにおいて必要量以上存在させた場合（例、好ましくは、連続投与、持続投与等）、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤および（または）性ホルモン分泌抑制剤として、例えば、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用できる。また、例えば単回投与することにより、性腺刺激ホルモン分泌促進剤および（または）性ホルモン分泌促進剤として、例えば、排卵誘発または促進剤などとして用いられる。上記連続投与、持続投与には、単回投与で薬効成分を徐放させる投与方法も含まれる。

上記本発明の受容体アンタゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、例えば排卵抑制剤、卵巣機能調節剤などとして、例えば避妊剤、思春期早発症、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの予防・治療剤として使用できる。

#### 【0051】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの活性または機能を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができます。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、不妊症の治療の目的で本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する

10

20

30

40

50

。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。また、例えば、避妊剤の目的で本発明のポリペプチドの活性を阻害する化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物またはその塩（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体アゴニストなど）は、他の薬剤、例えばアルキル化剤（例、サイクロフォスファミド、イフオスファミド等）、代謝拮抗剤（例、メソトレキセート、5-フルオロウラシル等）、抗癌性抗生物質（例、マイトマイシン、アドリアマイシン等）、植物由来抗癌剤（例、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール等）、シスプラチニン、カルボプラチニン、エトポキシドなどと併用してもよい。上記化合物またはその塩および上記薬剤は、同時または異なった時間に、患者に投与すればよい。10

#### 【0052】

##### （3）本発明のポリペプチドの定量

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドまたは受容体を特異的に認識することができるるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたは受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドまたは受容体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法、および20

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたは受容体の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドまたは受容体のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドまたは受容体のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のポリペプチドまたは受容体に対するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドまたは受容体の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。30

本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドまたは受容体の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

#### 【0053】

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>32</sup>P]、[<sup>33</sup>P]、[<sup>35</sup>S]など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど）、酵素（例、-ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ、アルカリ fosfatas ターゼ、ペーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）、ビオチン、ランタニド元素などが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることができる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレ40

50

ン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に進行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0054】

10

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたは受容体を感度良く定量することができる。

【0055】

50

本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドまたは受容体の濃度を定量することによって、本発明のポリペプチドまたは受容体の濃度の減少が検出された場合、例えば、不妊症〔例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など〕、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のポリペプチドまたは受容体の濃度の増加が検出された場合には、例えば、思春期早発症などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

10

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチドまたは受容体を検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドまたは受容体を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドまたは受容体の検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドまたは受容体の挙動の分析などのために使用することができる。

#### 【0056】

##### （4）遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えは、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えは、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

20

#### 【0057】

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えは、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 5巻, 874 - 879頁（1989年）、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86巻, 2766 - 2770頁（1989年）などにより実施することができる。

例えは、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のポリペプチドまたは受容体の遺伝子の発現低下または遺伝子の欠損が検出された場合は、例えは、不妊症〔例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など〕、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの疾病である可能性が高い、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

30

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のポリペプチドまたは受容体の遺伝子の発現過多が検出された場合は、例えは、思春期早発症などの疾病である可能性が高い、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

#### 【0058】

##### （5）本発明の抗体を含有する医薬

40

本発明の抗体（例、活性化抗体）は、例えは性腺機能改善剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤、性ホルモン分泌促進剤、性ホルモン分泌抑制剤などとして使用することができ、例えは、不妊症〔例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など〕ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして有用である。また、本発明の抗体（例、活性化抗体）は、薬効を発揮させたい部位、組織などにおいて必要量以上存在させた場合（例、好ましくは、連続投与、持続投与等）、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤および（または

50

) 性ホルモン分泌抑制剤として、例えば、ホルモン感受性癌または子宮内膜症の予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用できる。また、例えば単回投与することにより、性腺刺激ホルモン分泌促進剤および(または)性ホルモン分泌促進剤として、例えば、排卵誘発または促進剤などとして用いられる。上記連続投与、持続投与には、単回投与で薬効成分を徐放させる投与方法も含まれる。

本発明の中和抗体は、例えば排卵抑制剤、卵巣機能調節剤などとして、例えば避妊剤、思春期早発症、ホルモン感受性癌(例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など)、子宮内膜症などの予防・治療剤として使用できる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の不妊症の治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて增量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

