

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99812722.1

C12N 15/12

C07K 14/705 C07K 16/28

C12P 21/08 C12Q 1/68

A61K 38/02 A61P 35/00

A61P 15/06

[43]公开日 2001 年 11 月 28 日

[11]公开号 CN 1324405A

[22]申请日 1999.10.26 [21]申请号 99812722.1

[30]优先权

[32]1998.10.27 [33]JP [31]305949/1998

[32]1999.2.4 [33]JP [31]27710/1999

[32]1999.3.4 [33]JP [31]57207/1999

[32]1999.9.29 [33]JP [31]276225/1999

[86]国际申请 PCT/JP99/05905 1999.10.26

[87]国际公布 WO00/24890 日 2000.5.4

[85]进入国家阶段日期 2001.4.27

[71]申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪府

[72]发明人 渡边卓也 寺尾宁子 新谷靖

大泷彻也 金桥贵美子 北田千惠子

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 71 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 新型 G 蛋白偶联型受体蛋白、DNA 及其配体

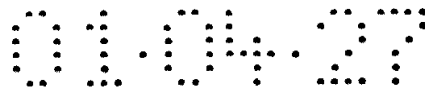
[57]摘要

本发明涉及大鼠脑干周边部及人脑的 G 蛋白偶联型受体蛋白或其盐、其部分肽、或其酰胺或酯或盐;其配体;使这些配体与所述 G 蛋白偶联型受体蛋白之间的结合特性发生变化的化合物的筛选方法/试剂盒;通过所述筛选获得的化合物或其盐;所述 G 蛋白偶联型受体蛋白的抗体。本发明中大鼠脑干周边部及人脑的 G 蛋白偶联型受体蛋白可用于:(1)测定针对本发明受体蛋白的配体(本发明的配体肽)(激动剂),(2)作为预防和/或治疗与本发明 G 蛋白偶联型受体蛋白的功能异常相关的疾病的制剂,(3)作为基因诊断制剂,(4)定量针对本发明 G 蛋白偶联型受体蛋白的配体,(5)筛选使本发明的 G 蛋白偶联型受体蛋白与一种配体(本发明的配体肽)之间的结合特性发生改变的化合物(激动剂、拮抗剂等),(6)作为预防和/或治疗各种疾病的制剂,其中包含使本发明的 G 蛋白偶联型受体蛋白与一种配体(本发

明的配体肽)之间的结合特性发生改变的化合物(激动剂、拮抗剂等),(7)定量本发明的受体蛋白、其部分肽或盐,(8)通过抗体来中和本发明的受体蛋白、其部分肽或盐,(9)制备编码本发明 G 蛋白偶联型受体蛋白的非人类动物的 DNA。

知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 一种蛋白质或其盐，其含有与 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列相同或基本相同的氨基酸序列。
- 5 2. 权利要求 1 的蛋白质或其盐，其中所述相同或基本相同的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5 所示序列。
3. 权利要求 1 所述蛋白的部分肽，或其酯、或其酰胺或其盐。
4. 一种多核苷酸，其包含具有编码权利要求 1 所述蛋白质的碱基序列的多核苷酸。
- 10 5. 权利要求 4 的多核苷酸，该多核苷酸为 DNA。
6. 权利要求 4 的多核苷酸，其含有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 所示的碱基序列。
7. 一种重组载体，其含有权利要求 4 的多核苷酸。
8. 一种转化体，其用权利要求 7 所述重组载体转化而成。
- 15 9. 一种生产权利要求 1 的蛋白或其盐的方法，其包含培养权利要求 8 的转化体，并从中产生和积累权利要求 1 的蛋白质。
10. 一种抗体，其针对权利要求 1 的蛋白质或其盐以及权利要求 3 的部分肽或其酯或其酰胺或其盐。
11. 权利要求 10 的抗体，其为能使权利要求 1 所述蛋白质的信号传导
- 20 活性失活的中和抗体。
12. 一种诊断组合物，其含有权利要求 10 的抗体。
13. 一种针对权利要求 1 中蛋白质或其盐的配体，该配体通过使用权利要求 1 的蛋白质或其盐或权利要求 3 的部分肽、其酯、其酰胺或其盐获得。
- 25 14. 一种药物组合物，其含有权利要求 13 的配体。
15. 一种用于测定针对权利要求 1 中蛋白或其盐的配体的方法，其中使用权利要求 1 的蛋白或其盐或权利要求 3 的部分肽、其酰胺、其酯或其盐。
16. 一种用于筛选能改变配体与权利要求 1 中蛋白质或其盐的结合特
- 30 性的化合物或其盐的方法，其包括对权利要求 1 中蛋白质或其盐或权利要求 3 中部分肽、其酰胺、其酯或其盐的应用。

17. 一种用于筛选能改变配体与权利要求 1 中蛋白质或其盐之结合特性的化合物或其盐的试剂盒，其包含权利要求 1 的蛋白质或其盐，或权利要求 3 的部分肽、其酯、其酰胺或其盐。

5 18. 一种能改变配体与权利要求 1 中蛋白质或其盐之结合特性的化合物或其盐，所述化合物或其盐可通过使用权利要求 16 的筛选方法或权利要求 17 的试剂盒而获得。

19. 一种药物组合物，其含有能改变配体与权利要求 1 中蛋白质或其盐之结合特性的化合物或其盐，所述化合物或其盐可通过使用权利要求 16 的筛选方法或权利要求 17 的试剂盒获得。

10 20. 一种定量权利要求 1 的蛋白质的方法，其包括使用权利要求 10 的抗体。

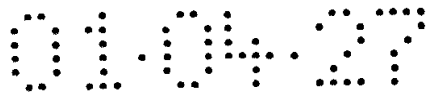
21. 一种肽、其酰胺、其酯或其盐，其在 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列中包含 N 端第 47-54 位的氨基酸，且其含有 8-54 个氨基酸残基。

15 22. 权利要求 21 的肽、其酰胺、其酯或其盐，它们在 C 末端包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列中 N 端第 47-54 位的氨基酸，并包含 8-15 个氨基酸残基。

23. 权利要求 21 所述肽的酰胺或盐，其包含 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

20 24. 权利要求 16 的筛选方法，其中所述配体是权利要求 21 的肽或其酰胺，其酯或其盐。

25. 权利要求 16 的筛选试剂盒，其中所述配体是权利要求 21 的肽或其酰胺，其酯或盐。



说明书

新型 G 蛋白偶联型受体蛋白、DNA 及其配体

5 发明领域

本发明涉及来自大鼠脑干周边部分及人脑的一种新型 G 蛋白偶联型受体蛋白或其盐及其编码 DNA，还涉及针对该 G 蛋白偶联型受体蛋白具有配体活性的肽或其酰胺或其酯或其盐等。

发明背景

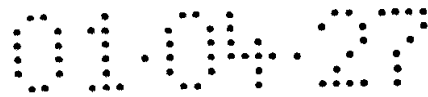
10 多种生理活性物质如激素、神经递质等通过细胞膜上特异性受体蛋白调节着生物机体的功能。很多这类受体蛋白通过活化它们所偶联的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(以下简称为 G 蛋白)而介导细胞内的信号传递，它们具有共同结构，即 7 个跨膜区，并因此总称为 G 蛋白偶联型受体蛋白或 7 跨膜区受体蛋白(7TMR)。

15 G 蛋白偶联型受体蛋白存在于机体细胞和内脏器官的每一功能性细胞表面，它们是诸如激素、神经递质、生理活性物质等分子的重要靶，这些分子可控制、调节或调整活体内细胞和内脏器官的功能。这些受体蛋白通过结合生理活性物质而介导细胞内的信号传递，并由这些信号引发各种反应如细胞的激活或抑制。

20 弄清那些调节各种活体内细胞和内脏器官之复杂功能的物质与它们的特异性受体蛋白(尤其 G 蛋白偶联型受体蛋白)之间的关系，将阐明各种活体内细胞和内脏器官的功能机制，并因此提供一种用于开发与这些功能有密切关系之药物的非常重要的方法。

如，在活体的各种器官中，生理功能均通过多种激素、激素样物质、
25 神经递质或生理活性物质控制。尤其是，机体内各个部位的生理活性物质通过其相应受体蛋白调节其生理功能。体内还有很多未知激素，神经递质或其他生理活性物质，至今仅对其表面的少数受体蛋白有报导。即使是已知的受体蛋白至今也不清楚其是否存在亚型。

30 药物开发中，弄清调节体内复杂功能的物质与其特异性受体蛋白之间的关系也十分重要。为了在药物开发中更有效地筛选受体蛋白的激动剂和



拮抗剂，必须阐明体内表达的受体蛋白基因的功能，并在适当的表达系统中表达这些基因。

近年来，cDNA 序列的随机分析已成为体内表达的基因的常用分析方法。如此获得的 cDNA 片段的序列已注册并作为表达序列标签(EST)公开在数据库。但大多数 EST 仅含有序列信息，很难推测其功能。

可以抑制 G 蛋白偶联蛋白与生理活性物质(即配体)结合的物质，以及能够结合生理活性物质从而诱导出与该生理活性物质(即配体)所诱导信号传导相似的信号传导的物质，这些物质已作为调节生物功能之受体的特异性拮抗剂或激动剂使用。因此，找到一种不仅对体内生理表达十分重要，而且可作为药物开发之目标的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白，并克隆这些基因(例如 cDNA)，对于寻找该新型 G 蛋白偶联型受体蛋白的特异性配体、激动剂及拮抗剂具有非常重要的意义。

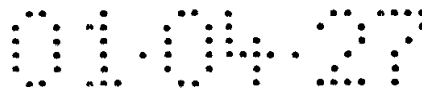
但是，并非所有的 G 蛋白偶联型受体蛋白都已经发现。即使到现在，仍然有许多未知的 G 蛋白偶联型受体，以及那些相应配体未明的受体，即孤儿受体。因而，亟需发现一种新型 G 蛋白偶联型受体蛋白，并阐明其功能。

G 蛋白偶联型受体可用于根据所述信号传导活性寻找新型生理活性物质(即配体)，还可用于寻找该受体的激动剂和拮抗剂。即使未发现任何生理配体，也可以通过受体灭活试验(基因敲除动物)分析该受体的生理活性以制备其激动剂和拮抗剂。该受体的配体、激动剂及拮抗剂可作为与 G 蛋白偶联型受体之功能紊乱相关的疾病的预防/治疗性药物及诊断药物。

因 G 蛋白偶联型受体的体内基因突变引发该受体功能低下或亢进常导致某些疾病。这种情况下，所述 G 蛋白偶联型受体不仅可作为拮抗剂或激动剂给药，还可通过将该受体基因转入机体(或特定器官)，或通过将反义核酸传至受体基因而实现基因治疗。在所述基因治疗中，所述受体基因碱基序列的信息对于研究该基因的缺失或突变是必不可少的。该受体基因还可作为与该受体失调相关的疾病的预防/治疗性药物及诊断药物。

此外，该受体的内源性配体或具有该配体活性的物质的发现可以确保构建用于筛选该受体的拮抗剂或激动剂的系统。

发明公开



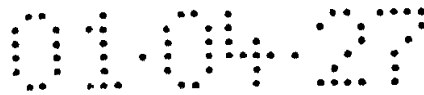
本发明提供了一种如上所述新型且有用的 G 蛋白偶联型受体蛋白。即，
本发明提供了一种新型 G 蛋白偶联型受体蛋白，它的部分肽及其盐，以及
包含编码该 G 蛋白偶联型受体蛋白及其部分肽的多核苷酸(DNA 和 RNA，
及其衍生物)的多核苷酸(DNA 和 RNA，及其衍生物)、含有上述多核苷酸的
5 重组载体、带有该重组载体的转化体、用于制备该 G 蛋白偶联型受体蛋白
及其盐类的方法、抗所述 G 蛋白偶联型受体蛋白、其部分肽及其盐类的抗
体、改变所述 G 蛋白偶联型受体蛋白表达水平的化合物、用于测定所述 G
蛋白偶联型受体蛋白的配体的方法、用于筛选能够改变配体与所述 G 蛋白
偶联型受体蛋白结合特性之化合物(拮抗剂及激动剂)或其盐类的方法、用于
10 所述筛选方法的试剂盒、利用所述筛选方法或所述筛选试剂盒和所述 G 蛋
白偶联型受体蛋白获得的配体结合特性已改变的化合物(拮抗剂及激动剂)或
其盐类、含有所述能改变 G 蛋白偶联型受体蛋白之配体结合特性的化合物的
药物组合物、或能改变 G 蛋白偶联型受体蛋白表达水平的化合物或其盐
类。

15 另外，本发明提供了具有针对 G 蛋白偶联型受体蛋白的配体活性的肽
类。

本发明人经过大量的研究，根据由简并 PCR 方法获得的 EST 信息，
成功分离到编码大鼠脑干周边部分以及人脑的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白
的 cDNA，从而成功分析了该 cDNA 的完整碱基序列。从该碱基序列推导
20 出的氨基酸序列支持了下述事实：从第 1 个到第 7 个跨膜结构域在疏水图
谱试验中都已发现，这样就确证了由该 cDNA 编码的蛋白质是一种 7 次通
过胞膜的 G 蛋白偶联型受体蛋白。

本发明人使用从已知肽中或基因数据库中发现的新型肽，进一步研究
发现一种肽，这种肽能增加 G 蛋白偶联型受体蛋白表达细胞的胞内 Ca 离
25 子水平。因此，现已查明由癌转移-抑制基因 KiSS-1(Genomics, 54, 145-148,
1998)编码的蛋白质的 C-末端肽具有活化该受体的活性。KiSS-1 是一种蛋白
质编码基因。本发明人将注意力集中到了由 KiSS-1 中的 54 个氨基酸残基
组成的肽的序列，并合成了上述 C-末端部分肽。将所述肽与受体进行反应
性试验证实所述肽具有上述的配体活性。

30 通过剪切上述 KiSS-1 基因产物获得的肽可以用于抑制肿瘤转移，因为
这些肽的基因是癌转移抑制基因。另外，这些肽在胎盘中发挥着重要作用，



这源于该基因在胎盘中表达量丰富，hOT7T175 是 G 蛋白偶联型受体蛋白当中的人类型的受体，它在胎盘中也大量表达。该受体在人胰腺中的表达量也相对丰富，因此该肽可能在胰腺中也具有一定生理功能。

基于这些发现，本发明人进行了广泛的研究，得出了结论，从而完成

5 本发明。

因此，本发明涉及：

(1)一种含有与 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列相同或基本相同的氨基酸序列的蛋白质或其盐类；

10 (2)一种如(1)所述蛋白质或其盐类，其中所述的基本相同的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；

(3)一种(1)所述蛋白质的部分肽或其酯或其酰胺或其盐；

(4)一种多核苷酸，其包含具有编码(1)所述蛋白质的碱基序列的多核苷酸；

(5)一种如(4)所述多核苷酸，该核苷酸为 DNA；

15 (6)一种如(4)所述多核苷酸，其含有如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 所示的碱基序列；

(7)一种含有如(4)所述多核苷酸的重组载体；

(8)一种被如(7)所述重组载体转化的转化体；

20 (9)一种用于制备如(1)所述蛋白质或其盐的方法，该方法包括培养如(8)所述转化体，制备并富集如(1)所述蛋白质；

(10)抗如(1)所述蛋白质或其盐的抗体以及抗如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐的抗体；

(11)如(10)所述的抗体，其是能够失活如(1)所述蛋白质的信号传导作用的中和抗体；

25 (12)一种含有如(10)所示抗体的诊断组合物；

(13)一种如(1)所述蛋白质或其盐的配体，该配体可通过使用如(1)所述蛋白质或其盐或使用如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐来获得；

(14)一种含有如(13)所述配体的药用组合物；

30 (15)一种用于测定如(1)所述蛋白质或其盐的配体的方法，其中使用如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐；

(16)一种用于筛选能够改变配体与如(1)所述蛋白质或其盐的结合特性的化合物或其盐的方法，该方法包括使用如(1)所述蛋白质或其盐，或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐；

5 (17)一种用于筛选能够改变配体与如(1)所述蛋白质或其盐结合特性的化合物或其盐的试剂盒，其使用如(1)所述蛋白质或其盐或，如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐；

(18)一种能够改变配体与(1)所述蛋白质或其盐的结合特性的化合物或其盐，该化合物可以通过使用如(16)所述筛选方法或如(17)所述筛选试剂盒来获得；

10 (19)一种含有能够改变配体与如(1)所述蛋白质或其盐结合特性的化合物或其盐的药用组合物，其可以通过使用如(16)所述筛选方法或如(17)所述筛选试剂盒来获得；

(20)一种定量(1)所述蛋白质的方法，该方法包括使用如(10)所述抗体；

15 (21)一种如(21)所述肽、其酰胺、其酯或其盐，其在 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列中包含 N 端第 47 至 54 位的氨基酸序列，而且其含有 8~54 个氨基酸残基；

(22)一种肽、其酰胺、其酯或其盐，其在 C 末端包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列中 N 端 47 至 54 位氨基酸序列，而且其含有 8~15 个氨基酸残基；

20 (23)如(21)所述肽的酰胺或盐，包括 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID 14 所示的氨基酸序列；

(24)一种如(16)所述筛选方法，其中所述配体是一种如(21)所述肽、其酰胺、其酯或其盐；以及

25 (25)一种如(17)所述筛选试剂盒，其中所述配体是一种如(21)所述肽、其酰胺、其酯或其盐。

本发明还提供了：

(26)一种如(1)所述蛋白质或其盐，其中包括(i)SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列，其中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，更优选 1~9 个氨基酸，最优选数(1~2)个氨基酸)被缺失；(ii)SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列，其中添加了 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，更优选 1~10 个氨基酸，最优选数(1~2)个氨基酸)；(iii)SEQ ID NO: 1 所示氨基

30

酸序列，其中的1个、2个或多个氨基酸(优选1~30个氨基酸，更优选1~10个氨基酸，最优选数(1~2)个氨基酸)被其他氨基酸所取代；以及(iv)上述氨基酸序列的组合；

5 (27)一种如(16)所述筛选方法，其中比较下述两种情况(i)让如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐与所述配体接触；(ii)让如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐与所述配体以及待测化合物接触；

10 (28)一种用于筛选能够改变配体与(1)所述蛋白质或其盐之间结合特性的化合物或其盐的方法，其中包括测量和比较：(i)使标记配体与如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐接触后，与如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐结合的该标记配体的量；(ii)使标记配体及待测化合物与如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐接触后，与如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐结合的该标记配体的量；

15 (29)一种用于筛选能够改变配体与(1)所述蛋白质或其盐之间结合特性的化合物或其盐的方法，其中包括测量和比较：(i)使标记配体与含有如(1)所述蛋白质的细胞接触后，与该细胞结合的该标记配体的量；(ii)使标记配体及待测化合物与所述细胞接触后，与所述细胞结合的标记配体的量；

20 (30)一种用于筛选能够改变配体与(1)所述蛋白质或其盐之间结合特性的化合物或其盐的方法，其中包括测量和比较：(i)使标记配体与含有如(1)所述蛋白质的细胞膜组分接触后，与该细胞膜组分结合的该标记配体的量；(ii)使标记配体及待测化合物与所述细胞膜组分接触后，与该细胞膜组分结合的标记配体的量；

25 (31)一种用于筛选能够改变配体与(1)所述蛋白质或其盐之间结合特性的化合物或其盐的方法，其中包括测量和比较：(i)通过培养如(8)所述转化体，使标记配体与转化体细胞膜上表达的蛋白质接触，而结合在该表达蛋白上的标记配体的量；(ii)通过培养如(8)所述转化体，使标记配体及待测化合物与转化体细胞膜上表达的蛋白质接触，而结合在该表达蛋白上的标记配体的量；

30 (32)一种用于筛选能够改变配体与(1)所述蛋白质或其盐之间结合特性的化合物或其盐的方法，其中包括测量和比较：(i)使能活化如(1)所述蛋白

质或其盐的化合物与含有如(1)所述蛋白质的细胞接触时，蛋白质介导的细胞刺激活性；(ii)使能活化如(1)所述蛋白质或其盐的化合物及待测化合物与含有如(1)所述蛋白质的细胞接触时，蛋白质介导的细胞刺激活性；

5 (33)一种用于筛选能够改变配体与(1)所述蛋白质或其盐之间结合特性的化合物或其盐的方法，其中包括测量和比较：(i)使能活化如(1)所述蛋白质或其盐的化合物与如(8)所述转化体培养后表达在其细胞膜上的蛋白质接触时，蛋白质介导的细胞刺激活性；(ii)使能活化如(1)所述蛋白质或其盐的化合物及待测化合物与如(8)所述转化体培养后表达在其细胞膜上的蛋白质接触时，蛋白质介导的细胞刺激活性；

10 (34)一种如(32)或(33)所述筛选方法，其中所述能够活化(1)所述蛋白质的化合物是如(21)所述肽、其酰胺、其酯或其盐；

(35)一种能够改变配体与如(1)所述蛋白或其盐之间结合特性的化合物，其可通过(27)～(34)所述筛选方法获得；

15 (36)一种药用组合物，其含有能够改变配体与如(1)所述蛋白或其盐之间结合特性的化合物，该化合物可通过(27)～(34)所述筛选方法获得；

(37)一种如(17)所述筛选试剂盒，其包括含如(1)所述蛋白质的细胞；

(38)一种如(17)所述筛选试剂盒，其中包括一种含有如(1)所述蛋白质的细胞膜组分；

20 (39)一种如(17)所述筛选试剂盒，其中包括一种通过培养如(8)所述转化体细胞而在其膜中表达的蛋白质；

(40)一种能够改变配体与如(1)所述蛋白质或其盐之间结合特性的化合物或其盐，该化合物或其盐可通过(37)～(39)所述筛选方法获得；

25 (41)一种药用组合物，其包括一种能够改变配体与如(1)所述蛋白或其盐之间结合特性的化合物或其盐，该化合物或其盐可通过(37)～(39)所述筛选方法获得；

(42)一种用于定量如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐的方法，该方法包括让如(10)所述抗体与如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐接触；

30 (43)一种用于定量样品溶液中的如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐的方法，该方法包括让样品中的如(10)所述抗体与样品溶液及标记的(1)所述蛋白质或其盐或经标记后的(3)所述部分肽或其

