



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2009-0111346  
(43) 공개일자 2009년10월26일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.<br/>C07K 14/705 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7019090(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2002년06월26일<br/>심사청구일자 2009년09월11일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2003-7014859<br/>원출원일자 2003년11월14일<br/>심사청구일자 2007년06월21일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2009년09월11일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2002/007263</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2003/005036<br/>국제공개일자 2003년01월16일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>01202474.1 2001년06월27일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>얀센 파마슈티카 엔.브이.<br/>벨기에왕국 베-2340-비어세 투른호우트세베크 30</p> <p>(72) 발명자<br/>부이스트 아르잔<br/>벨기에왕국 베-2340 비어세 투른호우트세베크 30<br/>얀센 파마슈티카 엔.브이.<br/>벤더 에크하드<br/>벨기에왕국 베-2340 비어세 투른호우트세베크 30<br/>얀센 파마슈티카 엔.브이.<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>이은선, 최규팔</p> |
|--|--|

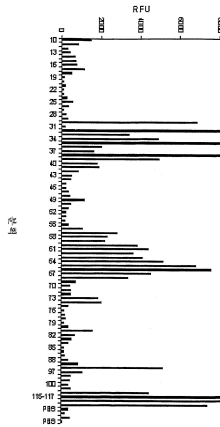
전체 청구항 수 : 총 3 항

**(54) 이피에프 수용체 에세이, 화합물 및 치료학적 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 EPF 및 그의 EPF 관련 펩티드와 hDRR 수용체와의 상호작용의 연구를 위한 에세이를 제공한다. 본 에세이는 EPF 및 그의 EPF 관련 펩티드가 수용체에 결합할 수 있는 조건하에서 시험 화합물이 hDRR 수용체에 결합할 수 있는지를 확인하는데 유용하다. 에세이는 또한 시험 화합물이 hDRR의 작용제인지 또는 길항제인지를 결정하는데 유용하다. 상기 에세이는 EPF 및 그의 EPF 관련 펩티드와 hDRR의 상호작용을 양성 또는 음성 대조군으로서 평가하거나 시험 화합물을 사용하여 얻은 결과와 비교하는 경쟁, 비경쟁 및 비교 에세이를 포함하는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다.

**대표도**



(72) 발명자

**미에우센 톰 줄리아 레온**

벨기에왕국 베-3000 레우벤 오우데 마르크트 카토  
리에케 유니베르시테 레우벤

**클리넨 엘케 제니 헨리에테**

벨기에왕국 베-3000 레우벤 오우데 마르크트 카토  
리에케 유니베르시테 레우벤

**스쿠프스 리리안네 아멜리에 헨리카**

벨기에왕국 베-3000 레우벤 오우데 마르크트 카토  
리에케 유니베르시테 레우벤

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호: 7에 의해 코딩되는 인간 후근 수용체 4(hDRR4) 또는 인간 후근 수용체 7(hDRR7) 결합 단편으로 구성되는 펩티드를 코딩하는, 분리되고 정제된 핵산 분자.

### 청구항 2

약제로서 사용하기 위한, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 및 서열번호: 21로부터 선택되는 아미노산 서열에 의해 코딩되는, 초기임신인자(EPF)와 적어도 70%의 서열 상동성을 갖는 펩티드.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 EPF와 적어도 90%의 서열 상동성을 갖는 것을 특징으로 하는 펩티드.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

<1> 본 발명은 Chaperonin 10으로도 공지되어 있는 초기임신인자(EPF) 및 EPF 관련 펩티드에 대한 수용체와 상호작용하는 화합물에 대한 에세이 분야 및 그의 치료적 용도에 관한 것이다.

#### 배경기술

- <2> EPF 및 미토콘드리아 chaperonin 10은 상이한 유전자에 의해 코딩될 수 있고(Summers et al., 1998) 생리학적으로 매우 상이하게 작용하지만 아미노산 서열(서열번호: 4)이 일치한다. 또한, EPF는 분비된 펩티드이지만, chaperonin 10은 분비 경로를 따라 세포내 소포에서 발견된다.
- <3> Chaperonin 10은 열 쇼크 단백질 패밀리에 속한다. 이는 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질 폴딩 및 작용에 중요한 열 쇼크 단백질 60과 chaperonin 컴플렉스를 형성한다. 허혈에 있어서, 이들 두개의 단백질을 상향조절하여 뇌조직 및 심장근육세포(Lau et al., 1997)를 허혈/재관류손상에 대하여 보호할 수 있다(Hickey et al., 2000).
- <4> 현재까지 EPF는 착상전 및 착상기 배아 발생에서 중요한 인자로서 공지되어 있다(Athanasas Platsis et al., 2000). 이들 두 단계에서 그 중요성은 성장 조절 및 면역조절 성질에 기초한다. 시험관내 및 생체내 모두에서 자가분비 성장인자로서 작용하여(Morton, 1998) 일차 및 종양 세포를 증식시켜 생산될 때 EPF의 작용은 명백하게 나타난다.
- <5> EPF의 존재가 임신 성공에 필수적이라는 것이 반복적으로 확인되었다. 최근, Cheng SJ 등(Am. J. REPFod. Immunol. 2000 Oct; 44(4): 211-3)은 낙태 수술 후 EPF 수준이 급속하게 감소되었고 그것으로서 EPF의 활성을 모니터링하는 것이 정상적인 임신의 진행 및 배아 케어에 유용한 인덱스라고 제안하였다. 따라서, EPF의 활성을 억제하는 것이 피임의 목적을 가질 수 있는 반면, EPF의 활성을 증진시킴으로써 태아 손실을 예방할 수 있다.
- <6> EPF는 수정 후 6-12시간 이내에 모체의 혈청내로 분비되고, 따라서 EPF 또는 EPF-유래 또는 -관련 펩티드는 임신 진단에 유용한 초기 표지가 될 수 있다. 이러한 진단은 인간 의료뿐만 아니라 수의학 적용에도 유용할 수 있다. 현재 사용되고 있는 EPF 에세이(예: 로제트 시험)는 번거롭고 신뢰할 수 없다. 또한, 다양한 형태의 EPF를 식별하지 못한다. 그러므로, EPF의 활성을 갖는 (폴리)펩티드에 대하여 특이적인 항체에 기초한 시험 또는 다양한 형태의 생활성 EPF를 식별하는 에세이(예: 크로마토그래피 및/또는 질량 분광법에 기초)가 중요한 장점을 제공할 수 있다. EPF의 활성이 임신 성공에 필수적이라는 것이 반복적으로 확인되었다. 최근, Cheng SJ 등(Am. J. REPFod. Immunol. 2000 Oct; 44(4): 211-3)은 낙태 수술 후 EPF 수준이 급속하게 감소되었고 그것으로서 EPF의 활성을 모니터링하는 것이 정상적인 임신의 진행 및 배아 케어에 유용한 인덱스라고 제안하였다. 따라서, EPF의 활성을 억제하는 것이 피임의 목적을 가질 수 있는 반면, 생리학적인 EPF의 활성을 증진시키거나 비정상적인 EPF의 활성을 수정하여 태아 손실을 예방할 수 있다.

