

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4873825号  
(P4873825)

(45) 発行日 平成24年2月8日 (2012.2.8)

(24) 登録日 平成23年12月2日 (2011.12.2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C O 7 K 14/575 (2006.01)

C O 7 K 14/575

C O 7 K 16/26 (2006.01)

C O 7 K 16/26

A 6 1 K 38/22 (2006.01)

A 6 1 K 37/24

請求項の数 19 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-518278 (P2002-518278)  
 (86) (22) 出願日 平成13年7月31日 (2001.7.31)  
 (65) 公表番号 特表2004-505640 (P2004-505640A)  
 (43) 公表日 平成16年2月26日 (2004.2.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/023976  
 (87) 国際公開番号 W02002/012307  
 (87) 国際公開日 平成14年2月14日 (2002.2.14)  
 審査請求日 平成20年7月28日 (2008.7.28)  
 (31) 優先権主張番号 60/223, 255  
 (32) 優先日 平成12年8月4日 (2000.8.4)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/273, 969  
 (32) 優先日 平成13年3月7日 (2001.3.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591026333  
 リサーチ ディベロップメント ファンデーション  
 RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION  
 アメリカ合衆国, 89703 ネバダ, カーソン シティ, ノース ディヴィジョン ストリート 402 番地  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウロコルチン蛋白質及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする DNA であって、該 DNA は、

(a) 配列識別番号 No. 2 ~ 4 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有するヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする、単離精製された DNA と、

(b) 遺伝子コードの縮重によってコドン配列が上記 (a) の単離された DNA と異なり、かつ配列識別番号 No. 2 ~ 4 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有するヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする、単離精製された DNA とからなる群より選択される、DNA。

【請求項 2】

前記 DNA が配列識別番号 No. 1 に示される配列を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 に記載の DNA を発現することができるベクターであって、該ベクターは、

該 DNA と、

細胞内での該 DNA の発現に必要な調節要素と、

を含む

ことを特徴とする、ベクター。

【請求項 4】

10

20

請求項 3 に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞であって、

該ベクターがヒト・ウロコルチン関連ペプチドタンパク質を発現することを特徴とする、宿主細胞。

【請求項 5】

バクテリア細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、および昆虫細胞からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

前記バクテリア細胞が大腸菌であることを特徴とする、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドであって、

(a) 配列識別番号 No. 2 ~ 4 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有する、単離精製されたヒト・ウロコルチン関連ペプチド；ならびに

(b) (i) 配列識別番号 No. 2 ~ 4 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有するヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする、単離精製された DNA と、

(ii) 配列識別番号 No. 1 に示される配列を有する DNA のアンチセンス相補体に高度に厳しい条件の下でハイブリダイズする、単離精製された DNA であって、

該 DNA は、CRF - R 1 に対してよりも高い親和性で CRF - R 2 に結合するヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする、  
単離精製された DNA と、

(iii) 遺伝子コードの縮重によってコドン配列が上記 (i) 及び (ii) の単離された DNA と異なっており、かつ配列識別番号 No. 2 ~ 4 のうちのいずれか 1 つに示される配列を有するヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする、単離精製された DNA と

から選択される DNA でコードされた、単離精製されたヒト・ウロコルチン関連ペプチド；

からなる群より選択される、ヒト・ウロコルチン関連ペプチド。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のヒト・ウロコルチン関連ペプチドに対する、抗体。

【請求項 9】

モノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

配列識別番号 No. 2 ~ 4 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を有するペプチドが C 末端におけるアミド化によって改変された、改変型ヒト・ウロコルチン関連ペプチド。

【請求項 11】

請求項 7 または 10 のうちのいずれか 1 項に記載のヒト・ウロコルチン関連ペプチドと、

薬学的に許容されるキャリアと、  
を含む、医薬品組成物。

【請求項 12】

前記ペプチドが C 末端にアミドを有することにより特徴付けられる、請求項 11 に記載の医薬品組成物。

【請求項 13】

前記ペプチドが配列識別番号 No. 3 に示される配列を有することにより特徴付けられる、請求項 11 または 12 に記載の医薬品組成物。

【請求項 14】

前記ペプチドが配列識別番号 No. 4 に示される配列を有することにより特徴付けられる、請求項 11 または 12 に記載の医薬品組成物。

【請求項 15】

配列識別番号 No. 2 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載のヒト・ウロコ

10

20

30

40

50

ルチン関連ペプチド。

【請求項 16】

配列識別番号 No. 3 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載のヒト・ウロコルチン関連ペプチド。

【請求項 17】

配列識別番号 No. 4 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載のヒト・ウロコルチン関連ペプチド。

【請求項 18】

配列識別番号 No. 4 に示されるアミノ酸配列を有する、単離されたヒト・ウロコルチン関連ペプチドであって、該ペプチドは、C 末端においてアミド化されている、ペプチド。

10

【請求項 19】

配列識別番号 No. 3 に示されるアミノ酸配列を有する、単離されたヒト・ウロコルチン関連ペプチドであって、該ペプチドは、C 末端においてアミド化されている、ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(連邦政府からの資金援助について)

本発明は一部連邦政府からの資金援助第 D K - 2 6 7 4 1 を用いて行われたものである。従って、本発明に対して連邦政府は一定の権利を有している。

【0002】

(発明の分野)

20

本発明は一般的には神経内分泌学及びストレスに關与するメカニズムの分野に関するものである。より具体的には、本発明はストレス反応に關与する新しいコルチコトロピン放出因子関連蛋白質、ウロコルチン II 及びヒトのウロコルチン関連蛋白質に関するものである。

【0003】

(関連技術の説明)

コルチコトロピン放出因子 (C R F) はタイプ 1 C R F レセプタ (1) によって媒介される効果であるストレスに対する下垂体アドレナリン反応の開始における不可欠の役割で最も良く知られている 41 アミノ酸ペプチドである。さらに、コルチコトロピン放出因子は脳において広範囲に分布しており、種々の脅迫状況に対する相補的自律神経系及び行動上の調節の起動に關与していることが繰り返し示されている (2、3)。このことがコルチコトロピン放出因子とその関連するペプチド系統が基底及びストレス状態での視床下部下垂体副腎軸 (H P A) の調節に重要な役割を果たしているという広く支持されている仮説を広めることとなった (4、5)。コルチコトロピン放出因子が多くの組織における他の神経内分泌及び傍分泌反応にも關与しているとも考えられている。C R F 系統のメンバーはストレス因子に対して内分泌性、自律神経性及び行動上の反応を一体化して示す。これらのペプチドは食欲、覚醒、及び認知機能の制御にも關与している可能性も考えられる。不安症、拒食症、及び鬱などのストレスの長期の影響の結果として重大な心理上、生理上の結果が起きる場合がある。

30

【0004】

40

コルチコトロピン放出因子系統のメンバーは高い親和性で C R F レセプタに特異的に結合することによってそれらの生物学的作用を仲介する (6、7)。C R F レセプタはアデニレート・シクラーゼを通じて作用し、構造的にその分泌物系統に關係している G 蛋白質結合レセプタである。この系統は G R F、V I P、P T H、及びカルシトニン・レセプタも含んでいる。C R F レセプタ遺伝子は 13 のエクソンを有しており、このレセプタのいくつかのスプライス変種が見つかっている。C R F - R 1 レセプタは脳全体に分布しており、感覚及び運動中継サイトでも見られる (8)。C R F - R 2 は横隔膜、腹側中間視床下部、孤束の核、及び背部縫線核に分布しており、これらは C R F - R 1 がほとんど、あるいはまったく発現されない領域である (9)。C R F - R 2 はほとんどの場合、心臓、血管、胃腸管、精巣上体、肺及び皮膚を含む抹消サイトに見出される (7、10)。こ

50

れら2つのタイプのレセプタの薬学的特徴はコルチコトロピン放出因子がCRF-R2に対しては低い親和性( $K_i = 15 - 100 \text{ nM}$ )を示し、CRF-R1に対しては高い親和性( $K_i = 1 - 2 \text{ nM}$ )を示す点である。コイ・ウロテンシン、カエル・ソウヴァジン(sauvagine)、及びウロコルチンはCRF-R2に対して高い親和性を有している。CRF-R2ノックアウト・マウスはストレス因子に対する過敏性によって引き起こされる不安症状挙動の増大傾向を示す(11)。

#### 【0005】

ストレス上の自律神経性及び挙動反応の誘発におけるペプチド作用のサイトとして認められている多数の細胞グループは必要なリガンド、レセプタ、あるいはそれらの両方の発現を欠いている、あるいは貧弱であることが認められている(12、13)。このことはさらに別のCRF関連情報伝達分子を探す研究を加速させており、現段階では2つの異なった遺伝子(CRF-R1とCRF-R2)から誘導されたG蛋白質結合レセプタと、その機能がまだ完全には解明されていない結合蛋白質の2つのリガンドが見つかった(14、15)。

#### 【0006】

第2の哺乳動物CRF関連神経ペプチドであるウロコルチン(Ucn)が最近発見され(16)、両方の知られているCRFレセプタによって高い親和性で結合されるのに対して、CRFはCRF-R1によって高度に優先的に結合されることが示されている。主に投与されるウロコルチンは食欲抑制においてはCRFより強力な作用を示すが、急性不安症状効果と一般的な挙動活性化の発生においてはそれ程でもない(17)。このことはウロコルチンが少なくとも部分的にCRF-R2に対する内発性リガンドとして機能することで当初CRFの作用とされていた一部のストレスを媒介するのかもしれないと受け取られている。しかしながら、この見解に対しては、脳におけるウロコルチン発現の主要細胞台座が中心的なストレス関連回路の不可分の構成要素としては認められないこと、そしてCRF-R2発現のほとんどのサイトがウロコルチン含有突起物によって刺激を受けることが少ないという観察結果に基づく反論も提出されている(18)。これら及びその他の知見は哺乳動物の脳における1つ以上のさらに別のCRFレセプタ・リガンドの存在の可能性を示唆している。

#### 【0007】

先行技術はさらに別のウロコルチン遺伝子及び蛋白質の認識が欠如している点で不十分である。本発明はこの技術分野における長年のニーズと願望を果たすものである。

#### 【0008】

##### (発明の要約)

ヒト及びマウス・ゲノム両方の配列データの蓄積が急激に進んだことから多くの蛋白質系列の新しいメンバーの識別が可能になってきている。新しいペプチド配列であるヒト・ウロコルチン関連ペプチド(URP)は公開されているヒト・ゲノム・データベースから識別されたものである。このウロコルチン関連ペプチド配列はヒト・ウロコルチン(44%)、コイ・ウロコルチン(39%)、そしてヒトCRF(36%)との相同性を有している。合成されたウロコルチン関連ペプチドはCRF-R1( $K_i = 70 \text{ nM}$ )より高い親和性( $K_i = 0.5 \text{ nM}$ )でCRF-R2に対してペプチド結合する。ヒト・ウロコルチン関連ペプチドはウロコルチンあるいはCRFと比較してその程度はかなり低いがラット脳下垂体前葉細胞からのACTH分泌を促進する。配列相同性検索ツールを用いて、38アミノ酸ペプチドをコードするマウス遺伝子も確認され、これは神経ペプチドのCRF系列の新しいメンバーである。ウロコルチンII(Ucn II)と命名されたこのペプチドはそれが高い選択性でCRF-R2と結合する点で他の知られている系列メンバーとは違っている。ラットの脳にウロコルチンIIが存在している証拠は免疫組織学研究とウロコルチンIIに対して高い特異性を示す抗体を用いたin situでのハイブリダーゼーション研究の両方で示されている。

#### 【0009】

本発明の1つの実施の形態で、ウロコルチンIIをコードするDNA配列が提供される。

10

20

30

40

50

この配列は単離精製されたウロコルチンIIをコードするDNA；単離精製された、高度に厳しい条件でウロコルチンII DNAのアンチセンス補体にハイブリダイズするDNA；ウロコルチンIIをコードするが、遺伝子コードの劣化の故に配列が異なっている単離精製されたDNAで構成される群から選択される。このDNAは配列識別番号No. 10に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質前駆体をコードする。

【0010】

本発明の別の好ましい実施の形態において、本発明はウロコルチンIIを発現することができるベクターに向けられている。そうしたベクターはウロコルチンIIをコードするDNAと細胞内でのウロコルチンIIの発現に必要な調節要素で構成されている。1つの好ましい実施の形態で、このベクターは配列識別番号No. 11のアミノ酸配列の蛋白質をコードする。本発明はそうしたベクターによってトランスフェクトされ、それからのウロコルチンIIを発現する宿主細胞にも関係している。上記蛋白質はバクテリア細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、そして昆虫細胞から選択される細胞タイプで発現されてもよい。1つの好ましい実施の形態で、上記蛋白質は大腸菌で発現される。

10

【0011】

本発明のさらに別の実施の形態で、上に述べたようなDNAからコードされ、単離精製されたヒト・ウロコルチンIIが提供される。好ましくは、上記精製ヒト・ウロコルチン関連ペプチドは配列識別番号No. 11に対応するアミノ酸配列を有している。

【0012】

本発明の別の実施の形態で、上記ウロコルチンII蛋白質に対する抗体が提供される。この抗体はモノクローナル抗体である。

20

【0013】

本発明のさらに別の実施の形態で、ウロコルチンII蛋白質で構成される医薬品組成物が提供される。そうした医薬品組成物は体温を低下させ、食欲を減退させ、鬱血性心臓疾患及び種々のストレス関連不全の治療あるいは予防のために用いることができる。

【0014】

本発明のさらに別の実施の形態で、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードするDNA配列が提供される。この配列はヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする単離精製されたDNA；高度に厳しい条件で上記ヒト・ウロコルチン関連ペプチドDNAのアンチセンス補体にハイブリダイズする単離精製されたDNA；そして、ウロコルチンIIをコードするが、遺伝子コードの変質の故に配列が異なっている単離精製されたDNAで構成される群から選択される。このDNAは好ましくは配列識別番号No. 1に示される配列を有しており、そして配列識別番号No. 2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質前駆体をコードする。