酯或其酰胺或其盐进行竞争性反应，测定与所述抗体结合的上述标记物质的相应比例；以及

(44)一种用于定量样品溶液中的如(1)所述蛋白质或其盐或如(3)所述部分肽或其酯或其酰胺或其盐的方法，该方法包括让一种样品溶液与固定于载体上的(10)所述抗体以及经标记后的(10)所述抗体同时或先后反应，然后测定固定于载体上的标记物活性。

附图简述

图 1 为编码实施例 1 中来自大鼠脑干周边部分的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的 DNA 碱基序列以及从该 DNA 序列推导的氨基酸序列(下接图 2)。

图 2 为编码实施例 1 中来自大鼠脑干周边部分的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的 DNA 碱基序列以及从该 DNA 序列推导的氨基酸序列(上续图 1，下接图 3)。

图 3 为编码实施例 1 中来自大鼠脑干周边部分的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的 DNA 碱基序列以及从该 DNA 序列推导的氨基酸序列(续图 2)。

图 4 为在图 1~3 所示氨基酸序列基础上制备的大鼠脑干周边部分新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的疏水性图谱。

图 5 为编码实施例 2 中来自人脑的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的 DNA 碱基序列以及从该 DNA 序列推导的氨基酸序列(下接图 6)。

图 6 为编码实施例 2 中来自人脑的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的 DNA 碱基序列以及从该 DNA 序列推导的氨基酸序列(上续图 5，下接图 7)。

图 7 为编码实施例 2 中来自人脑的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的 DNA 碱基序列以及从该 DNA 序列推导的氨基酸序列(上续图 6)。

图 8 为在图 5~7 所示氨基酸序列基础上制备的来自人脑干周边部分的新型 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的疏水性图谱。

图 9 为实施例 3(1-2)中对细胞内 Ca 离子水平-增加活性进行测试所得到的测量结果。

本发明实施方案的最佳模式

本发明的蛋白质(受体蛋白、G 蛋白偶联型受体蛋白; 下文通常称为"本发明受体蛋白")的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1(图 1 ~ 3 所示氨基酸序列)相同或基本相同。

- 5 本发明受体蛋白可以是来自人及其他哺乳动物(例如, 豚鼠、大鼠、小鼠、兔子、猪、绵羊、牛、猴子等)任一种细胞的任一种肽, 所述细胞如脾细胞、神经细胞、神经胶质细胞、胰腺 β 细胞、骨髓细胞、肾小球膜细胞、朗格罕氏细胞、表皮细胞、上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞、肌细胞、脂肪细胞、免疫细胞(例如, 巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞等)、巨核细胞、滑膜细胞、软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、
- 10 乳腺细胞、肝细胞或间质细胞、或这些细胞的前体细胞、干细胞或癌细胞等; 血细胞系; 或任一种含此类细胞的组织, 例如脑、脑的各部分(例如, 嗅球、屏状核、大脑基底神经节、海马回、丘脑、丘脑下部、丘脑下核、
- 15 大脑皮质、延髓、小脑、后额叶、前额叶、颞叶、豆状核、尾状核、胼胝体、黑质)、脊髓、脑垂体、胃、胰腺、肾、肝、生殖腺、甲状腺、胆囊、骨髓、肾上腺、皮肤、肌肉、肺、消化道(例如大肠、小肠)、血管、心脏、胸腺、脾、胰下腺、外周血、外周血细胞、前列腺、睾丸、附睾、卵巢、胎盘、子宫、骨、关节、骨骼肌等, 特别是脑及脑的各部分。所述肽也可以
- 20 以为合成肽。

与 SEQ ID NO: 1 所示序列相同或基本相同的氨基酸序列包括与 SEQ ID NO: 1 所示序列具有至少约 50% 同源性的氨基酸序列, 优选同源性至少约 70%, 较优选至少约 80%, 更优选约 90%, 最优选至少约 95%。

- 25 所述蛋白质具体实例包括一种包含 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列(图 5~7 所示氨基酸序列)的蛋白质。

与 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列基本相同的蛋白质的优选实例是一种序列与 SEQ ID NO: 1 基本相同以及活性与 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列基本相同的蛋白质。

- 30 基本相同活性的实例包括配体结合活性、信号传导活性等。术语“基本相同”是指其活性的实质彼此相同。因此优选地, 尽管配体结合活性或

信号传导活性等活性是同等的(如约 0.01-100 倍, 优选约 0.5-20 倍, 更优选约 0.5-2 倍), 但活性的大小以及蛋白质分子量等量化因素可以彼此不同。

所述活性, 例如配体结合活性或信号传导活性可以根据公知方法测定, 例如, 用将在下文中描述的配体测定以及筛选方法。

5 本发明受体蛋白可以包括(i)SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列, 其中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸, 更优选 1~10 个氨基酸, 最优选数个(1 或 2)氨基酸)被缺失; (ii)SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列, 其中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸, 更优选 1~10 个氨基酸, 最优选数个(1 或 2)氨基酸)被添加; (iii)SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列, 其
10 中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸, 更优选 1~10 个氨基酸, 最优选数个(1 或 2)氨基酸)被其他氨基酸所取代; 以及(iv)上述氨基酸序列的组合。

本发明受体蛋白可包括(i)SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列, 其中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸, 更优选 1~10 个氨基酸, 最优选
15 数个(1 或 2)氨基酸)被缺失; (ii)SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列, 其中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸, 更优选 1~10 个氨基酸, 最优选数个(1 或 2)氨基酸)被添加; (iii)SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列, 其中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~30 个氨基酸, 更优选 1~10 个氨基酸, 最优选数个(1 或 2)氨基酸)被其他氨基酸所取代; 以及(iv)上述氨基酸序列
20 的组合。

本发明受体蛋白可以用本领域已知的描述肽的方法来定义。即, 左末端(氨基端)为 N 末端, 右末端(羧基端)为 C-末端。本发明受体蛋白中包括 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列, C-末端为通常羧基(-COOH)或羧酸盐(-COO⁻), 但是 C-末端也可以为酰胺(-CONH₂)或酯(-COOR)。

25 用 R 表示的酯基团有 C_{1~6} 烷基如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基等; C_{3~8} 环烷基如环戊基、环己基等; C_{6~12} 芳基如苯基、 α -萘基等; 苯基-C_{1~2} 烷基, 如苯甲基、苯乙基等; α -萘基-C_{1~2} 烷基等 C_{7~14} 芳烷基, 如 α -萘甲基等。此外, 广泛用作口服酯类的三甲基乙酰氧甲基或其类似物也可以使用。

当本发明受体蛋白在羧基末端以外的位置上包括一个羧基(羧酸酯)时, 它可以酰胺化或酯化, 则这类酰胺或酯也可以包括在本发明所述受体的范围之内。所述酯基可以与上述 C-末端的酯基相同。

另外, 本发明受体蛋白可以包括下述衍生物, 其中上述蛋白质 N 末端
5 甲硫氨酸中的氨基用保护基(如 $C_{1\sim6}$ 酰基, 如甲酰基、乙酰基等)保护; 所述 N 末端区域在体内切割, 形成的谷氨酰基团焦谷氨酸化; 所述蛋白分子中氨基酸侧链上的取代基(例如, -OH, -SH, -COOH, 氨基、咪唑基、吡啶基、胍基等)受适当基团($C_{1\sim6}$ 酰基, 例如 $C_{2\sim6}$ 烷酰基, 象甲酰基、乙酰基等)保护, 或偶联型蛋白如通过糖链连接的糖蛋白。

10 本发明受体蛋白的实例包括含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的大鼠受体蛋白以及含有 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的人源受体蛋白。

本发明受体蛋白的部分肽(下文中有时称为部分肽)可以为任一种部分肽, 只要它构成上述本发明受体蛋白的肽部分的一部分。这类部分肽的实例包括暴露于本发明受体蛋白分子的细胞膜外侧, 并保留了受体结合活性的位点。
15

含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的本发明部分肽的一个实例为, 包含下述区域的肽, 该区域经分析为图 4 所示疏水图中的胞外区域(亲水区或亲水位点)。含 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的本发明部分肽的一个实例为包含下述区域的肽, 该区域经分析为图 8 所示疏水图中的胞外区域(亲水区或亲水位点), 部分含有疏水区或疏水位点的肽也可以使用。另外, 分别只包含一个结构域的肽可以使用, 同时含有多种结构域的部分肽也可使用。
20

本发明部分肽中参与构成本发明受体蛋白的氨基酸数目可以为至少 20 个或更多, 优选 50 个或更多, 更优选 100 个或更多。

基本相同的氨基酸序列指氨基酸序列的同源性至少约 50%, 优选至少
25 约 70%, 较优选至少约 80%, 更优选至少约 90%, 最优选至少约 95%。

本发明中, 术语“基本相同的活性”定义同上。“基本相同的活性”可以用上述方法分析。

本发明部分肽的氨基酸序列中, 缺失了 1 个、2 个或多个氨基酸(优选约 1~10 个氨基酸, 更优选数个(1 或 2)氨基酸); 添加了 1 个、2 个或多个
30 氨基酸(优选约 1~20 个氨基酸, 更优选约 1~10 个氨基酸, 最优选数个(1

或 2) 氨基酸); 或其中的 1 个、2 个或多个氨基酸(优选 1~10 个氨基酸, 更优选数个(1 或 2)氨基酸)被其他氨基酸所取代。

本发明部分肽中, C-末端为通常羧基(-COOH)或羧酸酯(-COO⁻), 但是 C-末端也可以为酰胺(-CONH₂)或酯(-COOR), 如前述。

5 如前述, 本发明部分肽也可以包括偶联型肽, 如 N 末端氨基受保护基团保护的肽; N 末端残基被体内切割, 产生的 Gln 转化为焦谷氨酸的肽; 肽分子中氨基酸侧链上的取代基受适当保护基团保护的肽; 以及以糖链连接为糖肽的肽。

10 因此, 本发明受体蛋白或其部分肽可以用生理上可接受的碱或酸形式使用, 优选为生理上可接受的酸加成盐。这样的盐有, 与无机酸(例如, 盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)形成的盐, 与有机酸(例如, 乙酸、蚁酸、丙酸、延胡索酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)等。

15 因此, 本发明的受体蛋白或其盐可用公知的从人或其他哺乳动物细胞或组织中纯化受体蛋白的方法来制备。替代地, 本发明受体蛋白或其盐也可以通过培养含有本发明受体蛋白之编码 DNA 的转化体而制备, 该方法见下文。本发明受体蛋白或其盐也可用下述蛋白合成法或其改良法来制备。

20 当从人或哺乳动物组织或细胞中制备受体蛋白或其盐时, 首先将人或哺乳动物组织或细胞匀浆, 然后用酸等抽提, 通过反向层析、离子交换层析等多种层析技术的联用来分离并纯化该抽提物。

为了合成本发明受体蛋白、部分肽或其盐或胺, 可以使用可用于蛋白合成的商用树脂。这类树脂的实例包括氯甲基树脂、羟甲基树脂、二苯甲胺树脂、氨甲基树脂、4-苄氧基苯甲醇树脂, 4-甲基二苯甲基胺树脂, PAM 树脂, 4-羟甲基苄基乙酰胺甲酯树脂, 聚丙烯酰胺树脂, 4-(2',4'-二甲氧基苯羟甲基)苯氧基树脂以及 4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨乙基)苯氧基树脂。使用这些树脂时, 将那些其侧链上 α -氨基及功能基团受到相应保护的氨基酸, 在树脂上按目标蛋白的序列顺序, 用本领域公知的各种缩合方法缩合。反应结束时, 将蛋白质从树脂上切除下来, 同时除去保护基团。然后在高度稀释的溶液中进行分子内二硫键的形成反应, 以获得目标蛋白或其酰胺。

30 进行上述受保护氨基酸的缩合反应时, 可使用蛋白合成的多种活化试剂, 但优选使用碳二亚胺。这样的碳二亚胺有 DCC、N,N'-二异丙基碳二亚

胺、以及正乙基-N'-(3-二甲基氨基脯氨酰基)碳二亚胺。用这些试剂活化时，直接在树脂上添加受保护的氨基酸及外消旋抑制剂(例如，HOBt, HOObt)，或先将受保护的氨基酸活化为对称酸酐、HOBt 酯或 HOObt 酯，然后添加到树脂上。

- 5 适用于受保护氨基酸的活化反应或适用于与树脂的缩合反应的试剂选自己知可用于蛋白质缩合反应的试剂。这样的试剂有酰胺类如 N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺以及正甲基吡咯烷酮；卤化烃类如亚甲基盐酸盐和氯仿；醇类如三氟乙醇；亚砷类如二甲亚砷；醚类如吡啶、二噁烷和四氢呋喃；腈类如乙腈和丙腈；酯类如乙酸甲酯和乙酸乙酯；以及这些溶剂的相应混合物。反应温度从已知适用于蛋白质成键反应的范围中选取，通常选约-20℃ - 50℃。活化的氨基酸衍生物通常以过量 1.5~4 倍的量使用。用茚三酮反应检验所述缩合反应；当所述缩合不充分时，可通过不除去保护基团而重复缩合反应来完成。当即使重复反应后仍未充分缩合时，用乙酸酐或乙酰咪唑将未反应的氨基酸乙酰化，以消除对后续反应的可能负影响。

- 15 用于保护初始氨基酸的保护基团有 Z、Boc、叔戊氧基羰基、异冰片基氧羰基、4-甲氧苄氧羰基、Cl-Z、Br-Z、金刚烷(adamantyl)氧基羰基，三氟乙酰基、邻苯二甲酰基、甲酰基、2-硝基苯基亚硫酸基、二苯硫磷基，以及 Fmoc。

- 20 羧基可用如下的酯化作用保护，例如烷基酯化(烷基如甲基、乙基、丙基、丁基、叔丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基和 2-金刚烷基的线性、支链或环状烷基酯)，芳烷基酯化(例如，苯甲酯、4-硝基苄酯、4-甲氧苄酯、4-氯苄酯以及二苯甲基酯)，苯甲酰甲基酯化，苄氧羰基酰肼化，t-丁氧羰基酰肼化以及三苯甲基酰肼化。

- 25 丝氨酸的羟基可以通过例如酯化作用或醚化作用来保护。适于酯化作用的基团有低级烷酰基如乙酰基，芳酰基如苯甲酰基，以及来自碳酸的基团如苄氧羰基和乙氧羰基。适于醚化的基团有苯甲基、四氢吡喃基和叔丁基。

适于保护酪氨酸中酚羟基的基团有 Bzl, Cl₂-Bzl, 2-硝基苄基、Br-Z 和叔丁基。

- 30 适于保护组氨酸中咪唑基的基团有 Tos, 4-甲氧-2,3,6-三甲基苯磺酰基、DNP、苄氧甲基、Bum、Boc、Trt 和 Fmoc。

起始氨基酸中的活化羧基有相应的酸酐、叠氮化物、活化酯(带有醇的酯(如五氯苯酚、2,4,5-三氯苯酚、2,4-二硝基酚、氰甲基醇、对硝基苯酚、HONB, N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基邻苯二甲酰亚胺、HOBt)。将起始物质中待活化的氨基酸的氨基活化时, 可以使用其相应磷酰胺。

- 5 为了除去(脱离)保护基, 在氢气流下用 Pd-黑或 Pd-碳等催化剂进行催化还原; 用氢氟酸酐、甲磺酸、三氟甲磺酸或三氟醋酸, 或这些酸的混合液进行酸处理; 用二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶或哌嗪等碱进行碱处理; 以及用液态氨中的钠还原。用上述酸处理除去所述保护基团的反应通常在约-20℃~40℃进行。在酸处理中, 添加阳离子清除剂以使反应有效进行,
- 10 例如使用甲氧基苯、苯酚、硫代甲氧基苯、间甲酚、对甲酚、二甲基硫化物、1,4-丁二硫醇或 1,2-乙二硫醇。此外, 用苯硫酚处理以除去已知可作为组氨酸中咪唑的保护基团的 2,4-二硝基苯基。用作色氨酸中吲哚的保护基团的甲酰基用下述方法去除: 在 1,2-乙二硫醇或 1,4-丁二硫醇存在时用上述酸进行处理, 以及用氢氧化钠稀溶液和稀氨水等碱进行处理。

- 15 与起始物质之反应无关的功能基团的保护、保护基的选择、该保护基的消除、以及与上述反应有关的功能基团的活化, 从公知的基团和公知的方法中适当选择。

- 20 获得酰胺化蛋白质的其它方法有, 如先将羧基末端氨基酸的 α -羧基酰胺化而加以保护; 然后, 将肽(蛋白)链从氨基侧延伸至预期长度。然后, 制备只将其中 N 末端 α -氨基的保护基团除去的蛋白质以及只将其中 C-末端羧基的保护基团除去的蛋白质。将这两种蛋白质浓缩在上述溶剂的混合液中。浓缩反应的细节同上。对浓缩所得被保护蛋白进行纯化后, 通过上述方法除去所有的保护基团获得所需粗制蛋白。该粗制蛋白可用各种已知的纯化方法进行纯化。冻干主要成分获得期望蛋白的酰胺化物。

- 25 将羧基末端氨基酸的 α -羧基与所选醇缩合获得氨基酸酯, 然后用与上述制备酰胺化蛋白方法类似的方法获得所需酯化蛋白。

- 30 本发明部分肽可通过已知的肽合成方法, 或用相应肽酶切割本发明受体蛋白而制备。就肽合成的方法而言, 固相合成或液相合成都可使用。即, 将能构成本发明受体蛋白的部分肽或氨基酸与本发明受体蛋白的其他部分缩合在一起。当产物中包含保护基团时, 除去这些保护基团得到所需肽。用来缩合或除去保护基团的公知方法见下列 1)~ 5)。

1)M. Bodanszky 和 M.A. Ondetti: 肽的合成, Inter 科学 Publishers, 纽约(1966)

2)Schroeder 和 Luebke: 肽, Academic Press, 纽约(1965)

3)泉屋信夫等: 多肽合成与实验, 丸善公司(1975)

5 4)矢岛治明和原俊平: 生物化学实验教材 1, 蛋白质化学 IV, 205(1977)

5)矢岛治明编: 药物开发续篇, 卷 14, 肽合成, 广州书店

10 反应完成后, 可将常规纯化方法如溶剂提取、蒸馏、柱层析、液体层析以及重结晶等进行组合以纯化并回收本发明部分肽。当用上述方法获得的部分肽为游离形式时, 可以用公知的方法将所述肽转化为相应盐; 当所述蛋白以盐形式获得时, 可以用公知的方法将其转化为游离形式。

15 编码本发明受体蛋白的多核苷酸可以为任一种多核苷酸, 只要其中含有上述的编码本发明受体蛋白的碱基序列(DNA 或 RNA, 优选 DNA)即可。所述多核苷酸可以为包含本发明受体蛋白的编码 mRNA 的 DNA 和 RNA。所述多核苷酸可以为双链也可以为单链。当该多核苷酸为双链时, 它可以为双链 DNA 或 DNA:RNA 杂合体。当该多核苷酸为单链时, 它可以为正义链(即编码链)或反义链(即非编码链)。

使用编码本发明受体蛋白的多核苷酸时, 可以用实验医学增刊, 15(7), “新型 PCR 及其应用”(1997)中公开的方法或其改良法对本发明受体蛋白的 mRNA 进行定量。

20 编码本发明受体蛋白的 DNA 可以为下述情形的任何一种: 基因组 DNA、基因组 DNA 文库、上述组织或细胞的 cDNA、上述组织或细胞的 cDNA 文库以及合成 DNA。用于上述文库的载体可以为噬菌体、质粒、粘粒以及噬菌粒中的任意一种。所述 DNA 可以用从上述细胞或组织中制备的总 RNA 或 mRNA 级分通过反转录聚合酶链反应(以下简称为 RT-PCR)直接扩增。

25 具体而言, 编码本发明受体蛋白的肽的 DNA 可以为任一种 DNA, 只要其具有, 例如, SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列的对应 DNA, 或其具有能在严谨条件下与 SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 6 所示碱基序列杂交的碱基序列, 并且以编码具有与本发明受体蛋白活性(配体结合活性、信号传导活性等)基本相同的蛋白质。

可与 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 所示碱基序列杂交的 DNA 有，与 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 所示碱基具有至少约 70% 同源性的 DNA，优选至少约 80%，更优选至少约 90%，最优选约 95%。

5 可以用公知方法或其改良方法进行所述杂交反应，例如，分子克隆，第 2 版；J. Sambrook 等，冷泉港实验室出版社，(1989)中所述方法。也以按照所附说明书使用文库商品。该杂交反应优选在高度严谨的条件下进行。

此处使用的高严谨度条件，例如钠离子的浓度为大约 19-40mM，优选 19-20mM，而温度为大约 50-70℃，优选大约 60-65℃。最优选钠离子浓度大约 19mM，杂交温度为大约 65℃。

10 更具体的，对于编码 SEQ ID NO: 1 所代表氨基酸序列的 DNA 序列，以使用 SEQ ID NO: 2 所代表的 DNA 序列，而对于编码 SEQ ID NO: 5 所代表氨基酸序列的 DNA 序列，以使用 SEQ ID NO: 6 所代表的 DNA 序列。

15 包含本发明受体蛋白之编码 DNA 的部分碱基序列或与该 DNA 互补的部分碱基序列的多核苷酸，不但包括下述编码本发明部分肽的 DNA，还包括 RNA。

根据本发明，基于所克隆或测定的受体蛋白编码 DNA 的碱基序列信息，可设计并合成能够抑制本发明受体蛋白基因复制或表达的反义多核苷酸(核酸)。这些多核苷酸(核酸)可以与所述蛋白基因的 RNA 杂交并抑制 RNA 的合成或 RNA 功能，或通过受受体蛋白相关 RNA 的相互作用，来调控受体蛋白基因的表达。与受体蛋白相关 RNA 的特定序列互补的多核苷酸，以及能与受体蛋白相关 RNA 特异性杂交的多核苷酸，可用于在体内和体外调控该受体蛋白基因的表达。这些多核苷酸也可用于治疗 and 诊断疾病。术语“相应”指与特定核苷酸序列、碱基序列或含有基因的核酸同源或互补。在核苷酸、碱基序列或核酸和肽(蛋白)之间，术语“相应的”通常指来自该核苷酸(核酸)或其互补序列的肽(蛋白)的氨基酸。可选定受体蛋白基因的 5' 25 末端发夹结构、5' 末端 6 碱基对重复序列、5' 末端非翻译区、多肽翻译起始密码子、蛋白编码区、ORF 翻译起始密码子、3' 端非翻译区、3' 端回文区、和 3' 端发夹环作为优选目标区域，但受体蛋白基因的任何区域都可作为目标区域。