#### 【0059】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤(例、ポリソルベート80、HCO-50(polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5~500mg、とりわけ注射剤では5~100mg、その他の剤形では10~250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

さらに、本発明の抗体は、他の薬剤、例えばアルキル化剤(例、サイクロフォスファミド、イフオスファミド等)、代謝拮抗剤(例、メソトレキセート、5-フルオロウラシル等)、抗癌性抗生物質(例、マイトマイシン、アドリアマイシン等)、植物由来抗癌剤(

10

20

30

40

50

例、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール等)、シスプラチン、カルボプラチン、エトポキシドなどと併用してもよい。本発明の抗体および上記薬剤は、同時または異なった時間に、患者に投与すればよい。

#### 【0060】

##### (6) アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のアンチセンスDNAは、例えれば排卵抑制剤、卵巣機能調節剤などとして、例えれば避妊剤、思春期早発症、ホルモン感受性癌(例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など)、子宮内膜症などの予防・治療剤として使用できる。

例えれば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

#### 【0061】

##### (7) DNA転移動物

外来性の本発明のポリペプチドまたは受容体をコードするDNA(以下、本発明の外来性DNAと略記する)またはその変異DNA(本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物も、排卵誘発または促進剤などをスクリーニングするために用いられる。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物(以下、本発明のDNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、D E A E - デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えれば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス(例えれば、純系として、C 5 7 B L / 6 系統, D B A 2 系統など、交雑系として、B 6 C 3 F<sub>1</sub> 系統, B D F<sub>1</sub> 系統, B 6 D 2 F<sub>1</sub> 系統, B A L B / c 系統, I C R 系統など)またはラット(例えれば、W i s t a r, S D など)などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異(例えれば、突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えれば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由來のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNA

10

20

30

40

50

を動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

#### 【0062】

本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(a)ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(b)各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターーゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリ fosファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na<sub>+</sub> K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1（EF-1）、アクチン、およびミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1（EF-1）のプロモーター、ヒトおよびニワトリアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

#### 【0063】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のポリペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

10

20

30

30

40

50

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

#### 【0064】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドが関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

#### 【0065】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリ

10

20

30

40

50

ペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

(a) 細胞培養のための細胞源としての使用、

(b) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、 10

(c) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(d) 上記(c)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(e) 本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治疗方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。 20

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることができ、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することができる。 30

#### 【0066】

##### (8) ノックアウト動物

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物も、性腺機能改善剤、不妊症の予防・治療剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤をスクリーニングするために用いられる。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人为的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。 40

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人为的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。 50

## 【0067】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスクレーヴィング遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。10

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活性化する元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス（C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>）を用いて樹立したものなども良好に用いられる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。20

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。30

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

## 【0068】

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を增幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。40

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行なうことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO纖維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1~10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/50

EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることができ〔Nature、第292巻、154頁、1981年；Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、第78巻、7634頁、1981年；ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体の細胞生物学的検討において有用である。  
10

#### 【0069】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。  
20

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人为的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。  
30

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人为的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体のホモ発現不全個体を得ることができる。

#### 【0070】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。  
40

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対  
50

して、正常個体 1 , ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活性化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0071】

10

(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

20

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

30

【0072】

例えば、性腺機能改善剤、不妊症の予防・治療剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤、性ホルモン分泌促進剤、性ホルモン分泌抑制剤などをスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物にPMS処置を行ない、PMS処置後48時間後に試験化合物を投与し、さらに24時間後に該動物の排卵数、血中ホルモン濃度などを経時的に測定する。

【0073】

40

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の排卵数が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上上昇した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成してもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との

50

塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の不妊症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

#### 【0074】

（8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、-ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の-ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに-ガラクトシダーゼが発現する。従つて、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ガラクトピラノシド（X-gal）のような-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成してもよく、該化合物の塩とし

