

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/12
C07K 14/705



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01822271.4

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1549858A

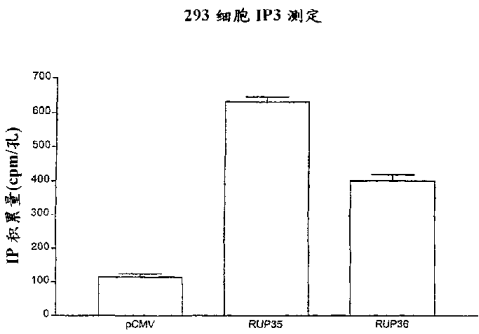
[22] 申请日 2001.11.26 [21] 申请号 01822271.4
[30] 优先权
[32] 2000.11.27 [33] US [31] 60/253,404
[32] 2000.12.12 [33] US [31] 60/255,366
[32] 2001.2.20 [33] US [31] 60/270,266
[32] 2001.2.20 [33] US [31] 60/270,286
[32] 2001.4.6 [33] US [31] 60/282,032
[32] 2001.4.6 [33] US [31] 60/282,356
[32] 2001.4.6 [33] US [31] 60/282,358
[32] 2001.4.6 [33] US [31] 60/282,365
[32] 2001.5.14 [33] US [31] 60/290,917
[32] 2001.7.31 [33] US [31] 60/309,208
[86] 国际申请 PCT/US2001/044386 2001.11.26
[87] 国际公布 WO2002/042461 英 2002.5.30
[85] 进入国家阶段日期 2003.7.25

[71] 申请人 阿伦纳药品公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 R·陈 Z·L·楚 H·T·当
K·P·罗维茨 C·普里德
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 玟

权利要求书 3 页 说明书 47 页 序列表 34 页
附图 1 页

[54] 发明名称 内源和非内源型人 G 蛋白偶联受体
[57] 摘要

本发明在本专利文件中涉及跨膜受体,更具体地说涉及未知其内源配体的人 G 蛋白偶联受体,以及表现组成型活性的所述人 GPCR 的突变(非内源)形式。



1. 一种 G 蛋白偶联受体, 所述受体由 SEQ.ID.NO.:2 的氨基酸序列编码。
- 5 2. 权利要求 1 的 G 蛋白偶联受体, 所述受体为非内源组成活化型受体。
3. 一种质粒, 所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:1 的 cDNA。
4. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含权利要求 3 的质粒。
- 10 5. 一种 G 蛋白偶联受体, 所述受体由 SEQ.ID.NO.:4 的氨基酸序列编码。
6. 权利要求 5 的 G 蛋白偶联受体, 所述受体为非内源组成活化型受体。
7. 一种质粒, 所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:3 的 cDNA。
- 15 8. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含权利要求 7 的质粒。
9. 一种 G 蛋白偶联受体, 所述受体由 SEQ.ID.NO.:6 的氨基酸序列编码。
10. 权利要求 9 的 G 蛋白偶联受体, 所述受体为非内源组成活化
- 20 型受体。
11. 一种质粒, 所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:5 的 cDNA。
12. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含权利要求 11 的质粒。
13. 一种 G 蛋白偶联受体, 所述受体由 SEQ.ID.NO.:8 的氨基酸
- 25 序列编码。
14. 权利要求 13 的 G 蛋白偶联受体, 所述受体为非内源组成活化型受体。
15. 一种质粒, 所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:7 的

cDNA。

16. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 15 的质粒。

17. 一种 G 蛋白偶联受体，所述受体由 SEQ.ID.NO.:10 的氨基酸序列编码。

5 18. 权利要求 17 的 G 蛋白偶联受体，所述受体为非内源组成活化型受体。

19. 一种质粒，所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:9 的 cDNA。

20. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 19 的质粒。

10 21. 一种 G 蛋白偶联受体，所述受体由 SEQ.ID.NO.:12 的氨基酸序列编码。

22. 权利要求 21 的 G 蛋白偶联受体，所述受体为非内源组成活化型受体。

15 23. 一种质粒，所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:11 的 cDNA。

24. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 23 的质粒。

25. 一种 G 蛋白偶联受体，所述受体由 SEQ.ID.NO.:14 的氨基酸序列编码。

20 26. 权利要求 25 的 G 蛋白偶联受体，所述受体为非内源组成活化型受体。

27. 一种质粒，所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:13 的 cDNA。

28. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 27 的质粒。

25 29. 一种 G 蛋白偶联受体，所述受体由 SEQ.ID.NO.:16 的氨基酸序列编码。

30. 权利要求 29 的 G 蛋白偶联受体，所述受体为非内源组成活化型受体。

31. 一种质粒，所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:15 的

cDNA。

32. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 31 的质粒。

33. 一种 G 蛋白偶联受体，所述受体由 SEQ.ID.NO.:18 的氨基酸序列编码。

5 34. 权利要求 33 的 G 蛋白偶联受体，所述受体为非内源组成活化型受体。

35. 一种质粒，所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:17 的 cDNA。

36. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 35 的质粒。

10 37. 一种 G 蛋白偶联受体，所述受体由 SEQ.ID.NO.:20 的氨基酸序列编码。

38. 权利要求 37 的 G 蛋白偶联受体，所述受体为非内源组成活化型受体。

15 39. 一种质粒，所述质粒包含一种载体以及 SEQ.ID.NO.:19 的 cDNA。

40. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 39 的质粒。

内源和非内源型人 G 蛋白偶联受体

5 相关申请的交叉引用

本申请是 1998 年 10 月 13 日在美国专利和商标局申请的美国序列号 09/170,496 的部分继续申请, 美国序列号 09/170,496 的对应 PCT 申请号 PCT/US99/23938 在 2000 年 4 月 20 日公开, 公开号为 WO 00/22129。本文件要求下面所有这些通过美国 Express Mail 于指定日期在美国专利和商标局申请的临时申请的优先权: 2000 年 11 月 27 日申请的美国临时序号 60/253,404; 2000 年 12 月 12 日申请的美国临时序号 60/255,366; 2001 年 2 月 20 日申请的美国临时序号 60/270,286; 2001 年 4 月 6 日申请的美国临时序号 60/282,356, 该申请要求 2001 年 2 月 20 日申请的美国临时申请 60/270,266 的优先权; 2001 年 4 月 6 日申请的美国临时序号 60/282,032; 2001 年 4 月 6 日申请的美国临时序号 60/282,358; 2001 年 4 月 6 日申请的美国临时序号 60/282,365; 2001 年 5 月 14 日申请的美国临时序号 60/290,917; 2001 年 7 月 31 日申请的美国临时序号 60/309,208; 所有这些临时申请的公开内容都通过引用完整地结合到本文中。

20 发明领域

本发明涉及跨膜受体, 在一些实施方案中涉及 G 蛋白偶联受体, 在一些优选实施方案中涉及受到改变以建立或增强所述受体的组成型活性的内源 GPCR。在一些实施方案中, 使用组成型活化的 GPCR 直接鉴定候选化合物中具有治疗剂应用性的受体激动剂或反激动剂 (inverse agonist)。

发明背景

虽然人体内存在许多受体家族，但目前最丰富并且与治疗最相关的是 G 蛋白偶联受体(GPCR)家族。据估计，人类基因组中有约 30,000-40,000 个基因，估计其中约 2%编码 GPCR。已经鉴定其内源配体的受体(包括 GPCR)称为“已知”受体，而未鉴定内源配体的受体称为“孤独”受体。

GPCR 是发展医药产品的重要领域：从 100 种已知 GPCR 中的约 20 种发展出全部处方药中约 60%的药品。例如，在 1999 年，在头 100 个品牌的处方药中，下面药物与 GPCR 相互作用(圆括号内指所治疗的疾病和/或紊乱)：

Claritin® (变态反应)	Prozac® (抑郁)	Vasotec® (高血压)
Paxil® (抑郁)	Zoloft® (抑郁)	Zyprexa® (精神病)
Cozaar® (高血压)	Imitrex® (偏头痛)	Zantac® (反流)
Propulsid® (反流病)	Risperdal® (精神分裂症)	Serevent® (哮喘)
Pepcid® (反流)	Gaster® (溃疡)	Atrovent® (支气管痉挛)
Effexor® (抑郁)	Depakote® (癫痫)	Cardura® (前列腺肥大)
Allegra® (变态反应)	Lupron® (前列腺癌)	Zoladex® (前列腺癌)
Diprivan® (感觉缺失)	BuSpar® (焦虑)	Ventolin® (支气管痉挛)
Hytrin® (高血压)	Wellbutrin® (抑郁)	Zyrtec® (鼻炎)
Plavix® (MI/中风)	Toprol-XL® (高血压)	Tenormin® (咽峡炎)
Xalatan® (青光眼)	Singulair® (哮喘)	Diovan® (高血压)
Harnal® (前列腺增生)		

(Med Ad News 1999 年数据)。

GPCR 共同具有一个共有结构基序, 该基序包含七个由 22 到 24 个疏水氨基酸组成的序列, 这七个序列形成七个 α 螺旋, 每个 α 螺旋都跨膜(用数字标示跨膜数, 即跨膜-1 (TM-1)、跨膜-2 (TM-2)等)。所述跨膜螺旋由细胞膜外面或“外侧”的在跨膜-2 和跨膜-3、跨膜-4 和跨膜-5、以及跨膜-6 和跨膜-7 之间的氨基酸链连接(这些氨基酸链分别称为“胞外”区 1、2 和 3 (EC-1、EC-2 和 EC-3))。所述跨膜螺旋也由细胞膜里面或“内侧”的在跨膜-1 和跨膜-2、跨膜-3 和跨膜-4、以及跨膜-5 和跨膜-6 之间的氨基酸链连接(这些氨基酸链分别称为“胞内”区 1、2 和 3 (IC-1、IC-2 和 IC-3))。所述受体的“羧基”(“C”)末端在细胞内的胞内间隙, 所述受体的“氨基”(“N”)末端在细胞外的胞外间隙。

一般地说, 当内源配体结合所述受体时(通常称为所述受体的“活化”), 在胞内区发生构象改变, 允许在所述胞内区和胞内“G-蛋白”间发生偶联。据报道, GPCR 与 G 蛋白是“滥交的”, 即 GPCR 能够与一种以上的 G 蛋白相互作用。见 Kenakin, T., 43 *Life Sciences* 1095 (1988)。虽然存在其它 G 蛋白, 但目前已经鉴定的 G 蛋白是 G_q 、 G_s 、 G_i 、 G_z 和 G_o 。与 G 蛋白偶联的配体活化的 GPCR 起始信号级联过程(称为“信号转导”)。在正常条件下, 信号转导最终导致细胞活化或细胞抑制。虽然不希望受到理论的限制, 但认为 IC-3 回环以及所述受体的羧基末端与所述 G 蛋白相互作用。

在生理条件下, GPCR 存在于细胞膜上, 处于两种不同构象间的平衡: “失活”状态和“活性”状态。失活状态的受体不能进入信号转导途径以起始导致生物学反应的信号转导。改变所述受体构象到活性状态使得能够进入转导途径(通过 G 蛋白)并产生生物学反应。

可以通过配体或化合物如药物将受体稳定于活性状态。最近的发现提供了除配体或药物以外促进和稳定所述受体于活性构象的方

法，所述最近的发现包括但不只限于修饰所述受体的氨基酸序列。这些方法通过刺激配体结合所述受体的效应，有效稳定所述受体于活性状态。通过所述独立于配体的方式获得的稳定称为“组成型受体活化”。

5

发明简述

本文公开入 GPCR 的内源形式和非内源形式以及它们的应用。

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:2 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

10

本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:1 的 cDNA 的质粒，以及包含所述质粒的宿主细胞。

15

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:4 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:3 的 cDNA 的质粒、所述质粒的非内源组成型活化形式、以及包含它们的宿主细胞。

20

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:6 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:5 的 cDNA 的质粒，以及包含所述质粒的宿主细胞。

25

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:8 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:7 的 cDNA 的质粒、所述质粒的非内源组成型活化形式、以及包含它们的

宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:10 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

- 5 本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:9 的 cDNA 的质粒，以及包含所述质粒的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:12 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

- 10 本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:11 的 cDNA 的质粒，以及包含所述质粒的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:14 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

- 15 本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:13 的 cDNA 的质粒，以及包含所述质粒的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:16 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

- 20 本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:15 的 cDNA 的质粒，以及包含所述质粒的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:18 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含它们的宿主细胞。

- 25 本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:17 的 cDNA 的质粒，以及包含所述质粒的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及由 SEQ.ID.NO.:20 的氨基酸序列编码的 G 蛋白偶联受体、所述受体的非内源组成型活化形式以及包含

它们的宿主细胞。

本发明的一些实施方案涉及包含载体以及 SEQ.ID.NO.:19 的 cDNA 的质粒, 以及包含所述质粒的宿主细胞。

5 附图简述

图 1 图示使用 293 细胞在测量肌醇磷酸(IP₃)积累的第二信使测定中, RUP32、G_q(del)/G_i 与 G_q(del)/G_i 共转染的 RUP32 以及 CMV (对照; 表达载体)的活化。

10 图 2 图示内源形式 RUP35 和 RUP36 与对照(“CMV”)相比引起的第二信使 IP₃ 产生。

发明详述

围绕受体发展的科学文献已经应用许多术语来命名对受体有各种效应的配体。为清楚和一致性, 在整个本专利文件中将使用下面定义。当这些定义与这些术语的其它定义矛盾时, 以下面定义为准:

15 **激动剂**应当指这样的物质(如配体、候选化合物): 当所述物质结合受体时, 活化细胞内反应或增加 GTP 与膜结合。在一些实施方案中, 激动剂是那些以前未知当结合受体时活化细胞内反应或增加 GTP 结合膜的物质。

20 本文使用的**氨基酸缩写**在表 A 中陈述:

表 A

丙氨酸	ALA	A
精氨酸	ARG	R
天冬酰胺	ASN	N
天冬氨酸	ASP	D
半胱氨酸	CYS	C
谷氨酸	GLU	E
谷氨酰胺	GLN	Q
甘氨酸	GLY	G
组氨酸	HIS	H
异亮氨酸	ILE	I
亮氨酸	LEU	L
赖氨酸	LYS	K
甲硫氨酸	MET	M
苯丙氨酸	PHE	F
脯氨酸	PRO	P
丝氨酸	SER	S
苏氨酸	THR	T
色氨酸	TRP	W
酪氨酸	TYR	Y
缬氨酸	VAL	V

拮抗剂应当指这样的物质(如配体、候选化合物): 所述物质与激动剂竞争结合受体的同一位点, 但不活化所述受体的活性形式所起始的细胞内反应, 因此能够抑制激动剂的细胞内反应。拮抗剂不减少在缺乏激动剂时的基础细胞内反应。在一些实施方案中, 拮抗剂是那些以前未知当结合受体时活化细胞内反应或增加 GTP 结合膜的物质。

候选化合物应当指应用筛选技术进行筛选的分子(例如但不限于化合物)。优选词组“候选化合物”不包括公众已知的选自以下的化合物：以前根据间接鉴定方法确定的受体的反激动剂、激动剂或拮抗剂(“间接鉴定的化合物”)；更优选不包括以前已经确定在至少一种哺乳动物中具有治疗功效的间接鉴定的化合物；最优选不包括以前已经确定在人体内有治疗应用的间接鉴定的化合物。

组合物指包括至少一种成份的物质；“药用组合物”是组合物的一个例子。

化合物功效应当指与受体结合亲和力相比，化合物抑制或刺激受体功能的能力(即活化/抑制信号转导途径)的度量。检测化合物功效的示例性方法在本专利文件的实施例部分公开。

密码子应当指三个核苷酸(或核苷酸的等同物)的组合，所述核苷酸一般包括与磷酸基团偶联的核苷(腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)和胸苷(T))，所述核苷酸的组合在翻译时编码一个氨基酸。

组成型活化的受体应当指受到组成型受体活化作用的受体。组成型活化的受体可以是内源或非内源的。

组成型受体活化应当指稳定所述受体于活性状态，所述稳定使用除以下方法以外的方法完成：受体与配体或其化学等同物结合。

接触应当指不论在体外系统或体内系统中，使至少两个部分接近。

直接鉴定或直接鉴定的就词组“候选化合物”而言，应当指针对组成型活化的受体筛选候选化合物并评价所述化合物的功效，所述组成型活化的受体优选是组成型活化的孤独受体，最优选是组成型活化的 G 蛋白偶联细胞表面孤独受体。该词组在任何情况下都不应解释或理解为包括或包括于词组“间接鉴定”或“间接鉴定的”。

内源应当指哺乳动物天然产生的物质。内源就例如但不限于术语“受体”而言，应当指由哺乳动物(例如但不限于人)或病毒天然生产。与此不同，本文中的**非内源**应当指不是由哺乳动物(例如但不限

于人)或病毒天然生产。例如但不限于此实例,当一种受体处于内源形式时并非组成型有活性,但经过操作后成为组成型有活性的受体,则所述受体最优选在本文中称为“非内源组成型活化的受体”。这两个术语都可以用于描述“体内”和“体外”系统。例如但不限于此实例,在筛选方法中,内源或非内源的受体可以指体外筛选系统。作为另一个例子但不限于此实例,当已经操作哺乳动物的基因组以包括非内源组成型活化的受体时,通过体内系统筛选候选化合物是可行的。

G 蛋白偶联受体融合蛋白和 GPCR 融合蛋白在本文公开的上下文中,都指非内源蛋白,所述非内源蛋白包括与至少一种 G 蛋白、最好所述 G 蛋白的 α 亚单位(该亚单位是结合 GTP 的亚单位)融合的内源组成型活化的 GPCR 或非内源组成型活化的 GPCR,所述 G 蛋白最好与天然偶联所述内源孤独 GPCR 的 G 蛋白同一类型。例如但不限于此实例,在内源状态,假如 G 蛋白“G_s α ”是与 GPCR 偶联的主要 G 蛋白,那么基于特定 GPCR 的 GPCR 融合蛋白是包含与 G_s α 融合的 GPCR 的非内源蛋白;在一些情况下,如下文陈述,可以将非主要 G 蛋白与所述 GPCR 融合。所述 G 蛋白可以直接与所述组成型活化 GPCR 融合,或者在二者之间有间隔区。