30

【0015】

本発明の別の実施の形態で、本発明はヒト・ウロコルチン関連ペプチドを発現することができるベクターに関連している。こうしたベクターはこうしたベクターはヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードするDNAと細胞内でのヒト・ウロコルチン関連ペプチドの発現に必要な調節要素で構成されている。1つの好ましい実施の形態で、このベクターは配列識別番号No. 3のアミノ酸配列の蛋白質をコードする。この発明はそうしたベクターによってトランスフェクトされ、それからのヒト・ウロコルチン関連ペプチドを発現する宿主細胞にも関係している。この蛋白質はバクテリア細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、そして昆虫細胞から選択される細胞タイプで発現されてもよい。1つの好ましい実施の形態で、上記蛋白質は大腸菌内で発現される。

40

【0016】

本発明の1つの実施の形態で、上に述べたようなDNAからコードされた、単離精製されたヒト・ウロコルチン関連ペプチド蛋白質が提供される。好ましくは、上記精製されたヒト・ウロコルチン関連ペプチドは配列識別番号No. 3に対応するアミノ酸配列を有する。

【0017】

50

本発明のさらに別の実施の形態で、上記ヒト・ウロコルチン関連ペプチドに対する抗体が提供される。この抗体はモノクローナル抗体である。

【0018】

本発明のさらに別の実施の形態で、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドで構成される医薬品組成物が提供される。そうした医薬品組成物は体温を低下させ、食欲を減退させ、鬱血性心臓疾患及び種々のストレス関連不全の治療あるいは予防のために用いることができる。

【0019】

本発明の別の実施の形態で、配列及び蛋白質の個々のアミノ酸に対する修飾を含む上記ウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチド蛋白質に対する種々の修飾について述べる。そうした修飾にはウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドの蛍光ラベル、錯体化放射性核種及び毒素との接合も含んでいる。

10

【0020】

(本発明の詳細な説明)

本発明によれば、この技術分野の技術範囲内の通常の分子生物学、微生物学、そして組み換えDNA技術を用いることができる。こうした技術については文献に十分に説明されている。例えば、Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach," Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins Eds. (1985)]; "Transcription and Translation" [B.D. Hames & S. J. Higgins Eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)参照。従って、本明細書で使われた場合、以下の用語は以下に述べるような定義を有するものとする。

20

【0021】

本明細書で使われる場合、『cDNA』とは遺伝子のmRNA転写のDNAコピーを意味する。

【0022】

本明細書で使われる場合、『誘導アミノ酸配列』とはcDNA内のヌクレオチド塩基の三連配列を読み取ることで判定されるアミノ酸配列を意味するものとする。

【0023】

本明細書で使われる場合、『ライブラリをスクリーニングする』という用語は、適切な条件下で、特定のDNAライブラリ内に存在しているプローブに対して相補的な配列が存在しているかどうかを調べるためにラベルされたプローブを用いることを指している。さらに、『ライブラリをスクリーニングする』ことはPCRによっても行うことができる。

30

【0024】

本明細書で使われる場合、『PCR』という用語はMullisに対する米国特許第4,683,195及び4,683,202及びこの技術分野で周知の他の改良の主題であるポリメラーゼ鎖反応を指している。

【0025】

すべてのアミノ酸残基配列は、本明細書においては、左から右への向きがアミノ末端からカルボキシ末端への向きを示す通常的方式で示されている。さらに、アミノ酸残基配列の開始点あるいは終点のダッシュは1つ以上のアミノ酸残基の別の配列へのペプチド結合を示している。

40

【0026】

ここに述べられているアミノ酸は好ましくは『L』異性体形態である。しかしながら、『D』異性体形態の残基も、ポリペプチドによって免疫グロブリン結合の望ましい機能的特性が保持される限り、いずれかのLアミノ酸残基で置換することができる。NH<sub>2</sub>とはポリペプチドのアミノ末端に存在している遊離アミノ基を指している。COOHはポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離カルボキシ基である。

【0027】

50

既存のアミノ酸の化学的修飾あるいは蛋白質の人為的合成によって非標準的なアミノ酸を蛋白質に組み込むことができる。非標準的なアミノ酸とは、化学構造が遺伝子コードでコードされる20種類の標準的なアミノ酸とは異なっているアミノ酸を指している。転写後の*in vivo*での翻訳による修飾も蛋白質内での非標準的なアミノ酸あるいはアミノ酸誘導体の存在をもたらす場合がある。1つの蛋白質のN末端NH<sub>2</sub>基とC末端COOH基は蛋白質の自然の、あるいは人為的翻訳後修飾によって修飾される場合もある。

【0028】

蛋白質はアミノ酸置換によっても修飾できる。多くの場合、なんらかの変化が蛋白質の活性の大幅な変化につながる場合があるが、逆にほとんど、あるいはまったく影響を及ぼさない場合もある。保存性置換が蛋白質の活性を劇的に変えることはほとんどない。『保存性アミノ酸置換』とは1つのアミノ酸を化学的に類似したアミノ酸と取り替えること、つまり、非極性アミノ酸を他の非極性アミノ酸と置換すること、極性アミノ酸を他の極性アミノ酸と置換したり、酸性残基を他の酸性アミノ酸と置換したりすることなどを意味する。好ましい保存性置換の例を表1に示す。

【0029】

【表1】

| 元の残基   | 好ましい保存性置換               | 最も好ましい保存性置換 |
|--------|-------------------------|-------------|
| Ala(A) | Val;Leu;Ile             | Val         |
| Arg(R) | Lys;Gln;Asn             | Lys         |
| Asn(N) | Gln;His;Lys;Arg         | Gln         |
| Asp(D) | Glu                     | Glu         |
| Cys(C) | Ser                     | Ser         |
| Gln(Q) | Asn                     | Asn         |
| Glu(E) | Asp                     | Asp         |
| Gly(G) | Pro                     | Pro         |
| His(H) | Asn;Gln;Lys;Arg         | Arg         |
| Ile(I) | Leu;Val;Met;Ala;Phe;Nle | Leu         |
| Leu(L) | Ile;Val;Met;Ala;Phe;Nle | Ile         |
| Lys(K) | Arg;Gla;Asn             | Arg         |
| Met(M) | Leu;Phe;Ile             | Leu         |
| Phe(F) | Leu;Val;Ile;Ala         | Leu         |
| Pro(P) | Gly                     | Gly         |
| Ser(S) | Thr                     | Thr         |
| Thr(T) | Ser                     | Ser         |
| Trp(W) | Tyr                     | Tyr         |
| Tyr(Y) | Trp;Phe;Thr;Ser         | Phe         |
| Val(V) | Ile;Leu;Met;Phe;Ala;Nle | Leu         |

10

20

30

## 【 0 0 3 0 】

『化学的誘導体』とは、官能側基の反応によって化学的に誘導された１つ以上の残基を有するポリペプチドを指している。こうした誘導ポリペプチドには、例えば、遊離アミノ基が誘導体化されてアミン塩酸塩、p - トルエン・スルホニル基、カルボベンゾキシ基、t - ブチロシカルボニル基、クロロアセチル基、あるいはホルミル基を形成しているものである。遊離カルボキシ基を誘導体化して、塩類、メチル及びエチル・エステルあるいはその他のタイプのエステル又はヒドラジドを形成している場合もある。化学的誘導体は上記２０の標準的アミノ酸の１種以上の天然アミノ酸の誘導体を含むペプチドを含んでいる場合もある。例えば、４ - ヒドロキシプロリンをセリンで置換してもよく、オルニチンをリシンと置換してもよい。本発明の範囲に含まれるペプチドはその修飾ペプチドが必要な生物学的活性を維持している限り、その配列がここに示されているような特定のペプチドに関して１つ以上の残基が追加されていたり、あるいは欠失しているペプチドも含んでいる。

40

50



## 【0031】

『レプリコン』とは、*in vivo*でのDNA複製の自立的単位として機能する、つまりそれ自体の制御下で複製を行なうことができるすべての遺伝子要素（例えば、プラスミド、クロモソーム、ウィルス）である。

## 【0032】

『ベクター』とは、別のDNAセグメントを取り付けて、その取り付けられたセグメントの複製を起こさせることができるプラスミド、ファージ、あるいはコスミドなどのレプリコンである。

## 【0033】

『DNA分子』とは、1本鎖あるいは2重鎖らせんのいずれかのデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）の重合体の形状をとったものを意味する。この用語はその分子の一次及び二次構造のみについて言い、特定のどんな三次的形狀にも限定するものではない。従って、この用語は、特に線状DNA分子（例えば、制限酵素断片）、ウィルス、プラスミド、及びクロモソームに見られる2重鎖DNAを含む。本明細書における上記構造に関する議論では、DNAの非転写鎖（例えば、mRNAに相同な配列を有するストランド）に沿って5'から3'の方向の配列のみを与える標準的な慣例に従う。

## 【0034】

『複製開始点』とは、DNA合成に関与するDNA配列を意味する。

## 【0035】

DNAの『コード配列』とは2重鎖DNA配列であり、適切な調節塩基配列の制御下に置かれたとき、*in vivo*でポリペプチドに転写され、翻訳される。コード配列の境界は5'（アミノ）末端の開始コドン及び3'（カルボキシル）末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード配列には原核生物配列、真核生物のmRNA起源のcDNA、真核生物（例えば、哺乳類）のDNA起源のゲノムDNA配列、そして合成DNA配列さえも含まれ得るが、それだけに限定されるものではない。ポリアデニル酸化シグナル及び転写終結配列は通常コード配列に対して3'の方向に位置するであろう。

## 【0036】

転写及び翻訳制御塩基配列は、宿主細胞でコード配列発現を提供するプロモータ、エンハンサ、ポリアデニル酸化シグナル、ターミネータ等のDNA調節配列である。

## 【0037】

『プロモータ配列』とは、細胞内でRNAポリメラーゼと結合し、下流（3'方向）のコード配列転写を開始することができるDNA調節領域である。本発明を明示する目的で、上記プロモータ塩基配列は転写開始部位によってその3'末端で結合され、バックグランドを超える検出可能なレベルで転写を開始するために必要な塩基あるいは成分の最低限数を含めるため上流（5'方向）に伸長される。プロモータ配列には転写開始部位はもちろん、RNAポリメラーゼ結合を担うタンパク質束縛領域（コンセンサス配列）も見られるであろう。真核生物のプロモータは常にではないが、しばしば『TATA』ボックス及び『CAT』ボックスを含んでいる。原核生物のプロモータは-10及び-35のコンセンサス配列に加え、SD配列を含んでいる。

## 【0038】

『発現制御配列』とは、別のDNA配列の転写及び翻訳を制御、調整するDNA配列である。RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写するとき、コード配列は細胞内で転写及び翻訳制御配列の『制御下』にあり、その後上記コード配列によってコードされるタンパク質に翻訳される。

## 【0039】

『シグナル配列』とは、コード配列に近似したものに含めることができる。この配列はシグナル・ペプチドのN末端をポリペプチドにコードし、シグナル・ペプチドはポリペプチドを細胞表面に導くか、またはポリペプチドを媒体に分泌するよう宿主細胞に伝達し、このシグナル・ペプチドはタンパク質が細胞を離脱する前に宿主細胞によって切り取ら

10

20

30

40

50

れる。シグナル配列は原核生物及び真核生物が生来持つ各種タンパク質に関連して見られる。

【 0 0 4 0 】

『オリゴヌクレオチド』とは、ここで使われているように本発明のプロープに関し、2つ以上、より好ましくは3つ以上のリボヌクレオチドからなる分子として定義される。その厳密な大きさは多くの要因に左右されるが、一方で最終的な機能及びオリゴヌクレオチドの利用にも左右される。

【 0 0 4 1 】

『プライマー』とは、本明細書で使われているように、精製された制限消化物のように自然発生するものであれ、人工的に生成されたものであれ、核酸ストランドが相補的なプライマー伸長生成物の合成が誘導される条件下、すなわちヌクレオチド及びDNAポリメラーゼのような誘導体の存在下で、適切な温度及びpHにあるときに合成開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを意味している。プライマーは1本鎖あるいは2重鎖のいずれでもよいが、誘導体の存在下で好ましい伸長生成物の合成をプライムするために十分な長さでなければならない。プライマーの厳密な長さは温度、プライマーの供給源及び使用法など多くの要因に左右される。例えば、分析に適用するときはターゲット配列の複雑性にもよるが、オリゴヌクレオチド・プライマーは通例15から25あるいはそれ以上のヌクレオチドを含み、それより少ないヌクレオチドを含む場合もある。

【 0 0 4 2 】

本明細書におけるプライマーは特定のターゲットDNA配列の異なるストランドに対して『実質的に』相補的であるよう選択される。このことはプライマーがその各々のストランドとハイブリダイズするため十分相補的でなければならないことを意味している。従って、プライマー配列がテンプレート配列を正確に反映する必要はない。例えば、非相補的なヌクレオチド断片はプライマーの5'末端に付着され、プライマー配列の残り部分はストランドに相補的であるかもしれない。もしプライマー配列がその配列に十分相補的であるか、またはその配列にハイブリダイズされ、それによって伸長生成物合成のためのテンプレートを形成するならば、二者択一的に非相補的塩基あるいはより長い配列がプライマーに散在させることができる。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使われているように、『制限エンドヌクレアーゼ』及び『制限酵素』とは、そのいずれも2重鎖DNAを特定のヌクレオチド配列で、あるいはその近傍で切断する酵素を意味する。

【 0 0 4 4 】

外来性または異種由来のDNAが細胞内に導入されたとき、そのようなDNAによって細胞は『形質転換』される。形質転換DNAは細胞のゲノム内に組み込まれる（共有結合される）ことも、組み込まれないこともある。例えば、原核生物、イースト菌、及び哺乳類の細胞では、形質転換DNAはプラスミドのようなエピソーム因子上に維持されるかもしれない。真核生物の細胞に関しては、安定的に形質転換した細胞は、クロモソーム複製を介して娘細胞によって受け継がれるように形質転換DNAがクロモソームに組み込まれたものである。この安定性は形質転換DNAを含む娘細胞群から成る細胞系またはクローンを確立する真核生物細胞の能力によって示される。『クローン』とは、単一の細胞または有糸分裂による原種に由来する細胞群である。『細胞系』とは、*in vitro*で何代にもわたって安定して成長できる第1次細胞のクローンである。