10

20

30

40

50

ては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

【0075】

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することができる、例えば、性腺機能改善剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤、性腺刺激ホルモン分泌抑制剤、性ホルモン分泌促進剤、性ホルモン分泌抑制剤などとして有用であり、例えば不妊症（例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など）、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの予防・治療剤、卵胞成熟阻害剤、性周期停止剤などとして使用することができる。また人工授精時における排卵誘発剤などとして使用することもできる。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、該ポリペプチドの機能を阻害することができる、例えば排卵抑制剤、卵巣機能調節剤などとして、例えば避妊剤、思春期早発症、ホルモン感受性癌（例、ホルモン感受性前立腺癌、ホルモン感受性乳癌など）、子宮内膜症などの予防・治療剤として使用できる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0076】

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

10

20

30

40

50

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々の蛋白質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0077】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

D N A	: デオキシリボ核酸	
c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸	
A	: アデニン	20
T	: チミン	
G	: グアニン	
C	: シトシン	
I	: イノシン	
R	: アデニン（A）またはグアニン（G）	
Y	: チミン（T）またはシトシン（C）	
M	: アデニン（A）またはシトシン（C）	
K	: グアニン（G）またはチミン（T）	
S	: グアニン（G）またはシトシン（C）	
W	: アデニン（A）またはチミン（T）	
B	: グアニン（G）、グアニン（G）またはチミン（T）	30
D	: アデニン（A）、グアニン（G）またはチミン（T）	
V	: アデニン（A）、グアニン（G）またはシトシン（C）	
N	: アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）もしくはチミン（T）または不明もしくは他の塩基	
R N A	: リボ核酸	
m R N A	: メッセンジャー リボ核酸	
d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸	
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸	
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸	
d C T P	: デオキシシチジン三リン酸	40
A T P	: アデノシン三リン酸	
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸	
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム	
B H A	: ベンズヒドリルアミン	
p M B H A	: p - メチルベンズヒドリルアミン	
T o s	: p - トルエンスルfonyl	
B z l	: ベンジル	
B o m	: ベンジルオキシメチル	
B o c	: t - ブチルオキシカルボニル	
D C M	: ジクロロメタン	50

H O B t	: 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール	
D C C	: N, N' - ジシクロヘキシカルボジイミド	
T F A	: トリフルオロ酢酸	
D I E A	: デイソプロピルエチルアミン	
B S A	: ウシ血清アルブミン	
C H A P S	: 3 - [ ( 3 - コラミドプロピル ) ジメチルアンモニオ ] - 1 - プロパンスホナート	
G l y 又は G	: グリシン	
A l a 又は A	: アラニン	
V a l 又は V	: バリン	10
L e u 又は L	: ロイシン	
I l e 又は I	: イソロイシン	
S e r 又は S	: セリン	
T h r 又は T	: スレオニン	
C y s 又は C	: システイン	
M e t 又は M	: メチオニン	
G l u 又は E	: グルタミン酸	
A s p 又は D	: アスパラギン酸	
L y s 又は K	: リジン	
A r g 又は R	: アルギニン	20
H i s 又は H	: ヒスチジン	
P h e 又は F	: フェニルアラニン	
T y r 又は Y	: チロシン	
T r p 又は W	: トリプトファン	
P r o 又は P	: プロリン	
A s n 又は N	: アスパラギン	
G l n 又は Q	: グルタミン	
p G l u	: ピログルタミン酸	
T y r ( I )	: 3 - ヨードチロシン	
D M F	: N, N - ジメチルホルムアミド	30
F m o c	: N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル	
T r t	: トリチル	
P b f	: 2, 2, 4, 6, 7 - ペンタメチルジヒドロベンゾフラン - 5 - スルホニル	
C l t	: 2 - クロロトリチル	
B u t	: t - ブチル	
M e t ( O )	: メチオニンスルフォキシド	

## 【 0 0 7 8 】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号： 1 ]

40

ヒトメタスチン(45-54)のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 2 ]

マウスマタスチン(43-52)およびラットメタスチン(43-52)のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 3 ]

ヒトメタスチンのアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 4 ]

ヒトメタスチンをコードする D N A の塩基配列を示す。

[配列番号： 5 ]

マウスマタスチンのアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 6 ]

50

マウスメタスチンをコードする c DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：7]

ラットメタスチンのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：8]

ラットメタスチンをコードする c DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：9]