宿主细胞应当指能够在其中加入质粒和/或载体的细胞。在原核宿主细胞的情况下,质粒通常在宿主细胞复制时作为自主分子复制(一般随后分离所述质粒以引入真核宿主细胞);在真核宿主细胞的情况下,将质粒整合进所述宿主细胞的细胞 DNA,以便当所述真核宿主细胞复制时,所述质粒复制。在一些实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞,更优选是哺乳动物细胞,最优选选自 293、293T 和 COS-7 细胞。

间接鉴定或间接鉴定的指药物发现过程的传统方法,所述传统方法涉及鉴定特异性针对内源受体的内源配体,针对所述受体筛选候选化合物以确定那些干扰和/或竞争所述配体-受体相互作用的化合

物，以及评价所述化合物影响与所述活化受体有关的至少一种第二信使途径的功效。

抑制就术语“反应”而言，应当指与不存在化合物的情况相比，所述化合物的存在降低或预防反应。

5 **反激动剂**应当指这样的物质(如配体、候选化合物)：所述化合物结合所述受体的内源形式或所述受体的组成型活化形式，并抑制由所述受体的活化形式起始的基础细胞内反应，使其降到在不存在激动剂的情况下所观察到的正常基础活性水平以下，或者减少 GTP 结合膜。优选与不存在所述反激动剂的情况下的基础反应相比，存在
10 所述反激动剂抑制所述基础细胞内反应至少 30%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 92%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、最优选至少 99%。

15 **已知受体**应当指这样的内源受体：已经鉴定特异性针对所述受体的内源配体。

配体应当指特异性针对天然受体的分子。

突变的或**突变**就内源受体的核酸序列和/或氨基酸序列而言，应当指对所述内源序列作出的特定一个改变或多个改变，以便所述内源非组成型活化的受体表现所述受体的组成型活化。就特定序列的
20 等同物而言，在以下情况下人受体的随后突变形式被认为是所述人受体第一个突变的等同物：(a)人受体的随后突变形式的组成型活化水平基本与所述受体第一个突变表现的水平相同；和(b)所述受体的随后突变形式与所述受体的第一个突变之间的序列(氨基酸和/或核酸)
25 同一性百分率是至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 92%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%和最优选至少 99%。
在一些实施方案中，考虑到本文公开的用于获得组成型活化的一些优选盒在所述 GPCR 的内源形式和非内源形式之间包括单氨基酸和/或密码子改变，优选序列同一性百分率应当至少 98%。

非孤独受体应当指特异性针对已鉴定配体的内源天然分子，其中配体与受体的结合活化细胞内信号途径。

孤独受体应当指这样的内源受体：未鉴定特异性针对所述受体的内源配体，或者所述配体是未知的。

- 5 **药用组合物**应当指包括至少一种活性成份的组合物，因此组合物适合在哺乳动物(例如但不限于人)中研究特定有效效果。本领域一般技术人员能够理解和评价根据技术人员的需要适于检测活性成份是否具有所需要的效果的技术。

10 **质粒**应当指载体和 cDNA 的组合。一般地说，将质粒引入宿主细胞以便复制所述 cDNA 和/或表达所述 cDNA 成为蛋白。

15 **第二信使**应当指作为受体活化结果而产生的细胞内反应。第二信使可以包括，例如，肌醇三磷酸(IP₃)、二酰甘油(DAG)、环状 AMP (cAMP)和环状 GMP (cGMP)。可以测量第二信使反应以确定受体活化。此外，可以测量第二信使反应以直接鉴定候选化合物，所述候选化合物包括，例如，反激动剂、激动剂和拮抗剂。

20 **信噪比**应当指响应活化、增强或刺激而产生的信号，其中所述信号比在无活化、无增强或无刺激的情况下的背景噪音或基础水平强。

25 **间隔区**应当指位于基因(例如目的 GPCR)最后一个密码子或最后一个氨基酸之后、但在目的 G 蛋白起始密码子或开始区之前的翻译的数个氨基酸，其中所述翻译的数个氨基酸符合读框地置于所述目的 G 蛋白的开始区内。可以根据技术人员的需要定制所述翻译的氨基酸的数量，该数量一般从约一个氨基酸、优选二个氨基酸、更优选三个氨基酸、更优选四个氨基酸、更优选五个氨基酸、更优选六个氨基酸、更优选七个氨基酸、更优选八个氨基酸、更优选九个氨基酸、更优选十个氨基酸、更优选十一个氨基酸、甚至更优选十二个氨基酸。

刺激就术语“反应”而言，应当指与不存在化合物的情况相比，

所述化合物的存在增强反应。

实质上应当指结果在对照结果的 40%以内、优选 35%以内、更优选 30%以内、更优选 25%以内、更优选 20%以内、更优选 15%以内、更优选 10%以内、更优选 5%以内、更优选 2%以内、最优选 1%以内。例如，在受体功能性情况下，假如根据本文教导的方法或技术人员已知的相似方法测量，所转导的信号在对照信号产生的信号 40%以内，则测试受体可能表现与对照受体实质上相似的结果。

载体就 cDNA 而言，应当指能够在其中加入至少一种 cDNA 并且本身能够掺入宿主细胞的环状 DNA。

下面部分的顺序是为了陈述方便，不是并且不应解释为限制下面的公开内容或权利要求。

A. 介绍

受体的传统研究一般根据一个先验假设(基于历史)进行：必须首先鉴定内源配体，然后进一步发现可能影响所述受体的拮抗剂和其它分子。甚至在首先已知拮抗剂的情况下，研究也立即延伸到寻找内源配体。甚至在发现组成型活化的受体后，该思维模式仍然在受体研究中持续。因此，以前没有认识到的是受体的活性状态对于发现所述受体的激动剂和反激动剂是最有用的。对于那些由过度活性的受体或活性不足的受体引起的疾病，治疗药物的需要是分别减少受体活性状态或增强受体活性的化合物，而不一定是内源配体的拮抗剂药物。这是因为减少或增强活性受体状态活性的化合物不一定与内源配体结合同一位点。因此，根据本发明教导的方法，任何寻找治疗化合物的研究应当从筛选对独立于配体的活性状态的化合物开始。

B. 鉴定人 GPCR

人类基因组计划的实施已经鉴定位于人基因组内关于核酸序列

的过多信息；在该努力过程中，可以获得遗传序列信息而不理解或认识任何特定基因组序列是否包含或可能包含翻译成蛋白质的可读框信息。鉴定人基因组内核酸序列的几种方法在本领域内一般技术人员的能力范围内。例如但不限于此实例，本文公开的多种人 GPCR 是通过搜索 GenBank™数据库发现的。下面的表 B 列出我们已经发现的几种内源 GPCR，以及与所公开的 GPCR 同源的其它 GPCR。

表 B

公开的人 孤独 GPCR	鉴定的登记 号	可读框(碱基 对)	同源 GPCR 对照	与指定 GPCR 的同 一性百分率
hRUP28	AC073957	1,002 bp	hGPR30	34%
hRUP29	AC083865	918 bp	hGPR18	27%
hRUP30	AC055863	1,125 bp	hBRB1	27%
hRUP31	AL356214	1,086 bp	hGALR-1	31%
hRUP32	AL513524	1,038 bp	hPNR	43%
hRUP33	AL513524	1,020 bp	GPR57 GPR58	50% 51%
hRUP34	AL513524	1,029 bp	hPNR	45%
hRUP35	AC021089	1,062 bp	hκ-3 型阿片 样物质	27%
hRUP36	AC090099	969 bp	GPR90	42%
hRUP37	AC090099	969 bp	hMRG	41%

受体同一性用于获得所述受体在人体内作用的认识。随着本专利文件的进一步说明，将会讨论突变这些受体以建立这些受体的非内源组成型活化形式的技术。

本文公开的技术也可应用于本领域内已知的其它人 GPCR，这对于本领域内技术人员是显而易见的。

C. 筛选受体

针对本文公开的 GPCR 的非内源组成型活化形式筛选候选化合物允许直接鉴定作用于细胞表面受体的候选化合物，而不要求应用所述受体的内源配体。人们使用常规的通常商业化可得的技术，能够确定本文公开的人 GPCR 的所述内源形式在体内表达和/或过量表达的部位。受体表达定位于特定组织使科学家能够确定所述受体的生理功能。也有可能使用这些技术确定与所述受体的表达和/或过量表达有关的相关疾病/紊乱状态；本专利文件公开这样的方法。此外，受体在疾病器官中的表达能够帮助人们确定所述受体临床相关性的重要性。

本文公开的组成型表达的 GPCR 基于距假定位于 GPCR 的 TM6 内的脯氨酸残基的距离；该算法技术在共同未决及共同转让的专利文件 PCT 申请号 PCT/US99/23938 中公开，该专利文件在 2000 年 4 月 20 日作为 WO 00/22129 公开，与本文列出的其它专利文件一起通过引用结合到本文中。所述算法技术不基于传统的序列“排列对比”，而是基于距前述 TM6 脯氨酸残基的特定距离(当然，或者是所述脯氨酸残基的内源组成型取代)。通过突变从该残基(假设位于所述受体的 IC3 区)开始的位于 16 氨基酸残基的氨基酸残基到最优选赖氨酸残基，可以组成型活化所述受体。可以在该位点的突变中使用其它氨基酸残基以达到该目的，这将在下文详细讨论。

D. 鉴定和/或筛选疾病/紊乱

如下文所述，可以通过本发明的方法鉴定所述非内源组成型活化 GPCR 的反激动剂和激动剂。所述反激动剂和激动剂是用作前驱化合物的理想候选物，用于寻找治疗与该受体有关的疾病的药物发现程序。因为能够直接鉴定针对所述 GPCR 的反激动剂并因此允许发展药用组合物，相应地寻找与所述 GPCR 相关的疾病和紊乱。将受体表达定位于特定组织为科学家提供分配所述受体生理功能的能

力。例如，扫描疾病组织样品和正常组织样品中 GPCR 的存在目前不仅仅是学术运用，人们可以使用该方法鉴定针对特定 GPCR 的内源配体。可以对广泛范围的健康组织和疾病组织进行组织扫描。所述组织扫描为将特定受体与疾病和/或紊乱联系提供潜在的第一步。

5 此外，在疾病器官中表达受体能够帮助人们确定所述受体临床相关性的的重要性。

可以使用 GPCR 的 DNA 序列制造探针/引物。在一些优选实施方案中，使用所述 DNA 序列制造探针用于(a)针对组织 mRNA 进行斑点杂交分析，和/或(b)RT-PCR 鉴定所述受体在组织样品中的表达。

10 受体在源组织或疾病组织中的存在、或者所述受体在疾病组织中以比正常组织更高的浓度存在可以用于将定位与功能联系起来，指出所述受体的生理作用/功能，并创建治疗方法，用于治疗包括但不限于与所述功能/作用相关的疾病。用该技术也可以将受体定位于器官的区。根据所述受体定位的特定组织的已知或假定作用/功能，可以

15 推导所述受体的推定生理功能。例如但不限于此实例，在丘脑区域内定位/表达的蛋白与感觉运动处理和觉醒有关(见 Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版, 第465页(1996))。在海马或许旺细胞内表达的蛋白分别与学习和记忆以及外周神经的髓鞘形成有关(见 Kandel, E.等, Essentials of Neural Science and Behavior 分别在第 657、680 和 28 页(1995))。

20

E. 筛选候选化合物

1. GPCR 类筛选测定技术

当 G 蛋白受体组成型活化时，它结合 G 蛋白(如 G_q 、 G_s 、 G_i 、 G_z 、 G_o)并刺激 GTP 结合所述 G 蛋白。所述 G 蛋白随后作为 GTP 酶起作用，水解 GTP 成为 GDP，由此所述受体在正常条件下失活。然而，组成型活化的受体继续转化 GDP 成为 GTP。一种 GTP 的不可水解的类似物 [^{35}S]GTP γ S 可以用于监测表达组成型活化受体的膜的增强结

25

合。据报道, $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 可用于在配体存在和不存在的条件下监测 G 蛋白偶联膜。在其它众所周知并且本领域内技术人员使用的例子中, 该监测的一个例子由 Traynor 和 Nahorski 在 1995 年报道。该测定系统的应用一般是用于候选化合物的初步筛选, 因为该系统可普遍应用于所有 G 蛋白偶联受体, 包括与受体细胞内结构域相互作用的特定 G 蛋白。

2. 特异性 GPCR 筛选测定技术

一旦使用“类”G 蛋白偶联受体测定(用于选择成为激动剂或反激动剂的化合物的测定)鉴定候选化合物, 优选进行进一步的筛选, 确认所述化合物在所述受体位点有相互作用。例如, 通过所述“类”测定鉴定的化合物不一定结合所述受体, 但可能仅使所述 G 蛋白从所述细胞内域上“解偶联”。

a. G_s 、 G_z 和 G_i .

G_s 刺激腺苷酸环化酶。另一方面, G_i (以及 G_z 和 G_o) 抑制腺苷酸环化酶。腺苷酸环化酶催化 ATP 到 cAMP 的转化; 因此, 偶联 G_s 蛋白的组成型活化 GPCR 与 cAMP 细胞内水平增加有关。另一方面, 偶联 G_i (或 G_z 、 G_o) 蛋白的组成型活化 GPCR 与 cAMP 细胞内水平降低有关。一般可见, “突触传递的间接机制”, 第 8 章, From Neuron to Brain (第 3 版) Nichols, J.G. 等编辑, Sinauer Associates, Inc. (1992)。因此, 可以利用检测 cAMP 的测定确定候选化合物是否是例如所述受体的反激动剂(即所述化合物会降低 cAMP 的水平)。可以利用本领域内已知的测量 cAMP 的多种方法; 最优选的方法依赖于应用基于 ELISA 模式的抗 cAMP 抗体。可以利用的其它类型测定是全细胞第二信使报道系统测定。基因启动子驱动特定基因编码的蛋白的表达。环状 AMP 通过如下机制驱动基因表达: 环状 AMP 促进 cAMP 反应性 DNA 结合蛋白或转录因子(CREB)的结合, 所述 cAMP 反应性 DNA 结合蛋白或转录因子随后结合特定定位点的启动子(cAMP 反应元件)并驱动所述基因表达。可以构建报道系统, 所述报道系统在报道基因(如

β -半乳糖苷酶或萤光素酶)之前具有包含多个 cAMP 反应元件的启动子。因此,组成型活化 G_s 偶联的受体导致 cAMP 的积累,而 cAMP 的积累随后活化基因,导致所述报道基因的表达。随后使用标准生物化学测定(Chen 等 1995)检测报道蛋白如 β -半乳糖苷酶或萤光素酶。

5 **b. G_o 和 G_q .**

G_q 和 G_o 与磷脂酶 C 的活化有关,而磷脂酶 C 随后水解磷脂 PIP_2 , 释放两种细胞内信使: 二酰甘油(DAG)和肌醇 1,4,5-三磷酸(IP_3)。 IP_3 积累的 10 增加与 G_q 和 G_o 相关受体的活化有关。一般可见,“突触传递的间接机制”,第 8 章, From Neuron to Brain (第 3 版) Nichols, J.G. 等编辑 Sinauer Associates, Inc. (1992)。可以利用检测 IP_3 积累的测定来确定候选化合物是否是例如 G_q 和 G_o 相关受体的反激动剂(即所述化合物降低 IP_3 的水平)。也可以使用 AP1 报道测定检查 G_q 相关受体,其中依赖于 G_q 的磷脂酶导致包含 AP1 元件的基因活化;因此,活化的 G_q 相关受体将表现所述基因的表达增加,由此其反激动剂将表现 15 所述基因表达的降低,而激动剂将表现所述表达的增加。可以获得这种检测的商业化测试。

3. GPCR 融合蛋白

应用内源组成型活化 GPCR 或非内源组成型活化 GPCR 进行筛选候选化合物以直接鉴定反激动剂造成一个有趣的筛选难题,因为 20 根据定义,受体甚至在缺乏与其结合的内源配体时也是有活性的。因此,为了区分如在存在候选化合物情况下的非内源受体以及在不 存在候选化合物情况下的非内源受体,这种区分的目的在于了解所述化合物是否是反激动剂或激动剂或对所述受体没有影响,优选利用能够增强所述区分的方法。优选方法是应用 GPCR 融合蛋白。

25 一般地说,一旦使用上文所述测定技术(以及其它的技术)确定非内源 GPCR 已经组成型活化,就有可能确定偶联所述内源 GPCR 的主要 G 蛋白。偶联所述 G 蛋白到所述 GPCR 提供能够评价的信号途径。在一些实施方案中,优选使用哺乳动物表达系统进行筛选,预

期所述系统将在其中包括内源 G 蛋白。因此, 根据定义, 在所述系统中, 所述非内源组成型活化 GPCR 将持续给出信号。在一些实施方案中, 优选增强所述信号, 以便在例如所述受体的反激动剂存在下, 更有可能更容易地在筛选情况下区分与所述反激动剂接触的受体。

所述 GPCR 融合蛋白将增强与所述非内源 GPCR 偶联的 G 蛋白的功效。所述 GPCR 融合蛋白优选用于内源组成型活化 GPCR 或非内源组成型活化 GPCR 的筛选, 因为所述方法增强在所述筛选技术中利用的信号。这对于获得有效的“信噪”比是重要的; 筛选如本文公开的候选化合物优选所述信噪比。