【 0 0 4 5 】

2つのDNA配列は、ヌクレオチドの少なくとも約75%（好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90%または約95%）がDNA配列の規定された長さを超えて一致するとき『実質的に相同』である。実質的に相同な配列は塩基配列データバンクで利用できる標準的なソフトウェアを用いるか、または例えばその特定のシステムのために規定された厳格な条件下でのサザン・ハイブリダイゼーション実験で配列を比較することによって同定できる。適切なハイブリダイゼーション条件の定義はこの技術分野の

10

20

30

40

50

技術範囲内にある。例えば、Maniatis et al., supra; DNA Cloning, Vols. I & II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra参照。

【0046】

DNA構成の『非相同』領域は、自然界のより大きな分子に関連して見られない、より大きなDNA分子内の同定可能なDNAセグメントである。従って、非相同領域が哺乳類の遺伝子をコードするとき、その遺伝子は通常そのもとの生物体のゲノム内の哺乳類ゲノムDNAをフランクしないDNAによってフランクされるであろう。他の実施例では、コード配列はそのコード配列自体が自然界に見られない構成である（例えば、ゲノムコード配列が自然界の遺伝子とは異なるコドンを含むイントロンまたは合成配列を含むcDNA）。対立性変異個体あるいは自然発生の突然変異体には本明細書で明示されるDNAの非相同領域が生じない。

10

【0047】

これらの研究のために最も一般的に使われるラベルは放射性元素、酵素、紫外線にあたると蛍光を発する化学物質などである。数多くの蛍光性物質が周知であり、ラベルとして用いることができる。それらは例えば、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサス・レッド、AMCAブルー、ルシフェル・イエローなどである。特殊な検出用素材としてはヤギを使ってつくられ、イソチオシアン酸塩を介してフルオレセインと接合される抗ウサギ抗体がある。

【0048】

この技術分野で開発され用いられる特殊な分析方法はレセプタ分析として周知である。レセプタ分析において、分析される物質は適切にラベル付けされ、その後一定の細胞テストコロニーは多数のboth the labelが植え付けられ、その後ラベル付けされた物質がどの程度細胞レセプタと結合しているかを測定するために結合試験が行なわれる。この方法によって、物質間の親和性の違いが確かめられる。

20

【0049】

本明細書で使われているように、『ホスト』とは、原核生物だけでなく、イースト菌、植物、及び動物の細胞など真核生物も含まれている。当業者に周知の技術のいずれかをを使って、本発明によるタンパク質をコードする組み換え体のDNA分子または遺伝子をホストを形質転換させるために用いることができる。原核生物のホストは大腸菌、*S. typhimurium*, *Serratia marcescens*そして*Bacillus subtilis*などである。真核細胞のホストは*Pichia pastoris*などのイースト菌、哺乳類細胞及び昆虫細胞などである。

30

【0050】

一般的に、挿入されたDNAフラグメントを効率的に転写できるようにするプロモータ配列を含む発現ベクターがホストとの関連で用いられる。発現ベクターは通常複製の発生源、プロモータ、ターミネータ、及び形質転換細胞内で表現形選択を提供することができる特殊な遺伝子を含んでる。形質転換されたホストはこの技術分野で知られている手段によって細胞成長がもっともうまくいくように発酵、培養される。

【0051】

適切な転写性及び翻訳性制御信号を含む発現ベクター構成するために、当業者に周知の方法を用いることができる。例えば、Sambrookら1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Press, N. Y.参照。1つの遺伝子とその転写制御配列は、その転写制御配列がその遺伝子の転写を効果的に制御する場合、『操作可能に結合されている』と定義される。本発明によるベクターはプラスミド・ベクターとウィルス性ベクターなどを含んでいるが、これらに限定されない。

40

【0052】

本発明はウロコルチンIIをコードするDNA配列を対象にしている。この配列はウロコルチンIIをコードする単離精製されたDNAであってもよい。あるいは、高度に厳しい条件下でウロコルチンIIDNAのアンチセンス相補体とダイブリダイズする単離精製されたDNAであってもよい。最後に、このDNAはウロコルチンIIをコードするが、その遺伝子コードの劣化の故に配列が違っている単離精製されたDNAであってもよい。このDN

50

Aは好ましくは配列識別番号No. 10のアミノ酸及び配列識別番号No. 11のアミノ酸をコードする。

【0053】

本発明はウロコルチンIIを発現することができるベクターも対象にしている。こうしたベクターはウロコルチンIIを発現するDNAと細胞内でのウロコルチンIIの発現に必要な調節要素で構成されている。1つの好ましい実施の形態においては、このベクターは配列識別番号No. 10あるいはNo. 11のアミノ酸の蛋白質をコードする。本発明はそうしたベクターからのウロコルチンIIによってトランスフェクトされ、それを発現する宿主細胞も対象にしている。この蛋白質はバクテリア細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、そして昆虫細胞から選択された細胞タイプ内で発現することもできる。1つの好ましい実施の形態においては、上記蛋白質は大腸菌内で発現される。

10

【0054】

本発明は上に述べたようなDNAからコードされた単離精製ウロコルチンII蛋白質も対象にしている。好ましくは、上記精製されたウロコルチンIIは配列識別番号No. 10あるいは配列識別番号No. 11に対応するアミノ酸配列を有している。

【0055】

本発明はまた、上記ウロコルチンII蛋白質に対する抗体も対象にしている。この抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。

【0056】

さらに、本発明は上記ウロコルチンII蛋白質と薬学的に許容される基質で構成される医薬品組成物を対象にしている。こうした医薬品組成物は体温を低下させたり、食欲を抑えたり、鬱血性心臓不全を治療あるいは予防したり、ストレス及び不安感を治療したり、そして望ましくない程度の低レベルのACTH分泌を改善するために用いることができる。

20

【0057】

本発明はヒト・ウロコルチン関連ペプチドも対象にしている。この配列はヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードする単離精製されたDNAであってもよい。あるいは、高度に厳しい条件下で上記ヒト・ウロコルチン関連ペプチドDNAのアンチセンス相補体にハイブリダイズする単離精製されたDNAであってもよい。最後に、このDNAはヒト・ウロコルチン関連ペプチドをコードするが、遺伝子コード劣化の故に配列が異なっている単離精製されたDNAであってもよい。このDNAは好ましくは配列識別番号No. 1に示される配列を有しており、そして好ましくは蛋白質分解酵素によって配列識別番号No. 3のアミノ酸配列の蛋白質に変えられる配列識別番号No. 2のアミノ酸配列の前駆体蛋白質をコードする。

30

【0058】

本発明は上記ヒト・ウロコルチン関連ペプチドを発現することができるベクターも対象にしている。こうしたベクターはウロコルチン関連ペプチドと細胞内でのヒト・ウロコルチン関連ペプチドの発現に必要な調節要素で構成されている。1つの好ましい実施の形態においては、このベクターは配列識別番号No. 3のアミノ酸配列の蛋白質をコードする。本発明はそうしたベクターからのヒト・ウロコルチン関連ペプチドによってトランスフェクトされ、それを発現する宿主細胞も対象としている。この蛋白質はバクテリア細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、そして昆虫細胞から選択された細胞タイプ内で発現することもできる。1つの好ましい実施の形態においては、上記蛋白質は大腸菌内で発現される。

40

【0059】

本発明は上に述べたようなDNAからコードされる単離精製されたヒト・ウロコルチン関連ペプチド蛋白質も対象としている。好ましくは、上記精製されたウロコルチン関連ペプチドは配列識別番号No. 3に相当するアミノ酸配列を有している。

【0060】

本発明は上記ヒト・ウロコルチン関連ペプチド蛋白質に対する抗体も対象としている。この抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。

【0061】

50

さらに、本発明は上記ヒト・ウロコルチン関連ペプチド蛋白質と薬学的に許容される基質で構成される医薬品組成物も対象としている。そうした医薬品組成物は体温を低下させたり、食欲を抑えたり、鬱血性心臓不全を治療あるいは予防したり、ストレス及び不安感を治療したり、そして望ましくない程度の低レベルのACTH分泌を改善するために用いることができる。

#### 【0062】

本発明は蛋白質の放射性ヨード化のために用いられるチロシン残基を含むように突然変異されたウロコルチンIIあるいはヒト・ウロコルチン関連ペプチドも対象としている。1つの特殊な修飾はTrp-Glyで構成される配列のウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチドのN末端への添加である。

10

#### 【0063】

本発明はウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチドの欠失突然変異体も対象にしている。特に有益な欠失は上記蛋白質のN末端からの1-5個のアミノ酸の欠失である。

#### 【0064】

本発明は、その内部で標準的『L形』異性体アミノ酸が『D形』異性体アミノ酸と置換されているウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチドも対象としている。ヒト・ウロコルチン関連蛋白質の場合、配列識別番号No.3の位置9に対応するイソロイシン残基のD-イソロイシン、D-フェニルアラニン、及びD-ロイシン、あるいはその他のD形アミノ酸との置換が特に有益である。もうひとつの有益な置換は、配列識別番号No.3又は11の位置17のグルタミン酸残基のDグルタミン酸との置換である。

20

#### 【0065】

本発明は、その内部で種々のアミノ酸が非標準的なアミノ酸と置き換えられているウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチドも対象としている。C-メチル化ロイシン、C-メチル化アラニン、N-im-ベンジルヒスチジン、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリシン、3-メチルヒスチジン、ホモセリン、及びオリニチンはそうした非標準的なアミノ酸の例である。

#### 【0066】

本発明はアクリル化されたN末端を有するウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチドも対象にしている。この蛋白質アクリル化は、酵素による劣化からウロコルチンII又はウロコルチン関連ペプチドを保護したり、その親水性/疎水性などその蛋白質の種々の特性を変化させるために、その蛋白質のN末端の脂肪酸などの分子と結合するために用いられる。これらの修飾は、in vivoで上記蛋白質の持続性や生物学的利用能を変化させるために用いることができる。

30

#### 【0067】

本発明は画像化あるいは生物学的アッセイで利用するための蛍光性ラベルを含むように修飾されたウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチド蛋白質もその対象としている。

#### 【0068】

本発明は放射性核種のための錯化剤と接合されたウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチド蛋白質も対象にしている。放射性核種に錯体化されたウロコルチンIIもシンチグラフィあるいは種々のアッセイで有用である。

40

#### 【0069】

本発明は1つの毒素に接合されたウロコルチンII又はヒト・ウロコルチン関連ペプチドも対象にしている。得られた毒素接合体はCRFレセプタ担持細胞の標的を定めた破壊のために用いることができる。

#### 【0070】

#### 【実施例】

以下の実施例は本発明の種々の実施の形態を示すことのみを目的としており、いかなる意味でも本発明の限定は意図していない。

50

## 【 0 0 7 1 】

## 実施例 1

## ヒト・ウロコルチン関連蛋白質の同定

新しい C R F - R リガンドを同定する努力において、H M M E R ソフトウェア・パッケージ (Sean Eddy, Department of Genetics, Washington University, St, Louis, MO、参考文献 19 参照) を用いて、ラット/ヒト C R F、ラット・ウロコルチン、ヒト・ウロコルチン、カエル・ソウバジン、及びシロコバンザメ・ウロテンシン I を含む周知の C R F 蛋白質系統のクラスター性 W アラインメントから非顕マルコフ・モデル (H M M) を構成した。この H M M を用いて公開されているヒト・ゲノム・データベースを調査し、かなりの配列相同性を示しているが、これまでに同定されている遺伝子の一部ではない 1 0 9 塩基対領域を含むクロモソーム 3 p 2 1 . 3 - 4 から誘導された B A C (Genbank accession No. AC005903) が同定された。この領域は 6 2 1 塩基対にわたって広がっており、この配列 (Genbank accession No. BE622276) と重なったヒト E T S クローンとの同一性を有していた。しかしながら、このヒトの遺伝子配列はそのペプチドの C 末端処理を可能にするコンセンサス蛋白質分解性切断部分を含んでいない。従って、この蛋白質はヒト・ウロコルチン関連ペプチド (h U R P) 配列と命名された。図 1 はこのヒト U R P 蛋白質の予想されたオープン・リーディング・フレームのヌクレオチド配列 (配列識別番号 No. 1) を示している。この遺伝子はアミノ酸配列 (配列識別番号 No. 2) のペプチドをコードする。

## 【 0 0 7 2 】

ヒト・ウロコルチン関連ペプチド遺伝子の存在とその配列を確認するために、そのゲノム性クローンから上記ヒト・ウロコルチン関連ペプチド配列を増幅するために用いられたものと同様のオリゴヌクレオチド・プライマーを用いて、ヒト臍臓島 c D N A ライブラリから P C R によって c D N A フラグメントを単離した。このフラグメントも p G E M ベクター内にサブクローニングして、配列決定した。この c D N A 配列は上記ゲノム配列の一部に対応する。この部分的 c D N A 配列は図 2 の下線を付した配列と対応している。図 1 と 2 に示されている配列はヒト・ウロコルチン関連ペプチドのポリペプチド前駆体をコードする。ヒト・ウロコルチン関連ペプチドの最初の 1 9 個のヌクレオチドはその蛋白質の翻訳後修飾中に切断されてアミノ酸配列の成熟したヒト・ウロコルチン関連ペプチドをつくりだす信号ペプチドをコードする。

I V L S L D V P I G L L Q I L L E Q A R A R A A R E Q A T T N A R I L A R V G H C - N H <sub>2</sub> (配列識別番号 No. 3)

図 3 はヒト・ウロコルチン関連ペプチドのアミノ酸 7 2 - 1 0 9 間とヒト・ウロコルチン、ヒト・ウロテンシン I、ヒト・コルチコトロピン放出因子 (C R F)、カエル・ソウバジン、そしてサメ C R F / U r o の相当するセグメント間の相同性比較の結果を示している。この領域の相同性は 2 6 % から 4 2 % の範囲である。