ヒトメタスチン(40-54)のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：10]

ヒトメタスチン(40-54)をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：11]

10

ヒトメタスチン(46-54)のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：12]

ヒトメタスチン(46-54)をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：13]

ヒトメタスチン(47-54)のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：14]

ヒトメタスチン(47-54)をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：15]

ヒトメタスチン(48-54)のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：16]

20

ヒトメタスチン(48-54)をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：17]

ヒトメタスチン(45-54)をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：18]

マウスメタスチン(43-52)をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：19]

ラットメタスチン(43-52)をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：20]

ヒトOT7T175のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：21]

30

ヒトOT7T175をコードする c DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：22]

ラットOT7T175のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：23]

ラットOT7T175をコードする c DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：24]

マウスOT7T175のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：25]

マウスOT7T175をコードする DNA の塩基配列を示す。

【0079】

40

以下に実施例および製剤例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

#### 実施例 1

ヒトメタスチンを用いた未成熟ラットでの排卵誘発

equine chorionic gonadotropin (eCG、セロトロピン、大日本製薬) を100 IU/mLで生理食塩水(大塚製薬)に溶解し、生後23日齢の雌性Wistarラット(日本チャールズリバーパー)の背部皮下に、1個体当たり10 IUのeCGを、午前9時30分から10時の間に、容量1mLのツベルクリン用注射筒と26ゲージ注射針(いずれもテルモ)を用いて投与した。eCG投与後47~48時間後に以下に示す群分けを行い、それぞれの薬剤投与を行った。

グループA(ラット5匹) : human chorionic gonadotropin (hCG、ゴナトロピン、大日

50

本製薬)を100 IU/mLで生理食塩水に溶解し、1個体当たり20 IUを背部皮下に投与した。

グループB(ラット5匹)：ヒトメタスチンを100nmol/mLで生理食塩水に溶解し、1個体当たり20nmolを背部皮下に皮下投与した。

グループC(ラット5匹)：ヒトメタスチンを33.3nmol/mLで生理食塩水に溶解し、1個体当たり6.67nmolを背部皮下に投与した。

グループD(ラット6匹)：1個体当たり200 μLの生理食塩水を背部皮下に投与した。

上記の薬剤の投与後、さらに24～25時間後に断頭し、血液、両側卵管および子宮を回収した。血液回収に際しては、血液凝固を防止するために、回収する遠心チューブにはあらかじめ3mg/mL EDTAを含む10KIU/mLのアプロチニン溶液(トラジロール、バイエル)を90 μL入れておいた。血液回収後は、よく混和し、2,000Gで25分間遠心し、上清を回収して血漿サンプルとした。

10

排卵数の計数は、次のようにして行った。

実体顕微鏡下での卵管の観察により、卵管膨大部における卵の滞留が確認された場合には、同部位を27ゲージの注射針(テルモ)によって切開して卵を取り出し、トリプシン処理によって卵を取り囲む顆粒膜細胞を除去した後、卵を計数した。実体顕微鏡下での卵管の観察で、卵管膨大部での卵が確認できなかった場合には、先端を研磨した27ゲージの注射針を卵管口に挿入し、卵管および子宮内を400 μL以上の生理食塩水で洗浄した後、流出液中の卵の有無を観察した。

得られた排卵数を表1に示す。

【表1】

20

	グループA	グループB	グループC	グループD
1	36	29	29	0
2	35	56	39	0
3	40	17	32	0
4	42	25	22	0
5	35	32	16	0
平均排卵数	37.6	31.8	27.6	0.00
標準偏差	3.21	14.65	8.91	0.00

30

表中、1～5はラットの個体番号を示す。

汎用の過排卵処理群であるグループAでは、ラット1匹あたり平均37.6個の排卵が確認された。メタスチンを投与したグループB、グループCでは、それぞれ平均31.8個、27.6個の排卵が確認された。一方、生理食塩水を投与したグループDでは、排卵数の平均は0.6個であり、排卵刺激非存在下での自発的排卵はほとんどなかった。

表1に示すラットから採取した血漿中に含まれるエストラジオール濃度を、ラジオイムノアッセイ(DPC・エストラジオールキット; Diagnostic Products Corporation)により測定した結果を図1に示す。