- <7> 임신이 임신중 다발경화증의 재발율을 감소시킴으로써 다발경화증의 진행에 긍정적인 영향을 주는 것으로 관찰되었다(Confavreux et al., 1998). Morton(1998)이 지적인 바와 같이, EPF는 임신중 관찰되는 다발경화증의 변형에 관여하는 주요한 인자 중 하나로서 인정되고 있다. 임신중 EPF의 면역억제성 작용의 긍정적인 효능은 또 다른 자가-면역 질환인 류마티스 관절염에서 관찰할 수 있다(Davis and Maslow, 1992).
- <8> 인간 시스템에서 EPF 및 chaperonin 10의 강력한 활성이 펩티드가 펩티드의 생물학적 효능을 증진시키거나 저하시키는 화합물임을 확인하는 것을 목적으로 하는 연구에 대한 표적이 되게 한다. 그러나, EPF 및 chaperonin 10에 대한 결합 부위가 존재하는 것으로 보이지만, 이들 펩티드에 대한 수용체는 확인되지 않았다. 공지된 수용체가 부족하기 때문에 에세이 디자인이 제한되고 EPF 또는 chaperonin 10의 생물학적 효능을 모방하거나 변경시키는 화합물을 발견하고 연구하기 위한 노력이 방해받고 있다.
- <9> 역전 약리학(reverse pharmacology)으로 EPF 또는 chaperonin 10에 대한 수용체 단백질로서 인간 후근 수용체(human Dorsal Root Receptors(hDRRs))를 확인함으로써 본 발명은 이 문제를 해결하였다. 이 발견과 함께 본 발명자는 또한 hDRR 수용체가 림프절에서 발견되는 것으로 나타남에 따라 EPF의 면역조절성 특성을 입증하고, 염색체 11p15에 hDRRs의 염색체 지도화를 통해 다수의 림프모구백혈병과 관련되어 있음을 증명하였다. 추가로 EPF 또는 chaperonin 10의 생물학적 작용을 모방하거나 변화시키는 화합물을 확인하기 위한 에세이, 그의 약리학적 용도를 제공한다.
- <10> hDRRs는 세포의 N-말단, 추정상 세포막 영역을 구성하는 7개의 소수성 알파 나선 및 세포내 C-말단 영역으로 특징지어지는 공통된 구조 조직을 공유하는 G 단백질 연결(coupled) 수용체(GPCRs) 패밀리에 속한다. GPCRs G 단백질 변환의 활성화를 통해 세포내 시그널을 유발하는 다양한 리간드에 결합한다(Caron et al., Rec. Prog. Horm. Res. 48 : 277-290(1993); Freedman et al., Rec. Prog. Horm. Res. 51 : 319-353(1996)).
- <11> 최근 리뷰(Stadel et al., 1997; Wilson et al., 1998)에서는 상업적으로 유용한 약물용 표적으로서 사용되는 GPCRs를 140개의 특징화된 클로닝 인간 GPCRs중 18%를 구성하는 25개까지 카운트하고 있다. 전체 서열화된 계몽(효모, *C. 엘레강스(C. elegans)*)으로부터 예측하는 30,000개의 인간 유전자를 외삽법에 의해 추정된 결과 앞으로 3년 내 5,000개의 인간 GPCRs을 밝혀낼 수 있을 것으로 예상되었다. 현 총수에 유추하여 이후 10년 동안 150개의 신규한 오펜(orphan) GPCRs을 상업적으로 관심의 대상인 되는 약물의 표적으로 개발하여야 한다. 이러한 계산은 추가의 특징화된 GPCRs이 현재 개발중인 화합물의 주성분이라는 것을 고려하지 않았다.
- <12> 일반적으로, 오펜 GPCRs에 대한 역 약물학이 현행 방법보다 우수하고, 현행 방법으로는 치료할 수 없는 증상을 치료할 수 있는, 다양한 치료를 치료하는 신규한 방법을 제시할 것이라고 언급할 수 있다. 오펜 GPCR 리간드 확인에 대한 최근 문헌들(오파닌 FQ(Reinscheid et al, 1995.), 오렉신(Sakurai et al, 1998), 프로락틴-방출 펩티드(Hinuma et al.), 아페틴(Tatemoto et al., 1998))에 기술되어 있는 바 제약산업에도 인지되어 있다.
- <13> 인간 후근 수용체 1-6은 핵산 및 폴리펩티드 서열은 1999년 1월 1일 공개된 PCT 출원 WO 99/32519 A1에 기술되어 있다. 래트 후근 수용체에 대한 상동성에 기초하여, 이 문서에는 통증의 전달, 제어 및 감각에 관여하는 hDRR 수용체 및 마취 및 진통에 대한 신규한 약제의 확인을 위한 에세이에서 그의 용도를 기술하고 있다. 상기 PCT 출원에서는 후근 신경절 부위(localization)를 태아 후근 신경절에서 hDRR5에 대하여 확인하였다. 그러나, 후근 신경절을 포함하여 현재까지 연구한 성인 조직중 어느 것에 대하여도 hDRR 특이적 혼성화 시그널을 검출할 수 없었다. 추가로 이 출원번호(WO 99/32519 A1)에 기술된 hDRR 수용체 어느 것에 대하여도 자연발생된 리간드를 확인할 수 없었다. 상기 출원(WO 99/32519-A1)에서는 안지오텐신 II 및 III에 의한 수용체의 자극에 기초하여 안지오텐신 수용체로서의 hDRR4 을 본 발명에 의해 확인할 수 없었다.
- <14> 또 다른 인간 후근 수용체, hDRR7에 대한 핵산 및 폴리펩티드 서열은 2001년 3월 8일 공개된 PCT 출원번호 WO 01/16159-A1 및 2001년 3월 22일에 공개된 WO 01/19983-A1에 기술되어 있다. 이들 문서 중 어느 것에도 hDRR7 수용체에 대한 리간드가 확인되어 있지 않다. PCT 출원번호 WO 01/16159-A1에는 hDRR7 수용체를 상기 폴리펩티드와 관련되는 다수의 이상을 개시하면서 TheAnt로 언급하고 있다. 그러나, 상기 열거한 질환 상태와 이 수용체가 관련이 있다고 실질적으로 입증된 바는 없다. PCT 출원번호 WO 01/19983에는 일반적으로 hDRR7 수용체를 성장억제호르몬 3 수용체의 서열과의 유사도가 낮은 GPCR로서 기술하고 있다.
- <15> 그러므로, hDRR에 대한 자연발생된 리간드와의 경쟁, 또는 자연발생된 리간드와 hDRR의 상호작용 비교를 사용한 에세이는 기술된 바 없다. 후자의 경우 수용체의 작용 및 질환 상태와의 관련성을 조사하기 위하여 약물학적 도구로서 hDRRs를 사용하는 것이 필수적이다. 본 발명은 본 분야의 이러한 문제를 해결하고 후보 화합물이 hDRRs의 리간드, 작용제, 또는 길항제인지를 결정하기 위하여 hDRRs 및 EPF 또는 EPF-관련 펩티드의 상호작용을 이용