30 目标核酸和同目标序列至少有一部分互补的多核苷酸之间的关系，更具体的说，目标序列和能同其杂交的多核苷酸之间的关系被指定为“反义”。

反义多核苷酸可以是包含 2-脱氧-D-核糖的多聚脱氧核苷酸、包含 D-核糖的多聚脱氧核苷酸、任何其它正糖苷嘌呤或嘧啶的多核苷酸或其它含有非核苷酸骨架的多聚体(例如蛋白核酸和商品化合成的序列特异性核酸多聚体)或其它含有非标准键的多聚体(只要该多聚体含有核苷酸, 其构型允许碱基配对或堆积, 如在 DNA 或 RNA 中一样)。反义多核苷酸可以是双链 DNA、单链 DNA、单链 RNA 或 DNA:RNA 杂交体, 并进一步包括未修饰的多核苷酸(或未修饰的寡核苷酸)、具有众所周知修饰类型的多核苷酸, 例如具有本领域所知的标记的多核苷酸, 具有帽子的甲基化多核苷酸、用相应类似物替代一个或多个天然核苷酸的多核苷酸、在核苷酸分子内修饰的多核苷酸例如具有不带电荷的连接(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸酰胺、氨基甲酸酯等)以及具有电荷的连接或含有硫的连接的多核苷酸(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、具有侧链基团的多核苷酸例如蛋白(包括核酸酶、核酸酶抑制剂、毒素、抗体、信号肽、多聚 L-赖氨酸等)和糖(例如单糖等)、具有插入子的多核苷酸(例如丫啶、补骨脂素等)、具有螯合物的多核苷酸(例如, 金属、放射性金属、硼、金属氧化物等)、含有烷基化试剂的多核苷酸、含有修饰连接的多核苷酸(例如, α 异构核酸等)。此处术语“核苷”、“核苷酸”和“核酸”用以指代, 不但包含嘌呤和嘧啶碱基部分, 还包括经过修饰的杂环的分子。这些修饰包括甲基化嘌呤和嘧啶、乙酰化嘌呤和嘧啶以及其它杂环。修饰的核苷或核苷酸还包括在糖基部分的修饰, 例如可选择性的将一或多个羟基用卤素、脂肪酸基团代替, 或转化为相应功能基团例如醚、酰胺或类似物。

本发明的反义多核苷酸(核酸)为 RNA、DNA 或修饰的核酸(RNA、DNA)。修饰核酸的具体例子为, 但不局限于, 核酸的含硫衍生物和硫代磷酸衍生物以及能抗多核苷和寡核苷酰胺降解的核酸。本发明反义核酸的修饰优选根据以下设计进行, 也就是说, 通过增加反义核酸在细胞内的稳定性、增加该反义核酸的细胞通透性、增加该核酸同靶正义链的高亲和性、或如果反义核酸有毒性, 则降低其毒性。

在本领域有许多这样的修饰, 如 J. Kawakami 等, Pharm. Tech. Japan, vol. 8, pp.247, 1992; vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke 等编, 反义研究与应用, CRC Press, 1993 等。

本发明的反义核酸可包含改变或修饰的糖基、碱基或键。反义核酸可

以以脂质体、微球等或用于基因治疗的特殊形式提供、或组合连接部分。这些连接部分包括聚阳离子，例如作为磷酸骨架电荷中和剂的赖氨酸、或疏水部分如用于加强同细胞膜之相互作用或增加核酸摄入的脂(例如磷脂、胆固醇等)。优选的连接脂有胆固醇或其衍生物(例如胆甾烯基氯甲酸酯、胆

5 酸等)。这些部分可以连接在核酸的 3' 或 5' 端，也可通过连接碱基、糖基或分子内核苷键连接。其它部分可能为加帽基团，特异的置于核酸的 3' 或 5' 端，用于阻止核酸酶如外切酶、RNase 等对核酸的降解。这些加帽基团包括但不局限于本领域熟知的羟基保护基团、包括醇类如聚乙二醇、四乙醇等。

10 对反义核酸的抑制活性的检测，可以使用本发明的转化体、本发明的体外和体内基因表达系统、或本发明受体蛋白体外或体内翻译系统等进行。可以用不同的已知方法将核酸用于细胞。

编码本发明部分肽的 DNA 可以是任何 DNA，只要它包含编码本发明上述部分肽的碱基序列。DNA 可以是基因组 DNA、基因组 DNA 文库、来

15 自于上述细胞和组织的 cDNA、来自于上述细胞和组织的 cDNA 文库和合成性 DNA。用于文库的载体可以是噬菌体、质粒、粘粒或噬菌粒。DNA 可以通过反转录聚合酶链反应(此处仅指 RT-PCR)从上述细胞和组织制备的 mRNA 部分直接扩增得到。

编码本发明部分肽的 DNA 序列的具体例子包括(1)具有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 所示 DNA 的部分序列的 DNA 或(2)具有能同 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 所示 DNA 序列在高严谨条件下杂交并含有编码受体蛋白的部分 DNA 序列的 DNA，其中该受体蛋白具有同本发明受体蛋白基本上相同的活性(例如，配体结合活性、信号转导活性等)。

20

能同 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 所代表的 DNA 序列杂交的 DNA

25 例子包括，具有同 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 所代表的 DNA 序列至少 70% 同源性的 DNA，优选至少 80% 同源性，更优选至少 90%，最优选至少 95%。

克隆本发明受体蛋白或部分肽(以后有时指本发明的受体蛋白)的完整 DNA 编码序列时，可以用含有部分本发明受体蛋白碱基序列的合成 DNA 引物直接进行 PCR 扩增，或用编码本发明受体蛋白的部分或完整区域的标

30 记 DNA 片段或合成 DNA，通过杂交来筛选已插入到合适载体中的 DNA。杂交可以根据分子克隆第二版(J. Sambrook 等，冷泉港实验室出版社，1989)

描述的方法进行。也可用商品化的文库根据所附的说明进行杂交。

DNA 碱基序列的转换可根据众所周知的方法如 Gapped duplex 法或 Kunkel 法或其改进方法, 使用众所周知的商品化试剂盒 MutanTM-G 或 MutanTM-K(均来自宝酒造株式会社)进行。

- 5 已经克隆的编码本发明受体蛋白的 DNA, 根据所要达到的目的, 必要时, 可在用限制酶消化后或连接一接头之后使用。DNA 可能在 5' 端包含 ATG 密码作为翻译起始密码, 而在 3' 端有 TAA、TGA 或 TAG 作为翻译终止密码。这些翻译起始和终止密码也可用合适的合成 DNA 接头加上。

- 10 本发明受体蛋白的表达载体可通过以下方法生产, 例如, (a)从编码本发明受体蛋白的 DNA 上切下所需 DNA 片段, (b)将该 DNA 片段连接到一合适的载体的启动子下游。

- 可以使用的载体例子包括来自大肠杆菌的质粒(例如, pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、来自枯草杆菌的质粒(例如, pUB110、pTP5、pC194)、来自酵母的质粒(例如, pSH19、pSH15)、噬菌体如 λ 噬菌体等、
15 动物病毒如反转录病毒、痘苗病毒、杆状病毒等以及 pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo 等。。

- 本发明使用的启动子可以是任何启动子, 只要它能同所用的表达宿主很好的匹配。在使用哺乳动物细胞作为宿主时, 启动子有 SR α 启动子、SV40 启动子、LTR 启动子、CMV 启动子、HSV-TK 启动子等。在这些启动子中,
20 优选 CMV 启动子或 SR α 启动子。

- 如果宿主为大肠杆菌属的细菌, 优选的启动子有 trp 启动子、lac 启动子、recA 启动子、 λ PL 启动子、lpp 启动子等。在使用枯草杆菌属的细菌作宿主时, 优选的启动子有 SPO1 启动子、SPO2 启动子和 penP 启动子。在用酵母作宿主时, 优选的启动子有 PHO5 启动子、PGK 启动子、GAP 启动子和 ADH 启动子。在用昆虫细胞作宿主时, 优选的启动子有多角体蛋白启动子和 P10 启动子。

- 除了前述的实例, 表达载体可选择性的进一步包含, 增强子、剪接信号、poly A 加尾信号、选择标记、SV40 复制起始子(下文有时简写为 SV40ori)等。选择标记的例子包括, 二氢叶酸还原酶(下文缩写为 dhfr)基因[甲氨喋
30 呤(MTX)抗性]、氨苄青霉素抗性基因(下文有时缩写为 Amp^r)、新霉素抗性基因(下文有时缩写为 Neo, G418 抗性)等。具体的, 当 CHO(dhfr)细胞用 dhfr

基因作为选择标记时，使用无胸腺嘧啶的培养基进行筛选。

如果必需或希望，可在本发明受体蛋白的 N 端加上同宿主匹配的信号序列。在用大肠杆菌属细菌作宿主时，可以使用的信号序列的例子为 Pho A 信号序列、OmpA 信号序列等；当用枯草杆菌属的细菌作宿主时，可以使用的信号序列的例子为 SR α 淀粉酶信号序列、枯草杆菌蛋白酶信号序列等；在用酵母作宿主时，可以使用的信号序列的例子为 MF α 、SUC2 信号序列等；在用哺乳动物细胞作宿主时，可以使用的信号序列的例子为胰岛素信号序列、 α 干扰素信号序列、抗体分子信号序列等。

使用含有编码本发明受体蛋白 DNA 序列的构建载体，可获得转化体。
10 可以使用的宿主的实例有，属于大肠杆菌属的细菌、属于枯草杆菌属的细菌、酵母、昆虫细胞、昆虫以及动物细胞等。

大肠杆菌属的细菌有，大肠杆菌 K12 DH1(美国国家科学院院刊, 60, 160(1968))、JM103(核酸研究, 9, 309(1981))、JA221(分子生物学杂志, 120, 517(1978))、HB101(分子生物学杂志, 41, 459(1969))、C600(遗传学, 39, 15 440(1954))等。

枯草杆菌属的细菌有，枯草杆菌 MI114(基因, 24, 255(1983))、207-21(生物化学杂志, 95, 87(1984))等。

酵母有，酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)
20 NCYC1913、NCYC2036、巴斯德毕赤酵母(*pichia pastoris*)等。

就昆虫细胞而言，病毒为 AcNPV 时有草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, Sf)的细胞、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)中肠的 MG1 细胞、粉纹夜蛾卵的 High Five™ 细胞、甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)的细胞、*Estigment acrea* 的细胞等；病毒为 BmNPV 时有家蚕(*Bombyx mori*)的 N 细胞(BmN 细胞)等。
25 用的 Sf 细胞有 Sf9 细胞(ATCC CRL1711)和 Sf21 细胞(这两种细胞均由 Vaughn, J.L.等在 In Vivo, 13, 213-217(1977)中描述)。

作为昆虫的例子，可以使用家蚕的幼虫(Maeda 等，自然, 315, 592(1985))。

动物细胞包括猴 COS-7 细胞、Vero、中华仓鼠细胞 CHO(下文称作 CHO 细胞)、dhfr 基因缺失的中华仓鼠细胞 CHO(下文称作 CHO(dhfr)细胞)、小鼠 L 细胞、小鼠 AtT-20 细胞、小鼠骨髓瘤细胞、大鼠 GH3、人 FL 细胞等。

大肠杆菌属的细菌可以根据美国国家科学院院刊, 69, 2110(1972)或基因, 17, 107(1982)中描述的方法进行转化。

枯草杆菌属的细菌可以根据分子及普通遗传学, 168, 111(1979)中描述的方法进行转化。

5 酵母可以根据酶学方法, 194, 182-187(1991)或美国国家科学院院刊., 75, 1929(1978)中描述的方法进行转化。

昆虫细胞或昆虫可以根据生物/技术, 6, 47-55(1988)中描述的方法进行转化。

10 动物细胞的转化可以根据, 细胞工程学增订版 8, 细胞工程实验最新方法, 秀润出版社, 263-267(1995)或病毒学, 52, 456(1973)中描述的方法进行。

由此, 可以获得用含有本发明受体蛋白或部分肽之编码 DNA 的表达载体转化的转化体。

15 当宿主为大肠杆菌或枯草杆菌属的细菌时, 转化体可以在合适的液体培养基中保温, 该培养基含有转化体生长所需的物质例如碳源、氮源、无机物等。碳源的例子包括葡萄糖、糊精、可溶性淀粉、蔗糖等。氮源的例子包括无机或有机物质如铵盐、硝酸盐、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白、肉汁、黄豆饼粉、马铃薯抽提物等。无机物的例子包括氯化钙、磷酸二氢钠、氯化镁等。此外, 在培养基中也可加入酵母、维生素、促生长因子等。优选的, 培养基的 pH 值调节到大约 5-8。

优选用于培养大肠杆菌属细菌的培养基有, 加有葡萄糖和酪蛋白水解物的 M9 培养基(Miller, 分子遗传学实验杂志, 431-433, 冷泉港实验室, 纽约, 1972)。如果需要和希望, 可以在培养基中加入化学试剂如 3 β -吲哚基丙烯酸, 来有效激活启动子。

25 当用大肠杆菌属的细菌作为转化宿主时, 转化体通常在大约 15-43 $^{\circ}$ C 培养大约 3-24 小时。如果需要和希望, 培养物可以进行充气或搅拌。

当用枯草杆菌属的细菌作为转化宿主时, 转化体通常在大约 30-40 $^{\circ}$ C 培养大约 6-24 小时。如果需要和希望, 培养物可以进行充气或搅拌。

30 当用酵母作为宿主时, 转化体培养在, 例如 Burkholder 氏基本培养基 (Bostian, K.L.等, 美国国家科学院院刊, 77, 4505(1980))或加了 0.5% 酪蛋白水解物的 SD 培养基(Bitter, G.A.等, 美国国家科学院院刊, 81, 5330(1980))。

优选的，培养基 pH 值调节到大约 5-8。一般的，转化体通常在大约 20-35℃ 培养大约 24-72 小时。如果需要和希望，培养物可以进行充气或搅拌。

当用昆虫细胞或昆虫作为宿主时，转化体培养在，例如 Grace's 昆虫培养基(Grace, T.C.C., 自然, 195, 788(1962))，其中添加有固相化 10% 胎牛血清等适当添加剂。优选的，培养基 pH 值调节到大约 6.2-6.4。转化体通常在大约 27℃ 培养大约 3-5 天。如果需要和希望，培养物可以进行充气或搅拌。

当用动物细胞作为宿主时，转化体培养在，例如含有大约 5-20% 胎牛血清的 MEM 培养基(科学, 122, 501(1952))、DMEM 培养基(病毒学, 8, 396(1959))、RPMI 1640 培养基(美国医学会杂志, 199, 519(1967))、199 培养基(Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950))等。优选的，培养基 pH 值调节到大约 6-8。转化体通常在大约 30-40℃ 培养大约 15-60 小时。如果需要和希望，培养物可以进行充气或搅拌。

如上所述，本发明的受体蛋白或其部分肽可以生产在转化体的细胞膜上。

可以根据下述方法从上述培养物中分离纯化本发明的受体蛋白或部分肽。

在培养后，用众所周知的方法收集转化体或细胞，悬浮在一合适的缓冲液中，从中抽提本发明的受体蛋白或部分肽。然后用众所周知的方法破碎转化体或细胞，如超声处理、溶菌酶处理和/或反复冻溶等，然后离心、过滤。因此，可以获得本发明受体蛋白或部分肽的粗提物。用于此程序的缓冲液包含蛋白变性剂如尿素或盐酸胍、或表面活性剂如 Triton X-100™ 等。当本发明的受体蛋白或部分肽分泌在培养液中时，在培养后，用众所周知的方法从转化体或细胞中经分离而收集上清。

上清或包含在所获抽提物中的本发明受体蛋白或部分肽可通过将已知的分离和纯化方法适当组合来进行纯化。这些众所周知的分离纯化方法包括，利用溶解性差异的方法如盐析、溶剂沉淀等；利用分子量差异的方法如透析、超滤、凝胶过滤、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳等；利用电荷差异的方法如离子交换层析等；利用特异性亲和力差异的方法如亲和层析等；利用疏水性差异的方法例如反相高效液相色谱等；利用等电点差异的方法如等电聚焦电泳；和类似的方法。

当如此获得的本发明受体蛋白或部分肽为游离形式时，可用众所周知

的方法或修饰作用将其转换为盐。相反的，当获得的本发明的受体蛋白或部分肽为盐时，可用众所周知的方法或修饰作用将其转换为游离形式或另一种盐形式。

5 重组产生的本发明受体蛋白或部分肽，在纯化前或纯化后，可用相应蛋白修饰酶处理，从而使蛋白或部分肽经合适修饰，部分去除一段多肽。这种蛋白修饰酶的例子包括胰酶、胰凝乳蛋白酶、精氨酸内肽酶、蛋白激酶、糖苷酶或类似的酶。

由此产生的本发明的受体蛋白或其盐、部分肽或其酯、酰胺或盐的活性，可通过对标记配体的结合测试和特异性抗体的酶免疫分析法测定。

10 针对本发明受体蛋白或其盐、部分肽或其酯、酰胺或盐(下文有时并称作本发明的受体蛋白或类似物)的抗体或针对本发明配体肽(后面将描述)的抗体可以是任何多克隆或单克隆抗体，只要它们能识别本发明的受体蛋白或类似物或本发明的配体肽。

15 针对本发明的受体蛋白或类似物或本发明配体肽的抗体可用众所周知的生产抗体或抗血清的方法生产，其中使用本发明的受体蛋白或类似物或本发明配体肽作为抗原。

[单克隆抗体的制备]

(a)单克隆抗体生产细胞的制备

20 将本发明的受体蛋白或类似物或配体肽，单独或与载体或稀释剂一起给药于哺乳动物体内能产生抗体的部位。为了增强给药后抗体的产量，可给予弗氏完全或不完全佐剂。有效给药通常为大约每 2-6 周一次，一共 2-10 次。使用的哺乳动物包括猴子、兔子、狗、豚鼠、小鼠、大鼠、绵羊、山羊或类似的动物，优选小鼠和大鼠。

25 在制备产单克隆抗体的细胞时，从抗原免疫的恒温动物如小鼠中选择抗体滴度比较明显的动物，在最后一次免疫的 2-5 天后取脾脏或淋巴结，使其中产生抗体的细胞同骨髓瘤细胞融合，获得产生抗体的杂交瘤细胞。抗血清中抗体滴度的测定可以通过使抗血清与标记的本发明受体蛋白或类似物或配体肽反应，然后测定标记试剂同抗体的结合活性。可以根据 Koehler 和 Milstein(自然, 256, 495, 1975)的方法进行融合。融合加速剂的例子为聚乙
30 二醇(PEG)、仙台病毒等，优选 PEG。

骨髓瘤细胞的例子包括 NS-1、P3U1 和 SP2/0，优选 P3U1。所用产生

抗体细胞(脾细胞)同骨髓瘤细胞的比例优选为大约 1:1 到 20:1, PEG(优选 PEG 1000-6000)的加入浓度为大约 10%-80%。细胞融合可以有效的在 20-40°C 进行, 优选大约 30-37°C 保温约 1-10 分钟。

5 可以用各种方法筛选产生单克隆抗体的杂交瘤。这些方法有: 将作为抗原的本发明受体蛋白或类似物或配体肽, 直接或与载体一起吸附至一种固相, 将杂交瘤上清加入到该固相中, 然后加入标记有放射性物质、酶或蛋白 A 的抗免疫球蛋白抗体(如果用小鼠细胞作融合, 则用抗小鼠的免疫球蛋白抗体), 检测结合到固相上的单克隆抗体; 另一方法为, 将杂交瘤上清加入到吸附有抗免疫球蛋白抗体或蛋白 A 的固相中, 加入标记有放射性物质或酶的本发明受体蛋白或类似物或配体肽, 检测结合到固相上的单克隆抗体。

单克隆抗体的筛选可以根据众所周知的方法或其改进方法进行。一般的, 在含有 HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶)的动物细胞培养基中进行筛选。可以使用任何筛选和生长培养基, 只要杂交瘤可以在其中生长。
15 例如, 可以使用含有 1%-20%, 优选 10-20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基、含有 1%-10%胎牛血清的 GIT 培养基(和光纯药工业株式会社)、无血清的杂交瘤培养基(SFM-101, 日水制药株式会社)以及类似培养基来作为筛选或生长培养基。通常在含 5%CO₂ 的条件下于 20-40°C(优选 37°C)培养约 5 天-3 周(优选 1-2 周)。杂交瘤培养上清中抗体滴度的测定同上述抗血清中抗体滴度测定方法相同。

(b)单克隆抗体的纯化

单克隆抗体的分离和纯化可根据传统多克隆抗体分离和纯化相似的方法进行, 例如免疫球蛋白的分离和纯化方法(如盐析、乙醇沉淀、等电点沉淀、电泳、离子交换剂(如 DEAE)吸附和去吸附、超离心、凝胶过滤、或一种特异性纯化方法, 其包括收集仅与活化的吸附剂如抗原结合性固相、蛋白 A 或蛋白 G 结合的抗体, 然后解除该结合以获得抗体。

[多克隆抗体的制备]

本发明多克隆抗体的制备用众所周知的方法或其改进方法进行。例如, 用与上述生产单克隆抗体相似的方式配制免疫原(受体蛋白或类似物的抗原)与载体蛋白的复合物并用其免疫哺乳动物。从免疫动物收集产物, 其中含有本发明受体蛋白或类似物或配体肽的抗体, 分离和纯化该抗体。