40

これより、グループA、グループBおよびグループC間で、血漿中に含まれるエストラジオールの濃度差は無く、生理食塩水を投与したグループDでのみ、エストラジオールの濃度が非常に高かったことがわかる。

血漿中に含まれるプロゲステロン濃度を、ラジオイムノアッセイ(DPC・プロゲステロン; Diagnostic Products Corporation)により測定した結果を図2に示す。

これより、プロゲステロン濃度はグループAが最も高く、グループBおよびグループCは、グループAの約半分の血漿濃度であったことが、また、グループDのプロゲステロン濃度は非常に低かったことがわかる。

50

一般に、ラット、マウスおよびヒトの卵巣において産生される主なステロイドホルモンは、卵胞の成熟期ではエストロゲンであり、一方、排卵を誘発された後はプロゲステロンである。実際、図1および図2の結果でも、生理食塩水を投与したグループDでは、排卵が誘発されていないためにエストロゲン産生が高い状態にあり、一方hCGを投与したグループAでは、エストロゲン産生が低下し、プロゲステロンの産生が上昇していることがわかる。メタスチン投与群であるグループBおよびグループCでは、血漿中エストロゲン濃度は非常に低く、逆にプロゲステロン濃度が上昇していることから、メタスチンはラット卵巣に対して、正常な過程を経て排卵を誘発していることがわかる。また、グループAよりもグループB、グループCのプロゲステロン濃度が低いことから、hCGと比べてメタスチンは、より穏やかな卵巣刺激作用を有していると考えられる。

10

#### 【0080】

##### 実施例2

###### ヒトメタスチンの未成熟ラットでのゴナドトロピン放出作用

生後25日齢の雌性Wistarラット（日本チャールズリバー）に対し、午前9時から10時の間に、生理食塩水に33.3 nmol/mLの濃度で溶解したヒトメタスチンを、1個体当たり200  $\mu$ L、すなわちヒトメタスチン6.67nmolを背部皮下に投与した。メタスチンを投与する前、および投与してから1、2、4時間後に断頭し、血液を回収した。血液回収に際しては、血液凝固を防止するために、回収する遠心チューブにはあらかじめ3 mg/mLのEDTAを含む10 KIU/mLのアプロチニン溶液（トラジロール、バイエル）を90  $\mu$ L入れておいた。また回収後は、よく混和した後、2,000Gで25分間遠心し、上清を回収して血漿サンプルとした。血漿中に含まれるFSH（卵胞刺激ホルモン）、LH（黄体刺激ホルモン）、およびプロゲステロン濃度は、ラジオイムノアッセイ（Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH) [125I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、Rat Luteinizing Hormone (rLH) [<sup>125</sup>I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、いずれもアマシャムバイオサイエンス、およびDPC・プロゲステロン、Diagnostic Products Corporation）を用いて測定した。

20

メタスチン投与による未成熟ラット血漿FSH濃度の変動を測定した結果を、図3に示す。メタスチン投与後1時間から、血漿FSH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高くなっていた。4時間後では血漿FSH濃度の低下が認められたが、投与前に比べると高い状態を維持していた。

30

メタスチン投与による未成熟ラット血漿LH濃度の変動を測定した結果を、図4に示す。FSHの場合と同様に、メタスチン投与後1時間から、血漿LH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高くなっていた。4時間後では血漿LH濃度の低下が認められたが、投与前に比べると高い状態を維持していた。

メタスチン投与による未成熟ラット血漿プロゲステロン濃度の変動を測定した結果を、図5に示す。血漿LH濃度の上昇を反映して、血漿プロゲステロン濃度はメタスチン投与後1時間から穏やかな上昇を始め、2時間後は投与前に比べて有意に高い値を示した。

図3および図4の結果より、メタスチンを末梢投与すると、FSH、LHなどのゴナドトロピンの放出が誘導されることがわかる。実施例1で示したメタスチンによる排卵誘発は、このゴナドトロピン放出、特にLHの放出を介したものであると推察される。

40

なお、実施例1で示した排卵誘発作用はeCGを投与したラットでの作用であるが、本実施例の作用は未処置のラットを用いた結果であり、メタスチンによるゴナドトロピン放出作用にはeCGの前処理は必要としない。