## 【 0 0 7 3 】

## 実施例 2

## マウス・ウロコルチン II の同定

ヒト遺伝子配列に基づくフラグメント性 c D N A プローブをラットの組織 (脳) と特殊な方法でクロスハイブリダイズさせたところ、これら 2 つの種の間にはかなりの程度の相同性が存在することが示唆された。このヒト配列に基づいて、c D N A 末端急速増幅 (R A C E) 法で相同性マウス遺伝子を同定するためのプライマーを設計した。R A C E - レディ c D N A を、S M A R T R A C E c D N A 増幅キット (Clontech) を用いてマウス全脳ポリ (A +) R N A から作成した。最大の異種プライミングを行なわせるようにするために、P C R 反応を低刺激性 (低温 T<sub>m</sub>) 条件で実施した。一回目の増幅はタッチダウン方式 (9 4 °C、3 0 秒間; 7 0 °C から 5 5 °C へのインクリメント、3 0 秒間; 7 2 °C、3 分間) で行い、次いで、ネストされたプライマの複数の組み合わせを用いた二回目の増幅を行なった (9 4 °C、2 0 秒間; 5 5 °C、2 0 秒間; 7 2 °C、3 分間)。候補となる P C R 生成物を p C R I I - T O P O (Invitrogen) にクローニングして、両方のストランド

の配列決定を行なった。候補となる5'及び3'反応生成物をそれらの(ヒトの配列から推定された)予想サイズに基づいて同定し、クローニングし、さらに配列決定した。

#### 【0074】

マウス・ウロコルチンIIに関して予想されたアミノ酸配列を図4Aに示す。この遺伝子は112アミノ酸前駆体をコードし、そしてC末端配列はボックス内領域(図4A)に示されている推定38アミノ酸成熟ペプチドに対するコード領域を含んでいる。このコード配列のC末端部分の後に、グリシン及び対になった塩基性配列(R-R)が続いており、これがそれぞれアミド化及び前駆体からの切断と関与していると考えられる。

#### 【0075】

他の2つの推定あるいは知られているウロコルチン関連ペプチドが存在しており、1つはそのペプチド配列が公表されているヒトESTから推定されたヒトのもので、他方は最近クローンされた(20)(タキフグからの)フグURPである。これらヒト及びサカナ・ウロコルチン関連ペプチド、ラット・ウロコルチン、及びラット/ヒトCRFとのアラインメントを図4Bに示す。アミノ酸レベルでは、マウス・ウロコルチンIIのコード領域はヒト及びサカナ・ウロコルチン関連ペプチドとそれぞれ77%及び45%の相同性を示す。マウス・ウロコルチンIIはこのペプチド系列の知られているメンバーと比較的關係が深く、ラットCRF及びラットUCNとそれぞれ36%及び44%の相同性を有している。保存性置換を可能にすれば、関連性は62%(CRFと)及び59%(ウロコルチンと)に増大する。

#### 【0076】

### 実施例3

#### ペプチド合成

マウス・ウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドを固体相方式、メチルベンズヒドリル・アミン樹脂、及びBoc方式(21)を用いて手作業で合成した。ジクロロメタン内に60%の割合で溶かしたトリフルオロ酢酸を用いて、Boc基を除去した。主鎖集合はジイソプロピルカルボジイミドで媒介された。これらのペプチドを切断して、フッ化水素酸内で脱保護化し、RP-HPLC及び3つの溶媒システム(pH2.25及び6.5のリン酸トリエチルアンモニウム及び/又は0.1%TFA)(22)を用いて精製した。それぞれ独立のHPLC及びCZE基準を用いて調べたところ、これらのペプチドは95%以上の純度であった。質量スペクトルを用いて、これらの製剤の組成を確認した。

#### 【0077】

### 実施例4

#### ウロコルチンIIによるレセプタ活性化

ウロコルチンIIのCRF-R1及びCRF-R2レセプタに対する親和性を放射性レセプタ・アッセイで評価した。粗膜画分をクローンされたCRF-R1又はCRF-R2を安定的に発現するCHO細胞から調製した。テスト・ペプチド及び放射性リガンド、 $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>0</sup>, Glu<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]ソーバジンのアッセイ緩衝剤(20mM HEPES、2mM EGTA、0.1%BSA、10%サクロース、pH7.6)内に希釈させ、0.1%ポリエチレン・イミンで前もってコーティングしたMAGVマイクロタイター・プレート(Millipore)内でレセプタ膜調製物と結合させた。反応混合物を室温で90分間培養してから、アッセイ緩衝剤で急速洗浄を2回行なって、その後ろ過した。この放射性リガンド錯体はガンマ放射カウンティングで定量した。抑制的結合定数をPrismソフトウェアを用いて判定した。その結果を表2に要約して示した。

#### 【0078】

#### 【表2】

10

20

30

40

選択されたCRFレセプタ・リガンドの結合特性及び機能的活性

| ペプチド              | CRF-R 1               |                             | CRF-R 2               |                             |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
|                   | 平均 $K_i$ (nM)<br>(結合) | 平均 $EC_{50}$ (nM)<br>(cAMP) | 平均 $K_i$ (nM)<br>(結合) | 年齢 $EC_{50}$ (nM)<br>(cAMP) |
| ウロコルチンII<br>(マウス) | >100                  | >100                        | 0.66(0.13-3.3)        | 0.14(0.03-0.52)             |
| URP<br>(ヒト)       | >100                  | >100                        | 0.50(0.22-1.16)       | 0.42(0.16-1.1)              |
| ウロコルチン<br>(ラット)   | 0.32(0.14-0.77)       | 0.29(0.12-0.70)             | 0.62(0.14-2.8)        | 0.17(0.043-0.68)            |
| ソウバジン<br>(カエル)    | 0.94(0.49-1.8)        | N/A                         | 1.7(0.77-3.9)         | N/A                         |

10

【0079】

これらの値は、各テスト・ペプチドに対して安定的にトランスフェクトされたCHO細胞あるいはそれらの細胞膜を用いて3 - 6回の実験を繰り返して得られたものである。EC<sub>50</sub>と $K_i$ 値はPrismソフトウェアを用いて判定された。それらの常用対数値( $\log_{10}$ )の平均を取った( )。平均EC<sub>50</sub>あるいは $K_i$ は10 と取られた。常用対数値の標準偏差を計算した( )。示されている範囲は[ (10 ) 10 又は10 / 10 ]であった。

20

【0080】

ウロコルチンと比較して、ウロコルチンIIはラベルされたソーバジンをCRF-R 1に結合させる競合においては少なくとも1000分の1以下の効果であったが、CRF-R 2に結合させる競合においてはウロコルチンとほぼ同様であった。タイプ2レセプタに対するこのかなりの選択性は細胞内cAMPの蓄積によって測定したレセプタ活性化においても認められた。安定的にトランスフェクトされたCHO細胞(DMEM/10% FBS内で培養されたもの)を48ウェル組織培養皿(Costar)に入れて、24時間にわたって取り出された。この培養液は措置の少なくとも2時間前にDMEM/0.1% FBSに変更された。これらの細胞を0.1mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチンで30分間予備培養して、その後、37 の温度で20分間ペプチドに露出させた。細胞内cAMPを抽出して、RIAキット(Biomedical Technologies)を用いて3組ウェルからの2つのサンプルで測定した。cAMPアッセイにおいて、ウロコルチンIIはCRF-R 2に対してはウロコルチンとほぼ同様の有効性を示した(表2)。ウロコルチンIIのCRF-R 1に対する極端に低い親和性の故にこのレセプタに対する有効性についての判定は不可能であった。

30

【0081】

40

実施例 5

結合は真空ろ過多重スクリーン・アッセイ・システム(Millipore)を用いて96ウェル0.2  $\mu$ m Duraporeプレートで行われた。各ウェルは総体積200  $\mu$ lで、50  $\mu$ lの結合緩衝液(10% サクロース、0.1% BSA、2mM EGTA、20mM HEPES緩衝液、pH 7.5)；50  $\mu$ lの非ラベル競合物(ウロコルチン又はヒト・ウロコルチン関連ペプチド)を結合緩衝液内に種々の希釈度で溶かしたもの；50  $\mu$ lの<sup>125</sup>I-ソーバジンを1ウェルあたり150,000 cpm入れたもの；及び50  $\mu$ lの細胞膜で構成されていた。プレートを室温で1時間培養してから、真空ろ過して、結合緩衝液で2度洗浄し、その後乾燥させた。個々のフィルターをパンチ・アウトして、ガンマ・カウンタを用いてカウントした。

50



## 【0082】

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドが媒介するCHO細胞内で安定的に発現されたCRF-R1とCRF-F2への<sup>125</sup>I-ソーバジン結合の置き換えを図5に示す。このデータから、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドはCRF-R1に対しては78 nM、CRF-R2に対しては0.23 nMの解離定数( $K_d$ )を有していることが分かった。一方、ウロコルチンはCRF-R1に対しては0.13 nM、CRF-R2に対しては0.15 nMの解離定数を有していた。従って、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドはコルチコトロピン放出因子タイプIIレセプタに対してウロコルチンよりずっと強い特性を示す。

## 【0083】

## 実施例 6

## ウロコルチンII mRNAの発現

マウス及びラットの脳内でのウロコルチンII mRNA発現のパターンを分析するために、ハイブリダイゼーションに関する組織化学的研究を行った。動物を抱水クロール(350 mg/kg, ip)で深く麻酔にかけ、上行大動脈を介して食塩水で灌流培養を行い、その後、氷冷4%パラホルムアルデヒドを0.1%ホウ酸緩衝液pH9.5内に溶かしたもので灌流培養を行った。脳を16時間ポストフィックスして、10%サクロースを0.1Mリン酸緩衝液内に溶かしたもののの中にいれて凍結防止した。4つ(マウス)あるいは6つ(ラット)の30 µm厚凍結断片を摺動マイクロトームを用いて切り取り、低温エチレン・グリコールを主体とする凍結防止剤内に回収し、組織化学的処理を行うまで、-20℃の温度で保存した。

## 【0084】

最初にマウスcDNAを含んでいるTOPO-IIプラスミドを直線化して構成された<sup>35</sup>Sラベル・アンチセンス及びセンス(比較対照)cRNAプローブ(23)を用いてin situハイブリダイゼーションを行った。プローブを1-3 × 10<sup>9</sup> dpm/µgの特定の活性を示すようにラベルして、約10<sup>7</sup> cpm/mlの濃度でスライド上に置いて、高度に厳しい条件(50%ホルムアルデヒド)下で56℃の温度で一昼夜ハイブリダイゼーションさせた。最終的な洗浄を65-68℃の温度下で、15 mM NaCl/1.5 mM シュウ酸ナトリウム内で行った。その後スライドを脱水して、16時間X線フィルム(-Max; Kodak)に露出させ、そしてKodak NTB-2液体エマルジョンで被覆して、4℃の温度下に21-28日間放置した。

## 【0085】

ハイブリダイゼーションに関する組織化学的研究は、マウス及びラットの脳内でウロコルチンII mRNA発現の一貫し、限定されたパターンが発現されることを明らかにした。アンチセンス・プローブとして同様の特異活性にラベルされたセンス・ストランド流出液はバックグランド以上のハイブリダイゼーション信号をつくりだすことはできなかった。観察されたウロコルチンII mRNAの分布は圧倒的に皮質下であることが認められ、主な発現サイトは視床下部の傍室核、視索上核、そして弓状核などのストレスに関連した細胞群、そして、吻側橋の遺伝子配座などであった(図6)。脳幹の運動核(三叉、顔面、及び舌下)、及び脊髄腹壁角もウロコルチンII mRNA発現のサイトとして確認された。非神経要素の間では、硬膜静脈上ではポジティブなハイブリダイゼーション信号が観察されたが、脈絡叢と上衣においてはそれは認められなかった。グリア細胞要素によるウロコルチンII mRNA発現のはっきりした兆候はなかった。

## 【0086】

## 実施例 7

## 霊長類の脳におけるウロコルチン関連ペプチドの発現

霊長類の脳におけるヒト・ウロコルチン関連ペプチドの発現をin situハイブリダイゼーションによって調べた。このin situハイブリダイゼーションはヒト・ウロコルチン関連ペプチドの約400個の塩基対に対応する<sup>35</sup>Sラベル・アンチセンスcRNAプローブを用いて、マカカファスシキュラリス(Macaca fascicularis)から得られた脳組織の断片上で行った。このプローブを10<sup>7</sup> cpm/mlの濃度でスライド上に置い

10

20

30

40

50

て、一昼夜ハイブリダイゼーションが進行するようにした。ハイブリダイゼーション後、スライドを  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  のリボヌクレアーゼ A で  $37^\circ\text{C}$  の温度下で 30 分間処理して、 $70^\circ\text{C}$  の温度で  $15 \text{ nM}$   $\text{NaCl}/1.5 \text{ mM}$  シュウ酸ナトリウム /  $50\%$  ホルムアミド内で洗浄した。スライドを脱水して、X 線フィルム (BetaMax; Kodak) に 24 時間露出させた。そのオートラジオグラムを図 7 で示す。ウロコルチン関連ペプチドに関するポジティブ信号は霊長類視床下部の傍室核 (PVH)、視索上核で観察された。

【0087】

#### 実施例 8

##### ウロコルチンIIが誘発する Fos 発現

集中ウロコルチンII投与に反応を示す細胞群を確認し、これらが CRF - R2 発現のサイトに一致する程度を評価するために、icv ペプチド投与によって誘発された中間初期遺伝子生成物、Fos の発現について観察した。成長した雄 Sprague-Dawley ラット (実験開始時に  $250 - 300 \text{ g}$ ) 及び C57BL/6 マウス ( $25 - 40 \text{ g}$ ) をコロニー室に入れて、12:12 明暗サイクルで飼育し、実験開始前には水と食物に自由にアクセスできるようにしておいた。脳内血管内 (icv) 注射の場合、ラットをケタミン/キセラジン/アセプロマジンで麻酔にかけ、側脳室内で終端している 26 ga ガイド・カニューラで定位固定的に埋め込んだ。ペプチドを静脈注射 (iv) する場合、動物には内在頸静脈血管カテーテルが固定された。icv 注射を受けたラットにも腹部内にトランスミッタ (Mini-Mitter) を埋め込んで、全体的活性レベルと体温をリモート方式でモニターした。手術後、すべての実験を開始する前に動物に 7 日間の体力回復期を用意し、その間、それらの動物は日常的に取り扱われた。すべての手順は Institutional Animal Care and Use Committee of the Salk Institute によって承認を受けたものであった。