在由免疫原和载体组成的用于免疫动物的复合物中，对载体蛋白的类型和载体同半抗原的混合比率无限定，只要能针对与载体一起免疫的半抗原有效产生抗体。例如，牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或匙孔蛾血蓝蛋白与半抗原以载体比半抗原重量比约 0.1-20(优选 1-5)的方式偶联。

- 5 不同的缩合剂可用于偶联载体和半抗原。戊二醛、碳二亚胺、马来酰亚胺活化的酯和含有巯基或二硫代吡啶基的活化的酯试剂可用于偶联。

将缩合产物单独或与载体或稀释剂一起给药于恒温动物体内能产生抗体的部位。为了增强给药后抗体的产量，可给予弗氏完全或不完全佐剂。大约每 2-6 周给药一次，共 3-10 次。

- 10 多克隆抗体从用上述方法免疫的动物的血液、腹水等(优选血液)中收集。

血清中多克隆抗体滴度的测定同上述测定血清抗体滴度的方法相同。可以根据上述用于分离和纯化单克隆抗体的免疫球蛋白分离纯化方法来分离和纯化多克隆抗体。

- 15 本发明的受体蛋白或其盐、部分肽或其酯、酰胺或它们盐、以及编码这些物质的 DNA 可用于：(1)测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体(激动剂)，(2)作为预防和/或治疗同本发明受体蛋白功能异常相关疾病的制剂，(3)作为基因诊断制剂，(4)定量本发明受体蛋白的配体，(5)用于筛选能够改变本发明受体蛋白同配体的结合特性的化合物(激动剂、拮抗剂等)，(6)作为
20 预防和/或治疗各种疾病的制剂，其包含能够改变本发明受体蛋白同配体的结合特性的化合物(激动剂、拮抗剂等)，(7)定量本发明受体蛋白或其类似物，(8)通过抗体来中和本发明受体蛋白或其类似物，(9)制备非人类动物的编码本发明受体蛋白或其类似物的 DNA。

- 具体的，使人或其它哺乳动物特异性的本发明受体蛋白与其配体的结
25 合特性发生变化的化合物(激动剂、拮抗剂等)，可通过在后述配体-受体结合实验体系中利用本发明受体蛋白的重组表达系统筛选，这些激动剂或拮抗剂可作为下述各种疾病的预防/治疗制剂使用。

- 在下文具体描述本发明的受体蛋白或类似物、编码本发明受体蛋白或类似物的 DNA(此后有时统称本发明的 DNA)、和针对本发明受体蛋白或类似物的抗体(此后有时统称本发明的抗体)的用途。
30

(1)测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体(激动剂)

本发明受体蛋白或其类似物可用作发现或测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体(激动剂)的一种试剂。

也就是说, 本发明提供了一种测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体的方法, 其中包括, 使本发明的受体蛋白或其盐同待测化合物接触。

5 待测化合物包括众所周知的配体(例如, 血管紧张素、韩蛙皮素、canavinoid、缩胆囊素、谷氨酰胺、5-羟色胺、褪黑激素、神经肽 Y、类阿片、嘌呤、加压素、催产素、PACAP、促胰泌素、胰高血糖素、降钙素、肾上腺皮质激素、生长抑素、GNRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、血管肠肽(VIP)、生长抑素、多巴胺、胃动素、糊精、缓激肽、降钙素基因相关肽(CGRP)、白三烯、胰抑制素、前列腺素、血栓素、腺苷、肾上腺素、 α 和
10 β -趋化因子(例如 IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP1 β 和 RANTES)、内皮素、肠抑胃素、组胺、神经降压素、TRH、胰多肽、促生长激素神经肽等)其它物质, 例如人和哺乳动物(例如小鼠、大鼠、猪、牛、羊和猴)的
15 组织抽提物或细胞培养上清。例如, 将组织抽提物或细胞培养上清(具体为 Welch D.R.在国家癌症研究院杂志(J. Natl. Cancer Inst.), 88, 1731(1996)中描述的 Kiss-1 的特定肽段(例如, 由 8-54 个氨基酸残基组成、包含 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸序列中从 N 端数第 47-54 位氨基酸的肽或酰胺、酯或盐)加入到本发明的受体蛋白或类似物, 分析细胞刺激活性并同时使该部分分级
20 分离, 最后获得单一配体。

更具体的, 用以测定本发明配体的方法包括, 利用本发明的受体蛋白或类似物, 或利用在受体结合实验中构建的重组受体蛋白表达系统, 测定化合物(例如, 肽、蛋白、非肽类化合物、合成化合物、发酵产物)或其盐, 所述化合物或其盐与本发明的受体蛋白或类似物结合后具有细胞刺激活性
25 (例如, 促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)。

测定本发明配体的方法有以下特征, 通过使待测化合物与本发明的受体蛋白或其盐接触, 测定其结合于本发明受体蛋白或类似物的量或其细胞
30 刺激活性。

更具体的, 本发明提供了:

(1)一种测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体的方法，包括使一标记的待测化合物同本发明的受体蛋白或其盐接触，测定同受体蛋白或其盐或类似物结合的标记化合物的量；

5 (2)一种测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体的方法，包括使一标记的待测化合物同包含本发明的受体蛋白或类似物的细胞或该细胞的膜级分接触，测定同所述细胞或细胞膜级分结合的标记化合物的量；

(3)一种测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体的方法，其中包括，培养含有编码本发明受体蛋白或类似物 DNA 的转化体，使一标记的待测化合物同表达在细胞膜上的本发明的受体蛋白或类似物接触，测定同表达的受体蛋白或类似物结合的标记化合物的量；

10

(4)一种测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体的方法，包括，使一待测化合物同包含本发明受体蛋白或类似物的细胞接触，测定受体介导的细胞刺激活性(例如，促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)；

15

(5)一种测定针对本发明受体蛋白或其盐的配体的方法，其中包括，培养含有本发明受体蛋白或类似物 DNA 的转化体，使一标记的待测化合物同表达在细胞膜上的本发明受体蛋白或类似物接触，测定受体介导的细胞刺激活性(例如，促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)；

20

具体的，优选进行方法(1)至(3)来确认待测化合物可与本发明受体蛋白或类似物结合，然后进行方法(4)和(5)。

任何作为本发明的受体蛋白或类似物的实例可用于本发明测定配体的方法。但是，在哺乳动物细胞中大量表达的受体蛋白等更适合于本发明。

25

在生产本发明受体蛋白或类似物时，可使用上述表达方法，优选在哺乳动物细胞或昆虫细胞中表达所述受体蛋白等的 DNA。编码预期蛋白部分的 DNA 片段包括，但不限于互补 DNA(cDNA)。例如，可使用基因片段或合成 DNA。为了将编码所述受体蛋白等的 DNA 片段导入宿主动物细胞，并高效表达，优选将 DNA 片段插入具有昆虫宿主的杆状病毒属核多角体病毒(NPV)的多角体启动子、SV40 来源的启动子、金属硫蛋白启动子、人热

30

休克启动子、反转录病毒启动子、巨细胞病毒启动子、SR α 启动子或类似启动子下游。所表达受体的量和质的检测用众所周知的方法进行，例如，Nambi, P.等在 J. Biol. Chem.,267, 19555-19559(1992)中描述的方法。

5 因此，在本发明的测定配体的方法中，含有本发明受体蛋白或类似物的物质可以用众所周知的方法纯化的受体蛋白或类似物、含有受体蛋白的细胞或这些细胞的膜级分。

使用含有本发明受体蛋白或类似物的细胞测定配体时，这些细胞可用戊二醛、福尔马林等固定。固定可用众所周知的方法进行。

10 含有本发明受体蛋白或类似物的细胞指表达本发明受体蛋白或类似物的宿主细胞。这类细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌、酵母、昆虫细胞和动物细胞。

细胞膜级分指，用众所周知的方法破裂细胞并进行分级分离而制备的含有大量细胞膜的级分。细胞破裂的有效方法包括用 Potter-Elvehjem 匀浆器挤压、用 Waring blender 或 Polytron(Kinematica 公司生产)破裂、超声破
15 裂、用 French press 加压使细胞通过细嘴喷射而破裂。细胞膜组分分离主要通过离心力来实现，如分级离心和密度梯度离心。例如，细胞破碎液在低速(500-3000rpm)离心一小段时间(正常为 1-10 分钟)，得到的上清在高速(15000-30000rpm)正常离心 0.5-2 小时。由此获得的沉淀部分用作细胞膜级分。细胞膜级分富含表达的受体蛋白或类似物以及膜成分如细胞来源的磷
20 脂和膜蛋白。

在含有受体蛋白等的细胞和细胞膜级分中，受体蛋白含量优选 10^3 - 10^8 分子/细胞，更优选 10^5 - 10^7 分子/细胞。随着表达量的增加，单位细胞膜级分的配体结合活性(比活)增加，因而不但可以构建高敏感筛选体系，而且可以在同一批获得大量的样品。

25 为了进行方法 1-3 来测定针对本发明受体蛋白或类似物的配体，需要合适的受体级分和标记的待测化合物。

受体蛋白级分优选天然的受体蛋白级分，或与其具有同等活性的重组受体蛋白级分。此处术语“同等活性”是指在配体结合活性和信号传导活性方面同天然受体蛋白所拥有的活性同等。

30 优选标记的待测化合物有血管紧张素、韩蛙皮素、canavainoid、缩胆囊素、谷氨酰胺、5-羟色胺、褪黑激素、神经肽 Y、类阿片、嘌呤、加压素、

催产素、PACAP、促胰泌素、胰高血糖素、降钙素、肾上腺皮质激素、生长抑素、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、血管活性肠多肽(VIP)、生长抑素、多巴胺、胃动素、糊精、缓激肽、降钙素基因相关肽(CGRP)、白三烯、胰抑制素、前列腺素、血栓素、腺苷、肾上腺素、 α 和 β -趋化因子(例如 IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP1 β 和 RANTES)、内皮素、肠抑胃素、组胺、神经降压素、TRH、胰多肽、促生长激素神经肽以及 Welch D.R.在国家癌症研究院杂志, 88, 1731(1996)中描述的 Kiss-1 的特殊肽段(例如, 由 8-54 个氨基酸残基组成、包含 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸序列中从 N 端数第 47-54 位氨基酸序列的肽或酰胺、酯或盐), 它们用 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 或 $[^{35}\text{S}]$ 等标记。

更具体地, 本发明受体蛋白或类似物的配体用下述方法测定。首先, 将含有本发明受体蛋白或类似物的细胞或其膜级分悬浮于本方法的相应的缓冲液中, 制备标准受体制剂。可以使用任何缓冲液, 只要它不干扰配体-受体结合。此类缓冲液有 pH 值约 4-10 (优选 6-8)的磷酸盐缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。为了降低非特异结合, 可任选在缓冲液中加入表面活性剂如 CHAPS、Tween-80TM(Kao-Atlas 公司)、毛地黄皂甘或脱氧胆酸和各种蛋白如牛血清白蛋白或明胶等。为了抑制蛋白酶对受体或配体的降解, 可加入蛋白酶抑制剂如 PMSF、亮抑蛋白酶肽、E-64(Peptide Institute 公司生产)和胃蛋白酶抑制剂。将一定量(5000-500000cpm)的用 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 或 $[^{35}\text{S}]$ 标记的待测化合物或类似物加入到 0.01-10ml 的受体溶液中。为了测定非特异性结合(NSB), 需提供一个含有过量未标记的待测化合物的反应管。在约 0-50 $^{\circ}\text{C}$ (优选约 4-37 $^{\circ}\text{C}$)反应 20 分钟-24 小时(优选 30 分钟-3 小时)。在反应完成后, 反应混合物用玻璃纤维滤纸等过滤, 用合适量的相同缓冲液洗涤。然后用液闪仪或 γ -记数仪测定在玻璃纤维滤纸中的残留放射活性。从总结合数值(B)中减去非特异结合值(NSB)(B-NSB), 得到待测化合物的值, 该值超过 0 时相应化合物被选为本发明受体蛋白或盐的配体(激动剂)。

上述用于测定本发明受体蛋白或类似物配体的方法(4)或(5)可按照下述进行。用众所周知的方法或商品化的分析试剂盒来测定受体蛋白介导的细胞刺激活性(例如, 促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细

胞膜电位变化、细胞内蛋白的磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)。具体的，首先多孔板等上培养含有受体蛋白或类似物的细胞。在测定配体之前，用新鲜培养基或合适的非细胞毒性缓冲液替换培养基，然后在含有待测化合物等的条件下保温一段时间。然后提取细胞或回收上清，对得到的产物用适当方法定量。很难检测细胞刺激活性的指示物质(例如花生四烯酸)的产生，因为细胞中存在降解酶，故在分析前可加入该降解酶的抑制剂。检测 cAMP 产生的抑制活性等活性时，细胞中基线生产水平可通过毛喉素等提高，因此可检测对提高的基线生产的抑制效应。

10 用于测定能同本发明受体蛋白或类似物结合的配体的试剂盒中包含，本发明的受体蛋白或类似物、含有本发明的受体蛋白或类似物的细胞，或含有本发明的受体蛋白或类似物的细胞膜级分。

本发明配体测定试剂盒的例子如下。

1.测定配体的试剂

(1)用于分析和洗涤的缓冲液

15 补加有 0.05%牛血清白蛋白(Sigma 公司)的 Hanks' 平衡盐溶液(Gibco 公司生产)。

溶液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌，储存于 4°C 。或者，溶液可以在用时制备。

(2)标准受体蛋白

20 以 5×10^5 /孔的细胞密度，将表达本发明受体蛋白的 CHO 细胞在 12 孔板上传代培养，在含 5% CO_2 和 95%空气环境中于 37°C 培养两天。

(3)标记的待测化合物

用市售 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 或 $[^{35}\text{S}]$ 标记的化合物，或用合适方法标记的化合物。

25 化合物水溶液贮存在 4°C 或 -20°C 。溶液在使用时用分析缓冲液稀释到 $1\ \mu\text{M}$ 。低水溶性的待测化合物溶解在二甲基甲酰胺、DMSO 或甲醇中。

(4)非标记化合物

标记化合物的非标记形式的浓度比其相应标记化合物的高 100-1000 倍。

30 2. 分析方法

(1)用于表达本发明受体蛋白的 CHO 细胞在 12 孔板上进行培养。在用

1ml 的分析缓冲液洗涤 2 次后，每孔加入 490 μ l 该分析缓冲液。

(2)在加入 5 μ l 的标记测试化合物后，得到的混合液在室温保温 1 小时。
为了测定非特异结合，先在该系统中加 5 μ l 的非标记化合物。

(3)去除反应混合液，用 1ml 的洗涤液将培养孔洗涤 3 遍。用 0.2N
5 NaOH-1% SDS 溶解同细胞结合的标记测试化合物，然后同 4ml 的液闪剂 A(和光纯药生产)混合。

(4)用液闪计数器(Beckman 公司生产)测定放射性。

能与本发明受体蛋白或类似物结合的配体包括，在脑、垂体和胰腺中
特异存在的物质。这些配体的例子包括血管紧张素、韩蛙皮素、canavanoid、
10 缩胆囊素、谷氨酰胺、5-羟色胺、褪黑激素、神经肽 Y、类阿片、嘌呤、
加压素、催产素、PACAP、促胰泌素、胰高血糖素、降钙素、肾上腺皮质
激素、生长抑素、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、血管肠肽(VIP)、生
长抑素、多巴胺、胃动素、糊精、缓激肽、降钙素基因相关肽(CGRP)、白
三烯、胰抑制素、前列腺素、血栓素、腺苷、肾上腺素、 α 和 β -趋化因子(例
15 如 IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-
2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP1 β 和 RANTES)、内皮
素、肠抑胃素、组胺、神经降压素、TRH、胰多肽促生长激素神经肽、以
及 Welch D.R.在国家癌症研究院杂志, 88, 1731(1996)中描述的 Kiss-1 的特定
肽段(例如，由 8-54 个氨基酸残基组成、包含 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸
20 序列中从 N 端数第 47-54 位氨基酸序列的肽或酰胺、酯或盐)。

具体的，下述实施例 3 将描述，Kiss-1 的特定肽段(例如，由 8-54 个氨
基酸残基组成、包含 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸序列中的从 N 端数第 47-
54 位氨基酸序列的肽或酰胺、酯或盐)可作为与本发明受体蛋白或类似物结
合的配体例子。

25 术语“由 8-54 个氨基酸残基组成、包含 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸
序列中的从 N 端数第 47-54 位氨基酸序列的肽”指代任何肽，只要它是一个
由 8-54 个氨基酸组成的肽，并含有 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸序列中的
从 N 端数第 47-54 氨基酸的序列。这些肽同本发明的受体蛋白或类似物
具有大体上相同的活性(例如，配体-受体结合特性、配体诱导的对受体表达
30 细胞的细胞刺激活性)。

本发明受体肽的一个优选例子是由 8-54 个氨基酸组成的肽，其含有 SEQ

ID NO: 10 所代表氨基酸序列中位于 C 端的、从 N 端放向数第 47-54 位氨基酸的序列。

更优选的，本发明的配体肽包括 SEQ ID NO: 11、12、13 或 14 所代表的肽(尤其其酰胺)。

5 最优选的，本发明的配体肽包括 C 末端羧基已酰胺化的肽。

此类肽的酰胺或酯和它们的盐与本发明受体蛋白的盐以及肽段的酰胺或酯相同。

10 编码本发明配体肽的多核苷酸可以是任何多核苷酸，只要它包含编码本发明配体肽的碱基序列(DNA 或 RNA，优选 DNA)。这样的多核苷酸可以是包括编码本发明配体肽的 mRNA 的 DNA 或 RNA。多核苷酸可以是单链或双链。如果是双链的多核苷酸，可能是双链 DNA 或 DNA:RNA 杂交体。如果是单链的多核苷酸，可能是正义链(即编码链)或反义链(即非编码链)。

15 编码本发明配体肽的 DNA 可以是任何基因组 DNA、基因组 DNA 文库、来自上述细胞和组织的 cDNA、来自上述细胞和组织的 cDNA 库和合成 DNA。用于文库的载体可以是噬菌体、质粒、粘粒或噬菌粒。DNA 可以直接用上述细胞和组织制备的总 RNA 或 mRNA 经反转录多聚酶链反应(RT-PCR)扩增。

20 具体的，编码本发明配体肽的 DNA 可以是任何 DNA，只要它含有 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸序列中从 N 端数 47-54 位氨基酸的序列，并包含编码一肽的 DNA 序列，该肽由 8-54 个氨基酸残基组成。

25 更具体的，编码本发明配体肽的 DNA 例子包括，含有编码 SEQ ID NO: 10 所代表氨基酸序列中 C 端的从 N 端数 47-54 位氨基酸的碱基序列，并编码 8-15 个氨基酸残基的 DNA 序列。更具体的，编码本发明配体肽的 DNA 包括，含有编码 SEQ ID NO: 11、12、13 或 14 所代表氨基酸序列的碱基序列，并编码 8-15 个氨基酸残基的 DNA 序列。

编码本发明配体肽的 DNA 为，例如，含有 SEQ ID NO: 15 所代表的碱基序列 5' 端的 139-162 位，并包含 24-162 个碱基的 DNA 等。更具体的，编码本发明配体肽的 DNA 为含有 SEQ ID NO: 15 所代表的碱基序列 3' 端的从 5' 端数 139-162 位碱基，并包含 24-45 个碱基的 DNA。

30 编码本发明配体肽的 DNA 的典型例子包括，含有 SEQ ID NO: 16、17、18 和 19 分别所代表的碱基序列的 DNA。

本文中对应于以下序列的编码 DNA 具体为：

(1) 对于编码 SEQ ID NO:10 所代表氨基酸序列的 DNA，含有 SEQ ID NO:15 所代表碱基序列的 DNA；

(2) 编码 SEQ ID NO:11 所代表氨基酸序列的 DNA，含有 SEQ ID NO:16 所代表碱基序列的 DNA；

(3) 编码 SEQ ID NO:12 所代表氨基酸序列的 DNA，含有 SEQ ID NO:17 所代表碱基序列的 DNA；

(4) 编码 SEQ ID NO:13 所代表氨基酸序列的 DNA，含有 SEQ ID NO:18 所代表碱基序列的 DNA；

(5) 编码 SEQ ID NO:14 所代表氨基酸序列的 DNA，含有 SEQ ID NO:19 所代表碱基序列的 DNA；

本发明的配体肽或其酯、酰胺或它们的盐，以及编码配体肽的多核苷酸可用类似于本发明受体蛋白及其编码多核苷酸的产生方法产生。

本发明的配体肽或其酯、酰胺或盐(下文称本发明的配体肽等)，以及编码该配体肽的多核苷酸可作为具有配体活性的安全、低毒性药物使。

当本发明的配体肽用作上述预防/治疗药物时可用众所周知的方法制成药物制剂。

当编码本发明配体肽的 DNA(下文称本发明的配体 DNA)用作上述预防/治疗药物时，本发明的配体 DNA 可单独使用，或插入合适载体如反转录病毒载体、腺病毒载体或腺联病毒载体后按常规方法给药。本发明的配体 DNA 可以以裸露的 DNA 给药，或使用基因枪或含有水凝胶的导管使其与有助于吸收的佐剂联合给药。

例如，(1)本发明的配体肽或(2)其编码 DNA 可以制成片剂(必要时加糖衣)、胶囊、酏剂、微胶囊等口服剂型，或非胃肠道给药的可注射剂型如灭菌溶液和水悬浮液，或其它在药物学上可接受的液体形式。这些制剂的生产是通过将(1)本发明的配体肽或(2)其编码 DNA 与生理学上可接受的已知载体、调味剂、赋形剂、载色剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂等制成药剂常用的单位剂型。控制制剂中的活性成分使得在给定范围内获得合适剂量。

可与片剂、胶囊等混合的添加剂包括，粘和剂如凝胶、玉米淀粉、西黄耆胶和金合欢胶；赋形剂如结晶纤维素；膨胀剂如玉米淀粉、明胶和藻酸；润滑剂如硬脂酸镁；甜味剂如蔗糖、乳糖和糖精；加味剂如薄荷、akamono

oil 和樱桃。当单位剂型为胶囊形式时，可进一步将液体载体如油和脂肪同上述添加剂一起使用。可根据常规制药方法制备注射用无菌组合物，例如将活性成分与天然植物油如芝麻油和可可油等溶解或悬浮在载体，如注射用的水中来制备药物。用于注射的液体介质的例子包括，生理盐水和包含