构建用于表达 GPCR 融合蛋白的构建物在本领域内一般技术人员的能力范围内。商业化表达载体和系统提供适合研究者具体需要的各种方法。构建所述 GPCR 融合蛋白构建物的重要标准包括但不限于: 所述内源 GPCR 序列和所述 G 蛋白序列都符合读框(最好所述内源 GPCR 的序列在所述 G 蛋白序列上游), 并且所述 GPCR 的“终止”密码子缺失或受到取代, 以便表达所述 GPCR 时也能够表达所述 G 蛋白。其它实施方案包括这样的构建物: 在所述构建物中所述内源 GPCR 序列和所述 G 蛋白序列不符合读框和/或所述“终止”密码子没有缺失或受到取代。所述 GPCR 可以直接连接所述 G 蛋白, 或者在二者之间有间隔区残基(虽然残基数量可以容易地由本领域内技术人员确定, 但最好不超过约 12)。从方便的需要考虑, 优选使用间隔区。偶联所述非内源 GPCR 的所述 G 蛋白已经在制造所述 GPCR 融合蛋白构建物前得到鉴定。因为仅有少数 G 蛋白得到鉴定, 所以优选获取包含所述 G 蛋白序列的构建物(即通用 G 蛋白构建物(见实施例))以在其中插入内源 GPCR 序列; 这使大规模筛选多种具有不同序列的不同内源 GPCR 的效率更高。

如上文所述, 预期偶联 G_i 、 G_z 和 G_o 的组成型活化 GPCR 抑制 cAMP 的形成, 这使得基于这些 GPCR 类型的测定成为可能 (即 cAMP

信号在活化时降低, 因此使得直接鉴定如反激动剂(反激动剂将进一步降低该信号)成为可能)。如下文公开, 我们已经确定: 对于这些类型受体, 有可能创造不基于所述 GPCR 内源 G 蛋白的 GPCR 融合蛋白, 以便建立可行的基于环化酶的测定。因此, 例如, 内源 G_i 偶联受体可以与 G_s 蛋白融合 - 所述融合构建物表达时“驱动”或“驱使”所述内源 GPCR 偶联如 G_s 而不是“天然” G_i 蛋白, 以便可以建立基于环化酶的测定。因此, 对于 G_i 、 G_z 和 G_o 偶联受体, 在一些实施方案中, 当使用 GPCR 融合蛋白并且所述测定基于对

腺苷酸环化酶的检测时, 优选使用 G_s (或者刺激腺苷酸环化酶形成的等同 G 蛋白) 建立所述融合构建物。

G 蛋白	cAMP 产生对 GPCR 活化(即组成型活化或激动剂结合)的效应	IP ₃ 累积对 GPCR 活化(即组成型活化或激动剂结合)的效应	cAMP 产生对与反激动剂结合的效应	IP ₃ 累积对于与反激动剂结合的效应
G_s	增加	N/A	降低	N/A
G_i	降低	N/A	增加	N/A
G_z	降低	N/A	增加	N/A
G_o	降低	增加	增加	降低
G_q	N/A	增加	N/A	降低

同等有效的是利用与 G_s 、 G_i 、 G_z 或 G_o 蛋白融合的 G_q 蛋白的 G 蛋白融合构建物。在一些实施方案中, 可以使用 G_q 蛋白获得优选的融合构建物, 所述 G_q 蛋白缺失 G 蛋白 α 亚单位(“ $G\alpha_q$ ”)的头六(6)个氨基酸, 并且 $G\alpha_q$ 的 C 末端的最后五(5)个氨基酸被目的 G 蛋白 $G\alpha$ 的对应氨基酸取代。例如, 融合构建物可以具有与 G_i 蛋白融合的 G_q (缺失 6 个氨基酸), 产生“ G_q/G_i 融合构建物”。该融合构建物将驱使内

源 G_i 偶联受体与其非内源 G 蛋白 G_q 偶联, 以便可以测量第二信使(例如肌醇三磷酸或二酰甘油)以替代测量 cAMP 产生。

4. 靶 G_i 偶联 GPCR 与信号增强剂 G_s 偶联 GPCR 的共转染(基于 cAMP 的测定)

5 已知 G_i 偶联受体抑制腺苷酸环化酶, 并因此降低 cAMP 产量的水平, 这使得评价 cAMP 的水平成为可能。测量 cAMP 产量降低(在活化时主要偶联 G_i 的受体组成型活化的指标)的有效技术能够如下完成: 共转染信号增强剂和与 G_i 连接的 GPCR, 所述信号增强剂例如是活化时主要偶联 G_s 的非内源组成型活化受体(如下文公开的 TSHR-A623I)。明显的, 可以根据 cAMP 产量的增加测定 G_s 偶联受体的组成型活化。 G_i 偶联受体的组成型活化导致 cAMP 产量减少。因此, 所述共转染方法将有利地利用这些“对立”效应。例如共转染非内源组成型活化的 G_s 偶联受体(所述“信号增强剂”)以及所述内源 G_i 偶联受体(所述“靶受体”), 提供基础 cAMP 信号(即虽然所述 G_i 偶联受体会降低 cAMP 水平, 但该“增加”对于组成型活化的 G_s 偶联信号增强剂建立的 cAMP 水平实质性增加是相对的)。然后通过共转染所述信号增强剂与所述靶受体的组成型活化形式, 预期 cAMP 将由于所述 G_i 靶的活性增加(即降低 cAMP)而相对于基础进一步降低。

10 然后可以使用基于 cAMP 的测定筛选候选化合物, 其中相对于应用所述内源受体/G 蛋白融合体有两个“改变”: 首先, 相对所述 G_i 偶联的靶受体, 将会产生“对立”效应, 即所述 G_i 偶联靶受体的反激动剂会增加测量的 cAMP 信号, 而所述 G_i 偶联靶受体的激动剂将降低该信号; 第二, 明显的, 应该独立评价使用该方法直接鉴定的候选化合物, 以保证它们并不靶向所述信号增强受体(这可以在针对所述共转染受体进行筛选之前或之后完成)。

F. 药物化学

一般而言, 但并不是在所有情况下, 将通过组合化学技术产生

化合物与直接鉴定候选化合物结合起来进行，由此随机制备用于所述分析的几千种化合物。一般地说，所述筛选将产生具有独特核心结构的化合物；此后，围绕优选核心结构对这些化合物进行其它化学修饰，进一步增强它们的药物特性。所述技术是本领域内技术人员已知的，并且将不在本专利文件中详细说明。

G. 药用组合物

可以将选出用于进一步发展的候选化合物使用本领域内技术人员众所周知的技术配制成药用组合物。合适的药学上可接受的载体是本领域内技术人员知道的；例如，见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, 1980, Mack Publishing Co., (Osol 等编辑)。

H. 其它应用

虽然本文公开的 GPCR 的非内源形式的优选应用是直接鉴定用作反激动剂或激动剂(最好用作药物)的候选化合物，但这些形式的 GPCR 有其它应用。例如，可以利用加入 GPCR 的体外系统和体内系统进一步阐明和了解这些受体在人体状况(正常或疾病)中的作用，以及了解当其应用于信号级联时组成型活化的作用。在一些实施方案中，优选所述内源受体是“孤独受体”，即未鉴定针对所述受体的内源配体。因此，在一些实施方案中，可以使用所述修饰的非内源 GPCR 了解内源受体在人体内的作用，然后因此鉴定内源配体。也可以使用所述内源配体进一步阐明已知受体以及通过所述受体转导信号的途径。特别是研究本专利文件后，所述公开受体的其它应用对于本领域内技术人员将变得明显。

实施例

为阐明本发明提供下面的实施例，而不是限制本发明。虽然本文公开了具体的核酸序列和氨基酸序列，但本领域内一般技术人员能够对这些序列做小的修饰并获得与下文报道结果相同或基本相似

的结果。从一种序列到另一种序列(如从大鼠受体到人受体或从人受体 A 到人受体 B)应用或了解序列盒的传统方法一般建立在序列排列对比技术的基础上,使用所述技术排列对比所述序列,以确定共有区域。本文公开的突变方法并不依赖于该技术,而是建立在算法方法以及距人 GPCR 的 TM6 区内保守脯氨酸残基的位置距离。一旦掌握该方法,本领域内的技术人员就有能力对此做出小的修饰并获得与本文公开的结果实质上相同的结果(即组成型活化)。所述修饰方法被认为在本公开物的范围内。

10 实施例 1

内源性人 GPCR

1. 鉴定人 GPCR

在搜索 GenBank™数据库信息的基础上鉴定所公开的内源性人 GPCR。在搜索所述数据库时,鉴定得到下表(表 C)所示的 cDNA 克隆:

表 C

公开的人孤独 GPCR	鉴定的登记号	可读框(碱基对)	同源 GPCR 的对照	核酸 SEQ.ID.N O.	氨基酸 SEQ.ID.N O.
hRUP28	AC073957	1,002 bp	hGPR30	1	2
hRUP29	AC083865	918 bp	hGPR18	3	4
hRUP30	AC055863	1,125 bp	hBRB1	5	6
hRUP31	AL356214	1,086 bp	hGALR-1	7	8
hRUP32	AL513524	1,038 bp	hPNR	9	10
hRUP33	AL513524	1,020 bp	GPR57 GPR58	11	12
hRUP34	AL513524	1,029 bp	hPNR	13	14
hRUP35	AC021089	1,062 bp	hk-3 型阿片 样物质	15	16
hRUP36	AC090099	969 bp	GPR90	17	18
hRUP37	AC090099	969 bp	hMRG	19	20

2. 全长克隆

a. hRUP28 (Seq. Id. Nos. 1 & 2)

在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP28。当搜索所述数据库时，鉴定出登记号 AC073957 的 cDNA 克隆，该克隆是来自染色体 7 的人基因组序列。

使用成人肝 Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)作为模板，用下列引物通过 PCR 克隆全长 RUP28:

5'-CAGAGCTCTGGTGGCCACCTCTGTCC-3' (SEQ.ID.NO.:21; 有义链, 5'的起始密码子),

5'-CTGCGTCCACCAGAGTCACGTCTCC-3' (SEQ.ID.NO.:22; 反义链, 3'的终止密码子)。

使用 Advantage™ cDNA 聚合酶(Clontech)在 50 µl 反应物中按下面循环进行扩增，其中步骤 2 到 4 重复 35 次: 95℃5 分钟; 94℃30 秒钟; 58℃30 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃7 分钟。

从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.16 kb 的 PCR 片段，克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen)，使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:1 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:2 推定的氨基酸序列。

b. hRUP29 (Seq. Id. Nos. 3 & 4)

在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP29。当搜索所述数据库时，鉴定出登记号 AC0083865 的 cDNA 克隆，该克隆是来自染色体 7 的人基因组序列。

使用人基因组 DNA 作为模板，用下列引物通过 PCR 克隆全长 RUP29:

5'-GTATGCCTGGCCACAATACCTCCAGG-3' (SEQ.ID.NO.:23; 有义链, 包含起始密码子),

5'-GTTTGTGGCTAACGGCACAAAACACAATTCC-3' (SEQ.ID.NO.:24; 反义链, 包含终止密码子)。

使用 TaqPlus® Precision DNA 聚合酶(Stratagene)在 50 µl 反应物

中按下面循环进行扩增，其中步骤2到4重复35次：95℃5分钟；94℃30秒钟；54℃30秒钟；72℃1分钟30秒；和72℃7分钟。

从1%琼脂糖凝胶分离出一个930 bp的PCR片段，克隆进pCRII-TOPO载体(Invitrogen)，使用ABI Big染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。

使用人白细胞和卵巢 Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)快速扩增cDNA末端(RACE)，确定RUP29 cDNA的精确5'末端。使用具有下面序列的RUP29特异性引物(1)：

5'-GGTACCACAATGACAATCACCAGCGTCC-3'
(SEQ.ID.NO.:25)

和AP1引物(Clontech)进行第一轮PCR反应，具有下面序列的RUP29特异性引物(2)：

5'-GGAACGTGAGGTACATGTGGATGTGCAGC-3'
(SEQ.ID.NO.:26)

和AP2引物(Clontech)进行第二轮PCR反应。分离所述RACE反应的产物，克隆进pCRII-TOPO载体(Invitrogen)并测序。见SEQ.ID.NO.:3的核酸序列和SEQ.ID.NO.:4的推定氨基酸序列。

c. hRUP30 (Seq. Id. Nos. 5 & 6)

在应用GenBank数据信息的基础上鉴定公开的人RUP30。当搜索所述数据库时，鉴定出登记号AC055863的cDNA克隆，该克隆是来自染色体17的人基因组序列。

如下通过5'RACE-PCR克隆全长RUP30：使用人胰腺 Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)作为模板，用下面寡核苷酸

5'-GCAGTG TAGCGGTCAACCGTGAGCAGG-3'
(SEQ.ID.NO.:27；有义链，包含起始密码子)和AP1引物(Clontech)进行第一轮RT-PCR，使用寡核苷酸：

5'-TGAGCAGGATGGCGATCCAGACTGAGGCGTGG-3'
(SEQ.ID.NO.:28；反义链，包含终止密码子)和AP2引物(Clontech)进行第二轮PCR。将通过所述5'RACE-PCR产生的DNA片段克隆进

pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 SP6/T7 引物(Stratagene)测序。

根据所述 5'RACE 产物的序列, 使用人胰腺 Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)作为模板, 用下面引物通过 RT-PCR 克隆全长 RUP30:

5 5'-GAGGTACAGCTGGCGATGCTGACAG-3' (SEQ.ID.NO.:29; 有义链, ATG 为起始密码子),

5'-GTGGCCATGAGCCACCCTGAGCTCC-3' (SEQ.ID.NO.:30; 反义链, 3'的终止密码子)。

10 使用 Taq DNA 聚合酶(Stratagene)在 50 µl 反应物中按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 35 次: 94℃40 秒钟; 94℃20 秒钟; 64℃20 秒钟; 72℃2 分钟; 和 72℃5 分钟。

15 从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.2 kp 的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序几个克隆。见 SEQ.ID.NO.:5 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:6 的推定氨基酸序列。

d. hRUP31 (Seq.Id.Nos. 7 & 8)

在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP31。当搜索所述数据库时, 鉴定出登记号 AL356214 的 cDNA 克隆, 该克隆是来自染色体 10 的人基因组序列。

20 使用人乳腺 Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)作为模板, 用下列引物通过 RT-PCR 克隆全长 RUP31:

5'-GGAATGTCCACTGAATGCGCGCGG-3' (SEQ.ID.NO.:31; 有义链, 包含起始密码子),

25 5'-AGCTCGCCAGGTGTGAGAACTCGG-3' (SEQ.ID.NO.:32; 反义链, 3'的终止密码子)。

使用 Advantage™ cDNA 聚合酶(Clontech)在 50 µl 反应物中按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 35 次: 94℃40 秒钟; 94℃20 秒钟; 66℃20 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃5 分钟。

从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.1 kb 的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:7 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:8 推定的氨基酸序列。

5 **e. hRUP32 (Seq.Id.Nos. 9 & 10)**

在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP32。当搜索所述数据库时, 鉴定出登记号 AL513524 的 cDNA 克隆, 该克隆是来自染色体 6 的人基因组序列。

10 使用人基因组 DNA (Clontech)作为模板, 用下列引物通过 PCR 克隆全长 RUP32:

5'-GCGTTATGAGCAGCAATTCATCCCTGCTGG-3'
(SEQ.ID.NO.:33; 有义链, 包含起始密码子),

5'-GTATCCTGAACTTCGTCTATACAACTGC-3'
(SEQ.ID.NO.:34; 反义链)。

15 使用 TaqPlus® Precision DNA 聚合酶(Stratagene)按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 35 次: 94℃3 分钟; 94℃20 秒钟; 58℃20 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃7 分钟。

20 从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.06 kb 的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:9 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:10 推定的氨基酸序列。

f. hRUP33 (Seq.Id.Nos. 11 & 12)

25 在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP33。当搜索所述数据库时, 鉴定出登记号 AL513524 的 cDNA 克隆, 该克隆是来自染色体 6 的人基因组序列。

使用人基因组 DNA (Clontech)作为模板, 用下列引物通过 PCR 克隆全长 RUP33:

5'-CCCTCAGGAATGATGCCCTTTTGCCACAA-3'
(SEQ.ID.NO.:35; 有义链, 包含起始密码子),

5'-ATCCATGTGGTTGGTGCATGTGGTTCGT-3'

(SEQ.ID.NO.:36; 反义链)。

使用 TaqPlus® Precision DNA 聚合酶(Stratagene)按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 35 次: 94℃3 分钟; 94℃20 秒钟; 56℃
5 20 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃7 分钟。

从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.1 kb 的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:11 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:12 推定的氨基酸序列。

10 **g. hRUP32 (Seq.Id.Nos. 13 & 14)**

在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP34。当搜索所述数据库时, 鉴定出登记号 AL513524 的 cDNA 克隆, 该克隆是来自染色体 6 的人基因组序列。

使用人基因组 DNA (Clontech)作为模板, 用下列引物通过 PCR
15 克隆全长 RUP32:

5'-AAACAACAAACAGCAGAACCATGACCAGC-3'

(SEQ.ID.NO.:37; 有义链, 包含起始密码子),

5'-ACATAGAGACAAGTGACATGTGTGAACCAC-3'

(SEQ.ID.NO.:38; 反义链)。

20 使用 TaqPlus® Precision DNA 聚合酶(Stratagene)按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 35 次: 94℃3 分钟; 94℃20 秒钟; 60℃20 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃7 分钟。

从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.27 kb 的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:13 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:14 推定的氨基酸序列。
25

h. hRUP35 (Seq. Id. Nos. 15 & 16)

在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP35。当搜索所述数据库时, 鉴定出登记号 AC021089 的 cDNA 克隆, 该克隆

是来自染色体 16 的人基因组序列。

使用人胎儿脑 Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)作为模板, 通过 5'RACE-PCR 确定 RUP35 的 5'序列。用寡核苷酸