한 에세이를 제공하였다.

<16> 최근, Lembo 등(Nature Neuroscience 5,201-209(2002))이 감각 뉴런-특이적(Sensory Neuron-Specific) G 단백질 연결된-수용체 4(SNSR4)로서 공지되어 있는 hDNR 4 수용체 또는 Mas 관련 유전자(Mas Related Gene 수용체 1) (hMrgX1)는 오피오이드(opioid) 펩티드 전구체 프로엔케파린(proenkephalin) A의 유전자 산물에 의해 강력하게 활성화된다는 것을 증명하였다. 특히 통각 조절에 관여하는 것으로 공지되어 있는 BAM22 및 BAM22 단편은 FLIPR 기초 칼슘 에세이에서 hDNR을 활성화시키는 것으로 나타났다. 본 발명에서 EPF 및 EPF-관련 펩티드가 hDNR4 및 hDNR7 수용체 모두를 활성화시키는 것으로 나타났다. 또한, hDNR4는 후근 및 삼차 신경절에서 우세하게 발현되는 것으로 나타난 반면(Lembo et al., Nature Neuroscience 5, 201-209(2002)), hDNR7은 림프절에서 우세하게 발현되는 것으로 나타나는 것으로 입증되었다. 이러한 수용체의 특이적 발현 패턴이 리간드 활성화 반응에 대한 상이한 기능을 제시한다.

<17> 따라서, 수용체 관련 질환 치료에 유용한 수용체-특이적 화합물을 디자인할 수 있다면 유익할 것이다. hDNR4 및 hDNR7에 대한 리간드로서 EPF 및 EPF-관련 펩티드가 현재 통증의 전달, 제어 및 감각에 관여하는 hDNR을 조절할 수 있는 화합물을 확인하기 위한 시험관내 스크리닝 방법을 개발함에 있어 기초가 되고 있다. 추가로, 이는 피임제로서, 마취 및 통증에서 및 류마티스관절염, 다발경화증 또는 면역억제성 작용이 염증성 장 질환(IBD)에서와 같은 hDNR 매개 질환을 조절할 수 있는 화합물의 확인할 때 또는 이식거부 예방에 유용하다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

<18> 본 발명은 초기임신인자(EPF) 및 EPF 관련 펩티드에 대한 수용체와 상호작용하는 화합물에 대한 에세이 분야 및 그의 치료적 용도를 제공하는 것을 기술적 과제로 한다.

**과제 해결수단**

<19> 본 발명의 상기 및 다른 일면을 더욱 상세히 설명한다.

**발명의 요약**

<21> 본 발명은 EPF 또는 EPF-관련 펩티드와 hDNR 수용체의 상호작용에 대한 연구를 위한 에세이를 제공한다. 본 에세이는 EPF 또는 EPF-관련 펩티드가 수용체에 결합할 수 있는 조건하에서 시험 화합물이 hDNRs에 결합하는지를 확인하는데 유용하다. 에세이는 또한 시험 화합물이 hDNRs의 작용제인지 길항제인지를 결정하는데 유용하다. 상기 에세이는 EPF 또는 관련 펩티드와 hDNRs와의 상호작용을 양성 또는 음성 대조군으로서 평가하거나 시험 화합물을 사용하여 수득한 결과와 비교하는 경쟁, 비경쟁 및 비교 에세이를 포함하는 다양한 포맷으로 수행할 수 있다.

<22> 또다른 일면으로 본 발명은 아미노산 서열(AFRKFLPLFDRVLVERSA(서열번호: 8))을 갖는 EPF의 hDNR 결합 단편을 코딩하는, 분리되고 정제된 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 분자 및 그의 진단 및 치료적 용도에 관한 것이다.

<23> 그에 따라서, 본 발명은 아미노산 서열(LGQAFRKFLPLFDRVLVE(서열번호: 18)),(LGQAFRKFLPLFDRVLVE(서열번호: 19)),(LGQAFRKFLPLFDRVL(서열번호: 20)) 및(LGQAFRKFLPLFDRVL(서열번호: 21))을 갖는 hDNR 수용체에 결합하고 이를 활성화시킬 수 있는 EPF-관련 펩티드를 코딩하는, 분리되고 정제된 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 분자 및 그의 진단 및 치료적 용도에 관한 것이다.

<24> 추가의 일면으로 본 발명은 본 발명에 의해 제공되는 에세이에서 확인된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물 및 피임제로서 사용하거나, 류마티스관절염, 다발경화증 또는 염증성 장 질환(IBD)과 같이 면역억제 작용이 요구되는 다른 이상과 같은 자가면역 질환의 치료 또는 이식거부를 예방하거나, 이행세포암종, 지방육종, 선암종, 미만 거대 B-세포 림프종, 림프구성 백혈병, 림프모구백혈병, 골수모구백혈병, 골수단핵구백혈병, 골육종과 같은 암; 불응성 빈혈을 포함하되 이들로 제한되지 않는 특정 질환을 치료적 용도를 제공한다.