5 葡萄糖及其它辅助制剂(如 D-山梨醇、D-甘露醇和氯化钠)的等渗溶液，并可以进一步同合适的助溶剂如醇(如乙醇)、聚醇(如丙烯醇和聚乙二醇)、非离子表面活性剂(如聚山梨酸酯 80TM 和 HCO-50)等结合使用。油性介质有芝麻油和豆油，它们可与助溶剂如苯甲酸苄酯和苯甲醇结合使用。

此外，上述的治疗/预防制剂可进一步与缓冲液(例如磷酸盐缓冲液和乙

10 酸钠缓冲液)、镇静剂(例如苯扎氯胺和盐酸普鲁卡因)、稳定剂(如人血清白蛋白、聚乙二醇)、防腐剂(例如苯甲醇、酚)、抗氧化剂等结合使用。由此制备的注射液体一般装在合适的安瓿中。

所获制剂安全、低毒，因此可用于人和哺乳动物(例如，大鼠、小鼠、兔、羊、猪、牛、猫、狗、猴等)。

15 本发明配体肽的剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而异；在对癌症病人(体重 60kg)口服给药时，正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天。在对癌症病人(体重 60kg)非胃肠道给药时，单位剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而变，但优选活性成分静脉注射，剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/

20 天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

本发明配体 DNA 的剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而异，在对癌症病人(体重 60kg)口服给药时，正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天；在对癌症病人(体重 60kg)

25 非胃肠道给药时，单位剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而变，但优选活性成分静脉注射，剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

30 (2)应用于本发明受体蛋白功能异常之相关疾病的预防和/或治疗制剂

本发明的受体蛋白等、或其编码 DNA 可作为同本发明配体肽功能异常相关疾病的预防和/或治疗制剂使用。

例如，当病人受体蛋白水平低下(受体蛋白不足)使本发明受体蛋白的生理活性达不到预期水平时，可通过下述方法实现配体活性：(1)使病人服用本发明的受体蛋白等，从而补充受体蛋白等的量；或(2)增加病人的本发明受体蛋白的量，通过：a)用编码本发明受体蛋白的 DNA 给药来表达受体蛋白，或通过 b)将编码本发明受体蛋白的 DNA 插入靶细胞表达，然后将表达细胞移植给病人。因此，病人受体蛋白的量可以增加，由此使配体的活性得以实现。因此，本发明的受体蛋白等或编码本发明受体蛋白的 DNA 可用作安全、低毒的预防和/或治疗制剂，用于同本发明受体功能异常相关的疾病。

本发明的受体蛋白及其编码 DNA 具有癌转移抑制活性，因此可用作所有癌(例如肺癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、大肠癌、直肠癌、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌等)的预防和治疗。

本发明的受体蛋白及其编码 DNA 具有胎盘功能调节活性，因此可用作绒毛癌、葡萄胎、恶性葡萄胎、流产、胎儿发育不全、糖代谢障碍、脂代谢障碍和引产的预防和/或治疗药物。

当本发明的受体蛋白用作上述预防/治疗药物时，可用众所周知的方法制成药剂。

当编码本发明受体蛋白的 DNA(下文称本发明的 DNA)用作上述预防/治疗药物时，本发明的 DNA 可单独使用，或插入合适载体如反转录病毒载体、腺病毒载体或腺联病毒载体后按常规方法给药。本发明的配体 DNA 可以以裸露的 DNA 给药，或使用基因枪或含有水凝胶的导管使其与有助于吸收的佐剂联合给药。

例如，(1)本发明的配体肽或(2)其编码 DNA 可以制成片剂(必要时加糖衣)、胶囊、酏剂、微胶囊等口服剂型，或非胃肠道给药的可注射剂型如灭菌溶液和水悬浮液，或其它在药物学上可接受的液体形式。这些制剂的生产是通过将(1)本发明的配体肽或(2)其编码 DNA 与生理学上可接受的已知载体、调味剂、赋形剂、载色剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂等制成药剂常用的单位剂型。控制制剂中的活性成分使得在给定范围内获得合适剂量。

可与片剂、胶囊等混合的添加剂包括，粘和剂如凝胶、玉米淀粉、西黄耆胶和金合欢胶；赋形剂如结晶纤维素；膨胀剂如玉米淀粉、明胶和藻酸；润滑剂如硬脂酸镁；甜味剂如蔗糖、乳糖和糖精；加味剂如薄荷、akamono oil 和樱桃。当单位剂型为胶囊时，可进一步将液体载体如油和脂肪同上述
5 添加剂一起使用。可根据常规制药方法制备注射用无菌组合物，例如将活性成分与天然植物油如芝麻油和可可油等溶解或悬浮在载体，如注射用的水中来制备药物。用于注射的液体介质的例子包括，生理盐水和包含葡萄糖及其它辅助制剂(如 D-山梨醇、D-甘露醇和氯化钠)的等渗溶液，并可以进一步同合适的助溶剂如醇(如乙醇)、聚醇(如丙烯醇和聚乙二醇)、非离子
10 表面活性剂(如聚山梨酯 80TM 和 HCO-50)等结合使用。油性介质有芝麻油和豆油，它们可与助溶剂如苯甲酸苄酯和苯甲醇结合使用。

此外，上述的治疗/预防制剂可进一步同缓冲液(例如磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液)、镇静剂(例如苯扎氯胺和盐酸普鲁卡因)、稳定剂(如人血清白蛋白、聚乙二醇)、防腐剂(例如苯甲醇、酚)、抗氧化剂等结合使用。由此
15 制备的注射液体一般装在合适的安瓿中。

所获制剂安全、低毒，因此可用于人和哺乳动物(例如，大鼠、兔子、绵羊、猪、牛、猫、狗、猴子等)。

本发明受体蛋白的剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而异；在对癌症病人(体重 60kg)口服给药时，正常剂量为大约 0.1-100mg/
20 天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天。在对癌症病人(体重 60kg)非胃肠道给药时，单位剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而变，但优选活性成分静脉注射，剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

25 编码本发明受体蛋白的 DNA 的剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而异，在对癌症病人(体重 60kg)口服给药时，正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天；在对癌症病人(体重 60kg)非胃肠道给药时，单位剂量依赖于给药受体、靶器官、症状和给药方法等而变，但优选活性成分静脉注射，剂量为大约 0.01-30mg/天，
30 优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

(3)基因诊断试剂

用编码本发明受体蛋白的 DNA 或编码本发明配体肽的 DNA 作探针，
可以检测人或哺乳动物(例如，大鼠、小鼠、兔、羊、猪、牛、猫、狗、猴
5 等)中编码本发明受体蛋白等或配体肽的 DNA 或 mRNA 的异常(基因异常)。
因此，本发明的 DNA 可用作基因诊断制剂，用于诊断 DNA 或 mRNA 的损伤、突变，或其表达量的减少、表达量的增加或 DNA 或 mRNA 的过表达。

上述基因诊断通过使用编码本发明受体蛋白等或配体肽的 DNA，用众所周知的 Northern 杂交分析或 PCR-SSCP 分析来完成(Genomics, 5, 874-
10 879(1989); 美国科学院报, 86, 2766-2770(1989))。

(4)针对本发明受体蛋白等的配体的定量

因为本发明受体蛋白等具有配体结合特性，因此可体内定量该配体活性，且灵敏度高。

15 本发明的定量方法可与竞争方法联合使用。因此，可使待测样品同本发明的受体蛋白等接触，由此测定样品中配体浓度。具体的，可以使用下述方法(1)或(2)或其改进方法进行：

(1)入江宽编：“放射免疫分析”(1974，讲谈社，日本)；和

(2)入江宽编：“放射免疫分析，续篇”(1979，讲谈社，日本)

20

(5)能改变本发明受体蛋白、其盐同配体(本发明配体肽)结合活性的化合物(激动剂，拮抗剂等)的筛选方法

通过使用本发明受体蛋白、其盐，或构建受体蛋白等的重组表达系统并应用该表达系统实施受体结合试验，可以有效筛选能改变本发明受体蛋白与配体(本发明配体肽)结合的活性的化合物(如肽、蛋白、非肽化合物、
25 合成化合物、发酵产物等)或其盐。

上述化合物的例子包括(a)表现 G 蛋白偶联型受体所介导的细胞刺激性(如促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、
30 细胞内蛋白的磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)的化合物(所谓本发明受体蛋白等的激动剂)；或(b)不具有此类细胞刺激活性的化合物(所谓本发明受

体蛋白等的拮抗剂)；或(c)降低配体(本发明配体肽)与本发明受体蛋白的结合特性的化合物(优选用上列配体测定法来筛选化合物(a))。

因此，本发明也提供了筛选能改变本发明受体蛋白与配体(本发明配体肽)的结合活性的化合物或其盐的方法，其中包括比较下述两种情况：(i)使
5 本发明受体蛋白等同配体(本发明配体肽)接触；和(ii)使本发明受体蛋白等同配体(本发明配体肽)及待测化合物接触。

在本发明的筛选方法中，(i)和(ii)的比较为，例如结合受体蛋白的配体(本发明的配体肽)的量或其细胞刺激活性。

更具体的，本发明提供了下述方法。

10 (1)筛选能改变本发明受体蛋白等同配体(本发明配体肽)结合活性的化合物或盐的方法，其中包括，在本发明受体蛋白等同标记配体(本发明配体肽)接触的情况下，和在本发明受体蛋白等同配体(本发明配体肽)及待测化合物接触的情况下，测定并比较结合到本发明受体蛋白等上的标记配体(本发明配体肽)的量。

15 (2)筛选能改变本发明受体蛋白等同配体(本发明配体肽)结合活性的化合物或盐的方法，其中包括，在含本发明受体蛋白之细胞或其细胞级分与标记配体(本发明配体肽)接触的情况下，和在含本发明受体蛋白之细胞或细胞级分与配体(本发明配体肽)及待测化合物接触的情况下，测定并比较结合到所述细胞或其细胞级分上的标记配体(本发明配体肽)的量。

20 (3)筛选能改变本发明受体蛋白等和配体(本发明配体肽)结合活性的化合物或盐的方法，其中包括，通过培养含有本发明 DNA 的转化体，使细胞膜上表达的受体蛋白与标记配体(本发明配体肽)接触，和通过培养含有本发明 DNA 的转化体，使细胞膜上表达的受体蛋白与标记配体(本发明配体肽)及待测化合物接触，然后测定并比较结合到本发明受体蛋白等上的标记配
25 体(本发明配体肽)的量。

(4)筛选能改变本发明受体蛋白等和配体(本发明配体肽)结合活性的化合物或盐的方法，其中包括，使能活化本发明受体蛋白等的化合物(如本发明受体蛋白的配体)与含本发明受体蛋白的细胞接触，和使该化合物及待测化合物与含本发明受体蛋白的细胞接触，测定并比较受体介导的细胞刺激
30 活性(如促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、

细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白的磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)。

(5)筛选能改变本发明受体蛋白等和配体(本发明配体肽)结合活性的化合物或盐的方法，其中包括，使能活化本发明配体肽的化合物(如本发明受体蛋白的配体(本发明配体))与本发明受体蛋白(其通过培养含本发明 DNA 的转化体而表达在细胞膜上)接触，和使上述能活化本发明配体肽的化合物及待测化合物与本发明受体蛋白(其通过培养含本发明 DNA 的转化体而表达在细胞膜上)接触，检测并比较受体介导的细胞刺激活性(如促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白的磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)。

在获得本发明的受体蛋白等之前，应使用含 G 蛋白偶联型受体蛋白的细胞、组织或细胞膜级分，确定待测化合物是否能抑制 G 蛋白偶联型受体蛋白与配体的结合，从而筛选 G 蛋白偶联型受体蛋白的激动剂或拮抗剂。但由于细胞、组织或细胞级分不可避免混有其它受体蛋白，因此很难筛选所选受体蛋白的激动剂或拮抗剂。

但使用本发明的受体蛋白使得能有效筛选抑制 G 蛋白偶联型受体蛋白与配体结合的化合物。此外，可轻易评价筛选的化合物是激动剂还是拮抗剂。

用于本发明的筛选方法在下文有更详细描述。

首先，用于本发明筛选方法的本发明受体蛋白等可以是任何蛋白，只要它含有上述的本发明受体蛋白等，但优选使用哺乳动物器官的细胞膜级分。当筛选需要大量受体蛋白时，优选使用由重组体大量表达的受体蛋白。

在生产本发明受体蛋白等时，可使用上述的方法，优选使用哺乳动物和昆虫细胞中表达的本发明 DNA。编码目的蛋白区域的 DNA 片段可使用互补 DNA(cDNA)，但不局限于此。例如，可使用基因片段或合成 DNA 作为所述 DNA 片段。为了将编码本发明受体蛋白的 DNA 片段导入宿主动物细胞，并高效表达，优选将所述 DNA 片段插入杆状病毒属核多角体病毒(NPV)的多角体蛋白启动子、SV40 启动子、人热休克启动子、反转录病毒启动子、金属硫蛋白启动子、巨细胞病毒启动子、SR α 启动子等的下游。受体的表

达量和质用众所周知的方法检测，见 Nambi, P.等，生物化学杂志 267, 19555-19559(1992)。

因此，在本发明的筛选方法中，含有本发明受体蛋白等的物质可以用众所周知的方法纯化的受体蛋白。或者也可使用含有本发明受体蛋白等的细胞或细胞膜级分。

使用含有本发明受体蛋白或类似物的细胞测定配体时，这些细胞可用戊二醛、福尔马林等固定。固定可用众所周知的方法进行。

含有本发明受体蛋白或类似物的细胞指表达本发明受体蛋白或类似物的宿主细胞。这类细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌、酵母、昆虫细胞和动物细胞。

细胞膜级分指，用众所周知的方法破裂细胞并进行分级分离而制备的含有大量细胞膜的级分。细胞破裂的有效方法包括用 Potter-Elvehjem 匀浆器挤压、用 Waring blender 或 Polytron(Kinematica 公司生产)破裂、超声破裂、用 French press 加压使细胞通过细嘴喷射而破裂。细胞膜组分分离主要通过离心力来实现，如分级离心和密度梯度离心。例如，细胞破碎液在低速(500-3000rpm)离心一小段时间(正常为 1-10 分钟)，得到的上清在高速(15000-30000rpm)正常离心 0.5-2 小时。由此获得的沉淀部分用作细胞膜级分。细胞膜级分富含表达的受体蛋白或类似物以及膜成分如细胞来源的磷脂和膜蛋白。

在含有受体蛋白等的细胞和细胞膜级分中，受体蛋白含量优选 10^3 - 10^8 分子/细胞，更优选 10^5 - 10^7 分子/细胞。随着表达量的增加，单位细胞膜级分的配体结合活性(比活)增加，因而不但可以构建高敏感筛选体系，而且可以在同一批获得大量的样品。

为了进行方法 1-3 来测定针对本发明受体蛋白或类似物的配体，需要合适的受体级分和标记的待测化合物。

受体蛋白级分优选天然的受体蛋白级分，或与其具有同等活性的重组受体蛋白级分。此处术语“同等活性”是指在配体结合活性和信号传导活性方面同天然受体蛋白所拥有的活性同等。

标记配体的例子包括，用 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 或 $[^{35}\text{S}]$ 标记的配体。

更具体地，本发明受体蛋白或类似物的配体用下述方法测定。首先，将含有本发明受体蛋白或类似物的细胞或其膜级分悬浮于本方法的相应的

缓冲液中，制备标准受体制剂。可以使用任何缓冲液，只要它不干扰配体-受体结合。此类缓冲液有 pH 值约 4-10 (优选 6-8) 的磷酸盐缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。为了降低非特异结合，可任选在缓冲液中加入表面活性剂如 CHAPS、Tween-80TM(Kao-Atlas 公司)、毛地黄皂甘或脱氧胆酸等。为了抑制蛋白酶对受体或配体的降解，可加入蛋白酶抑制剂如 PMSF、亮抑蛋白酶肽、E-64 (肽 Institute 公司生产) 和胃蛋白酶抑制剂。将一定量(5000-500000cpm)的标记加入到 0.01-10ml 的受体溶液中，其中含有 10^{-4} - 10^{-10} M 的待测化合物。为了测定非特异性结合(NSB)，需提供一个含有过量未标记的待测化合物的反应管。在约 0-50℃(优选约 4-37℃)反应 20 分钟-24 小时(优选 30 分钟-3 小时)。在反应完成后，反应混合物用玻璃纤维滤纸等过滤，用合适量的相同缓冲液洗涤。然后用液闪仪或 γ -记数仪测定在玻璃纤维滤纸中的残留放射活性。在不含任何拮抗物质时的数值(B0)减去非特异结合值(NSB)，所得值(B0 - NSB)定为 100%，则特异结合值(B - NSB)为 50%或更小的测试化合物为所选化合物。

上述用于测定本发明受体蛋白或类似物配体的方法(4)或(5)可按照下述进行。用众所周知的方法或商品化的分析试剂盒来测定受体蛋白介导的细胞刺激活性(例如，促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白的磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)。

具体的，首先在多孔板等上培养含有受体蛋白或类似物的细胞。在测定配体之前，用新鲜培养基或合适的非细胞毒性缓冲液替换培养基，然后在含有待测化合物等的条件下保温一段时间。然后提取细胞或回收上清，对得到的产物用适当方法定量。很难检测细胞刺激活性的指示物质(例如花生四烯酸)的产生，因为细胞中存在降解酶，故在分析前可加入该降解酶的抑制剂。检测 cAMP 产生的抑制活性等活性时，细胞中基线生产水平可通过毛喉素等提高，因此可检测对提高的基线生产的抑制效应。

通过测定细胞刺激活性进行筛选时，需使用表达相应受体蛋白的细胞。优选表达本发明受体蛋白等的细胞为，含有本发明受体蛋白等的天然细胞系和表达重组型受体蛋白等的上述细胞系。

待测化合物的例子包括肽、蛋白、非肽类化合物、合成化合物、发酵产物、细胞抽提物、植物抽提物和动物组织抽提物。这些测试化合物可以是新的或已知的。

5 用于筛选能改变本发明受体蛋白与配体(本发明配体肽)的结合特性的试剂盒中包含, 本发明的受体蛋白或类似物、含有本发明的受体蛋白或类似物的细胞, 或含有本发明的受体蛋白或类似物的细胞膜级分。

本发明筛选试剂盒的例子如下。

1. 用于筛选的试剂

(1) 用于分析和洗涤的缓冲液

10 补加有 0.05% 牛血清白蛋白(Sigma 公司)的 Hanks' 平衡盐溶液(Gibco 公司生产)。

溶液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌, 储存于 4°C 。或者, 溶液可以在用时制备。

(2) G 蛋白偶联型受体蛋白制剂

15 以 5×10^5 /孔的细胞密度, 将表达本发明受体蛋白的 CHO 细胞在 12 孔板上传代培养, 在含 5% CO_2 和 95% 空气环境中于 37°C 培养两天。

(3) 标记的配体

用市售 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 或 $[^{35}\text{S}]$ 标记的配体等。

产物水溶液贮存在 4°C 或 -20°C , 使用时用分析缓冲液稀释到 $1\ \mu\text{M}$ 。

20 (4) 标准配体溶液

将配体溶于含 0.1% 牛血清白蛋白(Sigma)的 PBS 中, 浓度为 1mM , 储存于 -20°C

2. 分析方法

25 (1) 在 12 孔组织培养板上培养 CHO 细胞以表达本发明受体蛋白的。用 1ml 试验缓冲液将表达受体蛋白的 CHO 细胞洗 2 次后, 每孔加入 $490\ \mu\text{l}$ 试验缓冲液。

(2) 加入 $5\ \mu\text{l}$ 浓度为 10^{-3} - 10^{-10}M 的待测化合物后, 在体系中加入 $5\ \mu\text{l}$ 的标记配体。在室温保温 1 小时。为测定非特异性结合, 在系统中加 $5\ \mu\text{l}$ 浓度为 10^{-3}M 的配体, 代替待测化合物。

(3) 用 1ml 的洗涤液将培养孔洗 3 遍以去除反应混合物。将结合于细胞的标记待测化合物用 0.2N NaOH—1% SDS 溶解，与 4ml 的液闪剂 A(和光纯药)混合。

5 (4)用液闪仪(Beckman)测定放射性，根据以下等式计算 PMB(最大结合百分率)：

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

其中：

PMB：最大结合百分率

B：加入样品时的值

10 NSB：非特异性结合

B_0 ：最大结合

通过本发明筛选方法或筛选试剂盒获得的化合物或盐是能改变配体(本发明配体肽)和本发明受体蛋白的结合特性的化合物。更具体的，该化合物包括(a)表现 G 蛋白偶联型受体介导的细胞刺激活性的化合物(如促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白的磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)(所谓本发明受体蛋白的激动剂)；或(b)不具有此类细胞刺激活性的化合物(所谓本发明受体蛋白的拮抗剂)；或(c)降低配体(本发明配体肽)和本发明受体蛋白的结合的化合物(优选上述测定配体的方法来筛选化合物(a))。

这类化合物的例子包括肽、蛋白、非肽类化合物、合成化合物和发酵产物。这些化合物可以是新的或已知的。

本发明的受体蛋白等的激动剂具有同本发明受体蛋白等的配体(本发明的配体肽)相同的生理活性。因此，激动剂可用作安全、低毒的药物制剂，这取决于所述配体活性。

更具体地，本发明受体蛋白的激动剂具有癌转移抑制活性，因此可用于预防和治疗作所有癌(例如肺癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、大肠癌、直肠癌、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌等)。

30 本发明的受体蛋白及其编码 DNA 还具有胎盘功能调节活性，因此可用作绒毛癌、葡萄胎、恶性葡萄胎、流产、胎儿发育不全、糖代谢障碍、脂代谢障碍和引产的预防和治疗药物。