5'-GGTATGAGACCGTGTGGTACTTGAGC-3' (SEQ.ID.NO.:39; 有义链)和 AP1 引物(Clontech)进行第一轮 RT-PCR, 使用寡核苷酸:

5'-GTGGCAGACAGCGATATACTGTCAATGG-3' (SEQ.ID.NO.:40; 反义链)和 AP2 引物(Clontech)进行第二轮 PCR。将通过所述 5'RACE-PCR 产生的 DNA 片段克隆进 pCRII-TOPO 载体 (Invitrogen), 使用 SP6/T7 引物(Stratagene)测序。

10 根据所述 5'RACE 产物的序列, 使用人脑 Marathon-Ready™ cDNA (Clontech)作为模板, 用下面引物通过 RT-PCR 克隆全长 RUP30:

5'-GCGCTCATGGAGCACACGCACGCCAC-3' (SEQ.ID.NO.:41; 有义链,ATG 是起始密码子),

15 5'-GAGGCAGTAGTTGCCACACCTATGG-3' (SEQ.ID.NO.:42; 反义链, 3'的终止密码子)。使用 Advantage™ cDNA 聚合酶(Clontech), 在 100 μl 反应物中按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 45 次: 95℃2 分钟; 95℃20 秒钟; 60℃20 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃5 分钟。

20 从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.0 kp 的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:15 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:16 的推定氨基酸序列。

i. hRUP36 (Seq.Id.Nos. 17 & 18)

25 在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP36。当搜索所述数据库时, 鉴定出登记号 AC090099 的 cDNA 克隆, 该克隆是来自染色体 11 的人基因组序列。

使用人基因组 DNA (Clontech)作为模板, 用下列引物通过 PCR

克隆全长 RUP36:

5'-CATCTGGTTTGTGTTCCCAGGGGCACCAG-3'

(SEQ.ID.NO.:43; 有义链, 5'的起始密码子),

5'-GACAGTGTTGCTCTCAAAGTCCCGTCTGACTG-3'

5 (SEQ.ID.NO.:44; 反义链, 3'的终止密码子)。使用 TaqPlus® Precision DNA 聚合酶(Stratagene)在 50 µl 反应物中按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 30 次: 95℃, 5 分钟; 95℃30 秒钟; 70℃30 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃7 分钟。

10 从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 1.0 kb 的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:17 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:18 推定的氨基酸序列。

j. hRUP37 (Seq.Id.Nos. 19 & 20)

15 在应用 GenBank 数据信息的基础上鉴定公开的人 RUP37。当搜索所述数据库时, 鉴定出登记号 AC090099 的 cDNA 克隆, 该克隆是来自染色体 11 的人基因组序列。

使用人基因组 DNA (Clontech)作为模板, 用下列引物通过 PCR 克隆全长 RUP37:

20 5'-CTGTTTCCAGGGTCATCAGACTGGG-3' (SEQ.ID.NO.:45; 有义链),

5'-GCAGCATTGCTCTCAAAGTCCTGTCTG-3' (SEQ.ID.NO.:46; 反义链)。使用 TaqPlus® Precision DNA 聚合酶(Stratagene)按下面循环进行扩增, 其中步骤 2 到 4 重复 35 次: 95℃5 分钟; 95℃30 秒钟; 62℃30 秒钟; 72℃1 分钟 30 秒; 和 72℃7 分钟。

25 从 1%琼脂糖凝胶分离出一个 969 碱基对的 PCR 片段, 克隆进 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen), 使用 ABI Big 染料终止试剂盒(P.E. Biosystems)测序。见 SEQ.ID.NO.:19 的核酸序列和 SEQ.ID.NO.:20 推定的氨基酸序列。

实施例 2

制备非内源组成型活化的 GPCR

本领域内技术人员能够选择用于突变核酸序列的技术。下文是用于生产上文公开的几种人 GPCR 的非内源形式的方法。下文公开的突变基于算法方法，由此距保守脯氨酸(或因此内源保守取代)残基开始的第 16 个氨基酸(位于所述 GPCR 的 IC3 区内)优选突变为丙氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸残基，最优选突变为赖氨酸残基。

1. Transformer Site-Directed™诱变

可以使用例如 Transformer Site-Directed™ 诱变试剂盒 (Clontech)，按照生产商的指导，从人 GPCR 制备非内源性人 GPCR。在一些实施方案中，使用两种诱变引物，最好是一种产生赖氨酸突变的赖氨酸诱变寡核苷酸以及一种选择标记寡核苷酸。为方便，以标准形式(表 D)标出加入所述人 GPCR 的密码子突变：

表 D

受体标识	密码子突变
hRUP28	V274K
hRUP29	T249K
hRUP30	R232K
hRUP31	M294K
hRUP32	F220K
hRUP34	A238K
hRUP35	Y215K
hRUP36	L294K
hRUP37	T219K

实施例 3

受体表达

虽然本领域内技术人员可以使用多种细胞表达蛋白，但优选利

用哺乳动物细胞。主要原因在于实用性，即：虽然利用例如酵母细胞表达 GPCR 是可能的，但这在方法中引入不包含哺乳动物系统进化出的受体偶联、遗传机制和分泌途径(在酵母的情况下确实不包括这些)的非哺乳动物细胞，因此，在非哺乳动物细胞内获得的结果虽然可能是有用的，但更优选使用哺乳动物细胞获得的结果。在哺乳动物细胞中，虽然可以根据技术人员的需要选择所利用的特定哺乳动物细胞，但尤其优选 COS-7、293 和 293T 细胞。

a. 瞬间转染

第一天，接种 293 细胞， 6×10^6 细胞/10 cm 碟。第二天，制备两个反应管(每管含一碟的用量)：管 A 在 0.5 ml 无血清 DMEM (Gibco BRL)中含 4 μ g DNA (如 pCMV 载体；携带受体 cDNA 的 pCMV 载体等)；管 B 在 0.5 ml 无血清 DMEM 中含 24 μ l 脂质转染胺试剂(Gibco BRL)。颠倒几次，混合管 A 和管 B，然后在室温下温育 30-45 分钟。该混合物称为“转染混合物”。用 1XPBS 洗涤接种的 293 细胞，然后加入 5 ml 无血清 DMEM。在细胞中加入 1 ml 所述转染混合物，然后在 37°C/5% CO₂ 温育 4 小时。吸走除去所述转染混合物，随后加入 10 ml DMEM/10%胎牛血清。在 37°C/5% CO₂ 温育细胞。温育 48 小时后，收获细胞用于分析。

b. 稳定的细胞系

将约 12×10^6 293 细胞接种到 15 cm 组织培养板，在含 10%胎牛血清和百分之一丙酮酸钠、L-谷氨酸和抗生素的 DME High Glucose 培养基中培养。接种 293 细胞二十四小时后(达到约 80%汇合)，用 12 μ g DNA 转染所述细胞。将所述 12 μ g DNA 与 60 μ l 脂质转染胺试剂和 2 mL 无血清 DME High Glucose 培养基混合。从所述平板吸走除去所述培养基，用无血清培养基洗所述细胞一次。将所述 DNA、脂质转染胺试剂和培养基混合物以及 10 mL 无血清培养基加入所述平板。在 37°C 温育四到五小时后，洗走除去所述培养基，然后加入 25 ml 含血清的培养基。转染后二十四小时，再次吸走除去培养基，然后

加入含血清的新鲜培养基。转染后四十八小时，吸走除去培养基，然后加入含终浓度 500 $\mu\text{g/mL}$ 遗传霉素(G418 药物)的含血清培养基。然后选择转染细胞中含 G418 抗性基因的阳性转染细胞。选择过程中每四到五天更换一次培养基。选择过程中，培养细胞产生稳定的集

5 合体，或传代以选择稳定的克隆。

实施例 4

确定非内源 GPCR 组成型活性的测定

可以使用各种方法评价非内源性人 GPCR 的组成型活性。下面是说明性的；本领域内技术人员能够确定最适合技术人员需要的那些技术。

10

1. 膜结合测定： $[\text{S}]$ GTP γ S 测定

当 G 蛋白偶联受体由于配体结合或组成型活化而处于活性状态时，所述受体偶联 G 蛋白，刺激 GDP 释放以及 GTP 随后结合所述 G 蛋白。所述 G 蛋白受体复合物 α 亚单位作为 GTP 酶起作用，缓慢水解 GTP 成为 GDP，一般在此之后所述受体失活。组成型活化的受体继续转换 GTP 与 GDP。可以利用 GTP 的不可水解类似物 $[\text{S}]$ GTP γ S 证明 $[\text{S}]$ GTP γ S 增强与膜表达的组成型活化受体的结合。使用 $[\text{S}]$ GTP γ S 结合来测量组成型活化的好处包括但不限于以下：(i)它可

15

20 普遍应用于所有 G 蛋白偶联受体；(b)它接近膜表面，这使它较不可能拾起(pick-up)影响细胞内级联反应的分子。

所述测定利用 G 蛋白偶联受体刺激 $[\text{S}]$ GTP γ S 结合表达相关受体的膜。因此，所述测定可以用于直接鉴定方法中，筛选针对组成型活化的 G 蛋白偶联受体的候选化合物。所述测定是通用的，可应用于所有 G 蛋白偶联受体的药物发现。

25

所述 $[\text{S}]$ GTP γ S 测定在下面组合物中温育 1 小时：20 mM HEPES 和 1 到约 20 mM MgCl_2 (虽然优选 20 mM，但为针对优化结果而调整该量) pH7.4、含约 0.3 到约 1.2 nM $[\text{S}]$ GTP γ S 的结合缓冲液(虽然优

选 1.2, 但可以为优化结果而调整该量)和 12.5 到 75 μg 膜蛋白(如表达所述 G_s 融合蛋白的 293 细胞; 可以为优化而调整该量)以及 10 μM GDP (可以为优化改变量)。随后加入麦胚凝集素珠(25 μl ; Amersham), 所述混合物在室温下继续温育 30 分钟。所述管随后在
5 室温下于 1500 x g 离心 5 分钟, 然后用闪烁计数器计数。

2. 腺苷酸环化酶

改造设计用于基于细胞测定的 Flash Plate™腺苷酸环化酶试剂盒(New England Nuclear; Cat. No. SMP004A), 将其用于粗质膜。Flash Plate 孔可以包含闪烁包被物, 所述包被物也包含识别 cAMP 的特异性抗体。通过与放射性 cAMP 示踪物直接竞争与所述 cAMP 抗体的结合, 定量在孔内产生的 cAMP。下面是测量表达所述受体的全细胞内 cAMP 水平变化的方法的简短描述。

10

瞬间转染约二十四小时后收获转染细胞。小心地吸出并弃去培养基。在每碟细胞中温和加入 10 ml PBS, 然后小心吸出。每平板加入 1 ml Sigma 细胞解离缓冲液和 3 ml PBS。用移液管将细胞吸出平板, 将所述细胞悬浮液收集入 50 ml 圆锥形离心管。细胞在室温下于 1,100 rpm 离心 5 分钟。小心地重悬浮细胞沉淀于合适体积的 PBS (约 3 ml/平板)。然后使用血细胞仪计数细胞, 补充加入 PBS, 获得足够数量的细胞(达到约 50 μl /孔的终体积)。

15

按照厂家指导制备和维持 cAMP 标准和检测缓冲液(在 11 ml 检测缓冲液内含 1 μCi 示踪物 [^{125}I cAMP (50 μl)]。新鲜制备用于筛选的测定缓冲液, 所述测定缓冲液含 50 μl 刺激缓冲液、3 μl 测试化合物(12 μM 最终测定浓度)和 50 μl 细胞, 将所述测定缓冲液保存在冰上直到使用。在合适孔内加入 50 μl cAMP 标准, 然后在 H-11 和 H12 孔加入 50 μl PBSA, 开始测定。在所有孔内加入 50 μl 刺激缓冲液。使用能够分配 3 μl 化合物溶液的加样工具(pin tool), 在合适孔内加入 DMSO (或选定候选化合物), 达到 12 μM 测定化合物的终浓度和 100 μl 总测定体积。然后在孔内加入细胞, 在室温下温育 60 分钟。然后

20

25

在孔内加入 100 μ l 含示踪 cAMP 的检测混合物。继续温育平板 2 小时，然后使用 Wallac MicroBeta™ 闪烁计数器计数。每块测定平板都制作标准 cAMP 曲线，根据所述标准 cAMP 曲线外推 cAMP/孔的值。

3. 用于 G_i 偶联靶 GPCR 的基于细胞的 cAMP

5 TSHR 是 G_s 偶联 GPCR，在活化时引起 cAMP 积累。通过突变氨基酸残基 623 (即将丙氨酸残基改变为异亮氨酸残基)组成型活化 TSHR。预期 G_i 偶联受体抑制腺苷酸环化酶，并因此降低 cAMP 产量水平，这使得测定 cAMP 水平成为可能。测量 cAMP 产量降低(G_i 偶联受体组成型活化的指标)的有效技术是：共转染作为“信号增强剂”的最优选非内源组成型活化 TSHR (TSHR-A623I) (或内源组成型活化 G_s 偶联受体)以及 G_i 连接的靶 GPCR，建立基础 cAMP 水平。在创造所述 G_i 偶联受体的非内源形式后，使用所述靶 GPCR 的该非内源形式与所述信号增强剂共转染，可以使用所述物质进行筛选。当使用 cAMP 测定时，可以使用该方法有效产生信号；最好使用该方法针对 G_i 偶联受体直接鉴定候选化合物。注意到对于 G_i 偶联 GPCR，当使用该方法时，所述靶 GPCR 的反激动剂增加 cAMP 信号，而激动剂降低 cAMP 信号。

第一天，接种 2×10^4 293 细胞/孔。第二天，制备两个反应管(每管含一碟的用量)：管 A 如下制备：混合转染进哺乳动物细胞的每种受体 2 μ g DNA，在 1.2 ml 无血清 DMEM (Irvine Scientific, Irvine, CA) 中总量含 4 μ g DNA (如 pCMV 载体；携带突变 TSHR (TSHR-A623I) 的 pCMV 载体；TSHR-A623I 和 GPCR 等)；管 B 如下制备：在 1.2 ml 无血清 DMEM 中混合 120 μ l 脂质转染胺试剂(Gibco BRL)。颠倒几次，混合管 A 和管 B，然后在室温下温育 30-45 分钟。该混合物称为“转染混合物”。用 1XPBS 洗涤接种的 293 细胞，然后加入 10 ml 无血清 DMEM。在细胞中加入 2.4 ml 所述转染混合物，然后在 37°C/5% CO_2 温育 4 小时。吸走除去所述转染混合物，随后加入 25 ml DMEM/10%胎牛血清。在 37°C/5% CO_2 温育细胞。温育 24 小时后，

收获细胞用于分析。

可以根据技术人员需要，改造设计用于基于细胞测定的 Flash Plate™ 腺苷酸环化酶试剂盒 (New England Nuclear; Cat. No. SMP004A)，将其用于粗质膜。Flash Plate 孔可以包含闪烁包被物，
5 所述包被物也包含识别 cAMP 的特异性抗体。通过与放射性 cAMP 示踪物直接竞争与所述 cAMP 抗体的结合，定量在孔内产生的 cAMP。下面是测量表达所述受体的全细胞内 cAMP 水平变化的方法的简短描述。

瞬间转染约二十四小时后收获转染细胞。小心地吸出并弃去培
10 养基。在每碟细胞中温和加入 10 ml PBS，然后小心吸出。每平板加入 1 ml Sigma 细胞解离缓冲液和 3 ml PBS。用移液管将细胞吸出平板，将所述细胞悬浮液收集入 50 ml 圆锥形离心管。细胞在室温下于 1,100 rpm 离心 5 分钟。小心地重悬浮细胞沉淀于合适体积的 PBS (约 3 ml/平板)。然后使用血细胞仪计数细胞，补充加入 PBS，获得足够
15 数量的细胞(达到约 50 μ l/孔的终体积)。

按照厂家指导制备和维持 cAMP 标准和检测缓冲液(在 11 ml 检测缓冲液内含 1 μ Ci 示踪物 [125 I cAMP (50 μ l)]。新鲜制备用于筛选的测定缓冲液，所述测定缓冲液含 50 μ l 刺激缓冲液、3 μ l 测试化合物(12 μ M 最终测定浓度)和 50 μ l 细胞，将所述测定缓冲液保存在冰上直到
20 使用。在合适孔内加入 50 μ l cAMP 标准，然后在 H-11 和 H12 孔加入 50 μ l PBSA，开始测定。在所有孔内加入 50 μ l 刺激缓冲液。使用能够分配 3 μ l 化合物溶液的加样工具，在合适孔内加入选定化合物(如 TSH)，达到 12 μ M 测定化合物的终浓度和 100 μ l 总测定体积。然后在孔内加入细胞，在室温下温育 60 分钟。然后在孔内加入 100 μ l 含
25 示踪 cAMP 的检测混合物。继续温育平板 2 小时，然后使用 Wallac MicroBeta 闪烁计数器计数。每块测定平板都制作标准 cAMP 曲线，根据所述标准 cAMP 曲线外推 cAMP/孔的值。

4. 基于报道物的测定

a.CRE-LUC 报道物测定(Gs-偶联受体)