<25> 추가의 일면으로 본 발명은 세포 분획을 용질 기질에 고정된 EPF 또는 그의 hDNR 결합 단편과 접촉시키고 그로부터 hDNR을 용출시키는 것을 포함하는, hDNR을 포함하는 세포 분획으로부터 분리하는 방법을 제공한다.

**상세한 설명**

<27> 본 발명은 EPF 또는 EPF-관련 펩티드와 hDNR 수용체의 상호작용을 사용하는 에세이를 제공한다. Chaperonin 10

으로도 공지되어 있는 EPF 및 EPF-관련 펩티드는 그에 결합된 수용체를 활성화시키는 hDRRs의 고친화성 리간드이고 포스포리파아제 C를 활성화시켜 막내의 이노시톨 리피드를 가수분해시키고 이노시톨 트리포스페이트를 유리시킴으로써 최종적으로는 세포내 칼슘을 이동시킨다. 본 예세이는 hDRRs의 리간드이거나 hDRR 수용체의 작용제 또는 길항제인 화합물을 확인하는 방법 및 환자 치료시 그의 용도를 제공한다.

- <28> 본 명세서에서 사용되는 바, "EPF 또는 EPF-관련 펩티드"는 chaperonin 10으로도 공지되어 있는 서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 초기임신인자이거나, EPF-관련 펩티드는 EPF를 코딩하는 아미노산 서열중 한개 또는 수개의 아미노산이 치환, 결실 및/또는 첨가됨으로써 상기 언급한 서열로부터 유래되고, 본 발명에 따른 hDRR4 수용체 단백질에 결합할 수 있는 상기 관련 펩티드를 언급한다. 바람직한 일면으로 EPF-관련 펩티드는 서열번호: 8에 의해 코딩되는 hDRR 결합 부위를 포함한다. 더욱 바람직한 일면으로 EPF-관련 펩티드는 서열번호: 8에 의해 코딩되는 hDRR 결합 부위로 구성되어 있다. 추가의 일면으로 EPF-관련 펩티드는 (LGQAFRKFLPLFDRVLVE(서열번호: 18)), (LGQAFRKFLPLFDRVLVE(서열번호: 19)), (LGQAFRKFLPLFDRVL(서열번호: 20)) 및 (LGQAFRKFLPLFDRVL(서열번호: 21))로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 또 다른 일면으로 EPF-관련 펩티드는(서열번호: 18),(서열번호: 19),(서열번호: 20) 및(서열번호: 21)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 구성되어 있다.
- <29> 특정 일면으로, 본 발명에 따른 예세이에서 hDRR 수용체 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 hDRR4 수용체 단백질 또는 그의 단편, 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 hDRR7 수용체 단백질 또는 그의 단편이다.
- <30> 용어 "그의 단편"은 서열이 본 명세서에 개시되어 있는 단백질 분자의 조각, 또는 하위-부분(sub-region)으로서도 단백질에 인접한 5개 이상의 아미노산을 포함하는 것을 기술한다. 용어 "그의 단편"은 분리된 단편, 조각 또는 하위-부분이 수용체 단백질의 활성 부위, 결합 부위 또는 인산화 부위와 같이 기능상 구분되는 부위를 포함하는 "기능성 단편"을 포함하도록 한다. 기능성 단편은 클로닝 기술에 의해, 또는 대체 스플라이싱 기술의 천연 산물로서 제조될 수 있다.
- <31> 용어 "~로부터 유래"는 서열이 본 명세서에 개시되어 있는 단백질 분자의 조각, 또는 하위-부분으로서, 조각 또는 하위-부분의 서열이 모 서열과 관련성이 높은 것을 기술한다. 상기 관련성은 모 서열에 대한 서열의 일치도를 측정하여 측정할 수 있고, 여기에서 서열 관련성이 높다는 것은 분리된 펩티드 또는 폴리펩티드가 위치 배열을 사용하여 측정된 모 서열에 대하여 적어도 70, 80, 90, 95 또는 99% 일치도를 갖는다는 것을 언급한다.
- <32> 2개 이상의 서열의 일치도 및 유사도를 비교하는 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면 Winconsin Sequence Analysis Package, version 9.1(Devreux J. et al, Nucleic Acid Res., 12, 387-395,1984)에서 이용할 수 있는 프로그램, 예로서 프로그램 BESTFIT 및 GAP를 사용하여 두 개의 펩티드 또는 폴리펩티드 서열사이의 일치도(%) 및 유사도(%) 및 두 개의 폴리뉴클레오티드 사이의 일치도(%)를 측정할 수 있다. BESTFIT는 Smith 및 Waterman의 "부분 상동성"을 이용하고(J. Mol. Biol., 147, 195-197, 1981) 양 서열 사이의 최대 유사성의 단일 영역을 밝혀낸다. 짧은 서열이 긴 서열의 일부를 나타내는 것으로 가정된 프로그램인 BESTFIT는 길이가 상이한 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 두 개의 펩티드 또는 폴리펩티드 서열을 비교하는데 더욱 적절하다. 비교에서, GAP는 두 개의 서열을 배열하여 Needleman 및 Wunsch(J. Mol. Biol., 48,443-453, 1970)의 알고리즘에 따라 "최대 유사도"를 밝혀낸다. GAP는 길이가 거의 동일하고 전장에 대하여 배열된 것으로 기대되는 서열을 비교하는데 더욱 적절하다. 바람직하게, 각 프로그램에서 사용된 파라미터 "Gap Weight" 및 "Length Weight"는 각각 폴리뉴클레오티드 서열에 대하여 50 및 3, 폴리펩티드 서열에 대하여 12 및 4이다. 바람직하게, 비교하고자 하는 두개의 서열이 최적으로 배열되어 있을 때 일치도(%) 및 유사도(%)를 측정한다. 서열 사이의 일치도 및/또는 유사도를 측정하는 다른 프로그램은 본 분야에 잘 공지되어 있고, 예를 들면, BLAST 패밀리 프로그램(Altschul S F et al, Nucleic acid Res., 25: 3389-3402,1997)이다.
- <33> 본 명세서에서 사용되는 바, "화합물"은 모든 크기의 유기 또는 무기 원자 집합이고 저분자(약 2,500 돌턴 미만) 또는 고분자, 예로서, 펩티드, 폴리펩티드, 전체 단백질 및 폴리뉴클레오티드이다.
- <34> 본 명세서에서 사용되는 바, "시험" 화합물은 hDRR 수용체 폴리펩티드의 리간드인지 평가하기 위한 시험에서 사용되는 화합물이다. 시험 화합물은 또한 hDRR 수용체의 작용제 또는 길항제일 수 있다. 시험 화합물이 실제로 hDRR 폴리펩티드의 리간드, 작용제 또는 길항제인지 여부는 본 발명에 따른 예세이에서 결정된다.
- <35> 본 명세서에서 사용되는 바, "리간드"는 hDRR 수용체에 결합할 수 있고, 수용체에 결합하였을 때 리간드-수용체 콤플렉스의 구조를 가능하게 변화시켜 2차 메신저를 통해 생물학적 반응을 전달할 수 있는 화합물이다. 상기 리