本发明受体蛋白的拮抗剂可抑制本发明受体蛋白的配体(本发明的配体肽)的生理活性。因此,该拮抗剂可作为安全和低毒性的药物用于抑制所述配体的活性。

5 降低本发明受体蛋白与配体(本发明的配体肽)的结合的化合物可用作安全、低毒的药物制剂,用于降低本发明受体蛋白的配体(本发明的配体肽)的生理活性。

当通过本发明筛选方法或筛选试剂盒可获得的化合物或其盐用作上述药物组合物时,可使用传统方法制备。例如该化合物或其盐可以制成片剂、胶囊、酏剂、微胶囊、无菌溶液或悬浮液形式。

10 所获制剂安全、低毒,因此可用于人和哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、兔、羊、猪、牛、猫、狗、猴等)。

化合物或其盐(当为激动剂时)的剂量依赖于给药主体、靶器官、症状和给药方法等而异;在对癌症病人(体重 60kg)口服给药时,正常剂量为大约 0.1-100mg/天,优选大约 1.0-50mg/天,更优选 1.0-20mg/天。在对癌症病人(体重 60kg)非胃肠道给药时,单位剂量依赖于给药主体、靶器官、症状和给药方法等而变,但优选活性成分静脉注射,剂量为大约 0.01-30mg/天,优选大约 0.1-20mg/天,更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类,可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

20 (6)用于预防和/或治疗各种疾病、含有改变本发明受体蛋白与配体(本发明的配体肽)的结合特性的药物组合物

如上述,本发明受体蛋白在体内起重要作用,例如抑制癌转移活性。因此,改变本发明受体蛋白同配体(本发明的配体肽)结合特性的化合物(激动剂、拮抗剂)可用作预防和/或治疗同本发明受体蛋白功能异常相关的疾病的制剂。

25 当上述的化合物用于预防/治疗同本发明受体蛋白功能异常相关的疾病药物时,可用传统的方法制成药物制剂。

例如,化合物可以制成糖衣片剂、胶囊、酏剂、微胶囊等口服剂型,以及非胃肠道给药的可注射剂型如灭菌溶液和水悬浮液,或其它在药物学上可接受的液体形式。这些制剂的生产是通过将该化合物与生理学上可接
30 受的已知载体、调味剂、赋形剂、载色剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂等制

成药剂常用的单位剂型。控制制剂中的活性成分使得在给定范围内获得合适剂量。

可与片剂、胶囊等混合的添加剂包括，粘和剂如凝胶、玉米淀粉、西黄耆胶和金合欢胶；赋形剂如结晶纤维素；膨胀剂如玉米淀粉、明胶和藻酸；润滑剂如硬脂酸镁；甜味剂如蔗糖、乳糖和糖精；加味剂如薄荷、akamono oil 和樱桃。当单位剂型为胶囊时，可进一步将液态载体如油和脂肪同上述添加剂一起使用。可根据常规制药方法制备注射用无菌组合物，例如将活性成分与天然植物油如芝麻油和可可油等溶解或悬浮在载体，如注射用的水中来制备药物。用于注射的液体介质的例子包括，生理盐水和包含葡萄糖及其它辅助制剂(如 D-山梨醇、D-甘露醇和氯化钠)的等渗溶液，并可以进一步同合适的助溶剂如醇(如乙醇)、聚醇(如丙烯醇和聚乙二醇)、非离子表面活性剂(如聚山梨酯 80TM 和 HCO-50)等结合使用。油性介质有芝麻油和豆油，它们可与助溶剂如苯甲酸苄酯和苯甲醇结合使用。

此外，上述的治疗/预防制剂可进一步同缓冲液(例如磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液)、镇静剂(例如苯扎氯胺和盐酸普鲁卡因)、稳定剂(如人血清白蛋白、聚乙二醇)、防腐剂(例如苯甲醇、酚)、抗氧化剂等结合使用。由此制备的注射液体一般装在合适的安瓿中。

所获制剂安全、低毒，因此可用于人和哺乳动物(例如，大鼠、小鼠、兔、羊、猪、牛、猫、狗、猴等)。

化合物或其盐(当为激动剂时)的剂量依赖于给药主体、靶器官、症状和给药方法等而异；在对癌症病人(体重 60kg)口服给药时，正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天。在对癌症病人(体重 60kg)非胃肠道给药时，单位剂量依赖于给药主体、靶器官、症状和给药方法等而变，但优选活性成分静脉注射，剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

(7)本发明受体蛋白或配体肽的定量

本发明受体蛋白或配体肽的抗体能特异性识别本发明的受体蛋白和配体肽，因此可用于定量测试样品溶液中的本发明受体蛋白和配体肽，具体是通过夹心免疫分析进行定量。因此，本发明提供了下述的定量方法：

(i)一种定量待测样品液中本发明受体蛋白或配体肽的方法，其包括，使本发明受体蛋白或配体肽的抗体与待测样品液以及标记的本发明受体蛋白或配体肽进行竞争反应，测定与该抗体结合的本发明标记性受体蛋白或标记性配体肽的比率；和，

- 5 (ii) 一种定量待测样品液中本发明受体蛋白或配体肽的方法，其包括，同时或先后使所述待测样品液与固定在不溶性载体上的针对本发明受体蛋白或配体肽的抗体，以及标记的针对本发明受体蛋白或配体肽的抗体反应，测定不溶性载体上标记试剂的活性。

在上述方法(ii)中，优选一种抗体能识别本发明受体蛋白或配体肽的 N
10 末端区域，而另一抗体能识别本发明受体蛋白或配体肽的 C 末端区域。

针对本发明受体蛋白或配体肽的单克隆抗体(下文称本发明的单克隆抗体)可用于分析本发明受体蛋白或配体肽。此外，也可通过组织染色来检测本发明受体蛋白或配体肽。为此，可用抗体本身或使用抗体分子的 $F(ab')_2$ 、 Fab' 或 Fab 片段。对使用本发明受体蛋白或配体肽的抗体的分析方法没有
15 特别的限制；可以使用任何方法，只要它涉及以下方法，即根据待测样品液中相应抗原含量(例如本发明受体蛋白或配体肽的量)，用化学或物理方法检测抗体、抗原或抗体-抗原复合物的量，然后根据含已知量抗原的标准溶液制备的标准曲线来计算。优选的方法为，例如 nephrometry、竞争法、免疫测定(immunometric)方法和夹心法；就敏感性和特异性而言，特别优选后
20 面将要描述的夹心法。

用于分析方法的标记试剂的例子为放射性同位素、酶、荧光物质和化学发光物质等。同位素的例子包括 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ 等。优选酶的例子为稳定、具有高比活的酶，包括 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶和苹果酸脱氢酶。荧光物质的例子包括荧光胺、
25 异硫氰酸荧光胺等。化学发光物质的例子包括发光氨、发光氨衍生物、虫萤光素、光泽精等。此外，也可使用生物素-链霉素系统来对抗原或抗体标记。

在固定抗原或抗体时，可以使用物理吸附。作为替代方法，传统上也使用化学结合来固定蛋白质或酶。载体的例子包括，不溶性多糖如琼脂糖、
30 葡聚糖和纤维素；合成树脂如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、和硅；玻璃等。

在夹心法中，待测样品溶液同本发明的固定单克隆抗体反应(第一反应)，然后同本发明的标记单克隆抗体反应(第二反应)，测定不溶性载体上的标记试剂活性，由此可以测定待测样品中本发明受体蛋白或配体肽的量。第一和第二反应可以以相反次序进行，或同时或有间隔的顺序进行。标记试剂的类型和固定的方法同上述的相同。

在夹心法免疫分析中，用于标记和固相的抗体并不必需是一种类型或一个物种的抗体，也可使用两或多种抗体的混合物来改善测定的灵敏度等。

在根据本发明的夹心方法测定本发明的受体蛋白或配体肽时，优选用于第一和第二反应的单克隆抗体为，同本发明的受体蛋白或配体肽的结合位点彼此不同。因此，在第一和第二反应用的抗体为，当第二反应的抗体识别受体蛋白的 C 端区域时，优选在第一反应中使用能识别除 C 端区域以外的位点，如 N 端区域的抗体。

针对本发明的受体蛋白或配体肽的抗体可用于除夹心法以外的其它分析，例如竞争法、immunometric 法和 nephrometry。在竞争法中，待测溶液中的抗原和标记抗原竞争与抗体的反应，然后将未反应的标记抗原(F)及结合于抗体的标记抗原(B)区分(即 B/F 区分)，测定 B 或 F 的标记量，从而可以测定待测溶液中的抗原量。在此类方法的反应中，有一种液相方法和一种固相方法，前者使用可溶性抗体，加入针对第一抗体的第二抗体后，用聚乙二醇来有效区分 B/F；后者可用固定的抗体作为第一抗体，或用可溶性抗体作为第一抗体但第二抗体为固相抗体。

在 immunometric 法中，待测溶液中的抗原和固相抗原竞争性地与给定量的标记抗体反应，然后从液相中分离固相；或待测溶液中的抗原与过量标记抗体反应，然后加入固相抗原，使未反应的标记抗体与该固相结合，然后从液相中分离固相。随后，测定两相的标记量，来测定待测溶液中的抗原量。

在 nephrometry 中，测定抗原-抗体在凝胶或溶液中反应产生的不溶性沉淀的量。即使待测溶液中抗原量很少且仅获得小量的沉淀，利用激光散射的激光 nephrometry 方法也适于此应用。

本发明应用这些免疫分析方法中任何一个进行分析时，不需要任何特殊条件和操作。除了每种方法的常规条件和操作外，本领域技术人员可构建测定本发明受体蛋白及配体肽的其它分析系统。所述常规技术的细节，

参见如入江宽(编):“放射免疫分析”(1974, 讲谈社, 日本); 入江宽(编):“放射免疫分析, 第二版”(1979, 讲谈社, 日本); 石川荣志等(编):“酶免疫分析”(医学书院, 1978); 石川荣志等(编):“酶免疫分析, 第二版”(医学书院, 1982); 石川荣志等(编):“酶免疫分析, 第三版”(医学书院, 1987); “酶学方法”卷 70(免疫化学技术(A)); 同上, 卷 73(免疫化学技术(B)); 同上, 卷 74(免疫化学技术(C)); 同上, 卷 84(免疫化学技术(D:选择性免疫分析)); 同上, 卷 92(免疫化学技术(E:单克隆抗体及普通免疫分析方法)); 同上, 卷 121(免疫化学技术(I:杂交瘤技术及单克隆抗体))(Academic Press 出版)等)。

10 如上所述, 使用本发明的抗体可高度敏感地定量本发明的受体蛋白或配体肽。

此外, 使用本发明的抗体可高度敏感地定量本发明的受体蛋白或配体肽, 从而诊断各种同本发明受体蛋白功能异常相关的疾病。

15 本发明受体蛋白或配体肽的抗体可用于特异性检测待测样品液如体液、组织等中可能存在的本发明受体蛋白或配体肽。该抗体也可用于制备抗体柱, 用于纯化本发明受体蛋白或配体肽, 通过纯化检测级分中的本发明受体蛋白, 分析待检细胞中本发明受体蛋白或配体肽的行为。

(8)用本发明受体蛋白或配体肽的抗体进行中和反应

20 本发明受体蛋白或配体肽的抗体对所述受体蛋白或配体肽的中和活性指, 使所述受体蛋白或配体肽所参与的信号传导途径失去作用。因此, 当所述抗体具有中和活性时, 其可使受体所述受体蛋白或配体肽所参与的信号传导途径失去作用, 如受体蛋白介导的细胞刺激活性(如促进或抑制花生四烯酸释放、乙酰胆碱释放、细胞内钙离子释放、细胞内 cAMP 产生、细胞内 cGMP 产生、磷酸肌醇的产生、细胞膜电位变化、细胞内蛋白的磷酸化、c-fos 的激活和 pH 的降低)(所谓本发明受体蛋白的激动剂)。因此, 该抗体可用于预防和/或治疗由所述受体蛋白或配体肽过量表达导致的疾病。

(9)携带本发明受体蛋白之编码 DNA 的动物的产生

30 可用本发明的 DNA 产生出表达本发明受体蛋白的转基因动物。可使用哺乳动物(如大鼠、小鼠、兔、羊、猪、牛、猫、狗、猴等), 优选小鼠和兔。

为将本发明的 DNA 转入目标动物，通常优选使用基因构建体，其中将该 DNA 连接在一启动子下游，以使所述构建体能在动物细胞中表达该 DNA。例如，当转移本发明中兔子来源的 DNA 时，将该 DNA 连接在一种启动子(其能表达与本发明 DNA 高度同源的动物源 DNA)的下游，将该构建体显微注射至兔受精卵。从而可产生能高水平表达本发明受体蛋白的转基因动物。可使用的启动子为病毒启动子和广泛表达的启动子，如金属硫蛋白启动子，但优选特异性表达于脑部的 NGF 基因启动子和烯醇化酶基因的启动子。

在受精卵阶段转入本发明的 DNA，可保证该 DNA 在目标动物的所有生殖细胞和体细胞中存在。该转基因动物的生殖细胞中出现本发明的受体蛋白意味着，在该动物的所有后代的所有体细胞和生殖细胞都含有本发明的受体蛋白。含有该基因的动物后代在所有生殖细胞和体细胞中都含有本发明的受体蛋白。

含有本发明 DNA 的转基因动物在证实该基因可稳定维持后，可在常规育种条件下交配、并繁殖数代。而且，使含有所需 DNA 的雄性和雌性动物交配可得到纯合子，其在两条同源染色体上都含有该转导的基因，随后使这些雄性和雌性动物继续交配数代，使后代都含有该 DNA。

含有本发明 DNA 的转基因动物因大量表达本发明受体蛋白，而可用于筛选本发明受体蛋白的激动剂和拮抗剂。

含有本发明 DNA 的转基因动物也可用作组织培养的细胞源。可对本发明的受体蛋白进行分析，如直接分析本发明转基因小鼠组织中的 DNA 或 RNA，或分析表达了该受体蛋白的组织。用常规培养技术培养来自含本发明受体蛋白的组织的细胞。可用这些细胞研究通常难以培养的组织中的细胞(如脑部和周边组织的细胞)功能。可用这些细胞筛选能改善组织功能药物。有了高表达细胞系后，可从该细胞系中分离、纯化本发明的受体蛋白。

在说明数和附图中，碱基和氨基酸的代码使用 IUPAC-IUB 生化命名委员会规定的或本领域通用的代码，如下述例示。对于有光学异构体的氨基酸，除非特别说明，指 L 形式。

DNA：脱氧核糖核酸

cDNA：互补的脱氧核糖核酸

A：腺嘌呤

	T	: 胸腺嘧啶
	G	: 鸟嘌呤
	C	: 胞嘧啶
	RNA	: 核糖核酸
5	mRNA	: 信使核糖核酸
	dATP	: 脱氧腺苷三磷酸
	dTTP	: 脱氧胸腺嘧啶三磷酸
	dGTP	: 脱氧鸟苷三磷酸
	dCTP	: 脱氧胞嘧啶三磷酸
10	ATP	: 腺苷三磷酸
	EDTA	: 乙二胺四乙酸
	SDS	: 十二烷基硫酸钠
	Gly	: 甘氨酸
	Ala	: 丙氨酸
15	Val	: 缬氨酸
	Leu	: 亮氨酸
	Ile	: 异亮氨酸
	Ser	: 丝氨酸
	Thr	: 苏氨酸
20	Cys	: 半胱氨酸
	Met	: 蛋氨酸
	Glu	: 谷氨酸
	Asp	: 天冬氨酸
	Lys	: 赖氨酸
25	Arg	: 精氨酸
	His	: 组氨酸
	Phe	: 苯丙氨酸
	Tyr	: 酪氨酸
	Trp	: 色氨酸
30	Pro	: 脯氨酸
	Asn	: 天冬酰胺

Gln : 谷氨酰胺

PGlu : 焦谷氨酸

Me : 甲基

Et : 乙基

5 Bu : 丁基

Ph : 苯基

TC : 四氢噻唑-4(R)-酰胺基

本说明中大量使用的取代基、保护基和试剂的代码如下。

Tos : 对甲苯磺酰基

10 CHO : 中国仓鼠卵巢细胞

Bzl : 苄基

Cl₂Bzl : 2,6-二氯苄基

Bom : 苄氧甲基

Z : 苄氧基羰基

15 Cl-Z : 2-氯苄氧基羰基

Br-Z : 2-溴苄氧基羰基

Boc : 叔丁氧基羰基

DNP : 二硝基苯酚

Trt : 三苯甲基

20 Bum : 叔丁氧基甲基

Fmoc : N-9-芴基甲氧基羰基

HOBt : 1-羟基苯并三唑

HOObt : 3,4-二羟基-3-羟基-4-氧-1,2,3-苯并三嗪

HONB : 1-羟基-5-降冰片烯基-2,3-二羧酰亚胺

25 DCC : N,N'-二环己基碳二亚胺

BHA : 二苯基胺

MeBzl : 4-甲基苄基

OcHex : 环己酯

NMP : N-甲基吡咯烷酮

30 TFA : 三氟乙酸

本说明书的序列表中的序列编号(SEQ ID NO:)分别表示下列序列。

[SEQ ID NO:1]

本发明大鼠脑干周边部分的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:2]

5 本发明大鼠脑干周边部分的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的碱基序列，该序列含有[SEQ ID NO:1]中的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:3]

克隆编码本发明大鼠脑干周边部分的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的 cDNA 所用引物 1 的碱基序列。

10 [SEQ ID NO:4]

克隆编码本发明大鼠脑干周边部分的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的 cDNA 所用引物 2 的碱基序列。

[SEQ ID NO:5]

15 本发明人脑来源的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:6]

本发明人脑来源的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的碱基序列，该序列含有[SEQ ID NO:5]中的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:7]

20 克隆编码本发明人脑来源的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的 cDNA 所用探针的碱基序列。

[SEQ ID NO:8]

克隆编码本发明人脑来源的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的 cDNA 所用引物 1 碱基序列。

25 [SEQ ID NO:9]

克隆编码本发明人脑来源的新 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的 cDNA 所用引物 2 的碱基序列。

[SEQ ID NO:10]

实施例 3 中描述的肽(1-54)的氨基酸序列。

30 [SEQ ID NO:11]

实施例 3 中描述的肽(40-54)的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:12]

实施例 3 中描述的肽(45-54)的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:13]

实施例 3 中描述的肽(46-54)的氨基酸序列。

5 [SEQ ID NO:14]

实施例 3 中描述的肽(47-54)的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:15]

编码 SEQ ID NO:10 中所示氨基酸序列的 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:16]

10 编码 SEQ ID NO:11 中所示氨基酸序列的 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:17]

编码 SEQ ID NO:12 中所示氨基酸序列的 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:18]

编码 SEQ ID NO:13 中所示氨基酸序列的 DNA 的碱基序列。

15 [SEQ ID NO:19]

编码 SEQ ID NO:14 中所示氨基酸序列的 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:20]

实施例 3 中描述的 KiSS-1 产物的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:21]

20 实施例 3 中描述的肽(48-54)的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:22]

编码 SEQ ID NO:21 中所示氨基酸序列 DNA 的碱基序列。

实施例 1 描述的大肠杆菌转化体 DH10B/pAK-rOT175 于 1998 年 10 月 21 日保藏于通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH)，保藏
25 编号为 FERM BP-6553，，于 1998 年 10 月 1 日保藏于财团法人发酵研究所 (IFO)，保藏编号为 IFO 16209。

实施例 2 描述的大肠杆菌转化体 DH10B/pCMV-hOT175 于 1999 年 2 月 17 日保藏于通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH)，保藏编号为 FERM BP-6648，于 1999 年 2 月 9 日保藏于财团法人发酵研究所
30 (IFO)，保藏编号为 IFO 16258。。

实施例

参考实施例详述本发明，但并非限制本发明的范围。使用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 进行基因操作按“分子克隆”的方法进行。

实施例 1 大鼠脑干周边部分中 G 蛋白偶联型受体蛋白的 cDNA 的克隆和碱基序列的测定

5 用大鼠脑干周边部分的 cDNA 作为模板，用两个引物，即引物 1 (SEQ ID NO:3) 和引物 2 (SEQ ID NO:4)，进行 PCR 反应。上述反应溶液包含 1/10 体积的 cDNA 作为模板、1/50 体积的 Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech 公司)、0.2 μ M 的引物 1 (SEQ ID NO:3) 和 0.2 μ M 的引物 2 (SEQ ID NO:4)、200 μ M 的 dNTPs 和酶缓冲液，总体积 50 μ l。在 PCR 反应中，(1) 反应液 94
10 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟，(2) 然后以 94 $^{\circ}$ C 30 秒然后 72 $^{\circ}$ C 2 分钟进行 3 个循环，(3) 以 94 $^{\circ}$ C 30 秒然后 68 $^{\circ}$ C 2 分钟进行 3 个循环，(4) 以 94 $^{\circ}$ C 30 秒、64 $^{\circ}$ C 30 秒和 68 $^{\circ}$ C 2 分钟进行 30 个循环，和(5) 最后在 68 $^{\circ}$ C 延伸 8 分钟。在完成 PCR 反应后，用 TA 克隆试剂盒 (Invitrogen) 按说明书将产物亚克隆到质粒载体 pCR2.1 (Invitrogen)，再导入大肠杆菌菌株 DH5 α 中，携带所述 cDNA 的克
15 隆在含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上进行筛选。分析每一个克隆的序列，找出编码新的 G 蛋白偶联型受体蛋白的 cDNA 序列 (SEQ ID NO:2)。含有从该 cDNA 推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 的新 G 蛋白偶联型受体蛋白被命名为 rOT7T175。

含有大鼠脑干周边部分中 G 蛋白偶联型受体蛋白 rOT7T175 的编码
20 cDNA 的质粒 pAK-rOT7T175 用已知方法亚克隆至大肠杆菌菌株 DH10B，获得大肠杆菌转化体 DH10B/ pAK-rOT7T175。

实施例 2 人脑中 G 蛋白偶联型受体蛋白 hOT7T175 的编码 cDNA 的克隆和碱基序列的测定

cDNA 的克隆参照 GENE TRAPPER (Life Technologies) 的方案进行。在
25 对探针 (SEQ ID NO:7) 生物素化后，用该探针对单链人脑 cDNA 文库 (Superscript cDNA 文库，Life Technologies 公司) 进行杂交。用引物 1 (SEQ ID NO:8) 将得到的单链基因转换为双链。用电穿孔将该基因导入大肠杆菌菌株 DH10B 后，在含有氨苄青霉素的选择平板上筛选转化体。电穿孔用 E. Coli Pulser (BioRAD) 在 1.8kV 的电压下进行。所得转化体用探针 (SEQ ID NO:7)
30 和引物 2 (SEQ ID NO:9) 进行菌落 PCR，获得大肠杆菌菌株 DH10B/ pAK-hOT7T175 转化体。含有从所述 cDNA 推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5) 的