【0088】

Fos 発現の誘発パターンをモニターするために、合成ウロコルチンII (icv 注射の場合、動物 1 匹あたり  $2 \mu\text{l}$  生理食塩水あたり  $1, 5$  又は  $10 \mu\text{g}$  を溶かしたもの、iv 投与の場合は  $200 \mu\text{l}$ ) あるいは媒体だけを用いて、ラットに午前 10 時に icv あるいは iv 注射し、2 時間後に灌流培養した。食物摂取に対するペプチド投与の効果をモニターするために、動物に対して、消灯時間の 30 分前に合成マウス・ウロコルチンII、ラット・ウロコルチン、あるいはラット/ヒト CRF を icv で注射した。その後、6 時間の間 1 時間毎の摂取量と 12 時間の時の摂取量を測定した。変動の反復測定分析 (ANOVA) を用いて分析し、多重比較を行うための Bonferroni 補正を適用した。

【0089】

免疫組織化学的調査を行うために、細胞組織を  $0.3\%$  過酸化水素と  $1\%$  ホウ化水素ナトリウムで連続的に予備処理した。その後、PBS /  $0.2\%$  トリトン X - 100 で浸透可能にし、PBS /  $2\%$  ブロッキング血清内で 48 時間、一次抗血清で培養した。Fos 免疫活性をヒト Fos 蛋白質 (Santa Cruz Biotechnology, 1:5 K) の N 末端合成フラグメントに対してウサギ内に発生したポリクローナル抗血清を用いてその場所を特定した。場所の特定は参考資料 (24) に述べられている方法でニッケルを増強した通常のアビジン - ビオチン免疫パーオキシダーゼ法を用いて行われた。

【0090】

$1 \mu\text{g}$  の合成ウロコルチンIIを注射すると、中枢自立制御に関与している相互関連構造の群の中で最も顕著な活性応答が発生した ( $25, 26$ )。これらには分界条の基底核、小扁桃の中枢核、視床下部の傍室核 (PVH)、傍小脳脚核、及び孤束核 (NTS、図 8) などで個別の発生形態が含まれていた。もちろん、NTS だけが CRF - R2 発現の座として述べられてきている ( $27$ )。側方隔膜、中脳縫線核、及び視床下部の腹側正中核 ( $27, 28$ ) を含む CRF - R2 発現の他の重要なサイトでの Fos 誘発は食塩水を注射した比較対照群におけるそれと区別できなかった。ペプチドの投与量を大きくすると ( $5$  あるいは  $10 \mu\text{g}$ )、同様の分布のより強い活性応答が誘発された。

【0091】

icv 注射の潜在的な全身的影響を制御するために、同様の量のウロコルチンIIをラット

10

20

30

40

50

の別の群に対して静脈注射で与えた。最も高い(10 µg)の用量の場合だけ、比較対照レベルをはっきり上回るFos誘発が認められた。パターンは中枢注入に対する反応で見られるものと同様であったが、ラベルされた細胞の数やその染色強度も1 µgのウロコルチンIIをi c v注射した後に安定してみられるものには及ばなかった。

【0092】

#### 実施例 9

##### 脳におけるウロコルチン関連ペプチドによって刺激されたFOS発現

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドによる中枢ストレス関連細胞群の活性化について、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドを注射した後のそれら細胞におけるFos遺伝子生成物を検出することで調べた。ラットに実験を開始する7日前に、側方脳内血管内にガイド・カニ  
10  
ニューレを埋め込んだ。テストを実施した日に、それらのラットに5 µgの合成ヒト・ウロコルチン関連ペプチドを5 µlの無菌食塩水に溶かしたものを注射した。ラットを2時間後に致死させ、種々の脳断片のスライドを作成した。これらのスライドをウサギ内でヒトFos蛋白質の残基3 - 16に対して発生されたポリクローナル血清を用いて、Fos免疫反応性の免疫パーオキシダーゼ局所化によって染色した。

【0093】

図9に示されているように、Fos免疫反応性は分界条基底(BST)、視床下部の傍室核(PVH)、小扁桃中枢核(CeA)、側方傍小脳脚核(PBI)、青斑(LC)、及び孤束核(NTS)において検出された。これらのサイトのそれぞれはCRF関連ペプチド活性のサイトとして上に述べられている。  
20

【0094】

#### 実施例 10

##### ウロコルチンIIの挙動影響

CRF及びウロコルチンと同様、ウロコルチンIIは主に食物摂取を抑制するように機能することもできる(図10A)。昼夜サイクルの夜間フェーズの開始時にこれらのペプチドの注射(1 µg、i c v)を受けたラットの個別群からの測定値は、措置と時間との間のかなりの相互関係を明らかにしており[ $F(18, 95) = 4.22$ ,  $P < 0.0001$ ], 両方の主な効果も安定的に示された。これらの3つのペプチドのすべては12時間の時間間隔で食物摂取量をかなり減少させ、抑制範囲は30%(CRF)から35%(ウロコルチンII)、さらに70%(ウロコルチン)であった。これらの効果は時間の経過に伴  
30  
って異なって示される傾向があり、ウロコルチンとCRFで措置した動物の食物摂取量はテスト期間の初期(4 - 5時間)において、食塩水を注射した比較対象群に対して、ウロコルチンIIで措置したラット(6時間)と比較してかなり低下した。

【0095】

これら同じ固体で、総運動量と体温を遠隔測定で観察した(図10B)。活性データの分析は、薬と時点との間にかなりの相互関係があることを示し[ $F(33, 110) = 1.94$ ,  $p < 0.006$ ], 両方の主要効果も有意であった。ポストホック比較はCRFを投与された動物は注射後2 - 6時間にわたって媒体で処理したラットをかなり上回る活性を示した( $P < 0.001$ )。ウロコルチンとウロコルチンIIによる措置は、いずれも注射後のいずれの時点においても、安定した変化は示さなかった。中核体温についても記録したが、それぞれのペプチドは比較的軽度(0.5 - 1)で一過性(2時間)の体温低下反応を示したただであった(データ示さず)。  
40

【0096】

#### 実施例 11

##### ラット下垂体前葉細胞に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの効果の*in vitro* バイオアッセイ

前葉活動に関連して、これまでに述べられている(30)方法に従って、ラット下垂体前葉細胞の一次培養体において、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドに対するACTH分泌反応を測定した。ACTHレベルはNichols Institute Diagnostics製のACTH免疫アッセイ・キットを用いて判定した。ラット下垂体前葉細胞をラット・ウロコルチンあるいは  
50

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドのいずれかで処理して、分泌されたACTHのレベルをキット(Nichols Institute Diagnostics)を用いて測定した。ウロコルチン及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドのACTH分泌に対する影響を図11に示す。下垂体前葉細胞内でのACTH分泌の刺激のヒト・ウロコルチン関連ペプチドに対する感度はウロコルチンの場合と比較して低いことが分かった。

【0097】

#### 実施例12

##### A7R5細胞に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響の*in vitro*バイオアッセイ

天然のCRF-R2を発現するA7R5細胞におけるcAMPレベルに対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響について調べた。A7R5細胞株を10%ウシ胎児血清、2mM Lグルタミン、100µg/mlストレプトマイシンで補強されたDMEM内に保持した。細胞を10,000細胞/cm<sup>2</sup>の割合で播種し、6日間成長させた。血清枯渴細胞を0.1mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチンを用いてアッセイ培地内で20分間予備培養して、指示された濃度のペプチドで30分間措置した。cAMPレベルをRIA(Biochemical Technologies)によって測定し、その結果を図12に示す。ヒト・ウロコルチン関連ペプチドはcAMP生産に関してウロコルチンと同様に効果を示す。

【0098】

#### 実施例13

##### 全体的活性に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドがストレス反応の発生に一定の役割を果たしているかどうかを調べるために、ラットの総運動活性に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響について調べた。カニユーレを右側脳室内に外科的に入れて、総運動活性を継続的にモニターできるように遠隔測定装置を腹部内に埋め込んだ。これらの動物を手術後7日間は体力回復させた。この期間中、それらの動物に対しては注射手順に順化させるように毎日処理した。注射を行った日に、基底活性を4時間記録した。消灯が行われる午後6時に、それらの動物に5µlの食塩水か、全部で5µgのヒト・ウロコルチン関連ペプチドを含んでいる食塩水5µlを投与した。活性カウントを4時間期間毎に合計した。それらの結果を図13に示す。比較対照と比べて、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドを注射した動物において、全体的な運動活性において有意な変化は認められなかった。

【0099】

#### 実施例14

##### 体温に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドのラットの体温に対する影響について調べた。ヒト・ウロコルチン関連ペプチド注入のためのカニユーレを右側脳室に入れた。体温をひそかに継続的に分析するための遠隔測定装置を腹部内に埋め込んだ。これらの動物に7日間の術後回復期間を設定した。この期間に、被験動物に対して注射手順に慣れるように毎日措置した。注射を行なった当日、基底体温を3時間にわたって記録した。午後6時(消灯時)、それら被験動物に対して5µlの生理食塩水、あるいは1µg/µlの割合でヒト・ウロコルチン関連ペプチドを塩水に溶かしたもの5µlを注射した。体温を12時間にわたって5分間毎にモニターした。図14に示されているように、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドを注射された被験動物の体温は、注射直後と7時間後に低下している。

【0100】

#### 実施例15

##### 食欲に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響

食欲に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響についてもラットで調べた。ヒト・ウロコルチン関連ペプチドを注入するためのカニユーレを外科的に右側脳室内に入れて、それら被験動物に7日間の体力回復期間を設定した。この期間に、これらの被験動物に注入手順に慣れさせるための措置を毎日行なった。注入の当日、それらの被験動物に5µlの生理食塩水かあるいは1µg/µlの割合でヒト・ウロコルチン関連ペプチドを生理食

塩水に溶かしたもの 5  $\mu$  l を注射した。各動物が食べた餌の量を 6 時間にわたって 1 時間ごとに記録すると同時に 14 時間目にも記録した。

【0101】

実験の全期間を通じて摂取された餌の総量を各期間ごとに図 15 A に示してある。ヒト・ウロコルチン関連ペプチドを注射された被験動物は比較対照動物より摂取量がかなり低かった。図 15 B は期間毎に摂取された餌の量をまとめて示している。ヒト・ウロコルチン関連ペプチドで措置した動物は注射後 1 時間と、2 時間目から 3 時間目の間、そして実験の最後の 8 時間に摂取量が特に低下した。

【0102】

実施例 16

有益なウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチド修飾及び誘導体

ここに開示されているウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドはこれらの蛋白質のプロホルモン形態を示している可能性が高い。ホルモンの活性化は蛋白質分解処理とそれら蛋白質の非アミド化形態をもたらす修飾などそれら蛋白質に対する他の修飾が関係していることが考えられる。

【0103】

他の C R F レセプタに関するリガンドを用いたこれまでの研究は、それらリガンドのレセプタに結合する能力あるいは生物学的活性を失わずに、それらリガンドに対していろいろなアミノ酸置換を行なうことができることを示している。ウロコルチンを用いたこれまでの多数の研究は、1 つ、2 つ、あるいは 3 つまでもの置換でも容易に行なえることを示している。いくつかの例では、ウロコルチンに対する修飾はより望ましい薬学的特性を有する蛋白質をもたらした。ウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドは小型の蛋白質であるから、そうした修飾はこの技術分野の当業者に周知のペプチド合成方法によって非常に容易に組み込むことができる。これらには、固相法、部分固相法、フラグメント濃縮法、そして古典的な溶液添加などの方法がある。ウロコルチンIIやヒト・ウロコルチン関連ペプチドに組み込まれるアミノ酸が非標準的なものである場合、これらの方法が特に好ましい。また、これらの修飾がまったく天然のアミノ酸だけを用いて行なわれる場合には、修飾されたウロコルチンIIあるいはヒト・ウロコルチン関連ペプチドの突然変位及び事後的な発現のために組み換え D N A 技術を用いることもできる。

【0104】

ヒト・ウロコルチン関連ペプチドはチロシン残基を含んでいない。チロシン残基は蛋白質の放射性ヨード化に用いられるので、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドに対する 1 つの可能な修飾はそれら蛋白質内の別のアミノ酸をチロシンと置換する方法であろう。これまで、Try - Gly で構成される配列のウロコルチンの N 末端に対する付加については述べられている。得られた蛋白質は結合能力と生物学的活性を有する C R F レセプタを含んでいるが、蛋白質の放射性ヨード化には有益であろう。本発明による蛋白質の他の N 末端延長はラベリングやその他の方法にも適用できるであろう。

【0105】

ウロコルチンの最初の 7 つから 10 個の残基を欠失させると有効なウロコルチン拮抗物が形成されることが分かっている。これらの蛋白質は C R F レセプタに対して結合することはできるが、それらのレセプタを有意に刺激、あるいは活性化させるには至らなかった。ウロコルチンIIあるいはヒト・ウロコルチン関連ペプチドの最大 5 つのアミノ酸を欠失させても同様に有力な拮抗物が形成されるであろう。他のウロコルチンIIあるいはヒト・ウロコルチン関連ペプチド・フラグメントからも拮抗物をつくりだすことが可能であるかもしれない。これらの拮抗物は通常は C R F 結合蛋白質によって除去される内生的ペプチドのレベルを向上させる上で有効である。C R F 結合蛋白質と結合して、その同じ蛋白質に結合する C R F、ウロコルチン、ウロコルチンII、及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドをブロックすることにより、内発性 C R F、ウロコルチン、及びウロコルチンIIの有効な *i n v i v o* 濃度が増大する。こうした拮抗物はその効果を増大させるために C R F、ウロコルチン、ウロコルチンIIあるいはウロコルチン関連ペプチドのその他の促進物ある

10

20

30

40

50

いは拮抗物と共に投与することができる。

#### 【0106】

他のCRFレセプタ結合蛋白質に関する広範な分析は、通常のアミノ酸をD異性体アミノ酸あるいは環化アミノ酸と置換することで、CRFレセプタに対する親和性が増大することを示している。特に有益な置換は配列識別番号No.3あるいは配列識別番号No.11の位置9に対応するイソロイシン残基の『D形』異性体アミノ酸、好ましくはD-イソロイシン、D-フェニルアラニン、及びD-ロイシンとの置換である。同様に、配列識別番号No.3あるいは配列識別番号No.11の位置17に対応するグルタミン酸残基をDグルタミン酸と置換することも可能である。環化アミノ酸は2つ以上の残基の側鎖間の化学結合によっても形成することができる。例えば、隣接するグルタミン酸とリシン残基を反応させてラクタム環をつくりだすアミド結合を形成することができる。C-メチル化ロイシン、C-メチル化アラニン、N-im-ベンジルヒスチジン、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリシン、3-メチルヒスチジン、ホモセリン、そしてオルニチンなどの非標準的アミノ酸との置換もヒト・ウロコルチン関連ペプチドの促進物あるいは拮抗物を形成するために用いることができる。