간드는 수용체의 작용제이거나 길항제일 수 있다.

- <36> 본 명세서에서 사용되는 바, "작용제"는 hDRR 수용체의 폴리펩티드와 상호작용하고 이를 활성화시키는 화합물이다. 활성화된 hDRR 수용체 폴리펩티드는 수용체와 연결된 생화학적 경로상의 변화를 유도하고, 예를 들면, G 단백질에 의한 GTP 분해를 자극하고, 아데닐레이트 사이클레이스 경로를 활성화시키거나 포스포리파아제 C 경로를 활성화시킬 수 있다.
- <37> 본 명세서에서 사용되는 바, "길항제"는 hDRR 수용체 폴리펩티드와 상호작용하고 이의 활성화를 저해하거나 방해하는 화합물이다.
- <38> 폴리뉴클레오티드
- <39> 따라서, 제 1면으로 본 발명은 EPF 및 관련 펩티드와 hDRR 수용체와의 상호 작용을 이용하는 에세이에서 hDRR을 코딩하는 분리되고 정제된 핵산 분자 또는 그의 단편(여기에서, 핵산 분자는 DNA, DNA, cDNA 또는 게놈 DNA이다)의 용도에 관한 것이다.
- <40> 제 2면으로 본 발명은 EPF 및 관련 펩티드와 hDRR 수용체와의 상호 작용을 이용하는 에세이에서 EPF 또는 관련 펩티드를 코딩하는 분리되고 정제된 핵산 분자(여기에서, 핵산 분자는 DNA, DNA, cDNA 또는 게놈 DNA이다)의 용도에 관한 것이다.
- <41> 본 명세서에서 사용되는 바, "분리된"은 폴리뉴클레오티드, 단백질 및 폴리펩티드, 또는 그의 각각의 단편이 생체내 환경하에서 그로부터 제거되어 본 분야의 기술자에 의해 제한하는 것은 아니지만 서열화, 제한 분해, 위치 특이 유전자 변이(Site directed Mutagenesis)로 조작될 수 있고, 핵산 단편을 위한 발현 벡터내로 서브클로닝되고 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 아미노산 서열화, 및 펩티드 분해를 형성하는 기회를 갖는 양으로 단백질 또는 그의 단편을 수득한다는 사실을 언급한다. 그러므로, 청구하는 핵산은 전체 세포 또는 세포 용해물에 또는 부분적으로, 실질적 또는 전체적으로 정제된 형태로 존재할 수 있다.
- <42> 폴리뉴클레오티드는 환경 오염원으로부터 정제되었을 때 "정제된"것으로 간주된다. 따라서 세포로부터 분리된 폴리뉴클레오티드는 표준 방법에 의해 세포원으로부터 정제되었을 때 실질적으로 정제된 것으로 간주되고 화학적으로 합성된 핵산 서열은 그의 화학적 전구체로부터 정제되었을 때 실질적으로 정제된 것으로 간주된다. "실질적으로 순수한" 단백질 또는 핵산은 바람직하게는 적어도 85% 이상의 샘플을 포함할 것이다. 단백질 또는 핵산 분자의 순도를 측정하는 하나의 방법은 폴리아크릴아미드 또는 아가로오스와 같은 매트릭스에서 표본(preparation)을 전기영동하는 것이다. 순도는 염색시킨 후 단일 밴드의 출현에 의해 증명된다. 순도를 평가하는 다른 방법은 크로마토그래피, 질량 분광법 및 분석적 원심분리법을 포함한다.
- <43> 용어 "그의 단편"은 서열이 본 명세서에 개시되어 있는 핵산 분자의 조각, 또는 하위-부분으로서 모 핵산 분자에 인접한 15개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 것을 기술한다. 용어 "그의 단편"은 분리된 단편, 조각 또는 하위-부분이 수용체의 활성 부위, 결합 부위 또는 인산화 부위와 같이 기능상 구분되는 부위를 포함하는 "기능성 단편"을 포함하도록 한다. 기능성 단편은 클로닝 기술에 의해, 또는 대체 스플라이싱 기술의 천연 산물로서 제조될 수 있다.
- <44> 특히, 본 발명은 본 발명에 따른 에세이에서
- <45> (a) 서열번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 hDRR4를 코딩하는 핵산 분자;
- <46> (b) 서열번호: 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 hDRR4를 코딩하는 핵산 분자;
- <47> (c) 폴리뉴클레오티드(a) 또는 (b)에 상보적인 핵산 분자;
- <48> (d) 폴리뉴클레오티드(a),(b) 또는 (c)의 적어도 15개의 일련의 염기를 포함하는 핵산 분자;
- <49> (e) 엄격한 조건하에서 (a),(b) 또는 (c)의 폴리뉴클레오티드 분자에 혼성화하는 핵산 분자; 또는
- <50> (f) 유전자 코드 결과 (a) 내지 (e) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열로 측정되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 hDRR4 단백질을 코딩하는 핵산 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 구성원을 포함하는, hDRR4를 코딩하는 분리되고 정제된 핵산 분자 또는 그의 단편의 용도를 포함한다.
- <51> 본 발명의 더욱 바람직한 일면으로 hDRR4 코딩 핵산 분자는 서열번호: 1로 구성되어 있다.
- <52> 따라서,