図5の結果は、メタスチンの投与によるゴナドトロピンの放出が、卵巣にも生理的な刺激を与え、プロゲステロンの産生を亢進することを意味している。

#### 【0081】

##### 実施例3

###### ヒトメタスチンによる成熟雄性ラットのゴナドトロピン放出作用

生後11週齢の雄性Wistarラット（日本チャールズリバー）に対し、午前10時30分から11時30分の間に、生理食塩水に175 nmol/mLの濃度で溶解したヒトメタスチンを、1個体当た

50

り200  $\mu$ L、すなわちヒトメタスチン35 nmolを背部皮下に投与した。メタスチンを投与する前、および投与してから1、2、4時間後に断頭し、血液を回収した。血液回収に際しては、血液凝固を防止するために、回収する遠心チューブにはあらかじめ3 mg/mLのEDTAを含む10 KIU/mLのアプロチニン溶液（トラジロール、バイエル）を300  $\mu$ L入れておいた。また回収後は、よく混和した後、2,000Gで25分間遠心し、上清を回収して血漿サンプルとした。血漿中に含まれるFSH（卵胞刺激ホルモン）、LH（黄体刺激ホルモン）、およびテストステロン濃度は、ラジオイムノアッセイ（Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH)）[<sup>125</sup>I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、Rat Luteinizing Hormone (rLH) [<sup>125</sup>I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、いずれもアマシャムバイオサイエンス、およびDPC・トータルテストステロン キット、Diagnostic Products Corporation）を用いて測定した。  
10

メタスチン投与によるラット血漿FSH濃度の変動を測定した結果を、図6に示す。メタスチン投与後1時間から、血漿FSH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高く、4時間後でも高い状態を維持していた。

メタスチン投与によるラット血漿LH濃度の変動を測定した結果を、図7に示す。FSHの場合と同様に、メタスチン投与後1時間から、血漿LH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高くなっていた。4時間後では血漿LH濃度の低下が認められたが、投与前に比べると、高い状態を維持していた。

メタスチン投与によるラット血漿テストステロン濃度の変動を測定した結果を、図8に示す。血漿テストステロン濃度はメタスチン投与後1時間に急激な上昇を示し、2時間後、4時間後では低下が認められたが、投与前に比べるといずれの時点でも有意に高い値を示した。  
20

図6および図7の結果より、メタスチンを末梢投与すると、雄性ラットにおいてFSH、LHなどのゴナドトロピンの放出が誘導されることがわかる。実施例1の結果を考慮すると、メタスチンはゴナドトロピンの放出を促す上で、雌雄いずれにおいても非常に重要な因子であると考えられる。

図8の結果は、メタスチンの投与によるゴナドトロピンの放出が、精巣にも生理的な刺激を与え、テストステロンの産生を亢進することを意味している。

これらの結果から、メタスチンの投与は、ゴナドトロピンの放出を介して精巣を刺激すると考えられる。メタスチンは、精子の成熟やホルモンの分泌など、男性生殖機能にも影響を及ぼしうることが示唆された。  
30

#### 【0082】

#### 実施例4

#### ヒトメタスチンペプチドを用いた成熟雄性ラットでのテストステロンダウンレギュレーション作用

生後8週齢の雄性Copenhagenラット（米国チャールズリバー）に対し、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール、大日本製薬）を体重1 kgあたり50 mgとなるように腹腔内投与し、麻酔を施した後、3 mMの濃度で蒸留水に溶解したヒトメタスチン（メタスチン投与群）または蒸留水を封入したALZET浸透圧ポンプ（Model 2001、容量 200  $\mu$ L、速度1.0  $\mu$ L/hr）2個（蒸留水投与群）を、背部皮下に移植した（各群5匹）。これにより、メタスチン投与群では 6.0 nmol/hrの速度でヒトメタスチンが持続的に投与される。ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与には、容量1 mLのツベルクリン用注射筒および26ゲージ注射針（いずれもテルモ）を用いた。その後、ポンプの移植から7日後に体重を測定後、断頭し、血液を回収した。また、同時に精巣重量を測定した。血漿中のヒトメタスチン濃度は、エンザイムイムノアッセイ（EIA）により測定した（J. Clin. Endocrinol. Metab. 88(2): 914-919 (2003)）。また、血漿中に含まれるFSH（卵胞刺激ホルモン）、LH（黄体刺激ホルモン）およびテストステロン濃度は、ラジオイムノアッセイ（Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH) [<sup>125</sup>I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、Rat Luteinizing Hormone (rLH) [<sup>125</sup>I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、いずれもアマシャムバイオサイエンス、およびDPC・トータルテストステロン  
40  
50