10

#### 【0107】

ここに開示されているウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドに対する修飾は実行可能な修飾を示すためであって、いかなる意味でも本発明の範囲の限定は意図していない。

#### 【0108】

20

#### 検討

神経ペプチドのCRF系統の新しいメンバーを同定するためにゲノム全体にわたる相同性調査が行なわれた。新しいリガンドの1つであるウロコルチンIIはCRF-R2と選択的に結合し、ラットCNSの個々の領域で発現され、そして、内臓感覚情報の処理と自律性流出物の調節に関与する中枢ニューロンを活性化させる。さらに、ウロコルチンIIは総運動活性にはまったく影響を及ぼさずに食物摂取を抑制する。

#### 【0109】

CRF系統メンバーに期待される構造的、結合性、活性及び発現特性を示すマウスのペプチドに加えて、(一般に利用できるEST配列に基づいて)ヌクレオチド・レベルでマウス配列と80%同一のヒト・ウロコルチン関連ペプチドが同定された。しかしながら、ヒトのペプチドにはっきり示されている重要な相違点はヒトの相同体のC末端処理をおこなうであろういずれの明白な蛋白質分解性切断サイトが存在しないことである。この蛋白質からいずれかの相同性ヒト・ペプチドが発生されるかどうか、発生されるとしたらどのように発生されるのかは依然として検討課題である。しかしながら、ウロコルチンはCRF-R1及びCRF-R2の両方を通じての信号によって高い親和性で結合される(14-16)。マウス・ウロコルチンII及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドはこれらの測定で高度のCRF-R2選択性を示し、これら2つのレセプタ・タイプによって媒介される解離機能において疑いもなく一定の役割を果たすであろう。図16はウロコルチンIIがCRF-R1及びCRF-R2にどのように作用するかに関するモデルを示している。ウロコルチンIIは高い親和性でCRF-R2と結合するが、CRF-R1には結合しない。ウロコルチンは両方のレセプタに結合するが、CRFは高い親和性でCRF-R1には結合するものの、CRF-R2に対しては結合しない。

30

40

#### 【0110】

ウロコルチンII mRNAはCRF(傍室核、例えば参考文献31参照)及びウロコルチン(脳幹及び脊髄運動核、例えば参考文献18参照)のものと部分的に重なり合っているように見えるが、ネズミの脳内で一定の皮質下分布を示す。特に興味深いのは、その転写物がストレスに関連した生理学的及び行動上の機能に関与している細胞に発現されることである(参考文献13参照)。これには皮質膜に広く分布した突起をもたらし、種々のレベルの覚醒及び不安感の発生に関与していることが示されている青斑(参考文献32参照)、複数の関連神経分泌性群及び中枢自律神経回路内の感覚及び運動トラフィック

50

を調節するCNS内への突起を内包している傍室核（参考文献33参照）、そして、食物摂取とエネルギー・バランスの調節に役立っている広範なシステムの中核的構成要素としての弓状核（参考文献34参照）などが含まれている。こうした関連性における新しいペプチドの位置に関する解剖学的及び機能的データは未だ不足しているが、中枢ウロコルチンII系はより広い中枢CRFネットワークの領域としてこれまで長い間示唆されてきたストレス関連機能に関与している可能性がある。これは、その主な細胞発現の場所が脳のエディンジャー・ウェストファル核内にあり、前脳に対する文献化された考察の少なさも手伝ってこの点での可能性に制約があるウロコルチンとは対照的である（16、18）。

#### 【0111】

その結合特性と活性を考慮に入れば、中枢ウロコルチンIIによって誘発される細胞活性のパターンがCRF-R2分布を密接に模倣することができない点は予想外であった。icv CRFあるいはUCNによって誘発されるFos発現の分布を比較した最近の研究で、2つの知られている遺伝子によってコードされるCRF-Rsに対するこれらペプチドの結合親和性と大まかにではあるが同様の活性化パターンが文献化された（35）。つまり、ここで述べられていると同様の用量のCRFは高度に優先的な形態でCRF-R1発現のサイトを活性化させたのに対して、UCNの方は主に各レセプタを発現する細胞群の下位集合でFos誘発を引き起こした。しかしながら、さらに、両方のペプチド共、本明細書で示されているようにラットの脳のウロコルチンII誘発活性化反応の優勢的な場所であると思われる中枢自律神経構造のまったく同じ集合を補強した。これは中枢自律神経系の要素がCRF状ペプチドがストレス関連の自律性あるいは行動性反応を誘発するために働きかけることができるサイトで最もよく文献資料化されたものの中に含まれているという点で意味がある。これらの知見は、タイプ1と同様タイプ2レセプタ活性化が、その根拠は不明であるにしてもこのシステムに関与することができることを示唆するものであろう。中枢自律神経系網の結節点の中で、傍室核（R1）とNTS（R2）だけがCRF-R発現サイト（27、28、35）として確認されており、これらのいずれか、あるいは両方のレセプタに媒介された活性化がそのシステム全体の協力を得る上で十分なのかどうかについては検討の余地がある。合成ウロコルチンIIを全身的に注入しても、icv注射による研究で用いられたのと同じ範囲の用量で中枢自律神経細胞群に強力な活性化反応を起こすことができなかったことに留意しておくことは重要である。これは重要な比較対照である。というのは、末梢CRF-R2の活性化が血圧の顕著で一貫した低下をもたらす（16、17）ことができ、顕著な血液低下性刺激は中枢ウロコルチンII投与に対する反応とまったく同じように中枢自律神経構造を活性化できるからである（36、37）。

#### 【0112】

食物摂取及び活性に対するicvによるウロコルチンII投与の効果に関する初期的な特徴づけはストレス関連挙動における個々のCRF-Rsの役割を明らかにしようとする最近の研究努力を補完するものである。例えば、いずれかのレセプタにも変異が認められないマウスは通常の基底食物摂取を示すが、CRF-R1欠失動物は注射を受けた直後の期間には拒食作用には耐えるが、時間が経過するとその傾向がなくなるのに対して、CRF-R2変異体マウスでは逆の傾向が見られることが示されている（11、38、39）。これは、ウロコルチンが媒介する給餌抑制作用の初期及び後期のそれぞれCRF-R1とCRF-R2に媒介された事象であることを示唆している。異なったパラダイム（剥奪-誘導再給餌ではなく、夜間は自由に餌を接種させる）を用いたところ、R2固有リガンドが初期の時点においては食物摂取を安定的には抑制しなかったのに対して、注射から6時間以降経過すると抑制したので、そうした解析を裏付けるデータが提供された。

#### 【0113】

運動活性の測定もこうしたパラメータにはCRF-Rが関与していないことを裏付けている。自発運動活性化がCRF-R1に媒介された事象であることを示すノックアウト・マウスで最近得られた証拠（40）に沿って、R1選択性促進物、CRFが全体的運動活性をかなり増大させたのに対して、ウロコルチンIIを投与してもそうした傾向は認められな

10

20

30

40

50

いことが分かった。興味深いことに、両方のレセプタによって高い親和性で結合されるウロコルチンによる措置が活動増大の方向に有意な傾向を示さず、測定値はCRFに対する反応で見られるものより一貫して低かった。このことは最近増大しつつあるこれら2つの知られているレセプタ・タイプ間での機能的拮抗作用を裏付ける証拠とおおよそ一致している。CRF-R1欠失マウスはストレスに対してエンドクリン及び不安状反応の低下を示すが(41)、CRF-R2変異体系統ではこれらのパラメータの増大傾向が示されており(11、39、42)、このことはCRF-R2の基底活性が反対方向のCRF-R1駆動ストレス反応に一定の役割を果たしている可能性を示唆している。

#### 【0114】

内発性CRF-R2選択性リガンドの確認はストレスに関連した生理的、行動的機能における個々のCRF関連信号発生分子の役割についてのさらに詳しい分析を可能にしてくれるであろう。ウロコルチンII mRNAの中枢発現はペプチドの中枢投与に反応する細胞群を示し、CRF-R2活性化に関してこれまで想定されていた結果と一貫した行動上の反応を裏付けた。ストレスの生物学に関するこのペプチドの位置づけに関するさらなる洞察を行なうためには、ウロコルチンII含有細胞の中枢突起をはっきりさせることと、遺伝子発現及びペプチド放出を調節する因子及び状況についての確認が必要であろう。

#### 【0115】

本明細書には以下の文献が引用されている。

1. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. & Rivier, J. (1981) *Science* 213, 1394-7 20
2. Menzaghi, F., Heinrichs, S. C., Pich, E. M., Weiss, R. & Koob, G. F. (1993) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 697, 142-154
3. Sawchenko, P.E., Imaki, T., Potter, E., Kovacs, K., Imaki, J. & Vale, W. (1993) *Ciba Foundation Symposium* 172, 5-21
4. Rivier, C. and Vale W. (1983) *Nature*, 1983. 305 325-327
5. Rivier, J., C. Rivier, and Vale W. (1984) *n European Peptide Symposium*, Djurö, Sweden. P. 104
6. Chen, R., et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993. 90, 8967-8971
7. Perrin, M. H., et al., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2969-2973 30
8. Potter, E., et al. (1994) in 76th Annual Meeting of The Endocrine Society, Anaheim, CA, p. 217
9. Lovenberg, T. W., et al. (1995) *Endocrinology*, 136, 3351-3355
10. Rohde, E., et al. (1996) *Biochem Pharmacol*, 52 (6), 829-33
11. Bale, T. L., et al. (1999) *Nat. Genet.*, 24 (4), p.410-414
12. Herkenham, M. (1987) *Neuroscience* 23, 1-38
13. Bittencourt, et al. (2000) *J. Neurosci.* 20, 1142-56.
14. Behan, et al. (1996) *Molec. Psychiatry* 1, 265-277
15. Turnbull, et al. (1997) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215, 1-10 40
16. Vaughan, et al. (1995) *Nature* 378, 287-92
17. Spina, et al. (1996) *Science* 273, 1561-4
18. Bittencourt, et al. (1999) *J. Comp. Neurol.* 415, 285-312
19. Eddy, S. R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 361-365
20. Brunner, et al. (2000) *Chromosome Res.* 8, 465-476
21. Miranda, et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37, 1450-9. 94238641
22. Miller, C. & Rivier, J. (1996) *Biopolymers* 40, 265-317
23. Simmons, et al. (1989) *J. Histotechnol*, 12, 168-181
24. Sawchenko, et al. (1990) *Meth. Neurosci.* 3, 247-260
25. Sawchenko, P. E. (1983) *J. Auton. Nerv. Syst.* 9, 13-26 50



26. Saper, C. (1995) in The Rat Nervous System (2nd ed), ed. G. Paxinos, (Academic Press, San Diego) pp. 107-128
27. Van Pett, et al. (2000), J. Comp. Neurol. 428, 191-212
28. Chalmers, et al. (1995) J. Neurosci. 15, 6340-6350
29. Gray, P.C., et al. (2000) J. Biol. Chem., 275(5): p. 3206-3212
30. Vale, W., et al. (1983) Methods in Enzymology: Neuroendocrine Peptides, P. M. Conn, Editor. Academic Press: NY. p. 565-577. Biomedical Technologies Inc.

#### 【0116】

本明細書で取上げたすべての特許あるいは刊行物は本発明が関係する分野の当業者のレベルを示している。これらの特許及び刊行物は引用によって、それぞれ個々の刊行物が具体的、個別的に引用によって組み込まれるのと同様に全体としても本明細書に組み込まれる。

#### 【0117】

当業者であれば、本発明が上に述べた、及びそれに本質的に付随している目的を実行し、課題と利点を達成するのに適していることは自明であろう。ここに示されている実施例は、本明細書に述べられている方法、手順、措置、分子、及び具体的な化合物も含めて現時点での好ましい実施の形態を示すものであり、例示的なものであって、本発明の範囲の限定を意図するものではない。請求項の範囲で定義されている本発明の範囲内で当業者はその変更や他の利用法を想起するであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

上に述べた、及び以下に明らかにされる本発明の特徴、利点及び目的を達成し、より詳細に理解できるようにするために、上に要約的に述べた発明について添付図面に示すいくつかの実施の形態を参照して以下に詳しく説明する。これらの図面は本明細書の一部を構成する。しかしながら、添付図面は本発明の好ましい実施の形態を示すものであって、その範囲の限定を意図するものではない。

【図1】 新しいウロコルチン関連ペプチドとCRFの存在を予見するヒト・ゲノム性DNA配列を示す図。ゲノム配列は公共データベースに示されており、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドの新しい配列を予見するために用いられた。推定開始サイトは位置1であり、成熟したペプチド配列を太字で示す。予想された信号ペプチド切断サイトを矢印で示す。

【図2】 ヒト・ウロコルチン関連ペプチド前駆体と推定されるものを示す図。下線を付した領域はヒト臍島cDNAライブラリからPCRによって分離されたcDNA配列部分を示す。

【図3】 ヒト・ウロコルチン関連ペプチド(URP)とヒトUcn、ウロテンシンI、CRF、カエル・ソーバジン(sauvagine)、及びサメCRF/Uroとの比較を示す図。相同性が最も高い領域は白いボックス内である。保存されたアミノ酸の数を示してある。

【図4】 図4AはUcnIIの予想されたアミノ酸配列を示している。太字で示された開始メチオニンはボックス内に示されているペプチド・コード領域の上流に位置している。完全なヌクレオチド配列はGenbankにデポジットされている(登録番号第AF331517)。図4Bは、マウスUcnIIと相同性ヒト及びサカナ・ペプチド(URPs)及びラットUcn及びラット/ヒトCRFとの位置的整合を示している。マウスUcnII配列と同じ残基をボックスに入れて示してある。 はアミド化サイトを示す。

【図5】 CRFR1とCRFR2 に結合する<sup>125</sup>I - ソーバジンのヒト・ウロコルチン関連ペプチド媒介置換を示す図。CHO細胞内で安定的に発現されるCRFR1とCRFR2 に対するUcn及びURPペプチドの親和性は<sup>125</sup>I - ソーバジンの競合的置換によって判定された。このデータは3つの実験の結果を示しており、抑制的解離定数(K<sub>i</sub>)値(95%信頼限界)はブリズム・プログラマを用いて計算された。