- <53> 본 발명은 본 발명에 따른 에세이에서
- <54> (a) 서열번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 hDRR7을 코딩하는 핵산 분자;
- <55> (b) 서열번호: 11의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 hDRR7을 코딩하는 핵산 분자;
- <56> (c) 폴리뉴클레오티드(a) 또는(b)에 상보적인 핵산 분자;
- <57> (d) 폴리뉴클레오티드(a), (b) 또는(c)의 적어도 15개의 일련의 염기를 포함하는 핵산 분자;
- <58> (e) 엄격한 조건하에서 (a), (b) 또는 (c)의 폴리뉴클레오티드 분자에 혼성화하는 핵산 분자; 또는
- <59> (f) 유전자 코드 결과 (a) 내지 (e) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열로 축퇴되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 hDRR7 단백질을 코딩하는 핵산 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 구성원을 포함하는, hDRR7을 코딩하는, 분리되고 정제된 핵산 분자 또는 그의 단편의 용도를 포함한다.
- <60> 본 발명의 더욱 바람직한 일면으로 hDRR7 코딩 핵산 분자는 서열번호: 11로 구성되어 있다.
- <61> 추가의 일면으로 본 발명은 본 발명에 따른 에세이에서
- <62> (a) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 EPF을 코딩하는 핵산 분자;
- <63> (b) 폴리뉴클레오티드(a)에 상보적인 핵산 분자;
- <64> (c) 폴리뉴클레오티드(a) 또는(b)의 적어도 15개의 일련의 염기를 포함하는 핵산 분자;
- <65> (d) 엄격한 조건하에서 (a) 또는 (b)의 폴리뉴클레오티드 분자에 혼성화하는 핵산 분자;
- <66> (e) (a) 또는 (b)의 폴리뉴클레오티드 분자에 의해 코딩된 아미노산 서열과 70, 80, 90, 95 또는 99% 서열 일치성을 갖는 EPF-관련 펩티드를 코딩하는 핵산 분자;
- <67> (f) 유전자 코드 결과 (a) 내지 (d) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열로 축퇴되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 EPF 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 구성원을 포함하는, EPF 또는 EPF-관련 펩티드를 코딩하는 분리되고 정제된 핵산 분자의 용도를 포함한다.
- <68> 본 발명의 더욱 바람직한 일면으로 EPF 코딩 핵산 분자는 서열번호: 3으로 구성되어 있고 EPF-관련 펩티드는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 및 서열번호: 21로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 또는 서열번호: 8에 의해 코딩된 hDRR4 결합 단편으로 구성된다.
- <69> 본 분야의 기술자는 유전자 코드의 축퇴에 기인하여 코딩된 아미노산(들) 또는 단백질 산물의 일치도를 변경시키지 않고 다수의 뉴클레오티드 염기쌍의 "사일런트(silent)" 치환을 서열번호: 1, 서열번호: 11 또는 서열번호: 3으로 확인된 서열 내로 도입할 수 있음을 인지할 것이다. 모든 상기의 치환이 본 분야의 범위 내 포함된다.
- <70> 본 명세서에서 사용되는 용어 "상보적" 또는 "상보성"은 퓨린 및 피리미딘 뉴클레오티드가 수소 결합을 통해 결합하여 더블 스트랜드 핵산 분자를 형성하는 능력을 언급한다. 하기 염기쌍이 상보성과 관련된다: 구아닌 및 시토신; 아데닌 및 티민; 및 아데닌 및 우라실. 본 명세서에서 사용되는 바 "상보적"은 상기 언급된 관계가 전장의 상기 분자에 걸쳐 2개의 싱글-스트랜드 핵산 분자를 포함하는 모든 염기쌍에 실질적으로 적용된다. "부분적으로 상보적"은 2개의 싱글-스트랜드 핵산 분자중 하나의 길이 짧기 때문에 그 분자들 중 하나의 일부가 싱글 스트랜드로 남아있는 것 관계를 언급한다.
- <71> 본 명세서에서 사용되는 바 용어 "혼성화"는 싱글 스트랜드 핵산 분자가 뉴클레오티드 염기 쌍을 통해 상보적인 스트랜드와 결합하는 과정을 언급한다.
- <72> 용어 "엄격성"은 혼성화 조건을 언급한다. 고도로 엄격한 조건은 비상동성인 염기 쌍에 바람직하지 못하다. 낮은 엄격성은 반대 작용을 갖고 있다. 엄격성은 예를 들면, 온도, 염 농도에 의해 변경될 수 있다. "엄격한 조건"은 50% 포름아미드, 5x SSC(750 mM NaCl, 75 mM 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 7.6), 5x Denhardt's 용액, 10% 텍스트란 설페이트, 및 20 µg/ml 변성, 절단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액중 42°C에서 밤새도록 인큐베이션 한 후 0.1 x SSC중 약 65°C에서 세척하는 것을 언급한다. 추가로 적절한 혼성화 조건은 실시예에 기술한다.
- <73> hDRRs를 코딩하는 핵산 서열은 우선적으로 후근 신경절에서 발현되고(PCT 공개번호 WO 99/32519-A1) 이들 신경



질이 상기 수용체를 코딩하는 핵산 분리를 위한 공급원으로서 작용할 수 있다. 다른 세포 및 세포주 또한 hDRR 핵산을 분리하기 위하여 적절하게 사용될 수 있다. 본 명세서에서 기술한 바와 같이 세포 추출물 또는 전체 세포에서 hDRR 활성을 스크리닝하여 적절한 세포를 선별할 수 있다. 이들 에세이중 어느 하나에서 후근 수용체 활성을 갖는 세포가 hDRR 핵산 분리에 적절할 수 있다.