新 G 蛋白偶联型受体蛋白被命名为 hOT7T175。在菌落 PCR 中，反应溶液包含 1/50 体积的 Advantage cDNA Polymerase Mix(Clontech 公司)、0.2 μ M 探针(SEQ ID NO:7)和 0.2 μ M 引物 2(SEQ ID NO:9)、200 μ M dNTPs、1/25 体积的 DMSO 和酶缓冲液，总体积 10 μ l。在 PCR 反应中，(1)反应液在 94
 5 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟，(2)然后以 94 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 10 秒和 68 $^{\circ}$ C 1 分钟进行 25 个循环。在完成 PCR 反应后，用 TA 克隆试剂盒(Invitrogen)按说明书将产物亚克隆到质粒载体 pCR2.1(Invitrogen)，再导入大肠杆菌菌株 DH10B 中，携带所述 cDNA 的克隆在含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上进行筛选。分析每一个克隆的序列，找出编码新的 G 蛋白偶联型受体蛋白的 cDNA 序列(SEQ
 10 ID NO:6)。含有从该 cDNA 推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)的新 G 蛋白偶联型受体蛋白被命名为 hOT7T175。

实施例 3 筛选能活化 rOT7171(孤儿受体)的肽

(1-1)肽的合成

用下述方法合成基因数据库中，癌转移抑制基因(KiSS-1)产物(SEQ ID
 15 NO:20)的 68 位(Gly)到 121(Phe)位氨基酸(SEQ ID NO:10)共 54 个残基(此处的肽以后称为肽(1-54))。

此外，肽(1-54)(SEQ ID NO:10)的 C 末端肽，即肽(40-54)(SEQ ID NO:11)、肽(45-54)(SEQ ID NO:12)、肽(46-54)(SEQ ID NO:13)、肽(47-54)(SEQ ID NO:14)和肽(48-54)(SEQ ID NO:21)如下合成。

20 (1)肽(40-54)的制备

将市售 p-甲基 BHA 树脂(0.77 nmole/g 树脂)放入肽合成仪 ABI 430A 的反应罐中。随后，用 Boc 肽合成法(NMP-HOBt)依次将 Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Leu、Boc-Gly、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Asn、Boc-Trp(CHO)、Boc-Asn、Boc-Tyr(Br-Z)、Boc-Asn、Boc-Pro、Boc-Leu、Boc-
 25 Asp(OcHex)和 Boc-Lys(Cl-Z)导入该树脂，获得氨要求保护的肽树脂。使 0.12g 树脂与 1ml 对甲酚和 1.2ml 1,4-丁二硫醇在 10ml 无水氢氟酸中于 0 $^{\circ}$ C 搅拌 60 分钟。然后真空蒸馏除去氢氟酸。残留物中加入二乙醚，过滤沉淀。在沉淀中加入 50%的醋酸水溶液进行抽提，去除不溶性物质。抽提物经充分浓缩后，上样于装有 50% 醋酸水溶液的 Sephadex G-25 柱(2.0 $\times$ 80cm)，然
 30 后用同样的溶剂洗脱。收集主要级分，冻干获得 40mg 的白色粉末。再用其一半上样于反相层析柱(2.6 $\times$ 60cm)，该柱装有 LiChroprep(商品名)RP-18，

然后用 200ml 0.1% TFA 溶液洗柱。然后用 300ml 0.1% TFA 和 300ml 含有 0.1% TFA 的 33% 乙腈溶液进行线性密度梯度洗脱。收集主要级分，冻干获得 4.1mg 目的肽。

质谱(M+H)⁺ 1869.9(理论值 1969.9)

5 HPLC 洗脱时间：18.6 分钟。

柱条件：

柱子：Wakosil 5C18T, 4.6×100mm

洗脱剂：按 A/B=95/5-45/55 进行线性密度梯度洗脱，其中 A 液为 0.1% TFA，B 液为含 0.1% TFA 的乙腈(25 分钟)。

10 流速：1.0ml/min

(2)肽(45-54)的制备

将市售 p-甲基 BHA 树脂(0.77 nmole/g 树脂)放入肽合成仪 ABI 430A 的反应罐中。随后，用 Boc 肽合成法(NMP-HOBt)依次将 Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Leu、Boc-Gly、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Asn、Boc-Trp(CHO)、Boc-Asn、Boc-Tyr(Br-Z)导入该树脂，获得按要求保护的肽树脂。将 0.11g 树脂按上述(1)相似的方式处理以去除保护基，获得 2.2 mg 目的肽。

质谱(M+H)⁺ 1302.5 (理论值 1302.6)

HPLC 洗脱时间：18.7 分钟

柱条件：

20 柱子：Wakosil 5C18T, 4.6×100mm

洗脱剂：按 A/B=95/5-45/55 进行线性密度梯度洗脱，其中 A 液为 0.1% TFA，B 液为含 0.1% TFA 的乙腈(25 分钟)。

流速：1.0ml/min

(3)肽(46-54)的制备

25 将市售 p-甲基 BHA 树脂(0.77 nmole/g 树脂)放入肽合成仪 ABI 430A 的反应罐中。随后，用 Boc 肽合成法(NMP-HOBt)依次将 Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Leu、Boc-Gly、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Asn、Boc-Trp(CHO)、Boc-Asn 导入该树脂，获得按要求保护的肽树脂。将 0.11g 树脂按上述(1)相似的方式处理以去除保护基，获得 3.4 mg 目的肽。

30 质谱(M+H)⁺ 1139.6 (理论值 1139.6)

HPLC 洗脱时间：18.1 分钟

柱条件：

柱子：Wakosil 5C18T, $4.6 \times 100\text{mm}$

洗脱剂：按 A/B=95/5-45/55 进行线性密度梯度洗脱，其中 A 液为 0.1% TFA，B 液为含 0.1% TFA 的乙腈(25 分钟)。

5 流速：1.0ml/min

(4)肽(47-54)的制备

将市售 p-甲基 BHA 树脂(0.77 nmole/g 树脂)放入肽合成仪 ABI 430A 的反应罐中。随后，用 Boc 肽合成法(NMP-HOBt)依次将 Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Leu、Boc-Gly、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Asn、Boc-Trp(CHO)导入该树脂，获得按要求保护的肽树脂。0.12g 树脂按上述(1)相似的方式处理以去除保护基，获得 13mg 目的肽。

质谱(M+H)⁺ 1025.5 (理论值 1025.5)

HPLC 洗脱时间：17.6 分钟

柱条件：

15 柱子：Wakosil 5C18T, $4.6 \times 100\text{mm}$

洗脱剂：按 A/B=95/5-45/55 进行线性密度梯度洗脱，其中 A 液为 0.1% TFA，B 液为含 0.1% TFA 的乙腈(25 分钟)

流速：1.0ml/min

(5)肽(48-54)的制备

20 将市售 p-甲基 BHA 树脂(0.77 nmole/g 树脂)放入肽合成仪 ABI 430A 的反应罐中。随后，用 Boc 肽合成法(NMP-HOBt)依次将 Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Leu、Boc-Gly、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Asn、Boc-Trp(CHO)导入该树脂，获得按要求保护的肽树脂。使 0.16g 树脂与对甲酚在 10ml 无水氢氟酸中 0℃ 搅拌 60 分钟，然后反应混合物如上述(1)相似的方式处理以去除保护基，获得 29.0 mg 的预期肽。

质谱(M+H)⁺ 839.5 (理论值 839.5)

HPLC 洗脱时间：15.6 分钟

柱条件：

柱子：Wakosil 5C18T, $4.6 \times 100\text{mm}$

30 洗脱剂：按 A/B=95/5-45/55 进行线性密度梯度洗脱，其中 A 液为 0.1% TFA，B 液为含 0.1% TFA 的乙腈(25 分钟)

流速：1.0ml/min

(6)肽(1-54)的制备

肽(1-54)的制备如下：将市售 p-甲基 BHA 树脂(0.77 nmole/g 树脂)放入肽合成仪 ABI 430A 的反应罐中。随后依次导入 Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Leu、Boc-Gly、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Asn、Boc-Trp(CHO)、Boc-Asn、Boc-Tyr(Br-Z)、Boc-Asn、Boc-Pro、Boc-Leu、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Lys(Cl-Z)、Boc-Glu(OcHex)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Gln、Boc-Val、Boc-Leu、Boc-Val、Boc-Ala、Boc-Gly、Boc-Gln、Boc-Pro、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Ile、Boc-Gln、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Pro、Boc-Ala、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Leu、Boc-Gly、Boc-Pro、Boc-Gln、Boc-Gln、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Gly、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Glu(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Pro、Boc-Pro、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Leu、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Thr(Bzl)和 Boc-Gly 以获得按要求保护的肽树脂，按上述(1)制备肽(40-54)的相似方式从被保护的肽树脂中去除保护基。

(1-2)用 FLIPR 测定使细胞内钙离子浓度升高的活性

使用 CellPect 转染试剂盒(Amerham Pharmacia Biotech 公司)，将动物细胞表达质粒 pAK-rOT175 转导入 CHO/dhfr⁻细胞，获得稳定表达细胞系 rOT7T175。首先，将 240ml 缓冲液 A (CellPect 转染试剂盒所附)加入溶于 240ml 蒸馏水的 9.6mg 质粒 DNA 中，搅拌。将混合物放置 10 分钟，然后向其中加入 480ml 缓冲液 B (CellPect 转染试剂盒所附)，剧烈搅拌以形成含有该 DNA 的脂质体。然后将 4×10^5 的 CHO/dhfr⁻细胞(来自 ATCC)接种到 60mm 的 Petri 平皿中。在含有 10%牛血清白蛋白(BIO WHITTAKER 公司)的 Ham' s F-12 培养基(Nissui Seiyaku 有限公司)中于 37℃、5%CO₂ 中培养 2 天，将 480ml 脂质体滴入 Petri 平皿的细胞中。于 37℃、5%CO₂ 中培养 6 小时后，用无血清的 Ham' s F-12 培养基洗涤细胞两次，在 Petri 平皿的细胞中加入 15%甘油，处理 2 分钟。再用无血清的 Ham' s F-12 培养基洗涤细胞两次，然后在含有 10%牛血清白蛋白的 Ham' s F-12 培养基中于 37℃、5%CO₂ 保温 15 小时。用胰酶处理并从 Petri 平皿中回收细胞。回收的细胞以 1.25×10^4 细胞/孔接种到 6 孔板，在含有 10%透析过的牛血清白蛋白(JRH BIO 科学公司)的 DMEM 培养基(Nissui Seiyaku 有限公司)中于 37℃、5%CO₂ 保温 15 小时。经质粒转导的 CHO 细胞转化体可以在培养基中

生长，而未转导的细胞则逐渐死亡。在第 1 和 2 天更换培养基，以去除死细胞。选出保温 8-10 天仍持续生长的 CHO 转化体 20 个菌落。用市售 RNA 提取试剂盒从筛选的细胞中分别提取 RNA。用众所周知的 RT-PCR 方法，筛选 rOT7T175 表达型 CHO 细胞第 23 号克隆(此后缩写为 rOT7T175-23)，

5 其以高水平表达 rOT7T175 受体基因。

使用 ETA 表达性 CHO 细胞第 24 号克隆作为对照(此后缩写为 ETA24，参照药理学及实验性治疗杂志(Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics), 卷 279, 675-685 页, 1996)。

10 用 FLIPR(Molecular Devices)对 rOT7T175-23 和 ETA24 中经上述(1-1)获得的合成肽的细胞内钙离子浓度升高活性进行测定。

在含有 10%透析过的牛血清白蛋白(此后缩写为 dFBS)的 DMEM 培养基中传代培养 rOT7T175-23 和 ETA24 细胞，待用。在培养基中(10% dFBS-DMEM)以 15×10^4 细胞/ml 分别悬浮 rOT7T175-23 和 ETA24 细胞。用分配器将各 200 μ l (3.0×10^4 细胞/200 μ l)悬浮液接种到 FLIPR96 孔板(黑色板透明底, Costar)，然后于 37℃、5%CO₂ 培养箱中保温过夜。经过如此保温的细胞待用(此后称作细胞板)。然后混合 21ml 的 HANKS/HBSS(9.8g 的 HANKS'、0.35g 的碳酸氢钠、20ml 1M 的 HEPES，用 1N 的氢氧化钠调 pH 值到 7.4，过滤除菌)和 210 μ l 的 250mM [4-(二丙基氨磺酰基)苯甲酸]及 210 μ l 胎牛血清(FBS)。此外，Fluo3-AM 两小瓶(50 μ g/瓶)溶于 42 μ l DMSO 和 42 μ l 20% Pluronic acid)。所得溶液加入 20ml 上述 HANKS/HBSS-[4-(二丙基氨磺酰基)苯甲酸]-FBS，混合。在去除培养溶液后，用 8 道移液器将混合液以 100 μ l/孔加入细胞板中，于 37℃、5%CO₂ 培养箱中保温 1 小时(色素沉积)。将肽溶于 DMSO 中，浓度 1×10^{-3} M。向 0.002ml(1×10^{-3} M)肽的 DMSO 溶液中加入 0.066ml 的含 2.5mM[4-(二丙基氨磺酰基)苯甲酸]及 0.2% 牛血清白蛋白的 HANKS/HBSS 进行稀释(在活性实验中终浓度为 1×10^{-5} M)。随后，在 0.001ml(1×10^{-3} M)肽的 DMSO 溶液中，加入 0.009ml 的 DMSO。在分别加入 0.002ml 的稀释液后，在体系中加入 0.066ml 的含 2.5mM[4-(二丙基氨磺酰基)苯甲酸]及 0.2% BSA 的 HANKS/HBSS 进行稀释(终浓度为 1×10^{-6} M)。类似地，继续稀释到终浓度为 1×10^{-10} M，然后转移到 FLIPR 96 孔板(V 形底, Costar)(此后称为样品板)。将色素沉积到细胞板后，用洗涤液将细胞板洗涤 4 遍，洗涤液为含 2.5mM [4-(二丙基氨磺酰基)苯甲酸]的

HANKS/HBSS, 用洗板器洗涤, 在洗涤后留下 $100\ \mu\text{l}$ 洗涤液。细胞板和样品板置于 FLIPR, FLIPR 自动将样品板的 0.05ml 样品转移到细胞板, 启动细胞应答。随时间推移测定 180 秒的细胞内钙离子浓度。

结果显示上述(1-1)合成的肽可特异性诱导 rOT7T175 表达细胞的胞内钙离子浓度升高。通过比较剂量反应曲线(图 9), 肽(40-54)和肽(45-54)显示最高活性。

工业应用

本发明中 G 蛋白偶联的受体蛋白、其部分肽或其盐, 以及编码它们的多核苷酸(例如 DNA、RNA 及其衍生物)可用于: (1)测定配体(本发明的配体肽)(激动剂), (2)制备抗体和抗血清, (3)构建重组受体蛋白的表达系统, (4)用表达系统进行受体结合分析和筛选可能的药物化合物, (5)根据配体-受体的结构相似性比较来进行药物设计, (6)在基因诊断中作为制备探针和 PCR 引物的试剂, (7)构建转基因动物, 或(8)在基因治疗中作为预防/治疗剂。

序 列 表

<110> 武田药品工业株式会社

<120> 新型 G 蛋白偶联型受体蛋白、DNA 及其配体

<130> 2562W00P

<150> JP 10-305949

<151> 1998-10-27

<150> JP 11-027710

<151> 1999-02-04

<150> JP 11-057207

<151> 1999-03-04

<150> JP 11-276225

<151> 1999-09-29

<160> 22

<210> 1

<211> 396

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 1

Met Ala Ala Glu Ala Thr Leu Gly Pro Asn Val Ser Trp Trp Ala Pro

5

10

15

Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Gly

20

25

30

Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe

35

40

45

Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile

50

55

60

Phe Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr

65

70

75

80

Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val

85

90

95

Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Asp

100

105

110

Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala

115

120

125

Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro
 165 170 175
 Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser
 180 185 190
 Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn
 195 200 205
 Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr
 210 215 220
 Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala
 245 250 255
 Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe
 260 265 270
 Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu
 275 280 285
 Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro
 305 310 315 320
 Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg
 325 330 335
 Val Cys Pro Cys Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala
 340 345 350
 His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala
 355 360 365
 His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg
 370 375 380
 Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu
 385 390 395 396

<210> 2

<211> 1191

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 2

```

ATGGCCGCAG AGGCGACGTT GGGTCCGAAC GTGAGCTGGT GGGCTCCGTC CAACGCTTCG    60
GGATGCCCGG GCTGCGGTGT CAATGCCTCG GATGGCCCAG GCTCCGCGCC AAGGCCCTG    120
GATGCCTGGC TGGTGCCCTT GTTTTTCGCT GCCCTAATGT TGCTGGGGCT AGTCGGGAAC    180
TCACTGGTCA TCTTCGTTAT CTGCCGCCAC AAGCACATGC AGACCGTCAC CAATTTCTAC    240
ATCGCTAACC TGGCGGCCAC AGATGTCACT TTCCTTCTGT GCTGCGTACC CTTCAACGCG    300
CTCCTCTATC CGCTGCCAC CTGGGTGCTG GGAGACTTCA TGTGCAAATT CGTCAACTAC    360
ATCCAGCAGG TCTCGGTGCA AGCCACATGT GCCACTTTGA CAGCCATGAG TGTGGACCGC    420
TGGTACGTGA CTGTGTTCCC GCTGCGTGCA CTTCAACGCC GCACTCCGCG CCTGGCCCTG    480
ACTGTCAGCC TTAGCATCTG GGTGGGTTCG GCAGCTGTTT CCGCCCCGGT GCTGGCTCTG    540
CACCGCCTGT CGCCCGGGCC TCACACCTAC TGCAGTGAGG CGTTTCCCAG CCGTGCCCTG    600
GAGCGCGCTT TCGCGCTCTA CAACCTGCTG GCCCTATACC TGCTGCCGCT GCTCGCCACC    660
TGCGCCTGCT ACGGTGCCAT GCTGCGCCAC CTGGGCCGCG CCGCTGTACG CCCCACACCC    720
ACTGATGGCG CCCTGCAGGG GCAGCTGCTA GCACAGCGCG CTGGAGCAGT GCGCACCAAG    780
GTCTCCCGGC TGGTGGCCGC TGTGTCCTG CTCTTCGCCG CCTGCTGGGG CCCGATCCAG    840
CTGTTCTGCT TGCTTCAAGC CCTGGGCCCC TCGGGGGCCT GGCACCCTCG AAGCTATGCC    900
GCCTACGCGC TCAAGATCTG GGCTCACTGC ATGTCCTACA GCAATTCTGC GCTCAACCCG    960
CTGCTCTATG CCTTCTGGG TTCCCACTTC AGACAGGCCT TCTGCCGCGT GTGCCCTGCT   1020
GGCCCGCAAC GCCAGCGTCG GCCCCACGCG TCAGCGCACT CGGACCGAGC CGCACCCCAT   1080
AGTGTGCCGC ACAGCCGGGC TGCGCACCCCT GTCCGGGTCA GGACCCCGA GCCTGGGAAC   1140
CCTGTGGTGC GCTCGCCCTC TGTTCAAGAT GAACACACTG CCCCCTCTG A              1191

```

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

```

GTCGACATGG CCGCAGAGGC GACGTTGGGT    30

```

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

ACTAGTTCAG AGTGGGGCAG TGTGTTTCATC

30

<210> 5

<211> 398

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Met His Thr Val Ala Thr Ser Gly Pro Asn Ala Ser Trp Gly Ala Pro

5

10

15

Ala Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Ala Asn Ala Ser Asp Gly

20

25

30

Pro Val Pro Ser Pro Arg Ala Val Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe

35

40

45

Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile

50

55

60

Tyr Val Ile Cys Arg His Lys Pro Met Arg Thr Val Thr Asn Phe Tyr

65

70

75

80

Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val

85

90

95

Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Trp Val Leu Gly Asp

100

105

110

Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala

115

120

125

Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr

130

135

140

Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu

145

150

155

160

Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro

165

170

175

Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ala Tyr Cys Ser

180

185

190

Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn

195

200

205

Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr

210

215

220

Ala Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Val Ala Val Arg Pro Ala Pro

225

230

235

240

Ala Asp Ser Ala Leu Gln Gly Gln Val Leu Ala Glu Arg Ala Gly Ala

245

250

255

Val Arg Ala Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe

260

265

270

Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu

275

280

285

Gly Pro Ala Gly Ser Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu

290

295

300

Lys Thr Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro

305

310

315

320

Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Arg Arg

325

330

335

Val Cys Pro Cys Ala Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly

340

345

350

Pro Ser Asp Pro Ala Ala Pro His Ala Glu Leu His Arg Leu Gly Ser

355

360

365

His Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Lys Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ala