将 293 细胞和 293T 细胞以每孔 2×10^4 细胞的密度接种在 96 孔板上, 第二天按照生产厂家的指导用脂质转染胺试剂(BRL)进行转染。如下制备用于每 6 孔转染的 DNA/脂质混合物: 将在 100 μ l DMEM 内的 260 ng 质粒 DNA 与 100 μ l DMEM 内的 2 μ l 脂质温和混合(所述 260 ng 质粒 DNA 包含 200 ng 8xCRE-Luc 报道质粒、50 ng 含内源报道物或非内源报道物的 pCMV 或单独的 pCMV、以及 10 ng GPRS 表达质粒(在 pcDNA3 (Invitrogen)内的 GPRS)。如下制备所述 8XCRE-Luc 报道质粒: 将大鼠促生长素抑制素启动子(-71/+51)克隆进 p β gal-Basic 质粒(Clontech)的 BglV-HindIII 位点, 获得载体 SRIF- β -gal。由腺病毒模板 AdpCF126CCRE8 (见 7 *Human Gene Therapy* 1883 (1996))通过 PCR 获得 cAMP 反应元件的八个(8)拷贝, 克隆进 SRIF- β -gal 载体的 Kpn-BglV 位点, 产生 8xCRE- β -gal 报道载体。用得自 pGL3-基础载体(Promega)HindIII-BamHI 位点的萤光素酶基因取代 8xCRE- β -gal 报道载体的 β -半乳糖苷酶基因, 产生 8xCRE-Luc 报道质粒。在室温下温育 30 分钟后, 用 400 μ l DMEM 稀释所述 DNA/脂质混合物, 每孔加入 100 μ l 所述稀释物。在细胞培养箱内温育 4 小时后, 每孔加入 100 μ l 含 10% FCS 的 DMEM。第二天所述转染细胞更换到 200 μ l/孔含 10% FCS 的 DMEM。八小时后, 用 PBS 洗孔一次, 然后更换为 100 μ l/孔不含酚红的 DMEM。第二天使用 LucLite™报道基因测定试剂盒(Packard)根据生产商的指导测定萤光素酶活性, 在 1450 MicroBeta™闪烁发光计数器(Wallac)上读数。

b.AP1 报道测定(G_q 结合受体)

检测 G_q 刺激作用的方法是基于如下已知特性: 依赖于 G_q 的磷脂酶 C 引起在启动子中含 AP1 元件的基因活化。可以利用 Pathdetect™ AP-1 顺式报道系统(Stratagene, 目录号 219073), 采用上文关于 CREB 报道测定陈述的方法, 只是磷酸钙沉淀的成分是 410 ng pAP1-Luc、80

ng pCMV-受体表达质粒和 20 ng CMV-SEAP。

c.SRF-LUC 报道测定(G_q 结合受体)

检测 G_q 刺激的方法是基于如下已知特性：依赖于 G_q 的磷脂酶 C 引起在启动子中含血清反应因子的基因活化。可以利用 Pathdetect™ SRF-Luc 报道系统(Stratagene)，在如 COS7 细胞内测定 G_q 偶联活性。使用 Mammalian Transfection™试剂盒(Stratagene, 目录号 200285)，根据生产商的指导，用所述系统的质粒成分以及编码内源或非内源 GPCR 的指定表达质粒转染细胞。简要地说，按照生产商的指导在磷酸钙沉淀内混合 410 ng SRF-Luc、80 ng pCMV-受体表达质粒和 20 ng CMV-SEAP (分泌型碱性磷酸酶表达质粒；测量培养基内转染细胞与对照相比的碱性磷酸酶活性，检查样品间转染效率的差异)。将一半所述沉淀平均分配到 96 孔板的 3 个孔，在无血清培养基内与所述细胞保持接触 24 小时。最后 5 小时，根据指示，用 1 μ l 血管紧张肽温育细胞。然后裂解细胞，使用 Lucite™试剂盒(Packard, 目录号 6016911)和 “Trilux 1450 Microbeta” 液体闪烁发光计数器(Wallac)，按照生产商的指导测定萤光素酶活性。使用 GraphPad Prism™ 2.0a (GraphPad Software Inc.)分析数据。

d.细胞内 IP_3 积累测定(G_q 结合受体)

第 1 天，将包含所述受体(内源和/或非内源)的细胞接种到 24 孔板上，一般是 1×10^5 细胞/孔(可以优化该值)。第 2 天，如下转染细胞：首先混合 50 μ l 无血清 DMEM/孔内的 0.25 μ g DNA 和 50 μ l 无血清 DMEM/孔内的 2 μ l 脂质转染胺。温和混合所述溶液，然后在室温下温育 15-30 分钟。随后用 0.5 ml PBS 和 400 μ l 无血清培养基洗涤细胞，然后与转染培养基混合并加入所述细胞。所述细胞在 37°C/5%CO₂ 温育 3-4 小时，然后除去所述转染培养基，更换为 1 ml/孔常规培养基。第 3 天，用 ³H-肌醇标记细胞。简要地说，除去所述培养基，用 0.5 ml PBS 洗涤细胞。然后每孔加入 0.5 ml 无肌醇/无血清培养基 (GIBCO BRL)和 0.25 μ Ci ³H-肌醇，将细胞在 37°C/5%CO₂ 温育过夜。

16-18 小时。第 4 天, 用 0.5 ml PBS 洗涤细胞, 加入 0.45 ml 测定培养基, 或加入 0.4 ml 测定培养基以及 50 μ l 10x ketanserin (ket) 达到 10 μ M 的终浓度, 所述 0.45ml 测定培养基含无肌醇/无血清培养基、10 μ M pargyline、10 mM 氯化锂。所述细胞随后在 37°C 温育 30 分钟。用 0.5 ml PBS 洗涤细胞, 每孔加入 200 μ l 新鲜冰冷的终止溶液(1M KOH; 18 mM 硼酸钠; 3.8 mM EDTA)。所述溶液在冰上保持 5-10 分钟(或直到细胞裂解), 然后加入 200 μ l 新鲜冰冷的中和溶液(7.5% HCL)中和。随后将所述裂解物转移到 1.5 ml 微量离心管, 每管加入 1 ml 氯仿/甲醇(1:2)。涡流振荡所述溶液 15 秒钟, 将上层相加载到 Biorad AG1-X8™ 阴离子交换树脂(100-200 目)。首先用水以 1:1.25 W/V 洗所述树脂, 然后将 0.9 ml 上层相加载到柱上。用 10 ml 5 mM 肌醇和 10 ml 5 mM 硼酸钠/60 mM 甲酸钠洗柱。用 2 ml 0.1 M 甲酸/1 M 甲酸铵将肌醇三磷酸洗脱入含 10 ml 闪烁混合物的闪烁小管。如下再生柱子: 用 10 ml 0.1 M 甲酸/3M 甲酸铵洗涤, 用双蒸水清洗两次, 然后 4°C 下保存于水中。

参考图 1。在图 1 中, 用下面蛋白转染 293 细胞: 六氨基酸缺失的 G_q 蛋白 " $G_q(\text{del})$ "; 与 G_i 蛋白融合的 G_q 蛋白 " $G_q(\text{del})/G_i$ "; 内源 RUP32; 和具有 $G_q(\text{del})$ 的 RUP32 (" $\text{RUP32}+G_q(\text{del})/G_i$ ")。根据测量 RUP32 与 $G_q(\text{del})/G_i$ 共转染的 IP_3 积累, 这些数据指出: RUP32 并不与 G_q 蛋白内源偶联。然而, 当 RUP32 与 $G_q(\text{del})/G_i$ 融合蛋白共转染时, RUP32 不得不与 G_q 蛋白偶联。RUP27+ $G_q(\text{del})/G_i$ 与内源 RUP32 相比 IP_3 积累增加约九(9)倍。该数据表明: 所述 $G_q(\text{del})/G_i$ 融合构建物可以与 GPCR 共转染, 并可用于筛选激动剂或反激动剂。

参见图 2。在图 2 中, 用 RUP35 和 RUP36 受体转染 293 细胞, 并与对照 pCMV 相比。这些数据指出: RUP35 和 RUP36 都是内源组成型活化的。RUP35 与 pCMV 相比细胞内磷酸肌醇增加约六(6)倍, RUP36 与 pCMV 相比增加约四(4)倍。

实施例 5

制备融合蛋白

a. GPCR: G_s 融合构建物

可以如下完成组成型活化 GPCR-G 蛋白融合构建物的设计：工
5 程化大鼠 G 蛋白 $G_{s\alpha}$ (长形式; Itoh, H.等, 83 *PNAS* 3776 (1986))的 5'
末端和 3'末端, 在其上包括 HindIII (5'-AAGCTT-3')序列。确认正确
序列(包括侧翼 HindIII 序列)后, 通过使用 pcDNA3.1(-) (Invitrogen, 目
录号 V795-20)的 HindIII 限制位点进行亚克隆, 将所述完整序列穿梭
10 进所述载体。亚克隆进 pcDNA3.1(-)后, 确认所述 $G_{s\alpha}$ 序列的正确取
向。然后确认在 HindIII 序列包含所述大鼠 $G_{s\alpha}$ 基因的修饰
pcDNA3.1(-); 该载体以后用作“通用” $G_{s\alpha}$ 蛋白载体。所述 pcDNA3.1(-)
载体在 HindIII 位点上游包含多种众所周知的限制位点, 因此有利地
提供在所述 G_s 蛋白上游插入内源组成型有活性 GPCR 的编码序列的
能力。可以利用同样方法制造其它“通用”G 蛋白载体, 当然也可
15 以利用技术人员已知的其它商业化载体或专利载体。在一些实施方
案中, 重要的标准是所述 GPCR 的序列在所述 G 蛋白序列的上游并
且与所述 G 蛋白序列符合读框。

所述 G 蛋白和所述 GPCR 间限制位点内的间隔区是可选的。有
义引物和反义引物分别包括 XbaI 和 EcoRV 限制位点, 使得在所述 G
20 蛋白和所述 GPCR 之间存在间隔区(归因于所述限制位点)。

然后利用 PCR 保证各个受体序列融合入上文公开的所述 $G_{s\alpha}$ 通
用载体, 其中使用下面方法: 在各管内加入 100 ng 编码 GPCR 的
cDNA, 各管包含 2 μ l 每种引物(有义和反义)、3 μ l 10 mM dNTP、10 μ l
10XTaqPlus™ Precision 缓冲液、1 μ l TaqPlus™ Precision 聚合酶
25 (Stratagene: #600211)和 80 μ l 水。针对所述 GPCR 的反应温度和循环
时间如下, 其中步骤 2 到步骤 4 重复 35 次: 94°C 1 分钟; 94°C 30 秒
钟; 62°C 20 秒钟; 72°C 1 分钟 40 秒; 然后 72°C 5 分钟。PCR 产物在
1%琼脂糖凝胶上电泳, 然后纯化。用 XbaI 和 EcoRV 消化所述纯化

产物，纯化所需插入片段，连接进所述 G_s 通用载体的各个限制位点。转化后分离阳性克隆，然后通过限制酶消化确认；按照上文陈述的方法完成使用 293 细胞的表达。测序 GPCR- G_s 融合蛋白的各个阳性克隆，确认其正确性。

5 b. G_q (6 氨基酸缺失)/ G_i 融合构建物

如下完成 $G_q(\text{del})/G_i$ 融合构建物的设计：去除 $G\alpha_q$ 亚单位 N 末端六(6)个氨基酸(氨基酸 2 到 7，序列 TLESIM (SEQ.ID.NO.:47)，并 $G\alpha_i$ 蛋白的对应氨基酸(序列 DCGLF (SEQ.ID.NO.:49))取代 C 末端五(5)个氨基酸(序列 EYNLV (SEQ.ID.NO.:48))。使用质粒 63313 作为模板，
10 使用下面引物通过 PCR 获得该融合构建物：

5'-gatcAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGG-3'
(SEQ.ID.NO.:50)和

5'-

gatcGGATCCTTAGAACAGGCCGCGCAGTCCTTCAGGTTCAGCTGCA
15 GGATGGTG-3' (SEQ.ID.NO.:51)，所述质粒 63313 包含携带血凝素标记的小鼠 $G\alpha_q$ 野生型形式。小写字母表示的核苷酸是间隔区。

利用 TaqPlus® Precision DNA 聚合酶(Stratagene)通过如下循环扩增，其中步骤 2 到 4 重复 35 次：95℃ 2 分钟；95℃ 20 秒钟；56℃ 20 秒钟；72℃ 2 分钟；然后 72℃ 7 分钟。将所述 PCR 产物克隆进
20 pCRII-TOPO 载体(Invitrogen)，使用 ABI Big Dye Terminator 试剂盒(P.E.Biosystems)测序。通过 2 步骤克隆方法，将来自包含所述融合构建物序列的 TOPO 克隆的插入片段穿梭入表达载体 pcDNA3.1(+)的 HindIII/BamHI 位点。

25 **实施例 6**

所公开的人 GPCR 的组织分布：RT-PCR

应用 RT-PCR 证实表达，确认几种新型人 GPCR 的组织分布。所利用的寡核苷酸是 GPCR 特异性的，使用人多组织 cDNA 组合(MTC，

Clontech)作为模板。在 40 μ l 反应物内, 按照生产商的指导使用 Taq DNA 聚合酶(Stratagene)。将 20 μ l 所述反应物加载到 1.5%琼脂糖凝胶上, 分析所述 RT-PCR 产物。下面的表 E 列出受体、循环条件和所利用的引物, 并且列出与所述受体有关的典型疾病/紊乱。

5

表 E

受体名称	循环条件 分钟('), 秒('') 循环 2-4 重复 35 次	5'引物 (SEQ.ID.NO.)	3'引物 (SEQ.ID.NO.)	DNA 片 段	组织表达
hRUP28	94℃5 分钟; 94℃30 秒钟; 58℃30 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃7 分钟	GTCCTCACTGG TGGCCATGTAC TCC (52)	CTGCGTCCA CCAGAGTCA CGTCTCC (53)	710 bp	心、肾、 肝、肺和 胰
hRUP29	94℃5 分钟; 94℃30 秒钟; 58℃30 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃7 分钟	CTTGGATGTTT GGGCTGCCCTT CTGC (54)	GTTTGTGGC TAACGGCAC AAAACACAA TTCC (55)	690 bp	白细胞和 卵巢
hRUP30	94℃2 分钟; 94℃15 秒钟; 58℃20 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃10 分钟	CTGCTCACGGT TGACCGCTACA CTGC (56)	GTGGCCATG AGCCACCCT GAGCTCC (57)	690 bp	胰
hRUP31	95℃4 分钟; 95℃1 分钟; 52℃30 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃7 分钟	CTTCTTCTCCG ACGTCAAGG (58)	CCAAATCAG TGTGCAAAT CG (59)	56 bp	结肠、肺、 胰、胸腺; 大脑皮 层、脑的 海马以及 脂肪细胞
hRUP32	95℃4 分钟; 95℃1 分钟; 52℃30 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃7 分钟	TGAATGGGTCC TGTGTGAAA (60)	CAACGGTCT GACAACCTC CT (61)	527 bp	胸腺

hRUP34	95℃4 分钟; 95℃1 分钟; 52℃30 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃7 分钟	TTGCTGTGATG TGGCATT TTG (62)	CAGGAAGCC CATAAAGGC ATCAA (63)	534 bp	外周血白 细胞 (“PBL”)、 前列腺和 肾
hRUP35	95℃4 分钟; 95℃1 分钟; 52℃30 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃7 分钟	ACATCACCTGC TTCCTGACC (64)	CCAGCATCT TGATGCAGT GT (65)	557 bp	丘脑
hRUP37	95℃4 分钟; 95℃1 分钟; 52℃30 秒钟, 72℃1 分钟, 和 72 ℃7 分钟	CCATCTCCAAA ATCCTCAGTC (66)	GCTGTTAAG AGCGGACAG GAAA (67)	517 bp	睾丸、大 脑皮层和 海马

与位于这些组织或区域中的受体有关的疾病和紊乱包括但不限于：心脏紊乱和疾病(如血栓形成、心肌梗死、动脉粥样硬化、心肌病)、肾病/紊乱(如肾衰竭、肾小管性酸中毒、肾性糖尿、肾原性尿崩症、胱氨酸尿、多囊肾病)、嗜酸粒细胞增多、白细胞增多、白细胞减少、卵巢癌、性功能障碍、多囊卵巢综合征、胰腺炎和胰腺癌、过敏性肠综合征、结肠癌、Crohn 氏病、溃疡性结肠炎、憩室炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维变性、肺炎、肺动脉高血压、肺结核和肺癌、Parkinson 氏病、运动障碍和运动失调、学习记忆障碍、饮食障碍(如厌食、贪食症等)、肥胖、癌症、胸腺瘤、重症肌无力、循环系统疾病、前列腺癌、前列腺炎、肾病/紊乱(如肾衰竭、肾小管性酸中毒、肾性糖尿、肾原性尿崩症、胱氨酸尿、多囊肾病)、感觉运动处理和唤醒障碍、强迫观念与行为的障碍、睾丸癌、阴茎异常勃起、前列腺炎、疝、内分泌紊乱、性功能障碍、变态反应、抑郁、精神病、偏头痛、反流、精神分裂症、溃疡、支气管痉挛、癫痫、前列腺肥大、焦虑、鼻炎、咽峡炎和青光眼。因此，本发明的方法可以用于诊断和/或治疗这些和其它疾病和紊乱。

实施例 7

方法：直接鉴定反激动剂和激动剂

A. [35S]GTP γ S 测定

5 虽然已经使用内源组成型有活性的 GPCR 直接鉴定可用作例如反激动剂的候选化合物，但由于未曾完全理解的原因，可能加剧测定内的差异。在一些实施方案中，上文公开的 GPCR 融合蛋白也与非内源组成型活化的 GPCR 一起应用。当使用所述蛋白时，测定内差异看起来基本稳定，由此获得有效的信噪比。其良好结果是允许更可靠地鉴定候选化合物。因此，在一些实施方案中，优选在直接鉴定时使用 GPCR 融合蛋白，并且当使用所述融合蛋白时，利用下
10 面测定方法。