- <74> 본 분야에서 공지된 다양한 방법 중 어느 하나를 사용하여 hDRR을 분자적으로 클로닝할 수 있다. 한 방법으로, mRNA를 분리하고 제1 스트랜드 cDNA 합성을 수행한다. 제2 DNA 합성을 수행하여 제2 스트랜드를 생산할 수 있다. 이어서 정제된 hDRR 단백질의 아미노산 서열로부터의 축퇴 올리고뉴클레오티드 프라이머를 디자인하거나 게놈 서열로부터 유래된 서열 특이적 프라이머를 사용하는 DNA 합성을 통해 hDRR DNA 단편의 특이적 PCR 증폭에 의해 분리된 cDNA를 수득할 수 있다.
- <75> 바람직한 프라이머 세트는 hDRR4 전향 프라이머(CAGAATTCGCCACCATGGATCCAACGGTCTCAAC) (서열번호: 5) 또는 서열번호: 5 중 뉴클레오티드 15 내지 34로 구성된 그의 단편, hDRR4 역향 프라이머(GTCTCGAGTCACTGCTCCAATCTGCTTCCC) (서열번호: 6) 또는 서열번호: 6 중 뉴클레오티드 9 내지 30으로 구성된 그의 단편, hDRR7 전향 프라이머(CGAATTCGCCACCATGGATCCAACACCCCGG) (서열번호: 13) 및 hDRR7 역향 프라이머(GCTCTAGAGGCTGTCCATCTCTACACCAGACTGC) (서열번호: 14)로 구성된다. 원하는 경우 더블-스트랜드 cDNA는 적절한 벡터, 예를 들면, 플라스미드 내로 클로닝되어 cDNA 라이브러리를 형성할 수 있다. 또 다른 방법은 서열번호: 1 또는 서열번호: 11의 어느 적절한 부위에 표적되는 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 박테리오파지 또는 플라스미드 서플 벡터에 작제된 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 방법이다. 참조 예: PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis et al., Academic Press(1990).
- <76> 원핵 또는 진핵세포에서 증식시키기 위하여 플라스미드 또는 파지와 같은 적절한 벡터에서 cDNA 라이브러리를 작제하는 방법은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있다[참조 예: Maniatis et al. 상기와 동일]. 적절한 클로닝 벡터는 잘 공지되어 있고 광범위하게 이용할 수 있다.
- <77> 다른 유형의 라이브러리, 및 다른 세포 또는 세포 형태로부터 작제된 라이브러리를 본 발명에 따른 핵산 서열을 분리하는데 사용할 수 있다는 것을 본 분야의 기술자는 이해할 것이다. 다른 유형의 라이브러리는 제한하는 것은 아니지만, 다른 세포로부터, 인간 및 마우스로부터 유래된 cDNA 라이브러리 유래 및 YAC(효모 인공 염색체)을 포함하는 게놈 DNA 및 코스미드 라이브러리를 포함한다. 게놈 DNA 라이브러리의 작제는 본 분야에 공지되어 있는 표준방법에 의해 수행될 수 있다. 공지된 게놈 DNA 라이브러리 작제 기술은 T. Maniatis et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2d Ed. Chap. 14(1989)에 기재되어 있다.
- <78> 본 분야의 기술자는 다수의 경우에서 폴리펩티드를 코딩하는 부위가 cDNA의 5' 말단에서 짧다는 점에서, 분리된 cDNA 서열이 불완전하다는 것을 이해할 것이다. 1<sup>st</sup> 스트랜드 cDNA 합성시 mRNA 주형을 완전하게 DNA 복사하지 못하여 본래 낮은 "반응성(processivity)"(폴리머 반응동안 주형에 결합된 상태로 남아있는 효소의 능력에 대한 측량)을 갖는 역전사 효소의 결과이다.
- <79> 전장의 cDNAs를 수득하거나 짧은 cDNAs를 신장시키는 방법으로 이용가능한 여러 방법이 존재하고 본 분야에 잘 공지되어 있으며, 예를 들면, Rapid Amplification of cDNA ends(RACE) (Frohman et al., 1988, PNAS USA 85,8998-9002), 또는 상기 기술의 최근 수정법을 들 수 있다.
- <80> 폴리펩티드
- <81> 본 발명은 EPF 및 관련 펩티드와 hDRR 수용체와의 상호 작용을 이용하는 에세이에서 폴리펩티드가 본 발명에 따라 분리되고 정제된 핵산 분자에 의해 코딩되는 hDRR 수용체 단백질 또는 그의 단편의 용도에 관한 것이다.
- <82> 본 발명의 추가의 일면으로 hDRR 수용체 단백질은
- <83> i) 서열번호: 2의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 hDRR4를 코딩하는 분리되고 정제된 단백질 또는 그의 단편;
- <84> ii) 서열번호: 2의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 수용체 단백질을 그의 표면에 발현시키는 세포; 또는
- <85> iii) 서열번호: 2의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 수용체 단백질을 그의 표면에 발현시키는 세포의 막 표본으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 hDRR4 수용체이다.
- <86> 바람직한 일면으로 hDRR4 수용체 단백질은 서열번호: 2의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함한다. 더욱 바람

직한 일면으로 hDRR4 수용체 단백질은 서열번호: 2의 아미노산 서열 또는 그의 단편으로 구성되어 있다.

<87> 본 발명의 추가의 일면으로 hDRR 수용체 단백질은

<88> i) 서열번호: 12의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 hDRR4를 코딩하는 분리되고 정제된 단백질;

<89> ii) 서열번호: 12의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 수용체 단백질을 그의 표면에 발현시키는 세포; 또는

<90> iii) 서열번호: 12의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 수용체 단백질을 그의 표면에 발현시키는 세포의 막 표본으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 hDRR7 수용체이다;

<91> 바람직한 일면으로 hDRR7 수용체 단백질은 서열번호: 12의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함한다. 더욱 바람직한 일면으로 hDRR7 수용체 단백질은 서열번호: 12의 아미노산 서열 또는 그의 단편으로 구성되어 있다.

<92> 용어 "그의 단편"은 서열이 본 명세서에 개시되어 있는 단백질 분자의 조각, 또는 하위-부분으로서 모 단백질에 인접한 5개 이상의 아미노산을 포함하는 것을 기술한다. 용어 "그의 단편"은 분리된 단편, 조각 또는 하위-부분이 수용체 단백질의 활성 부위, 결합 부위 또는 인산화 부위와 같이 기능상 구분되는 부위를 포함하는 "기능성 단편"을 포함하도록 한다. 기능성 단편은 클로닝 기술에 의해, 또는 대체 스플라이싱 기술의 천연 산물로서 제조될 수 있다.