キット、Diagnostic Products Corporation)を用いて測定した。

測定結果を図9～図12に示す。

ヒトメタスチン持続投与後の、ヒトメタスチン濃度の平均値は、およそ3.2 pmol/mLであった。

ヒトメタスチン持続投与後の、ラット血漿FSH濃度、LH濃度およびテストステロン濃度、を図9、図10および図11にそれぞれ示す。FSHおよびテストステロンは、ヒトメタスチンの持続投与により有意に低下していることが分かる。LHに関しては有意な変動を認めることができなかった。

ヒトメタスチン持続投与後の、ラット精巣重量(体重に占める割合、%)を図12に示す。ヒトメタスチン持続投与により、精巣重量が有意に低下していることが分かる。

以上の結果より、ヒトメタスチンを持続投与することにより、ゴナドトロピンの放出および精巣におけるテストステロンの産生が低下することがわかった。また、一般にテストステロン産生刺激が低下すると精巣重量は低下するが、今回のヒトメタスチン持続投与による精巣重量の低下は、テストステロン産生刺激が低下したことを反映していると考えられる。

#### 【0083】

##### 製剤例1

(1) ヒトメタスチン	5.0mg
(2) 食塩	20.0mg
(3) 蒸留水	全量2mlとする

ヒトメタスチン5.0mgおよび食塩20.0mgを蒸留水に溶解させ、水を加えて全量2.0mlとする。溶液をろ過し、無菌条件下に2mlのアンプルに充填する。アンプルを滅菌した後、密封し注射用溶液を得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0084】

【図1】ラットの血漿中に含まれるエストラジオールの濃度を表す図である。図中、縦軸はエストラジオールの濃度を、横軸は薬剤投与群のグループをそれぞれ示す。

【図2】ラットの血漿中に含まれるプロゲステロンの濃度を表す図である。図中、縦軸はプロゲステロンの濃度を、横軸は薬剤投与群のグループをそれぞれ示す。

#### 【図3】メタスチン投与による未成熟ラット血漿FSH濃度の変動を表す図である。

#### 【図4】メタスチン投与による未成熟ラット血漿LH濃度の変動を表す図である。

【図5】メタスチン投与による未成熟ラット血漿プロゲステロン濃度の変動を表す図である。

#### 【図6】メタスチン投与によるラット血漿FSH濃度の変動を表す図である。

#### 【図7】メタスチン投与によるラット血漿LH濃度の変動を表す図である。

#### 【図8】メタスチン投与によるラット血漿テストステロン濃度の変動を表す図である。

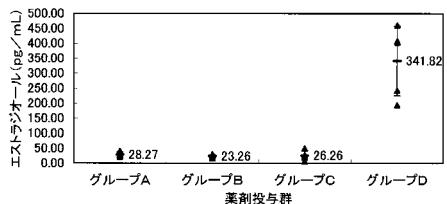
#### 【図9】ヒトメタスチン持続投与後のラット血漿FSH濃度を示した図である。

#### 【図10】ヒトメタスチン持続投与後のラット血漿LH濃度を示した図である。

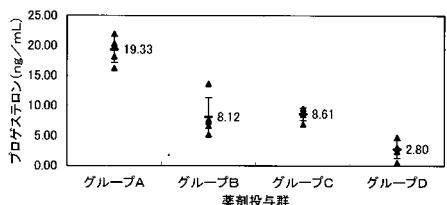
#### 【図11】ヒトメタスチン持続投与後のラット血漿テストステロン濃度を示した図である。