370

375

380

Ala Arg Gly Leu Cys Val Leu Gly Glu Asp Asn Ala Pro Leu

385

390

395

398

<210> 6

<211> 1197

<212> DNA

<213> 人

<400> 6

ATGCACACCG TGGCTACGTC CGGACCCAAC GCGTCCTGGG GGGCACC GGC CAACGCCTCC 60

GGCTGCCCGG GCTGTGGCGC CAACGCCTCG GACGGCCCAG TCCCTTCGCC GCGGGCCGTG 120
 GACGCCTGGC TCGTGCCGCT CTTCTTCGCG GCGCTGATGC TGCTGGGCCT GGTGGGGAAC 180
 TCGCTGGTCA TCTACGTCAT CTGCCGCCAC AAGCCGATGC GGACCGTGAC CAACTTCTAC 240
 ATCGCCAACC TGGCGGCCAC GGACGTGACC TTCCTCCTGT GCTGCGTCCC CTTACGGGCC 300
 CTGCTGTACC CGTGCCCGG CTGGGTGCTG GCGCACTTCA TGTGCAAGTT CGTCAACTAC 360
 ATCCAGCAGG TCTCGGTGCA GGCCACGTGT GCCACTCTGA CCGCCATGAG TGTGGACCGC 420
 TGGTACGTGA CGGTGTTCCC GTTGGCGGCC CTGCACCGCC GCACGCCCCG CCTGGCGCTG 480
 GCTGTACGCC TCAGCATCTG GGTAGGCTCT GCGGCGGTGT CTGCGCCGGT GCTCGCCCTG 540
 CACCGCCTGT CACCCGGGCC GCGCGCCTAC TGCAGTGAGG CCTTCCCCAG CCGCGCCCTG 600
 GAGCGCGCCT TCGCACTGTA CAACCTGCTG GCGCTGTACC TGCTGCCGCT GCTCGCCACC 660
 TGCGCCTGCT ATGCGGCCAT GCTGCGCCAC CTGGGCGGG TCGCCGTGCG CCGCGCGCCC 720
 GCCGATAGCG CCCTGCAGGG GCAGGTGCTG GCAGAGCGCG CAGGCGCCGT GCGGGCCAAG 780
 GTCTCGCGGC TGGTGGCGGC CGTGGTCCTG CTCTTCGCGG CCTGCTGGGG CCCCATCCAG 840
 CTGTTCCCTGG TGCTGCAGGC GCTGGGCCCC GCGGGCTCCT GGCACCCACG CAGCTACGCC 900
 GCCTACGCGC TTAAGACCTG GGCTCACTGC ATGTCCTACA GCAACTCCGC GCTGAACCCG 960
 CTGCTCTACG CCTTCCTGGG CTCGCACTTC CGACAGGCCT TCCGCCGCGT CTGCCCCTGC 1020
 GCGCCGCGCC GCCCCCGCG CCCCCGCGG CCCGGACCCT CGGACCCCGC AGCCCCACAC 1080
 GCGGAGCTGC ACCGCCTGGG GTCCACCCG GCCCCGCCA GGGCGCAGAA GCCAGGGAGC 1140
 AGTGGGCTGG CCGCGCGCGG GCTGTGCGTC CTGGGGGAGG ACAACGCCCC TCTCTGA 1197

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

GACCGTGACC AACTTCTACA TCGCCA

26

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 8

ATGCACACCG TGGCTACGTC CG

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 9

CCTGTCGGAA GTGCGAGCCC A

21

<210> 10

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 该多肽 C 末端为酰胺(-CONH₂)形式

<400> 10

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1

5

10

15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20

25

30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35

40

45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50

54

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 该多肽 C 末端为酰胺(-CONH₂)形式

<400> 11

Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

10

15

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 该多肽 C 末端为酰胺 (-CONH₂) 形式

<400> 12

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 该多肽 C 末端为酰胺 (-CONH₂) 形式

<400> 13

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 9

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 该多肽 C 末端为酰胺 (-CONH₂) 形式

<400> 14

Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 8

<210> 15

<211> 162

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 15

GGGACCTCGC TGTCCCCGCC CCCCAGAGC TCCGGGAGCC GCCAGCAGCC GGGCCTGTCC 60

GGCCCCACA GCGCCAGAT CCCCACACC CAGGGCGCGG TGCTGGTGCA GCGGGAGAAG 120

GACCTGCCGA ACTACAACTG GAACTCCTTC GGCCTGCGCT TC 162

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 16

AAGGACCTGC CGAACTACAA CTGGAATCC TTCGGCCTGC GCTTC 45

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 17

TACAACTGGA ACTCCTTCGG CCTGCGCTTC 30

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 18

AACTGGAAT CCTTCGGCCT GCGCTTC 27

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 19

TGGAATCCT TCGGCCTGCG CTTC 24

<210> 20

<211> 145

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Met Asn Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu Phe Leu Cys Ala Thr

1 5 10 15

His Phe Gly Glu Pro Leu Glu Lys Val Ala Ser Val Gly Asn Ser Arg

20 25 30

Pro Thr Gly Gln Gln Leu Glu Ser Leu Gly Leu Leu Ala Pro Gly Glu

35 40 45

Gln Ser Leu Pro Cys Thr Glu Arg Lys Pro Ala Ala Thr Ala Arg Leu

50 55 60

Ser Arg Arg Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser

65 70 75 80

Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala

85 90 95

Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr

100 105 110

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro

115 120 125

Gly Asn His Gly Arg Ser Ala Gly Arg Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly

130 135 140

Gln

145

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 该多肽 C 末端为酰胺 (-CONH₂) 形式

<400> 21

Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 7

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 22

AACTCCTTCG GCCTGCGCTT C

21

说 明 书 附 图

10	20	30	40	50	60
ATG GCC GCA GAG GCG ACG TTG GGT CCG AAC GTG AGC TGG TGG GCT CCG TCC AAC GCT TCG					
Met Ala Ala Glu Ala Thr Leu Gly Pro Asn Val Ser Trp Trp Ala Pro Ser Asn Ala Ser					
70	80	90	100	110	120
GGA TGC CCG GGC TGC GGT GTC AAT GCC TCG GAT GGC CCA GGC TCC GCG CCA AGG CCC CTG					
Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Gly Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu					
130	140	150	160	170	180
GAT GCC TGG CTG GTG CCC CTG TTT TTC GCT GCC CTA ATG TTG CTG GGG CTA GTC GGG AAC					
Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn					
190	200	210	220	230	240
TCA CTG GTC ATC TTC GTT ATC TGC CGC CAC AAG CAC ATG CAG ACC GTC ACC AAT TTC TAC					
Ser Leu Val Ile Phe Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr					
250	260	270	280	290	300
ATC GCT AAC CTG GCG GCC ACA GAT GTC ACT TTC CTT CTG TGC TGC GTA CCC TTC ACC GCG					
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val Pro Phe Thr Ala					
310	320	330	340	350	360
CTC CTC TAT CCG CTG CCC ACC TGG GTG CTG GGA GAC TTC ATG TGC AAA TTC GTC AAC TAC					
Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Asp Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr					
370	380	390	400	410	420
ATC CAG CAG GTC TCG GTG CAA GCC ACA TGT GCC ACT TTG ACA GCC ATG AGT GTG GAC CGC					
Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg					

图 1

430	440	450	460	470	480
TGG TAC GTG ACT GTG TTC CCG CTG CGT GCA CTT CAC CGC CGC ACT CCG CGC CTG GCC CTG					
Trp Tyr Val Thr Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu					
490	500	510	520	530	540
ACT GTC AGC CTT AGC ATC TGG GTG GGT TCC GCA GCT GTT TCC GCC CCG GTG CTG GCT CTG					
Thr Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro Val Leu Ala Leu					
550	560	570	580	590	600
CAC CGC CTG TCG CCC GGG CCT CAC ACC TAC TGC AGT GAG GCG TTT CCC AGC CGT GCC CTG					
His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu					
610	620	630	640	650	660
GAG CGC GCT TTC GCG CTC TAC AAC CTG CTG GCC CTA TAC CTG CTG CCG CTG CTC GCC ACC					
Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr					
670	680	690	700	710	720
TGC GCC TGC TAC GGT GCC ATG CTG CGC CAC CTG GGC CGC GCC GCT GTA CGC CCC GCA CCC					
Cys Ala Cys Tyr Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro					
730	740	750	760	770	780
ACT GAT GGC GCC CTG CAG GGG CAG CTG CTA GCA CAG CGC GCT GGA GCA GTG CGC ACC AAG					
Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala Val Arg Thr Lys					
790	800	810	820	830	840
GTC TCC CGG CTG GTG GCC GCT GTC GTC CTG CTC TTC GCC GCC TGC TGG GGC CCG ATC CAG					
Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln					
850	860	870	880	890	900
CTG TTC CTG GTG CTT CAA GCC CTG GGC CCC TCG GGG GCC TGG CAC CCT CGA AGC TAT GCC					
Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala					

图 2

01.04.27

910	920	930	940	950	960
GCC TAC GCG CTC AAG ATC TGG GCT CAC TGC ATG TCC TAC AGC AAT TCT GCG CTC AAC CCG					
Ala Tyr Ala Leu Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro					
970	980	990	1000	1010	1020
CTG CTC TAT GCC TTC CTG GGT TCC CAC TTC AGA CAG GCC TTC TGC CGC GTG TGC CCC TGC					
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg Val Cys Pro Cys					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GGC CCG CAA CGC CAG CGT CGG CCC CAC GCG TCA GCG CAC TCG GAC CGA GCC GCA CCC CAT					
Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AGT GTG CCG CAC AGC CGG GCT GCG CAC CCT GTC CGG GTC AGG ACC CCC GAG CCT GGG AAC					
Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CCT GTG GTG CGC TCG CCC TCT GTT CAG GAT GAA CAC ACT GCC CCA CTC TGA					
Pro Val Val Arg Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu ***					

图 3

01.04.27

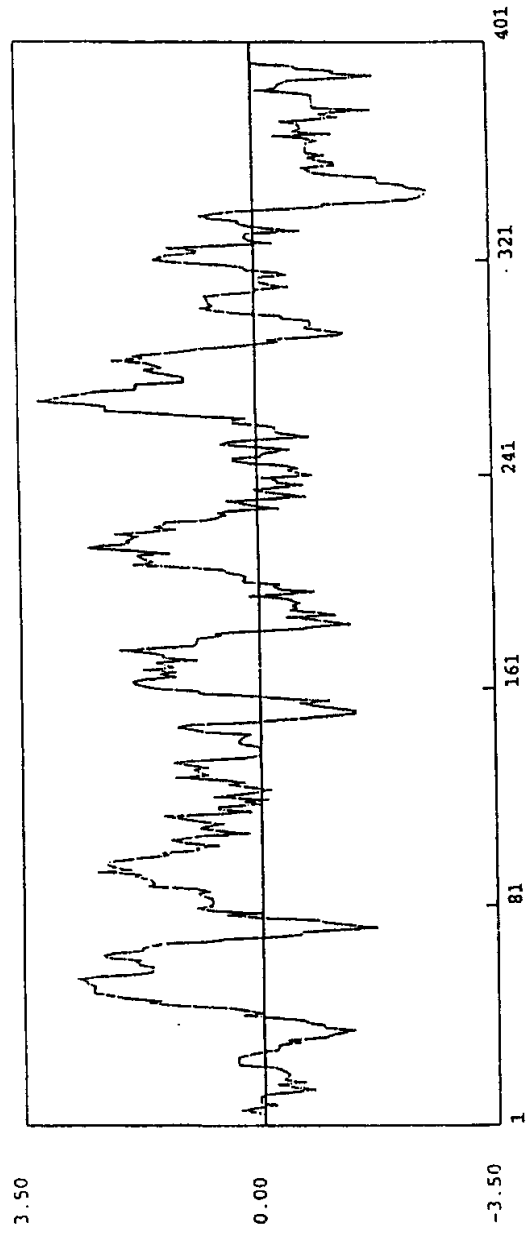


图 4

01.04.27

10	20	30	40	50	60
ATGCACACCG	TGGCTACGTC	CGGACCCAAC	GCGTCCTGGG	GGGCACCGGC	CAACGCCTCC
METHisThrV	alAlaThrSe	rGlyProAsn	AlaSerTrpG	lyAlaProAl	aAsnAlaSer
70	80	90	100	110	120
GGCTGCCCCG	GCTGTGGCGC	CAACGCCTCG	GACGGCCCAG	TCCCTTCGCC	GCGGGCCGTG
GlyCysProG	lyCysGlyAl	aAsnAlaSer	AspGlyProV	alProSerPr	oArgAlaVal
130	140	150	160	170	180
GACGCCTGGC	TCGTGCCGCT	CTTCTTCGCG	GCGCTGATGC	TGCTGGGCCT	GGTGGGGAAC
AspAlaTrpL	euValProLe	uPhePheAla	AlaLeuMETL	euLeuGlyLe	uValGlyAsn
190	200	210	220	230	240
TCGCTGGTCA	TCTACGTCAT	CTGCCGCCAC	AAGCCGATGC	GGACCGTGAC	CAACTTCTAC
SerLeuValI	leTyrValII	eCysArgHis	LysProMETA	rgThrValTh	rAsnPheTyr
250	260	270	280	290	300
ATGCCCAACC	TGGCGGCCAC	GGACGTGACC	TTCCTCCTGT	GCTGCGTCCC	CTTCACGGCC
IleAlaAsnL	euAlaAlaTh	rAspValThr	PheLeuLeuC	ysCysValPr	oPheThrAla
310	320	330	340	350	360
CTGCTGTACC	CGCTGCCCGG	CTGGGTGCTG	GGCGACTTCA	TGTGCAAGTT	CGTCAACTAC
LeuLeuTyrP	roLeuProGl	yTrpValLeu	GlyAspPheM	ETCysLysPh	eValAsnTyr
370	380	390	400	410	420
ATCCAGCAGG	TCTCGGTGCA	GGCCACGTGT	GCCACTCTGA	CCGCCATGAG	TGTGGACCGC
IleGlnGlnV	alSerValGI	nAlaThrCys	AlaThrLeuT	hrAlaMETSe	rValAspArg

图 5

01.04.27

430	440	450	460	470	480
TGGTACGTGA	CGGTGTTCCC	GTTGCGCGCC	CTGCACCGCC	GCACGCCCCG	CCTGGCGCTG
TrpTyrValT	hrValPhePr	oLeuArgAla	LeuHisArgA	rgThrProAr	gLeuAlaLeu
490	500	510	520	530	540
GCTGTCAGCC	TCAGCATCTG	GGTAGGCTCT	GCGGCGGTGT	CTGCGCCGGT	GCTCGCCCTG
AlaValSerL	euSerIleTr	pValGlySer	AlaAlaValS	erAlaProVa	lLeuAlaLeu
550	560	570	580	590	600
CACCGCCTGT	CACCCGGGCC	GCGCGCCTAC	TGCAGTGAGG	CCTTCCCCAG	CCGCGCCCTG
HisArgLeuS	erProGlyPr	oArgAlaTyr	CysSerGluA	laPheProSe	rArgAlaLeu
610	620	630	640	650	660
GAGCGCGCCT	TCGCACTGTA	CAACCTGCTG	GCGCTGTACC	TGCTGCCGCT	GCTCGCCACC
GluArgAlaP	heAlaLeuTy	rAsnLeuLeu	AlaLeuTyrL	euLeuProLe	uLeuAlaThr
670	680	690	700	710	720
TGCGCCTGCT	ATGCGGCCAT	GCTGCGCCAC	CTGGGCGGGG	TCGCCGTGCG	CCCCGCGCCC
CysAlaCysT	yrAlaAlaME	TLeuArgHis	LeuGlyArgV	alAlaValAr	gProAlaPro
730	740	750	760	770	780
GCCGATAGCG	CCCTGCAGGG	GCAGGTGCTG	GCAGAGCGCG	CAGGCGCCGT	GCGGGCCAAG
AlaAspSerA	laLeuGlnGl	yGlnValLeu	AlaGluArgA	laGlyAlaVa	lArgAlaLys

图 6


```

      790      800      810      820      830      840
GTCTCGCGGC TGGTGGCGGC CGTGGTCCTG CTCTTCGCGC CCTGCTGGGG CCCCATCCAG
ValSerArgL euValAlaAl aValValLeu LeuPheAlaA laCysTrpGl yProIleGln

      850      860      870      880      890      900
CTGTTCTGGG TGCTGCAGGC GCTGGGCCCC GCGGGCTCCT GGCACCCACG CAGCTACGCC
LeuPheLeuV alLeuGlnAl aLeuGlyPro AlaGlySerT rpHisProAr gSerTyrAla

      910      920      930      940      950      960
GCCTACGCGC TTAAGACCTG GGCTCACTGC ATGTCCTACA GCAACTCCGC GCTGAACCCG
AlaTyrAlaL euLysThrTr pAlaHisCys METSerTyrS erAsnSerAl aLeuAsnPro

      970      980      990      1000      1010      1020
CTGCTCTACG CCTTCCTGGG CTCGCACCTC CGACAGGCCT TCCGCCGCGT CTGCCCCTGC
LeuLeuTyrA laPheLeuGl ySerHisPhe ArgGlnAlaP heArgArgVa lCysProCys

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
GCGCCGCGCC GCGCCCGCGG CCGCCGCGCG CCGGACCCTT CCGACCCCGC AGCCCCACAC
AlaProArgA rgProArgAr gProArgArg ProGlyProS erAspProAl aAlaProHis

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
GCGGAGCTGC ACCGCCTGGG GTCCCACCCG GCGCCCGCCA GGGCGCAGAA GCCAGGGAGC
AlaGluLeuH isArgLeuGl ySerHisPro AlaProAlaA rgAlaGlnLy sProGlySer

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
AGTGGGCTGG CCGCGCGCGG GCTGTGCGTC CTGGGGGAGG ACAACGCCCC TCTCTGA
SerGlyLeuA laAlaArgGl yLeuCysVal LeuGlyGluA spAsnAlaPr oLeu***

```

图 7

0104.37

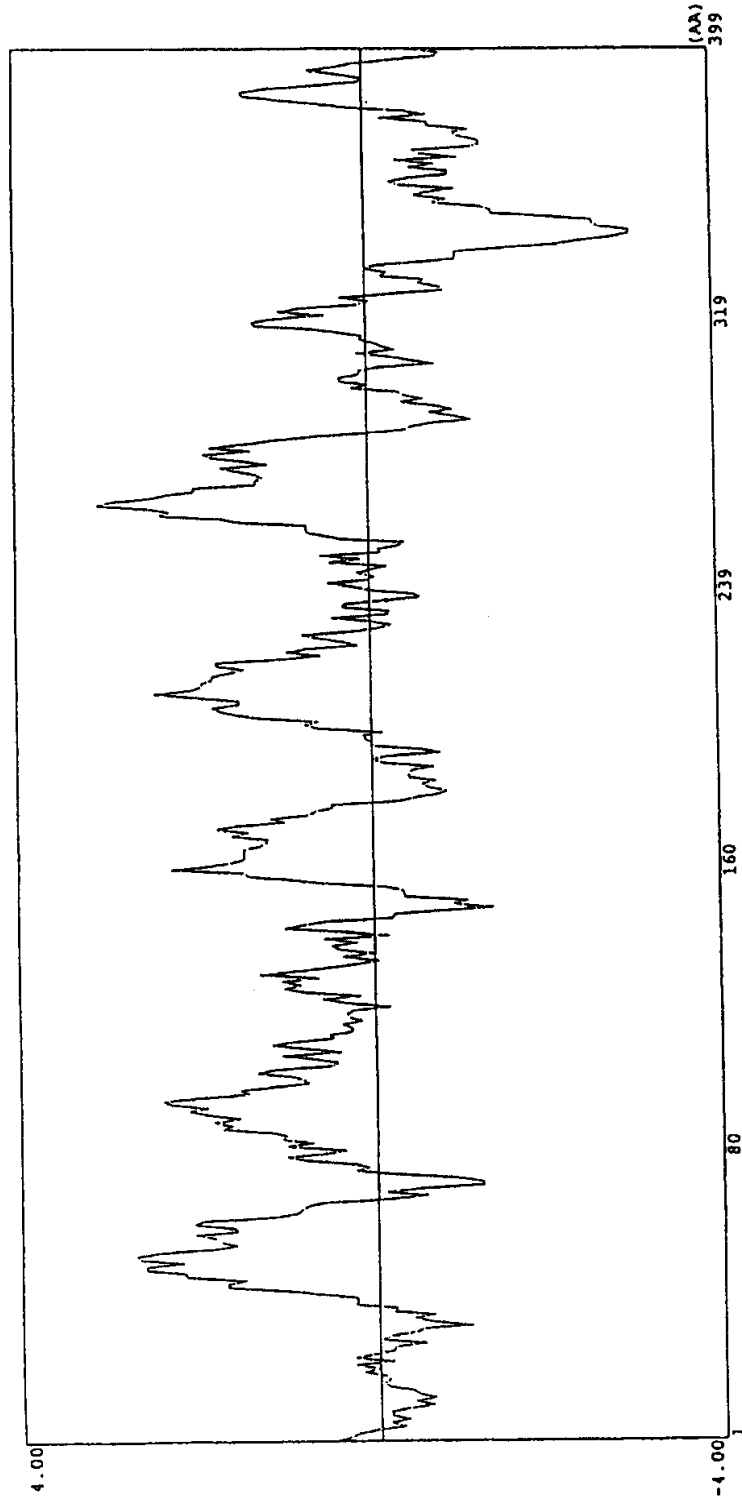


图 8

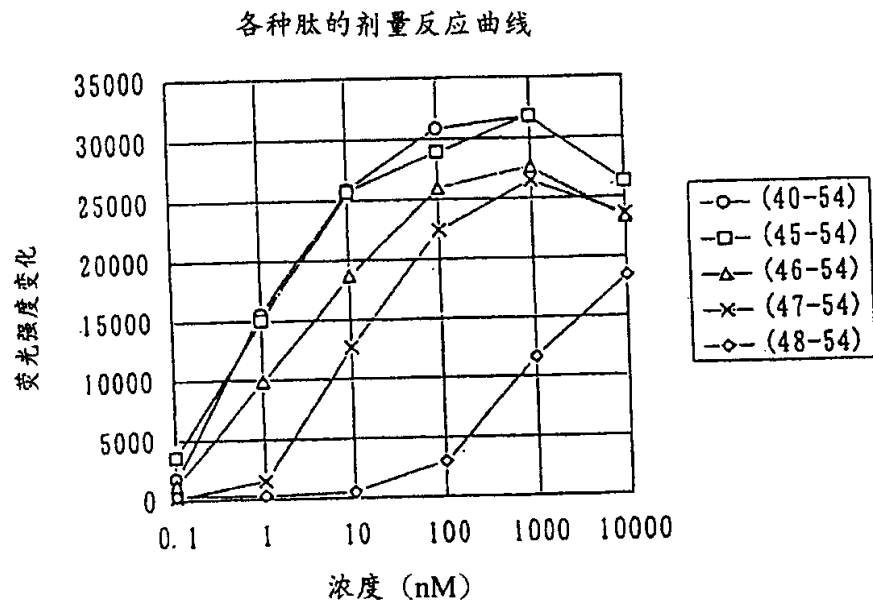


图 9