【図6】 図6A - 6Cはラットの脳におけるウロコルチンII mRNA発現を示している。マウス・ウロコルチンII cDNAから発生した同位体でラベルされたアンチセンス

10

20

30

40

50

cRNAプローブを用いて選択領域で観察されたラベリング(白い斑点)を示す暗視野顕微鏡写真。ポジティブ・ハイブリダイゼーション信号が視床下部核上(図6A)、主にはそのマグノ細胞分割部分(pm)上に観察され、よりぼんやりした信号は小細胞性側面(mp)上に見られ、そして青斑点上(LC;図6B)、顔面運動核(VII、図6C)、さらに脳の腹面の脳膜髄膜(men)上に観察される。他の略語: CBL、小脳; v3、第3心室; v4、第4心室。倍率: 図6Aと6B、75倍; 図6C、50倍。

【図7】 霊長類視床下部内でのヒト・ウロコルチン関連ペプチド発現のオートラジオグラムを示す図。PVH、傍室核; SO、視索上核; CN、尾状核; och、視交叉; me、正中隆起; ac、前交連; ic、内包; Sept、隔膜。

【図8】 図8A-8Fは中枢ウロコルチンII微量注入に対する反応における細胞活性化パターンを示す図である。図8A-8C及び8E: 1µg合成マウス・ウロコルチンIIのicv注射から2時間後に致死させたラットで誘発されたFos発現を示す免疫パーオキシダーゼの明視野顕微鏡写真。図8Cと8Eに示すものに対応する領域のCRF-R2 mRNAのハイブリダイゼーション組織化学的位置測定を示す暗視野顕微鏡写真を図8Dと8Fにそれぞれ示す。中枢ウロコルチンII注入は、主に、小細胞核の小細胞区分(図8A)、小脳扁桃の中核核(図8B)、そして孤束の核(NTS、図8C)を含む中枢自律神経及び神経内分泌制御に関与する一連の相互につながった構造におけるFos誘発を引き起こした。これらのうちで、NTSだけがCRF-R2発現のサイトである(図8D)。視床下部の腹側正中核(図8F)を含むCRF-R2発現の他の主要なサイトは検査されたペプチド用量(1-10µg)の範囲ではウロコルチンIIに誘発されたFos発現は示さなかった。すべての顕微鏡写真の倍率は75倍である。

【図9】 図9は分界条末端(BST)、視床下部小細胞核(PVH)、小脳扁桃(CeA)の中核核、外側傍小脳脚核(PBI)、青斑(LC)、そして孤束核(NTS)における核FOS発現の刺激を検査することで、ヒト・ウロコルチン関連ペプチドの中核注入の後の中枢ストレス関連細胞群の活性化を示す。BSTov、分界条末端の層状核(卵形核子構成要素); ic、内包; CP、コード果核(caudoputamen); ac、前交連; V3、第3心室; AHA、前視床下部; pm、後マグノ細胞部(小細胞核); fx、円蓋; CeAm、小脳扁桃中核核(中間部分); BLA、小脳扁桃の基底外側核; scp、上小脳脚; PBel、傍小脳脚核(外側部分); V4、第4心室; ep、上衣; AP、最後野; DMX、迷走神経の背側運動核; ts、孤束; 及びcc、中心管。

【図10】 図10A及び10Bは食物摂取及び総運動活性に対する中枢ウロコルチンIIの影響を示している。図10Aは1µg CRF、ウロコルチン又はウロコルチンIIのicv投与後の平均(±SEM; n=1グループあたり3-6)累積夜間食物摂取(g)を示す。CRFとウロコルチンの両方とも、注入後4時間目から食塩注入比較対象群と比較して食物摂取量をかなり低下させたが、ウロコルチンIIの効果は治療から6時間後まで明らかには示されなかった。\*P<0.002(CRF及びUcn:食塩水)、\*\*P<0.002(CRF、ウロコルチン、及びウロコルチンII:食塩水)。図10BはCRFのicv注入を受けた動物においてかなり上昇した総運動活性の遠隔測定結果を示している。ウロコルチンとウロコルチンIIのいずれも運動活性に対して大きな影響を及ぼすことはなかった。\*P<0.001(CRF:食塩水)。

【図11】 ウロコルチン及びヒト・ウロコルチン関連ペプチドによるラット前下垂体細胞からのACTH分泌の刺激を示す図。ラット前下垂体細胞を培養して、ラット・ウロコルチンあるいはヒト・ウロコルチン関連ペプチドのいずれかで処理した。分泌されたACTHはキット(Nichols Institute Diagnostics)を用いて測定した。

【図12】 天然のCRF-R2を発現するA7R5細胞内でのcAMPレベルに対するヒト・ウロコルチン関連ペプチドの影響を示している。cAMP生成に対する30分間のウロコルチン(白丸)あるいはヒト・ウロコルチン関連ペプチド(黒丸)による培養の用量依存効果。cAMPはRIA(Biochemical Technologies)によって測定した。

【図13】 ラットにおける総運動活性に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチド(hURP)の影響を示す図。

10

20

30

40

50

【図 1 4】 ラットの体温に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチド ( U R P ) の脳室内注射の影響を示す図。

【図 1 5】 ラットの夜間食物摂取に対するヒト・ウロコルチン関連ペプチド ( h U R P ) の脳室内注射の影響を示す図。

【図 1 6】 ヒト・ウロコルチン関連ペプチドが C R F - R 1 及び C R F - R 2 にどのように作用するかのモデルを示す図。ヒト・ウロコルチン関連ペプチドは C R F - R 2 に対しては高い親和性で結合するが、C R F - R 1 に対しては結合せず、一方、ウロコルチンは両方のレセプタに対して結合する。C R F は C R F - R 1 に対して高い親和性で結合するが、C R F - R 2 に対しては結合しない。

【配列表】

10

# SEQUENCE LISTING

<110> Vale, Wylie Walker Jr.  
Lewis, Kathy Ann  
Reyes, Teresa Marie  
Hogenesch, John Beren  
Sawchenko, Paul Emil  
Vaughan, Joan Maureen  
Rivier, Jean Edouard Frederic  
Perrin, Marilyn Heller

<120> Urocortin Proteins and Uses Thereof

20

<130> D6334PCT

<141> 2001-08-04

<150> US 60/273,969

<151> 2001-03-07

<160> 13

<210> 1

<211> 399

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

30

<220>

<221> CDS

<222> 7..345

<223> DNA Sequence encoding human

Urocortin-related peptide (hURP)

40

<400> 1

```
ctcacgatga ccaggtgtgc tctgctgttg ctgatggtcc tgatgttggg 50
cagagtcctg gttgtccag tgaccctat cccaaccttc cagctccgcc 100
ctcagaattc tcccagacc actcccgac ctggggcctc agagagcccc 150
tcagctgctc ccacatggcc gtgggctgcc cagagccact gcagccccac 200
ccgccacct ggctcgcca ttgtcctatc gctggatgtc cccatcggcc 250
tcttgcatat cttactggag caagcccggg ccagggctgc cagggagcag 300
```

gccaccacca acgcccgcac cctggcccgt gtggccact gctgagcctg 350  
 agagagggggg tcacagtgat agggccaccc tggatgggaa gacctggag 399

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Human Urocortin-related peptide (hURP)  
 precursor peptide

10

<400> 2

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

20

30

<210> 3

<211> 41

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Human Urocortin-related peptide (hURP)

&lt;400&gt; 3

```

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu
      5                      10                      15
Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr
      20                      25                      30
Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val Gly His Cys
      35                      40

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;220&gt;

<223> Amino acids 1-38 of human  
Urocortin-related peptide (hURP)

&lt;400&gt; 4

```

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu
      5                      10                      15
Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr
      20                      25                      30
Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val
      35

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Human Urocortin (hUcn)

&lt;400&gt; 5

```

Asp Asn Pro Ser Leu Ser Ile Asp Leu Thr Phe His Leu Leu Arg
      5                      10                      15
Thr Leu Leu Glu Leu Ala Arg Thr Gln Ser Gln Arg Glu Arg Ala
      20                      25                      30

```

10

20

30

Glu Gln Asn Arg Ile Ile Phe Asp Ser Val  
                   35                  40

<210> 6

<211> 41

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Human Corticotropin Releasing Factor

10

<400> 6

Ser Glu Glu Pro Pro Ile Ser Leu Asp Leu Thr Phe His Leu Leu  
                   5                  10                  15

Arg Glu Val Leu Glu Met Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Gln Gln  
                   20                  25                  30

Ala His Ser Asn Arg Lys Leu Met Glu Ile Ile  
                   35                  40

<210> 7

20

<211> 41

<212> PRT

<213> *Cyprinus carpio*

<220>

<223> Carp Urotensin (cUro)

<400> 7

Asn Asp Asp Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Thr Phe His Leu Leu  
                   5                  10                  15

Arg Asn Met Ile Glu Met Ala Arg Asn Glu Asn Gln Arg Glu Gln  
                   20                  25                  30

Ala Gly Leu Asn Arg Lys Tyr Leu Asp Glu Val  
                   35                  40

30

<210> 8

<211> 40

<212> PRT

<213> Unknown

10

20

30

Met Thr Arg Trp Ala Leu Val Val Phe Val Val Leu Met Leu Asp  
5 10 15

10

20

<400> 11

30

<220>  
<223> Pufferfish Urocartin Related Peptide



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Asp | Pro | Pro | Leu | Ser | Ile | Asp | Leu | Thr | Phe | His | Leu | Leu | Arg |
|     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Thr | Leu | Leu | Glu | Leu | Ala | Arg | Thr | Gln | Ser | Gln | Arg | Glu | Arg | Ala |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Glu | Gln | Asn | Arg | Ile | Ile | Phe | Asp | Ser | Val |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |

20

CTC AGC ATG ACC AGG TGT GCT CTG CTG TTG CTG ATG GTC CTG CTG  
 M T R C A L L L M V L M L G R V L

10

20  
 GTT GTC CCA GTG ACC CCT ATC CCA ACC TTC CAG CTG CGC CCT CAG ANT TCT CCC CAG ACC  
 V V V P V T P I P T F Q L R P Q N S P Q T T

30

40  
 ACT CCC GGA CCT GCG GCC TCA GAG AGC CCC TCA GCT GCT CCC ACA TGG CCG TGG GCT GCC  
 T P R P A A S E S P S A A P T W P W A A

50

60  
 CAG AGC CAC TGG AGC CCC ACC CGC CAC CCT GGC TCG CGC ATT GTC CTA TCG CTG GAT GTC  
 Q S H C S P T R H P G S R I V L S L D V

70

80  
 CCC ATC GGC CTC TTG CAG ATC TTA CTG GAG CAA GCC CGG GCC AGG GCT GCC AGG GAG CAG  
 P I G L L L Q I L E Q A R A R A R E Q

90

100  
 GCC ACC ACC AAC GCC CGC ATC CTG GCC CGT GTC GGC CAC TGC TGA GCC TGA GAG AGG GGG  
 A T T N A R I L A R V G H C \* (SEQ ID NO:2)

110

CCA CAG TGA TAG GGC CAC CCT GGA TGG GAA GAC CTG GAG (SEQ ID NO:1)

[illegible]

【 図 3 】

|          | (SEQ ID NO: 4)                      | (SEQ ID NO: 5) | (SEQ ID NO: 6) | (SEQ ID NO: 7) | (SEQ ID NO: 8) | (SEQ ID NO: 9) |
|----------|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| hURP     | IVTSPDPSGSLQQLIQQRVAREQDQNTTLLRLR   | 38/38          |                |                |                |                |
| hUCN     | DNPSPTDITFTFHRTTSLVATQSQREQRITFDSM  | 16/38          |                |                |                |                |
| hCRF     | SEPPSLDITFTFHRTVLEWLAQQLAQHGRKIMELI | 13/38          |                |                |                |                |
| cUro     | NDDPPIIGITFTFIRMTIEMANENCSQFNRKLTDE | 14/38          |                |                |                |                |
| fsvg     | -EGPTDITFTFIRMTIEMIEKEKQKQANRLRDTT  | 10/38          |                |                |                |                |
| dcRF     | PAETPSLDITFTFHRTVLEWLAQSQREQRITFDSM | 12/38          |                |                |                |                |
| dcRF/Uro |                                     |                |                |                |                |                |

【 図 4 】

|  |     |
|--|-----|
| MTKRALVVFVVVLMILDRILFVPGTPIPTFQILLPQNSLETTTP     | 40  |
| SSVTSESSSGTTTGPSASWNSKASPYLDDTRVILSLDVPIL        | 80  |
| GLLRILLEQARYKAARVQAATNAQILAHVGRR (SEQ ID NO: 10) | 112 |

**4A**

|               |   |                   |
|---------------|---|-------------------|
| mouse Ucn II: | VLSRQVYPIGLLRLLELQAVYKATRLQAATNAQILAHVGR  | • (SEQ ID NO: 11) |
| human URP:    | IVLSRQVYPIGLLRLLELQAVYKATRLQAATNAQILAHVGR | • (SEQ ID NO: 4)  |
| fish URP:     | LVLSRQVPTNIMNVLFDDVKKAKVILKAKAANATRLAHVLI | • (SEQ ID NO: 12) |
| rat Ucn:      | DDPTLGLDITTFHRLSTLPLDILNLSQSPFQNRILHFSV   | • (SEQ ID NO: 13) |
| z/hcrf:       | SEEPPTSSPDLTFHRLSEVEFMAAEGLAQQAQHNKRLMEII | • (SEQ ID NO: 6)  |