1. 膜制备

最好如下制备包含目标组成型有活性的孤独 GPCR 融合蛋白、并且用于直接鉴定可用作反激动剂或激动剂的候选化合物的膜：

15 a. 材料

“膜刮除缓冲液”包含 20 mM HEPES 和 10 mM EDTA, pH 7.4; “膜洗涤缓冲液”包含 20 mM HEPES 和 0.1 mM EDTA, pH 7.4; “结合缓冲液”包含 20 mM HEPES, 100 mM NaCl 和 10 mM MgCl₂, pH 7.4。

20 b. 方法

整个方法过程中所有物质都保存在冰上。首先从汇合的单层细胞上吸走培养基，用 10 ml 冷 PBS 清洗，然后吸走 PBS。此后，加入 5 ml 膜刮除缓冲液脱落细胞；然后将细胞提取物转移进 50 ml 离心管(4℃下在 20,000 rpm 离心 17 分钟)。此后，吸走上清，将沉淀重悬浮于 30 ml 膜洗涤缓冲液，4℃下在 20,000 rpm 离心 17 分钟。吸走上清，将沉淀重悬浮于结合缓冲液。然后使用 Brinkman Polytron™匀浆器匀浆所述重悬浮的沉淀(破碎 15-20 秒钟，直到物质形成悬浮液)。该物质在本文中称为“膜蛋白”。

25

2. Bradford 蛋白测定

匀浆后，测定所述膜的蛋白浓度，例如使用 Bradford 蛋白测定方法进行测定(稀释蛋白到约 1.5 mg/ml，等分并冰冻(-80℃)等待以后使用；冰冻时，使用方法如下：测定那一天，室温下解冻冰冻的膜蛋白，然后旋涡振荡，用 Polytron 在约 12 x 1,000 rpm 匀浆约 5-10 秒钟；注意在多次制备时，所述匀浆器在匀浆不同制备物之间应当充分清洁)。

a. 材料

结合缓冲液(如上文所述)；Bradford 染料试剂；按照生产商的指导使用 Bradford 蛋白标准(Biorad, 目录号 500-0006)。

b. 方法

制备两份管，一份管包括膜，另一份管作为对照“空白”。每管包含 800 μ l 结合缓冲液。此后，每管加入 10 μ l Bradford 蛋白标准(1 mg/ml)，在其中一管加入 10 μ l 膜蛋白(不是空白管)。此后，每管加入 200 μ l Bradford 染料试剂，旋涡振荡。五分钟后，再次旋涡振荡两管，将其中的物质转移到比色杯。使用 CECIL 3041 分光光度计在波长 595 对所述比色杯读数。

3. 直接鉴定测定

a. 材料

GDP 缓冲液含 37.5 ml 结合缓冲液和 2 mg GDP (Sigma, 目录号 G-7127)，在结合缓冲液中顺序稀释获得 0.2 μ M GDP 的浓度(每孔中 GDP 的最终浓度是 0.1 μ M GDP)；每孔的最终体积是 200 μ l，包含候选化合物、100 μ l GDP 缓冲液(最终浓度 0.1 μ M GDP)、50 μ l 结合缓冲液中的膜蛋白和 50 μ l 结合缓冲液中的 [35 S]GTP γ S (0.6 nM) (每 10 ml 结合缓冲液 2.5 μ l [35 S]GTP γ S)。

b. 方法

最好使用 96 孔板筛选候选化合物(可以冰冻在-80℃)。简单匀浆膜蛋白(或携带表达载体的膜作为对照，所述表达载体不含所述 GPCR

融合蛋白)直到成为悬浮液。然后使用例如上文所述的 Bradford 蛋白测定方法测定蛋白浓度。用结合缓冲液稀释膜蛋白(和对照)到 0.25 mg/ml (最终测定浓度 12.5 μ g/孔)。此后, 每个 Wallac Scintistrip™ (Wallac)孔加入 100 μ l GDP 缓冲液。然后使用 5 μ l 加样工具在所述孔中转移 5 μ l 候选化合物(即在总测定体积 200 μ l 中占 5 μ l, 构成 1:40 的比例, 使得所述候选化合物的最终筛选浓度是 10 μ M)。此外, 为避免污染, 每个转移步骤后都在三个池内清洗加样工具, 所述三个池盛有水(1X)、乙醇(1X)和水(2X), 每次清洗后从加样工具甩去多余液体, 用纸和 Kim 抹布擦干所述工具。此后, 每孔加入 50 μ l 膜蛋白(也利用对照孔, 该孔包含没有所述 GPCR 融合蛋白的膜), 室温下温育 5-10 分钟。此后, 每孔加入 50 μ l 结合缓冲液内的 [35 S]GTP γ S (0.6 nM), 然后在摇床内室温下温育 60 分钟(同样, 在本实施例中, 用箔片覆盖平板)。通过在 22 $^{\circ}$ C 下以 4000 RPM 离心所述平板 15 分钟, 终止测定。用 8 通道多支管吸走平板中的液体, 用平板盖封口。然后所述平板在 Wallac 1450 上使用设置 “Prot. #37” 读数(根据生产商的指导)。

B. 环状 AMP 测定

直接鉴定候选化合物的另一种测定方法可以使用基于环化酶的测定完成。除直接鉴定外, 可以利用本测定方法作为独立性的方法, 确认根据上文所述 [35 S]GTP γ S 方法获得的结果。

最好根据下面方法, 利用改良 Flash Plate™腺苷酸环化酶试剂盒 (New England Nuclear; 目录号 SMP004A)直接鉴定可用作 GPCR 反激动剂和激动剂的候选化合物。

转染后约三天收获转染细胞。匀浆在含 20 mM HEPES, pH7.4 和 10 mM MgCl₂ 的缓冲液内悬浮的细胞, 制备膜。使用 Brinkman Polytron™在冰上匀浆约 10 秒钟。得到的匀浆物在 4 $^{\circ}$ C 下于 49,000 X g 离心 15 分钟。得到的沉淀重悬浮于含 20 mM HEPES, pH 7.4 和 0.1 mM EDTA 的缓冲液内, 匀浆 10 秒钟, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下于 49,000 X g 离心 15

分钟。得到的沉淀保存在-80℃直到使用。在直接鉴定筛选的那一天，在室温下缓慢融化所述膜沉淀，重悬浮于含 20 mM HEPES, pH 7.4 和 10 mM MgCl₂ 的缓冲液，使得最终蛋白浓度为 0.60 mg/ml (所述重悬浮的膜置于冰上直到使用)。

- 5 按照生产商的指导制备和维持 cAMP 标准和检测缓冲液(在 11 ml 检测缓冲液内含 2 μCi 示踪物 [¹²⁵I cAMP (100 μl)]。新鲜制备用于筛选的测定缓冲液，所述缓冲液含 20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM 磷酸肌酸(Sigma), 0.1 单位/ml 肌酸磷酸激酶(Sigma), 50 μM GTP (Sigma)和 0.2 mM ATP (Sigma); 测定缓冲液保存在冰上直到使用。
- 10

最好将如上文鉴定的候选化合物(如果冰冻，则在室温下解冻)加入 96 孔板的孔内(3 μl/孔;最终测定浓度 12 μM)，并且加入 40 μl 膜蛋白(30 μg/孔)和 50 μl 测定缓冲液。所述混合物在室温下温和搅拌温育 30 分钟。

- 15 温育后，每孔加入 100 μl 测定缓冲液，然后温育 2-24 小时。然后在 Wallac MicroBeta™读板机上使用“Prot.#31”读板(根据生产商的指导)。

C. 黑素细胞筛选测定

- 可以如下进行鉴定 GPCR 候选激动剂或反激动剂的方法：引入色素细胞系的测试细胞，所述测试细胞能够应对特定刺激分散或聚集它们的色素，并表达编码所述 GPCR 的外源克隆。假如所述 GPCR 的活化诱导色素分散，则刺激物(如光)设置色素处理的起始状态为色素聚集在测试细胞内。然而，假如所述 GPCR 的活化诱导色素聚集，则用刺激物刺激细胞设置色素沉积的起始状态为色素分散。使所述测试细胞与所述化合物接触，确定细胞内的色素处理是否从色素处理的起始状态改变。与所述 GPCR 偶联候选化合物引起的色素细胞分散在培养皿上看起来较暗，而色素细胞的聚集看起来叫亮。
- 20
- 25

材料和方法根据美国专利号 5,462,856 和美国专利号 6,051,386

的公开内容，这两份公开物通过引用结合到本文中。

虽然为利用内源和非内源性人 GPCR 的目的，本领域内技术人员可以利用各种表达载体，但在一些实施方案中优选所利用的载体是 pCMV。该载体按照国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约规定于 1998 年 10 月 13 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)。所述 DNA 经过 ATCC 测试，确认是有活力的。ATCC 已经对 pCMV 给予如下保藏号：ATCC #203351。

除专门指明外，本专利文件中引用的参考文献，包括共同未决和相关专利申请都通过引用完整地结合到本文中。上面的公开方案和下面的权利要求包括在技术人员能力范围内的对所公开发明的修改和扩展。

-
- 5 <110> Arena Pharmaceuticals, Inc.
- <120> 内源和非内源组成型活化人 G 蛋白偶联受体
- <130> AREN-0309
- <150> 09/170,496
- <151> 1998-10-13
- <150> PCT/US99/23938
- <151> 1998-10-13
- <150> 60/253,404
- <151> 2000-11-27
- <150> 60/255,366
- <151> 2000-12-12
- <150> 60/270,286
- <151> 2001-02-20
- <150> 60/282,365
- <151> 2001-04-06
- <150> 60/270,266
- <151> 2001-02-20
- <150> 60/282,032
- <151> 2001-04-06
- <150> 60/282,358
- <151> 2001-04-06
- <150> 60/282,356
- <151> 2001-04-06
- <150> 60/290,917
- <151> 2001-05-14
- <150> 60/309,208
- <151> 2001-07-31
- <160> 67
- 10 <170> PatentIn 版本 3.1
- <210> 1
- <211> 1002
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- 15 <220>
- <223> 新型序列

```

<400> 1
atgtggagct gcagctgggt caacggcaca gggctgggtg aggagctgcc tgcctgccag    60
gacctgcagc tggggctgtc actgttgctc ctgctgggcc tgggtgggtgg cgtgccagtg    120
ggcctgtgct acaacgccct gctgggtgctg gccaacctac acagcaaggc cagcatgacc    180
atgccggacg tgtactttgt caacatggca gtggcaggcc tgggtgctcag cgccctggcc    240
cctgtgcacc tgctcggccc cccgagctcc cgggtgggcgc tgtggagtgt gggcggcgaa    300
gtccacgtgg cactgcagat ccccttcaat gtgtcctcac tgggtggccat gtactccacc    360
gccctgtctg gcctcgacca ctacatcgag cgtgcactgc cgcggaccta catggccagc    420
gtgtacaaca cgcggcacgt gtgcggcttc gtgtggggtg gcgcgctgct gaccagcttc    480
tcctcgctgc tcttctacat ctgcagccat gtgtccacc gcgcgctaga gtgcgccaag    540
atgcagaacg cagaagctgc cgacgccacg ctggtgttca tcggctacgt ggtgccagca    600
ctggccaccc tctacgcgct ggtgctactc tcccgcgtcc gcagggagga caccgccctg    660
gaccgggaca cgggccgggt ggagccctcg gcacacaggc tgcctgggtgc caccgtgtgc    720
acgcagtttg ggctctggac gccacactat ctgatcctgc tggggcacac ggtcatcatc    780
tcgcgaggga agcccggtga cgcacactac ctggggctac tgcactttgt gaaggatttc    840
tccaaactcc tggccttctc cagcagcttt gtgacaccac ttctctaccg ctacatgaac    900
cagagcttcc ccagcaagct ccaacggctg atgaaaagc tgccctgcgg ggaccggcac    960
tgctccccgg accacatggg ggtgcagcag gtgctggcgt ag                                1002

```

```

<210> 2
<211> 333
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

5
<220>
<223> 新型序列

```

<400> 2

Met Trp Ser Cys Ser Trp Phe Asn Gly Thr Gly Leu Val Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Pro Ala Cys Gln Asp Leu Gln Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Leu Leu
 20 25 30

Gly Leu Val Val Gly Val Pro Val Gly Leu Cys Tyr Asn Ala Leu Leu
 35 40 45

Val Leu Ala Asn Leu His Ser Lys Ala Ser Met Thr Met Pro Asp Val
 50 55 60

Tyr Phe Val Asn Met Ala Val Ala Gly Leu Val Leu Ser Ala Leu Ala
 65 70 75 80

Pro Val His Leu Leu Gly Pro Pro Ser Ser Arg Trp Ala Leu Trp Ser
 85 90 95

Val Gly Gly Glu Val His Val Ala Leu Gln Ile Pro Phe Asn Val Ser
 100 105 110

Ser Leu Val Ala Met Tyr Ser Thr Ala Leu Leu Ser Leu Asp His Tyr

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

<210> 3
 <211> 918
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 3	
atgcctggcc acaatacctc caggaattcc tcttgcgac ctatagtgac accccactta	60
atcagcctct acttcatagt gcttattggc gggctgggtg gtgtcatttc cattcttttc	120
ctcctggtga aatgaacac ccggtcagt accaccatgg cggtcattaa cttggtggtg	180

```

gtccacagcg tttttctgct gacagtgcc tttcgcttga cctacctcat caagaagact    240
tggaatgttt ggctgccctt ctgcaaattt gtgagtgcc tgctgcacat ccacatgtac    300
ctcacgttcc tattctatgt ggtgatcctg gtcaccagat acctcatctt cttcaagtgc    360
aaagacaaag tgg12aattcta cagaaaactg catgctgtgg ctgccagtgc tggcatgtgg    420
acgctgggtga ttgtcattgt ggtacccttg gttgtctccc ggtatggaat ccatgaggaa    480
tacaatgagg agcactgttt taaatttcac aaagagcttg cttacacata tgtgaaaatc    540
atcaactata tgatagtcac ttttgtcata gccgttgctg tgattctggt ggtcttccag    600
gtcttcatca ttatgttgat ggtgcagaag ctacgccact ctttactatc ccaccaggag    660
ttctgggctc agctgaaaaa cctatTTTTT ataggggtca tccttgtttg tttccttccc    720
taccagttct ttaggatcta ttacttgaat gttgtgacgc attccaatgc ctgtaacagc    780
aaggttgcat ttataacga aatcttcttg agtgaacag caattagctg ctatgatttg    840
cttctctttg tctttggggg aagccattgg ttttaagcaa agataattgg cttatggaat    900
tgtgttttgt gccgttag                                     918

```

```

<210> 4
<211> 305
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 4

```

```

Met Pro Gly His Asn Thr Ser Arg Asn Ser Ser Cys Asp Pro Ile Val
1          5          10          15

```

```

Thr Pro His Leu Ile Ser Leu Tyr Phe Ile Val Leu Ile Gly Gly Leu
20          25          30

```

```

Val Gly Val Ile Ser Ile Leu Phe Leu Leu Val Lys Met Asn Thr Arg
35          40          45

```

```

Ser Val Thr Thr Met Ala Val Ile Asn Leu Val Val Val His Ser Val
50          55          60

```

```

Phe Leu Leu Thr Val Pro Phe Arg Leu Thr Tyr Leu Ile Lys Lys Thr
65          70          75          80

```

```

Trp Met Phe Gly Leu Pro Phe Cys Lys Phe Val Ser Ala Met Leu His
85          90          95

```

```

Ile His Met Tyr Leu Thr Phe Leu Phe Tyr Val Val Ile Leu Val Thr
100         105         110

```

```

Arg Tyr Leu Ile Phe Phe Lys Cys Lys Asp Lys Val Glu Phe Tyr Arg
115         120         125

```

Lys Leu His Ala Val Ala Ala Ser Ala Gly Met Trp Thr Leu Val Ile
130 135 140

Val Ile Val Val Pro Leu Val Val Ser Arg Tyr Gly Ile His Glu Glu
145 150 155 160

Tyr Asn Glu Glu His Cys Phe Lys Phe His Lys Glu Leu Ala Tyr Thr
165 170 175

Tyr Val Lys Ile Ile Asn Tyr Met Ile Val Ile Phe Val Ile Ala Val
180 185 190

Ala Val Ile Leu Leu Val Phe Gln Val Phe Ile Ile Met Leu Met Val
195 200 205

Gln Lys Leu Arg His Ser Leu Leu Ser His Gln Glu Phe Trp Ala Gln
210 215 220

Leu Lys Asn Leu Phe Phe Ile Gly Val Ile Leu Val Cys Phe Leu Pro
225 230 235 240

Tyr Gln Phe Phe Arg Ile Tyr Tyr Leu Asn Val Val Thr His Ser Asn
245 250 255

Ala Cys Asn Ser Lys Val Ala Phe Tyr Asn Glu Ile Phe Leu Ser Val
260 265 270

Thr Ala Ile Ser Cys Tyr Asp Leu Leu Leu Phe Val Phe Gly Gly Ser
275 280 285

His Trp Phe Lys Gln Lys Ile Ile Gly Leu Trp Asn Cys Val Leu Cys
290 295 300

Arg
305

<210> 5

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

5

<223> 新型序列

<400> 5
atgctgacag ggagctgcgg ggaccctcag aaaaagccac aggtgaccca ggactcaggg 60
ccccagagca tggggcttga gggacgagag acagctggcc agccacgagt gaccctgctg 120
cccacgcca acgtcagcgg gctgagccag gagtttga aa gccactggcc agagatcgca 180
gagaggtccc cgtgtgtggc tggcgtcatc cctgtcatct actacagtgt cctgctgggc 240

```

ttggggctgc ctgtcagcct cctgaccgca gtggccctgg cgcgccctgc caccaggacc 300
aggaggccct cctactacta ccttctggcg ctacacagcct cggatatcat catccagggtg 360
gtcatcgtgt tcgcggggctt cctcctgcag ggagcagtgc tggcccgcca ggtgccccag 420
gctgtgggtgc gcacggccaa catcctggag tttgctgcc accacgcctc agtctggatc 480
gccatcctgc tcacggttga ccgctacact gccctgtgcc accccctgca ccatcggggc 540
gcctcgtccc caggccggac ccgcggggc attgctgctg tcctgagtgc tgccctgttg 600
accggcatcc ccttctactg gtggctggac atgtggagag acaccgactc accagaaca 660
ctggacgagg tcctcaagtg ggctcactgt ctcaactgtct atttcatccc ttgtggcgtg 720
ttcctgggtca ccaactcggc catcatccac cggctacgga ggaggggccc gagtgggctg 780
cagccccggg tgggcaagag cacagccatc ctctgggca tcaccacact gttcaccctc 840
ctgtggggcg cccgggtctt cgtcatgctc taccacatgt acgtggccc tgccaccgg 900
gactggaggg tccacctggc cttggatgtg gccaatatgg tggccatgct ccacacggca 960
gccaacttcg gcctctactg ctttgtcagc aagactttcc gggccactgt ccgacaggtc 1020
atccacgatg cctacctgcc ctgcactttg gcacacagc cagagggcat ggcggcgaag 1080
cctgtgatgg agcctccggg actccccaca ggggcagaag tgtag 1125