【図12】ヒトメタスチン持続投与後のラット精巣重量(体重に占める割合、%)を示した図である。

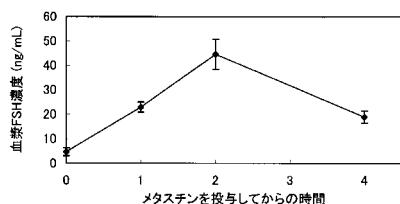
【図1】



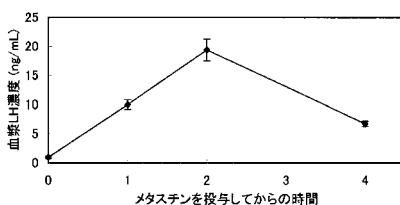
【図2】



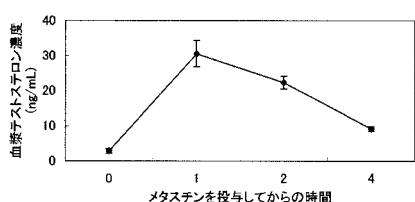
【図3】



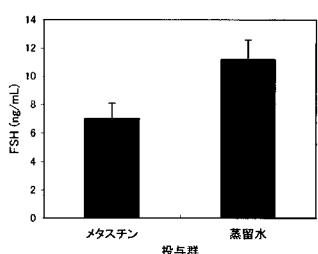
【図7】



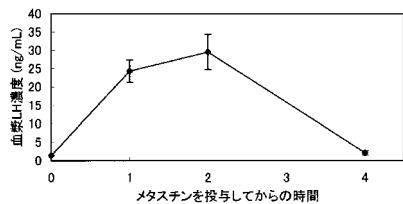
【図8】



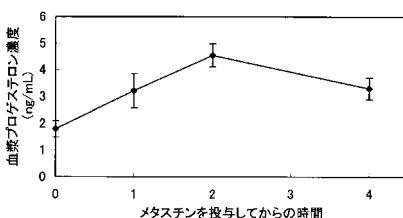
【図9】



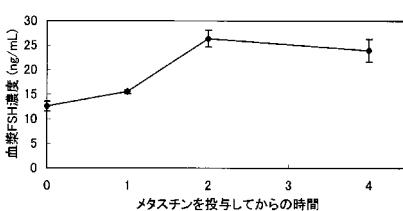
【図4】



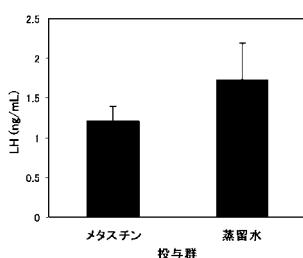
【図5】



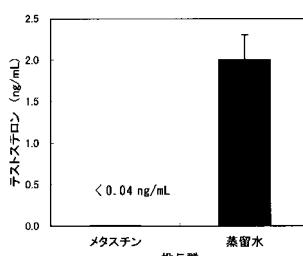
【図6】



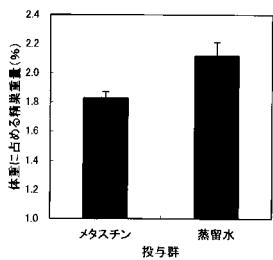
【図10】



【図11】



【図 1 2】



【配列表】

0004639052000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47

(72)発明者 松本 寛和  
茨城県つくば市春日2丁目35-10  
(72)発明者 北田 千恵子  
大阪府堺市南向陽町1丁2-8

審査官 宮坂 隆

(56)参考文献 特開2000-312590 (JP, A)  
特開2001-340094 (JP, A)  
特開2003-002841 (JP, A)  
Nature, 2001年, Vol.411, pp.613-7  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 2003年 2月, Vol.88, pp.914-9  
Nature, 1998年, Vol.393, pp.272-6  
Nature, 1998年, Vol.393, pp.211-2  
Biochem. J., 2001年, Vol.354, pp.379-85  
J. Biol. Chem., 2001年, Vol.276, pp.28969-75

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0  
A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8  
A 6 1 K 4 8 / 0 0  
A 6 1 P 1 5 / 0 8  
A 6 1 P 3 5 / 0 0  
C 0 7 K 1 4 / 4 7  
C A / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I )  
P u b M e d