【 図 5 】

5A CRF-R I への<sup>125</sup>Iソーバジン結合の置換

結合された<sup>125</sup>I CPM

■ Ucn  
 $K_i = 0.13\text{nM}$

▲ hURP  
 $K_i = 78\text{nM}$

log [競合物] M

5B

CRFR2βへの<sup>125</sup>Iソービン結合の置換

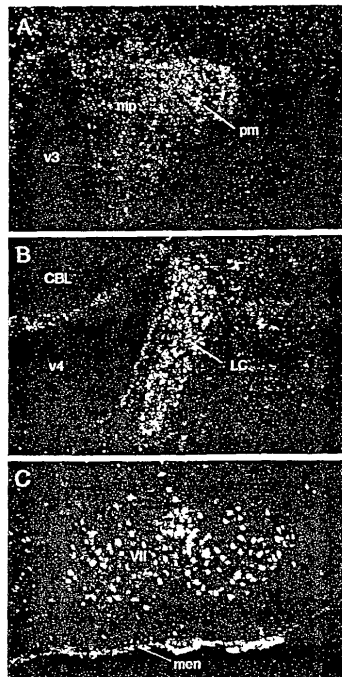
結合されたCOPM

hURP  
 $K_i = 0.23 \text{ nM}$

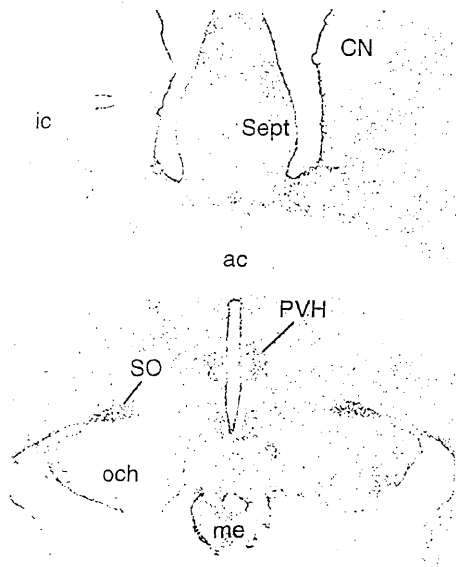
Ucn  
 $K_i = 0.15 \text{ nM}$

log [競合物] M

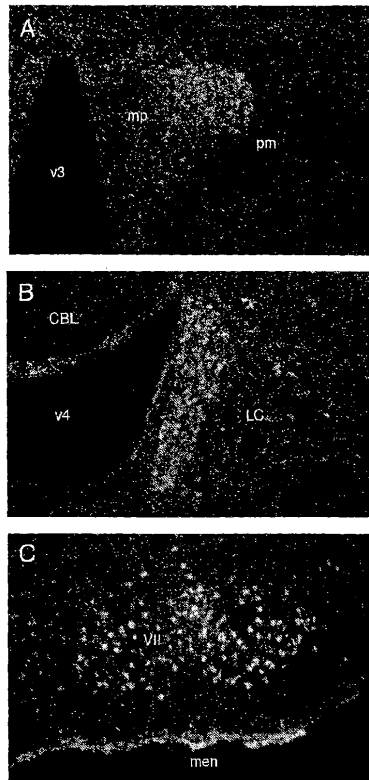
【 図 6 】



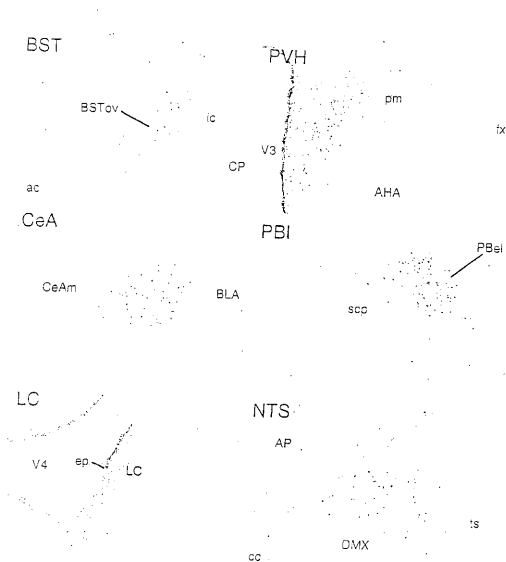
【図 7】



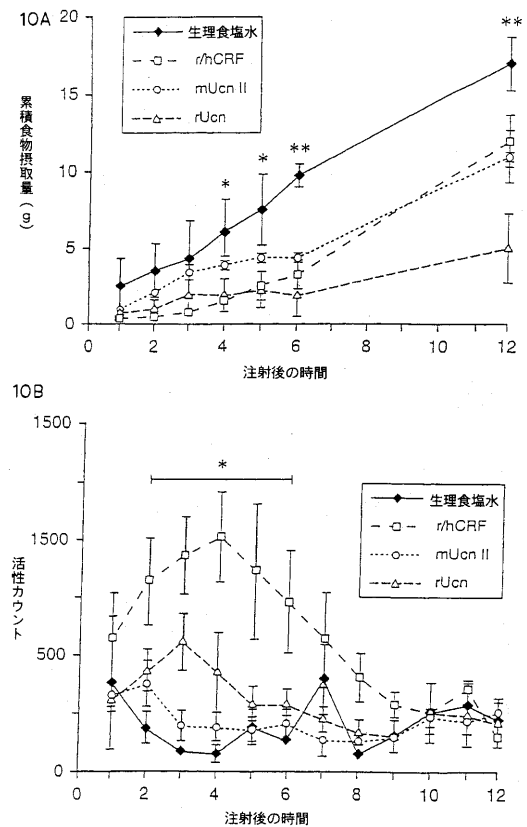
【図 8】



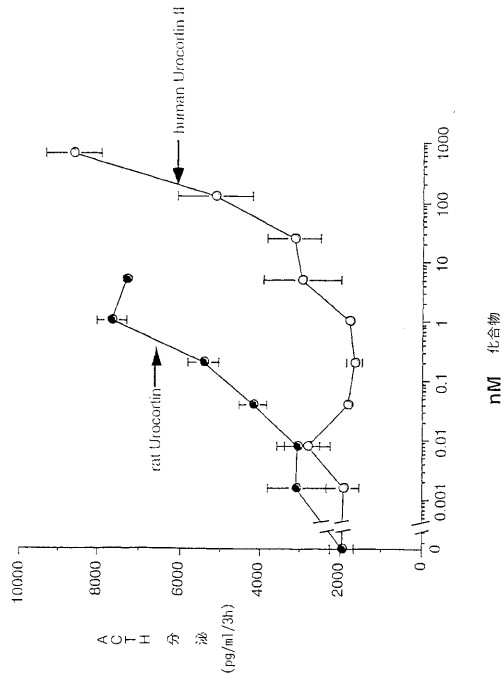
【図 9】



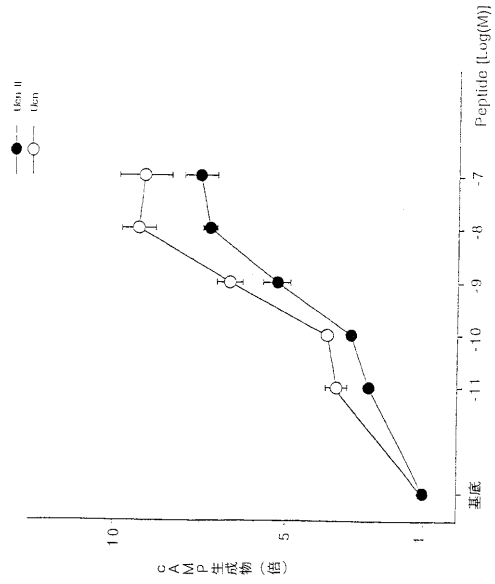
【図 10】



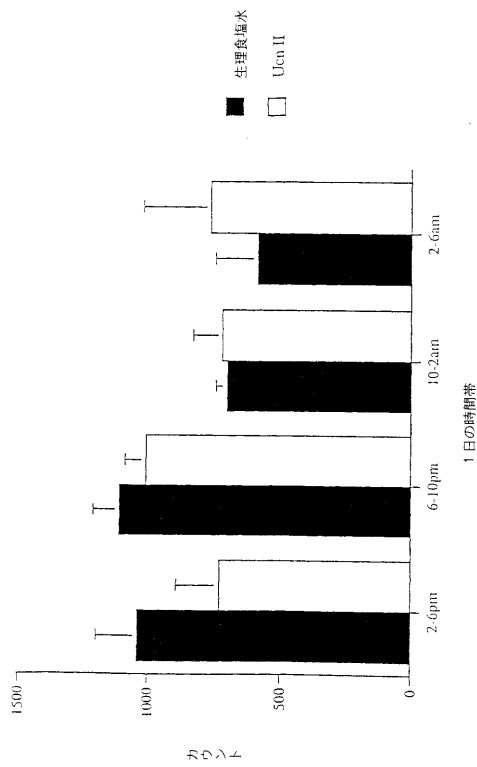
【図 1 1】



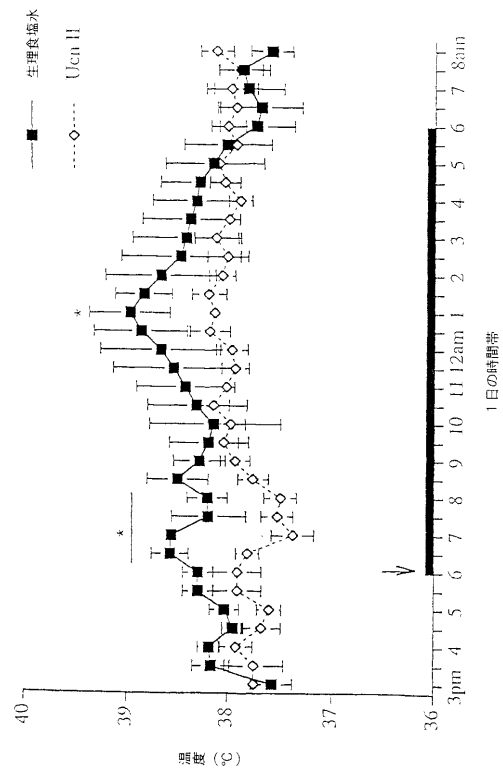
【図 1 2】



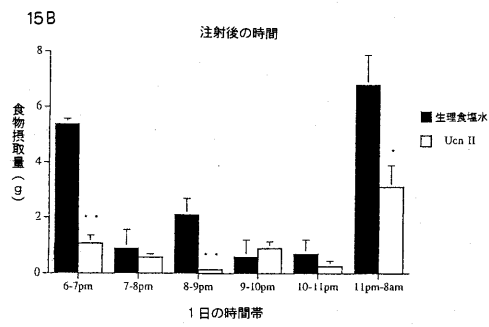
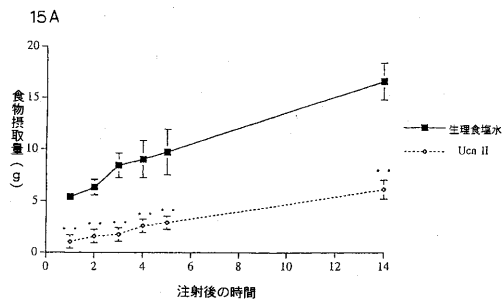
【図 1 3】



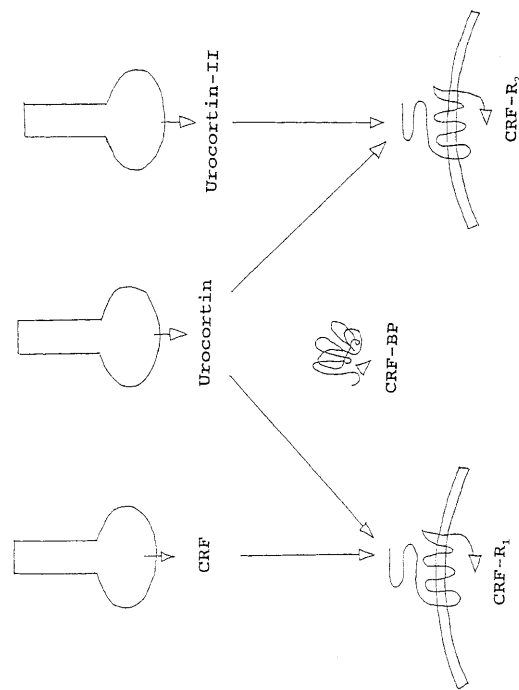
【図 1 4】



【図 15】



【図 16】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

**A 6 1 P 3/04 (2006.01)**

A 6 1 P 3/04

**A 6 1 P 5/06 (2006.01)**

A 6 1 P 5/06

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19

(74)代理人 100080115

弁理士 五十嵐 和壽

(72)発明者 ヴェイル, ワイリ, ダブリュ.

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア, ラ ジョラ, バルデ 1 6 4 3

(72)発明者 ソウチェンコ, ボール, エフ.

アメリカ合衆国 9 2 0 0 9 カリフォルニア, カールズバッド, パセオ 3 4 5 4

(72)発明者 ルイス, キャシイ, エイ.

アメリカ合衆国 9 2 1 0 3 カリフォルニア, サン ディエゴ, ウェスト モンテシト ウエイ  
1 7 6 0

(72)発明者 ヴォーン, ジョウン, エム.

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア, サン ディエゴ, ファローン サークル 3 8 8  
6

(72)発明者 レイズ, テレサ, エム.

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア, エンシニータス, セアロウ ストリート 3 1 6

(72)発明者 リビエール, ジーン, イー.

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア, ラ ジョラ, ブラックゴールド ロード 9 6 7  
4

(72)発明者 ホウグネッシュ, ジョウン, ビィ.

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア, エンシニータス, セアロウ ストリート 3 1 6

(72)発明者 ペリン, マリリン, エイチ.

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア, ラ ジョラ, ロビンフッド レイン 8 8 4 4

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 Database GenBank[online], 1 9 9 5 年, Accession No. L23982, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/495865?sat=0LD03&satkey=6328887>> 検索日 2 0 1 1 年 3 月 1 0 日, Homo sapiens collagen type VII (COL7A1) gene, promoter region and complete cdsDatabase GenBank[online], 2 0 0 0 年 7 月, Accession No. BE390203, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/9335668?report=genbank&sat=est&satkey=5422067>> 検索日 2 0 1 1 年 3 月 1 0 日, 601285320F1 NIH\_MGC\_44 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3606964 5-, mRNA sequence GENOMICS, 1 9 9 8 年, Vol.50, p.23-33

The EMBO Journal, 1 9 8 3 年, Vol.2, No.5, p.775-779

PNAS, 2 0 0 1 年 2 月, Vol.98, No.5, p.2843-2848

NATURE MEDICINE, 2 0 0 1 年 5 月, Vol.7, No.5, p.605-611

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

PubMed