```

<210> 6

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

5

<223> 新型序列

<400> 6

```

Met Leu Thr Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gln Lys Lys Pro Gln Val Thr
1           5           10           15

```

```

Gln Asp Ser Gly Pro Gln Ser Met Gly Leu Glu Gly Arg Glu Thr Ala
20           25           30

```

```

Gly Gln Pro Arg Val Thr Leu Leu Pro Thr Pro Asn Val Ser Gly Leu
35           40           45

```

```

Ser Gln Glu Phe Glu Ser His Trp Pro Glu Ile Ala Glu Arg Ser Pro
50           55           60

```

```

Cys Val Ala Gly Val Ile Pro Val Ile Tyr Tyr Ser Val Leu Leu Gly
65           70           75           80

```

```

Leu Gly Leu Pro Val Ser Leu Leu Thr Ala Val Ala Leu Ala Arg Leu
85           90           95

```

```

Ala Thr Arg Thr Arg Arg Pro Ser Tyr Tyr Tyr Leu Leu Ala Leu Thr

```

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

Pro Thr Gly Ala Glu Val
370

<210> 7

<211> 1086

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

5 <223> 新型序列

<400> 7

```

atgtccactg aatgcgcgcg ggcagcgggc gacgcgccct tgcgcagcct ggagcaagcc    60
aacgcacccc gctttccctt cttctccgac gtcaagggcg accaccggct ggtgctggcc    120
gcgggtggaga caaccgtgct ggtgctcacc tttgcagtgt cgctgctggg caacgtgtgc    180
gccctggtgc tgggtggcgcg ccgacgacgc cgcggcgcga ctgcctgcct ggtactcaac    240
ctcttctgcg cggacctgct cttcatcagc gctatccctc tgggtgctggc cgtgcgctgg    300
actgaggcct ggctgctggg ccccgttgcc tgccacctgc tcttctacgt gatgacctg    360
agcggcagcg tcaccatcct cacgctggcc gcggtcagcc tggagcgcat ggtgtgcacc    420
gtgcacctgc agcgcggcgt gcggggtcct gggcggcggg cgcgggcagt gctgctggcg    480
ctcatatggg gctattcggc ggtcgccgct ctgcctctat gcgtottctt ccgagtcgtc    540
ccgcaacggc tccccggcgc cgaccaggaa atttcgattt gcacactgat ttggcccacc    600
atttcctggag agatctcgtg ggatgtctct tttgttactt tgaacttctt ggtgccagga    660
ctggtcattg tgatcagtta ctccaaaatt ttacagatca caaaggcatc aaggaagagg    720
ctcacggtaa gcctggccta ctoggagagc caccagatcc gogtgtccca gcaggacttc    780
cggctcttcc gcacctctt cctcctcatg gtctccttct tcatcatgtg gagccccatc    840
atcatcacca tcctcctcat cctgatccag aacttcaagc aagacctggt catctggccg    900
tccctcttct tctgggtggt ggccttcaca tttgctaatt cagccctaaa ccccatcctc    960
tacaacatga cactgtgcag gaatgagtgg aagaaaattt tttgctgctt ctggttccca   1020
gaaaagggag ccattttaac agacacatct gtcaaaagaa atgacttgtc gattatttct   1080
ggctaa                                           1086

```

<210> 8

<211> 361

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

10 <223> 新型序列

<400> 8

```

Met Ser Thr Glu Cys Ala Arg Ala Ala Gly Asp Ala Pro Leu Arg Ser
1          5          10          15

```

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

	275	280	285	
	Ile Gln Asn Phe Lys Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe 290 295 300			
	Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu 305 310 315 320			
	Tyr Asn Met Thr Leu Cys Arg Asn Glu Trp Lys Lys Ile Phe Cys Cys 325 330 335			
	Phe Trp Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Asp Thr Ser Val Lys 340 345 350			
	Arg Asn Asp Leu Ser Ile Ile Ser Gly 355 360			
	<210> 9			
	<211> 1038			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
5	<223> 新型序列			
	<400> 9			
	atgagcagca attcatccct gctggtggct gtgcagctgt gctacgcgaa cgtgaatggg			60
	tcctgtgtga aaatcccctt ctgcgcggga tcccgggtga ttctgtacat agtgtttggc			120
	tttggggctg tgctggctgt gtttggaac ctctggtga tgatttcaat cctccatttc			180
	aagcagctgc actctccgac caattttctc gttgcctctc tggcctgcgc tgatttcttg			240
	gtgggtgtga ctgtgatgcc cttcagcatg gtcaggacgg tggagagctg ctggtatttt			300
	gggaggagtt tttgtacttt ccacacctgc tgtgatgtgg cattttgtta ctcttctctc			360
	tttcaattgt gttcatctc catcgacagg tacattgcgg ttactgaccc cctggtctat			420
	cctaccaagt tcaccgtatc tgtgtcagga atttgcatca gcgtgtcctg gatcctgccc			480
	ctcatgtaca gcggtgctgt gttctacaca ggtgtctatg acgatgggct ggaggaatta			540
	tctgatgccc taaactgtat aggaggttgt cagaccgttg taaatcaaaa ctgggtgttg			600
	acagattttc tatccttctt tatacctacc tttattatga taattctgta tggtaacata			660
	tttcttgttg ctgacgaca ggcgaaaaag atagaaaata ctggtagcaa gacagaatca			720
	tcctcagaga gttacaaagc cagagtggcc aggagagaga gaaaagcagc taaaaccctg			780
	ggggtcacag tggtagcatt tatgatttca tggttaccat atagcattga ttcattaatt			840
	gatgccttta tgggctttat aaccctgcc tgtatttatg agatttgctg ttggtgtgct			900
	tattataact cagccatgaa tcctttgatt tatgctttat tttacccatg gtttaggaaa			960
	gcaataaaaag ttattgtaac tggtcaggtt ttaaagaaca gttcagcaac catgaatttg			1020

ttttctgaac atatataa 1038

<210> 10
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> 人工序列

5 <220>
 <223> 新型序列

<400> 10

Met Ser Ser Asn Ser Ser Leu Leu Val Ala Val Gln Leu Cys Tyr Ala
 1 5 10 15

Asn Val Asn Gly Ser Cys Val Lys Ile Pro Phe Ser Pro Gly Ser Arg
 20 25 30

Val Ile Leu Tyr Ile Val Phe Gly Phe Gly Ala Val Leu Ala Val Phe
 35 40 45

Gly Asn Leu Leu Val Met Ile Ser Ile Leu His Phe Lys Gln Leu His
 50 55 60

Ser Pro Thr Asn Phe Leu Val Ala Ser Leu Ala Cys Ala Asp Phe Leu
 65 70 75 80

Val Gly Val Thr Val Met Pro Phe Ser Met Val Arg Thr Val Glu Ser
 85 90 95

Cys Trp Tyr Phe Gly Arg Ser Phe Cys Thr Phe His Thr Cys Cys Asp
 100 105 110

Val Ala Phe Cys Tyr Ser Ser Leu Phe His Leu Cys Phe Ile Ser Ile
 115 120 125

Asp Arg Tyr Ile Ala Val Thr Asp Pro Leu Val Tyr Pro Thr Lys Phe
 130 135 140

Thr Val Ser Val Ser Gly Ile Cys Ile Ser Val Ser Trp Ile Leu Pro
 145 150 155 160

Leu Met Tyr Ser Gly Ala Val Phe Tyr Thr Gly Val Tyr Asp Asp Gly
 165 170 175

Leu Glu Glu Leu Ser Asp Ala Leu Asn Cys Ile Gly Gly Cys Gln Thr
 180 185 190

Val Val Asn Gln Asn Trp Val Leu Thr Asp Phe Leu Ser Phe Phe Ile
 195 200 205

Pro Thr Phe Ile Met Ile Ile Leu Tyr Gly Asn Ile Phe Leu Val Ala

210	215	220
Arg Arg Gln Ala Lys Lys Ile Glu Asn Thr Gly Ser Lys Thr Glu Ser 225 230 235 240		
Ser Ser Glu Ser Tyr Lys Ala Arg Val Ala Arg Arg Glu Arg Lys Ala 245 250 255		
Ala Lys Thr Leu Gly Val Thr Val Val Ala Phe Met Ile Ser Trp Leu 260 265 270		
Pro Tyr Ser Ile Asp Ser Leu Ile Asp Ala Phe Met Gly Phe Ile Thr 275 280 285		
Pro Ala Cys Ile Tyr Glu Ile Cys Cys Trp Cys Ala Tyr Tyr Asn Ser 290 295 300		
Ala Met Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Leu Phe Tyr Pro Trp Phe Arg Lys 305 310 315 320		
Ala Ile Lys Val Ile Val Thr Gly Gln Val Leu Lys Asn Ser Ser Ala 325 330 335		
Thr Met Asn Leu Phe Ser Glu His Ile 340 345		

<210> 11

<211> 1020

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 新型序列

<400> 11

```

atgatgccct tttgccacaa tataattaat atttccctgtg tgaaaaacaa ctgggtcaaat    60
gatgtccgtg cttccctgta cagtttaatg gtgctcataa ttctgaccac actcgttggc    120
aatctgatag ttattgtttc tatatcacac ttcaaacaac ttcatacccc aacaaattgg    180
ctcattcatt ccatggccac tgtggacttt cttctgggggt gtctgggtcat gccttacagt    240
atgggtgagat ctgetgagca ctggttggtat tttggagaag tcttctgtaa aattcacaca    300
agcaccgaca ttatgctgag ctcagcctcc attttccatt tgtctttcat ctccattgac    360
cgctactatg ctgtgtgtga tccactgaga tataaagcca agatgaatat cttgggttatt    420
tgtgtgatga tcttcattag ttggagtgtc cctgctgttt ttgcatttgg aatgatcttt    480
ctggagctaa acttcaaagg cgctgaagag atatattaca aacatgttca ctgcagagga    540
ggttgctctg tcttcttttag caaaatatct ggggtactga cctttatgac ttctttttat    600
atacctggat ctattatggt atgtgtctat tacagaatat atcttatcgc taaagaacag    660

```

```

gcaagattaa ttagtgatgc caatcagaag ctccaaattg gattggaaat gaaaaatgga 720
atttcacaaa gcaaagaaag gaaagctgtg aagacattgg ggattgtgat gggagttttc 780
ctaatatgct ggtgcccttt ctttatctgt acagtcattg acccttttct tcactacatt 840
attccaccta ctttgaatga tgtattgatt tggtttggt acttgaactc tacatttaat 900
ccaatgggtt atgcattttt ctatccttgg tttagaaaag cactgaagat gatgctgttt 960
ggtaaaattt tccaaaaaga ttcattccagg tgtaaattat ttttgaatt gagttcatag 1020

```

<210> 12

<211> 339

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

5

<223> 新型序列

<400> 12

```

Met Met Pro Phe Cys His Asn Ile Ile Asn Ile Ser Cys Val Lys Asn
1           5           10           15

```

```

Asn Trp Ser Asn Asp Val Arg Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Met Val Leu
          20           25           30

```

```

Ile Ile Leu Thr Thr Leu Val Gly Asn Leu Ile Val Ile Val Ser Ile
          35           40           45

```

```

Ser His Phe Lys Gln Leu His Thr Pro Thr Asn Trp Leu Ile His Ser
          50           55           60

```

```

Met Ala Thr Val Asp Phe Leu Leu Gly Cys Leu Val Met Pro Tyr Ser
65           70           75           80

```

```

Met Val Arg Ser Ala Glu His Cys Trp Tyr Phe Gly Glu Val Phe Cys
          85           90           95

```

```

Lys Ile His Thr Ser Thr Asp Ile Met Leu Ser Ser Ala Ser Ile Phe
          100          105          110

```

```

His Leu Ser Phe Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Tyr Ala Val Cys Asp Pro
          115          120          125

```

```

Leu Arg Tyr Lys Ala Lys Met Asn Ile Leu Val Ile Cys Val Met Ile
          130          135          140

```

```

Phe Ile Ser Trp Ser Val Pro Ala Val Phe Ala Phe Gly Met Ile Phe
145           150          155          160

```

```

Leu Glu Leu Asn Phe Lys Gly Ala Glu Glu Ile Tyr Tyr Lys His Val
          165          170          175

```

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

<210> 13
 <211> 1029
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 新型序列

<400> 13
 atgaccagca atttttccca acctgttgtg cagctttgct atgaggatgt gaatggatct 60
 tgtattgaaa ctccctattc tcctgggtcc cgggtaattc tgtacacggc gtttagcttt 120
 gggctctttgc tggctgtatt tggaatctc ttagtaatga cttctgttct tcattttaag 180
 cagctgcact ctccaaccaa ttttctcatt gcctctctgg cctgtgctga cttcttggtg 240
 ggtgtgactg tgatgctttt cagcatgggc aggacggcgg agagctgctg gtattttgga 300
 gccaaatatt gtactcttca cagttgctgt gatgtggcat tttgttactc ttctgtcttc 360

```

cacttgtgct tcattctgcat cgacaggtag atttgtggtta ctgatccctt ggtctatgct    420
accaagttca ccgtgtctgt gtgggaatt tgcacagcg tgcctggat tctgcctctc    480
acgtacagcg gtgctgtgtt ctacacaggt gtcaatgatg atgggctgga ggaattagta    540
agtgctctca actgcgtagg tggctgtcaa attattgtaa gtcaaggctg ggtgttgata    600
gattttctgt tattcttcat acctaccctt gttatgataa ttctttacag taagattttt    660
cttatagcta aacaacaagc tataaaaatt gaaactacta gtagcaaagt agaatcatcc    720
tcagagagtt ataaaatcag agtggccaag agagagagga aagcagctaa aaccctgggg    780
gtcacggtag tagcatttgt ttttcatggt ttaccgtata cagttgatat attaattgat    840
gcctttatgg gcttcctgac ccctgcctat atctatgaaa tttgctgttg gagtgttat    900
tataactcag ccatgaatcc tttgatttat gctctatttt atccttggtt taggaaagcc    960
ataaaactta ttttaagtgg agatgtttta aaggctagtt catcaaccat tagttttatt  1020
ttagaataa                                1029

```

<210> 14

<211> 342

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新型序列

<400> 14

```

Met Thr Ser Asn Phe Ser Gln Pro Val Val Gln Leu Cys Tyr Glu Asp
1      5      10      15

```

```

Val Asn Gly Ser Cys Ile Glu Thr Pro Tyr Ser Pro Gly Ser Arg Val
      20      25      30

```

```

Ile Leu Tyr Thr Ala Phe Ser Phe Gly Ser Leu Leu Ala Val Phe Gly
      35      40      45

```

```

Asn Leu Leu Val Met Thr Ser Val Leu His Phe Lys Gln Leu His Ser
      50      55      60

```

```

Pro Thr Asn Phe Leu Ile Ala Ser Leu Ala Cys Ala Asp Phe Leu Val
      65      70      75      80

```

```

Gly Val Thr Val Met Leu Phe Ser Met Val Arg Thr Val Glu Ser Cys
      85      90      95

```

```

Trp Tyr Phe Gly Ala Lys Phe Cys Thr Leu His Ser Cys Cys Asp Val
      100      105      110

```

```

Ala Phe Cys Tyr Ser Ser Val Leu His Leu Cys Phe Ile Cys Ile Asp
      115      120      125

```

```

Arg Tyr Ile Val Val Thr Asp Pro Leu Val Tyr Ala Thr Lys Phe Thr
 130                      135                      140

Val Ser Val Ser Gly Ile Cys Ile Ser Val Ser Trp Ile Leu Pro Leu
145                      150                      155                      160

Thr Tyr Ser Gly Ala Val Phe Tyr Thr Gly Val Asn Asp Asp Gly Leu
                      165                      170                      175

Glu Glu Leu Val Ser Ala Leu Asn Cys Val Gly Gly Cys Gln Ile Ile
                      180                      185                      190

Val Ser Gln Gly Trp Val Leu Ile Asp Phe Leu Leu Phe Phe Ile Pro
                      195                      200                      205

Thr Leu Val Met Ile Ile Leu Tyr Ser Lys Ile Phe Leu Ile Ala Lys
 210                      215                      220

Gln Gln Ala Ile Lys Ile Glu Thr Thr Ser Ser Lys Val Glu Ser Ser
225                      230                      235                      240

Ser Glu Ser Tyr Lys Ile Arg Val Ala Lys Arg Glu Arg Lys Ala Ala
                      245                      250                      255

Lys Thr Leu Gly Val Thr Val Leu Ala Phe Val Ile Ser Trp Leu Pro
                      260                      265                      270

Tyr Thr Val Asp Ile Leu Ile Asp Ala Phe Met Gly Phe Leu Thr Pro
                      275                      280                      285

Ala Tyr Ile Tyr Glu Ile Cys Cys Trp Ser Ala Tyr Tyr Asn Ser Ala
 290                      295                      300

Met Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Leu Phe Tyr Pro Trp Phe Arg Lys Ala
305                      310                      315                      320

Ile Lys Leu Ile Leu Ser Gly Asp Val Leu Lys Ala Ser Ser Ser Thr
                      325                      330                      335

Ile Ser Leu Phe Leu Glu
                      340

```

<210> 15

<211> 1062

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 新型序列

<400> 15

```

atggagcaca cgcacgccc cctcgcagcc aacagctcgc tgtcttggtg gtccccggc      60
tcggcctgcg gcttggggtt cgtgcccggtg gtctactaca gcctcttgot gtgcctcggt      120
ttaccagcaa atatcttgac agtgatcatc ctctcccagc tggtaggcaag aagacagaag      180
tcctcctaca actatctctt ggcactcgtc gctgccgaca tcttggtcct ctttttcata      240
gtgtttgtgg acttcctggt ggaagatttc atcttgaaca tgcagatgcc tcagggtccc      300
gacaagatca tagaagtgtc ggaattctca tccatccaca cctccatag gattactgta      360
ccgttaacca ttgacaggta tatcgtgtc tgccaccgc tcaagtacca cacgggtctca      420
taccagccc gcacccggaa agtcattgta agtggtttaca tcacctgctt cctgaccagc      480
atccctatt actgggtggc caacatctgg actgaagact acatcagcac ctctgtgcat      540
cacgtcctca tctggatcca ctgcttcacc gtctacctgg tgccctgctc catcttcttc      600
atcttgaact caatcattgt gtacaagctc aggaggaaga gcaattttcg tctccgtggc      660
tactccacgg ggaagaccac cgccatcttg ttcaccatta cctccatctt tgccacactt      720
tgggccccc gcacatcat gattctttac cacctctatg gggcgcccat ccagaaccgc      780
tggctggtgc acatcatgtc cgacattgcc aacatgctag cccttctgaa cacagccatc      840
aactttctcc tctactgctt catcagcaag cggttccgca ccatggcagc cgccacgctc      900
aaggctttct tcaagtgcc gaagcaacct gtacagttct acaccaatca taacttttcc      960
ataacaagta gccoctggat ctgccggca aactcacact gcacaaagat gctggtgtac     1020
cagtatgaca aaaatggaaa acctataaaa gtatccccgt ga                        1062

```

<210> 16
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 新型序列

5

<400> 16

Met Glu His Thr His Ala His Leu Ala Ala Asn Ser Ser Leu Ser Trp
 1 5 10 15

Trp Ser Pro Gly Ser Ala Cys Gly Leu Gly Phe Val Pro Val Val Tyr
 20 25 30

Tyr, Ser Leu Leu Leu Cys Leu Gly Leu Pro Ala Asn Ile Leu Thr Val
 35 40 45

Ile Ile Leu Ser Gln Leu Val Ala Arg Arg Gln Lys Ser Ser Tyr Asn
 50 55 60

Tyr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ile Leu Val Leu Phe Phe Ile
 65 70 75 80

Val Phe Val Asp Phe Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Asn Met Gln Met
 85 90 95

Pro Gln Val Pro Asp Lys Ile Ile Glu Val Leu Glu Phe Ser Ser Ile
 100 105 110

His Thr Ser Ile Trp Ile Thr Val Pro Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Ile
 115 120 125

Ala Val Cys His Pro Leu Lys Tyr His Thr Val Ser Tyr Pro Ala Arg
 130 135 140

Thr Arg Lys Val Ile Val Ser Val Tyr Ile Thr Cys Phe Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Ile Pro Tyr Tyr Trp Trp Pro Asn Ile Trp Thr Glu Asp Tyr Ile Ser
 165 170 175

Thr Ser Val His His Val Leu Ile Trp Ile His Cys Phe Thr Val Tyr
 180 185 190

Leu Val Pro Cys Ser Ile Phe Phe Ile Leu Asn Ser Ile Ile Val Tyr
 195 200 205

Lys Leu Arg Arg Lys Ser Asn Phe Arg Leu Arg Gly Tyr Ser Thr Gly
 210 215 220

Lys Thr Thr Ala Ile Leu Phe Thr Ile Thr Ser Ile Phe Ala Thr Leu
 225 230 235 240

Trp Ala Pro Arg Ile Ile Met Ile Leu Tyr His Leu Tyr Gly Ala Pro
 245 250 255

Ile Gln Asn Arg Trp Leu Val His Ile Met Ser Asp Ile Ala Asn Met
 260 265 270

Leu Ala Leu Leu Asn Thr Ala Ile Asn Phe Phe Leu Tyr Cys Phe Ile
 275 280 285

Ser Lys Arg Phe Arg Thr Met Ala Ala Ala Thr Leu Lys Ala Phe Phe
 290 295 300

Lys Cys Gln Lys Gln Pro Val Gln Phe Tyr Thr Asn His Asn Phe Ser
 305 310 315 320

Ile Thr Ser Ser Pro Trp Ile Ser Pro Ala Asn Ser His Cys Ile Lys
 325 330 335

Met Leu Val Tyr Gln Tyr Asp Lys Asn Gly Lys Pro Ile Lys Val Ser

340 345 350

Pro

<210> 17
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 新型序列

5

<400> 17
 atggatccaa ccgtccagct cttoggtaca aaactgacac caatcaacgg acgtgaggag 60
 actccttgct acaatcagac cctgagcttc acggtgctga cgtgcatcat ttcccttgct 120
 ggactgacag gaaacgcggt agtgctctgg ctctctgggt acogcatgcg caggaacgct 180
 gtctccatct acatcctcaa cctggccgca gcagacttcc tcttctctcag cttccagatt 240
 atacgttcgc cattacgcct catcaatata agccatctca tccgcaaaat cctcgtttct 300
 gtgatgacct ttccctactt tacaggcctg agtatgctga ggcgccatcag caccgagcgc 360
 tgctgtcttg ttctgtggcc catctggtac cgctgccgcc gccccacaca cctgtcagcg 420
 gtctgtgttg tcctgctctg gggcctgtcc ctgctgttta gtatgctgga gtggaggttc 480
 tgtgacttcc tgttttagtg tgctgattct agttggtgtg aaacgtcaga ttcatccca 540
 gtgcgctggc tgattttttt atgtgtggtt ctctgtgttt ccagcctggg cctgctggtc 600
 aggatcctct gtggatcccg gaagatgccg ctgaccaggc tgtacgtgac catcctgctc 660
 acagtgtctg tcttctctct ctgcggcctg cccttcggca ttctgggggc cctaatttac 720
 aggatgcacc tgaatttgga agtcttatat tgtcatgttt atctggtttg catgtccctg 780
 tcctctctaa acagtgtgac caaccccatc atttacttct tcgtgggctc ctttaggcag 840
 cgtcaaaaata ggcagaacct gaagctgggt ctccagaggg ctctgcagga caagcctgag 900
 gtggataaag gtgaagggca gcttctctgag gaaagcctgg agctgtcggg aagcagattg 960
 gggccatga 969

<210> 18
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 新型序列

10

<400> 18
 Met Asp Pro Thr Val Pro Val Phe Gly Thr Lys Leu Thr Pro Ile Asn
 1 5 10 15
 Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Asn Gln Thr Leu Ser Phe Thr Val

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

Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Lys Pro Glu Val Asp Lys Gly
290 295 300

Glu Gly Gln Leu Pro Glu Glu Ser Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu
305 310 315 320

Gly Pro

<210> 19

<211> 969

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

5 <223> 新型序列

<400> 19

```
atggattcaa ccatcccagt ctgggtaca gaactgacac caatcaacgg acgtgaggag      60
actccttgct acaagcagac cctgagcttc acggggctga cgtgcatcgt ttcccttgct      120
gcgctgacag gaaacgcggt tgtgctctgg ctctgggct gccgcacgag caggaaacgt      180
gtctccatct acatcctcaa cctggtcgag gccgacttcc tcttccttag cggccacatt      240
atatgttcgc cgttacgcct catcaatata cgccatccca tctocaaaat cctcagtcct      300
gtgatgacct ttccctactt tataggccta agcatgctga gcgccatcag caccgagcgc      360
tgcctgtcca tcctgtggcc catctgtgtac cactgcccgc gcccagata cctgtcatcg      420
gtcatgtgtg tcctgtcttg ggccctgtcc ctgtgctgga gtatcctgga gtggatgttc      480
tgtgacttcc tgttttagtg tgctgattct gtttggtgtg aaacgtcaga ttccattaca      540
atcgcggtggc tggttttttt atgtgtggtt ctctgtgggt ccagcctggt cctgtcggtc      600
aggattctct gtggatcccg gaagatgccg ctgaccagga tgtacgtgac catcctcctc      660
acagtgcctg tcttcctcct ctgtggcctg ccttttgga ttcagtgggc cctgttttcc      720
aggatccacc tggattggaa agtcttattt tgatcatgtg atctagtttc cattttcctg      780
tccgctctta acagcagtg ccaacccatc atttacttct tcgtgggctc ctttaggcag      840
cgtcaaaata ggcagaacct gaagctggtt ctccagaggg ctctgcagga cagcctgag      900
gtggatgaag gtggagggtg gcttcctcag gaaaccctgg agctgtcggg aagcagattg      960
gagcagtga
```

<210> 20

<211> 322

<212> PRT

<213> 人工序列

10

<220>

<223> 新型序列

<400> 20

Met Asp Ser Thr Ile Pro Val Leu Gly Thr Glu Leu Thr Pro Ile Asn
 1_ 5 10 15

Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Phe Thr Gly
 20 25 30

Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Ala Leu Thr Gly Asn Ala Val Val
 35 40 45

Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr
 50 55 60

Ile Leu Asn Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly His Ile
 65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Arg His Pro Ile Ser Lys
 85 90 95

Ile Leu Ser Pro Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Met
 100 105 110

Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Ile Leu Trp Pro Ile
 115 120 125

Trp Tyr His Cys Arg Arg Pro Arg Tyr Leu Ser Ser Val Met Cys Val
 130 135 140

Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Phe
 145 150 155 160

Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Val Trp Cys Glu Thr Ser
 165 170 175

Asp Phe Ile Thr Ile Ala Trp Leu Val Phe Leu Cys Val Val Leu Cys
 180 185 190

Gly Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys
 195 200 205

Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val
 210 215 220

Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Ala Leu Phe Ser
 225 230 235 240

Arg Ile His Leu Asp Trp Lys Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val
 245 250 255

Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr

	260	265	270
	Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys 275 280 285		
	Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Thr Pro Glu Val Asp Glu Gly 290 295 300		
	Gly Gly Trp Leu Pro Gln Glu Thr Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu 305 310 315 320		
	Glu Gln		
	<210> 21 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列		
5	<220> <223> 新型序列		
	<400> 21 cagagctctg gtggccacct ctgtcc		26
	<210> 22 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列		
10	<220> <223> 新型序列		
	<400> 22 ctgcgtccac cagagtcacg tctcc		25
	<210> 23 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列		
15	<220> <223> 新型序列		
	<400> 23 gtatgcctgg ccacaatacc tccagg		26
	<210> 24 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列		
20			

	<220>		
	<223>	新型序列	
5	<400>	24 gtttgtggct aacggcaciaa aacacaattc c	31
	<210>	25	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
10	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	25 ggtaccaciaa tgacaatcac cagcgtcc	28
	<210>	26	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
15	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	26 ggaacgtgag gtacatgtgg atgtgcagc	29
	<210>	27	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
20	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	27 gcagtgtagc ggtcaaccgt gagcagg	27
	<210>	28	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
25	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	

	<400> 28 tgagcaggat ggcgatccag actgaggcgt gg	32
	<210> 29 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
5	<220> <223> 新型序列	
	<400> 29 gaggtacagc tggcgatgct gacag	25
	<210> 30 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
10	<220> <223> 新型序列	
	<400> 30 gtggccatga gccaccctga gctcc	25
	<210> 31 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
15	<220> <223> 新型序列	
	<400> 31 ggaatgtcca ctgaatgcgc gcgg	24
	<210> 32 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
20	<220> <223> 新型序列	
	<400> 32 agctcgccag gtgtgagaaa ctggg	25
25	<210> 33 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	33	
		gcgttatgag cagcaattca tccctgctgg	30
	<210>	34	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
5	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	34	
		gtatcctgaa cttcgtctat acaactgc	28
	<210>	35	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
10	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
15	<400>	35	
		ccctcaggaa tgatgccctt ttgccacaa	29
	<210>	36	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
20	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	36	
		atccatgtgg ttggtgcatg tggttcgt	28
	<210>	37	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
25	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	

	<400> 37 aaacaacaaa cagcagaacc atgaccagc	29
	<210> 38 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
5	<220> <223> 新型序列	
	<400> 38 acatagagac aagtgacatg tgtgaaccac	30
	<210> 39 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
10	<220> <223> 新型序列	
	<400> 39 ggtatgagac cgtgtggtac ttgagc	26
	<210> 40 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
15	<220> <223> 新型序列	
	<400> 40 gtggcagaca gcgatatacc tgtcaatgg	29
	<210> 41 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
20	<220> <223> 新型序列	
	<400> 41 gcgctcatgg agcacacgca cgcccac	27
	<210> 42 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
25		

	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	42	
		gaggcagtag ttgccacacc tatgg	25
	<210>	43	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
5	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	43	
		catctggttt gtgttcccag gggcaccag	29
	<210>	44	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
10	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
15	<400>	44	
		gacagtgttg ctctcaaagt cccgtctgac tg	32
	<210>	45	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
20	<223>	新型序列	
	<400>	45	
		ctgtttccag ggtcatcaga ctggg	25
	<210>	46	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
25	<223>	新型序列	
	<400>	46	
		gcagcattgc tctcaaagtc ctgtctg	27

	<210>	47	
	<211>	6	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
5	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	47	
	Thr Leu Glu Ser Ile Met		
	1 5		
	<210>	48	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
10	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	48	
	Glu Tyr Asn Leu Val		
	1 5		
	<210>	49	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
15	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	49	
	Asp Cys Gly Leu Phe		
	1 5		
	<210>	50	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
20	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	50	
	gatcaagctt ccatggcgtg ctgcctgagc gagg		34
	<210>	51	
	<211>	53	
25	<212>	DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
5	<400>	51 gatcggatcc ttagaacagg ccgcagtcct tcaggttcag ctgcaggatg gtg	53
	<210>	52	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
10	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	52 gtcctcactg gtggccatgt actcc	25
	<210>	53	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
15	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	53 ctgcgtccac cagagtcacg tctcc	25
	<210>	54	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
20	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
25	<400>	54 cttggatggtt tgggctgccc ttctgc	26
	<210>	55	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
30	<223>	新型序列	

	<400> 55 gtttgtggct aacggcaca aacacaattc c	31
	<210> 56 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
5	<220> <223> 新型序列	
	<400> 56 ctgctcacgg ttgaccgcta cactgc	26
	<210> 57 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
10	<220> <223> 新型序列	
	<400> 57 gtggccatga gccaccctga gctcc	25
	<210> 58 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
15	<220> <223> 新型序列	
	<400> 58 cttcttctcc gacgtcaagg	20
	<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
20	<220> <223> 新型序列	
	<400> 59 cttcttctcc gacgtcaagg	20
	<210> 60 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
25	<220> <223> 新型序列	

	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	60	
		cttcttctcc gacgtcaagg	20
	<210>	61	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
5	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	61	
		caacggtctg acaacctct	20
	<210>	62	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
10	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	
15			
	<400>	62	
		ttgctgtgat gtggcatttt g	21
	<210>	63	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
20			
	<220>		
	<223>	新型序列	
	<400>	63	
		caggaagccc ataaaggcat caa	23
	<210>	64	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
25	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	新型序列	

	<400> 64 acatcacctg cttcctgacc	20
	<210> 65 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
5	<220> <223> 新型序列	
	<400> 65 ccagcatctt gatgcagtgt	20
	<210> 66 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
10	<220> <223> 新型序列	
	<400> 66 ccatctccaa aatcctcagt c	21
	<210> 67 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
15	<220> <223> 新型序列	
	<400> 67 gctgttaaga gcggacagga aa	22

图 1
293 细胞 IP3 测定

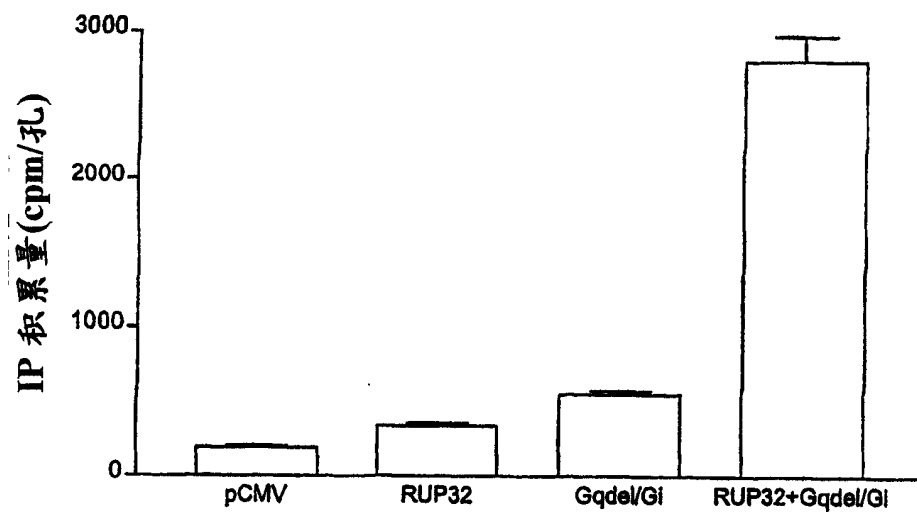


图 2
293 细胞 IP3 测定