<93> 추가의 일면으로, 본 발명에 따른 에세이에서 EPF 및 관련 펩티드의 용도에 관한 것이다. 바람직한 일면으로 EPF 또는 EPF-관련 펩티드는

<94> i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 EPF를 코딩하는 분리된 폴리펩티드;

<95> ii) EPF로부터 유래되고 hDRR4에 결합할 수 있는 분리된 폴리펩티드;

<96> iii) 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 및 서열번호: 21로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 EPF-관련 펩티드를 코딩하는 분리된 폴리펩티드; 또는

<97> iv) 서열번호 8의 아미노산 서열에 의해 코딩되는 hDRR4 결합 단편을 포함하는 분리된 폴리펩티드로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

<98> 본 발명의 더욱 바람직한 일면으로 EPF는 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되어 있고 EPF-관련 펩티드는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 및 서열번호: 21로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 또는 서열번호: 8의 아미노산 서열에 의해 코딩되는 hDRR4 결합 단편으로 구성된다.

<99> 본 발명에 따른 수용체 단백질 및 펩티드는 모든 가능한 보존적인 아미노산 변형을 포함하고, 여기서 "보존적인 아미노산 변형"은 특정 아미노산의 치환성(substitutability)이 인정되는 분야에 기초하여 모 분자의 생물학적 활성에 영향을 주지않고 모 수용체 단백질 또는 펩티드에서 하나 이상의 아미노산 잔기(들)가 대체되는 것을 의미한다(참조 예: M. Dayhoff, In Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Supp. 3, pgs 345-352, 1978).

<100> 본 분야의 기술자는 본 분야에 따른 폴리펩티드 즉, hDRR4 수용체 단백질, hDRR7 수용체 단백질 및 EPF 또는 EPF-관련 펩티드를 다수의 제조법 DNA 기술, 예를 들면, 혼성화, 중합효소연쇄반응(PCR) 증폭, 또는 신생(de novo) DNA 합성(참조 예: T. Maniatis et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2d Ed. Chap. 14(1989))에 의해 수득할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

<101> 본 발명의 펩티드 및 유도체는 일반적으로 그의 설명을 광범위하게 이용할 수 있는, 잘 확립된 표준 액체 또는 바람직하게 고체상 펩티드 합성 방법에 따라 용이하게 제조할 수 있거나, 액상 방법 또는 고체상, 액상 및 용액 화합의 조합법에 의해 용액중에서 제조할 수 있다.

<102> 예로서, 본 발명의 폴리펩티드는 RaininSymphony Multiplex Peptide Synthesizer를 사용하는 Fmoc 고체상 펩티드 합성 화학법 또는 N-a-9-플루오레닐메틸옥시카보닐을 사용하여 합성할 수 있다.

<103> 아미노산의 펩티드-수지 성장 쇠(peptid-resin growing chain)에 대한 커플링에 사용되는 표준 싸이클은 일반적으로 하기를 포함한다:(1) N,N-디메틸포름아미드(DMF)를 사용하여 30초 동안 펩티드 수지를 3회 세척하고;(2) 펩티드-수지가 침전되지 못하도록 10초마다 1초 동안 반응 용기를 통해 질소를 버블링하여 혼합 공정을 수행하는 동안 각각 15분 동안 2회 세척하여 DMF중 20% 피페리딘으로 탈보호화하여 아미노산 말단 상의 Fmoc 보호 그룹을 제거하고;(3) DMF를 사용하여 30초 동안 펩티드 수지를 3회 세척하고;(4) 동량의 250mM의 적절한 아미노산

의 Fmoc 유도체 용액, 및 DMF중 400 mM N-메틸모르폴린 및 250 mM(2-(1H-벤조트리아졸-1-4))-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HHTU)으로 구성된 활성화제 믹스를 가하여 아미노산을 펩티드-수지에 커플링하고;(5) 45분 동안 상기 용액을 혼합하도록 하고;(6) DMF를 사용하여 30초 동안 펩티드 수지를 3회 세척한다.

<104> 필요에 따라 적절한 아미노산 서열을 사용하여 이 사이클을 반복하여 원하는 펩티드를 제조할 수 있다. 이 사이클에 대한 예외는 그의 소수성 성질에 의해 난해한 것으로 예측되는 아미노산 커플링 또는 합성시 예측되는 나선 형태 내의 포함물(inclusion)이다. 이들 상황에 대하여 상기 사이클은 관심의 대상이 되는 아미노산을 "더블 커플"로 처음 45초간의 커플링 단계를 마친 후 즉시 1초 동안 단계 4를 반복하여 변형될 수 있다. 펩티드 합성의 처음 커플링 단계에서, 초기 DMF 세척시 30초 동안 3회 세척보다는 15분 동안 3회 세척하는 것으로 혼합 시간을 연장시켜 더욱 효과적으로 커플링할 수 있도록 수지를 스웰링(swell)시킬 수 있다.

<105> 합성 후, 펩티드를 하기와 같이 수지로부터 분해시킬 수 있다:(1) DMF를 사용하여 30초 동안 펩티드 수지를 3회 세척하고;(2) DMF중 20% 피페리딘에서 15분 동안 2회 세척하여 아미노산 말단 상의 Fmoc 보호 그룹을 제거하고;(3) DMF를 사용하여 30초 동안 펩티드 수지를 3회 세척하고;(4) 95% 트리플루오로아세트산(TFA), 2.4% 물, 2.4% 페놀, 및 0.2% 트리소프로필실란으로 구성된 분해 각테일을 펩티드-수지와 2시간 동안 혼합한 뒤 분해 각테일 중 펩티드를 수지로부터 여과하고 2 용적의 에틸 에테르를 가하여 용액 밖의 펩티드를 침전시켰다.

<106> 펩티드를 분리하기 위하여, 에테르-펩티드 용액을 20분동안 -20℃에 방치한 후 5분동안 6,000 x G에서 원심분리하여 펩티드를 펠릿화하였다. 펩티드를 에틸 에테르로 세척하여 잔존하는 분해 각테일 성분을 제거할 수 있다. 최종 펩티드 산물을 0.1% TFA로 구성된 1차 용매 및 80% 아세토니트릴 및 0.1% TFA로 구성된 용출 완충액으로 역상 고압 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)에 의해 정제할 수 있다. 정제된 펩티드를 이어서 분말로 동결시킬 수 있다.

<107> 정제된 생물학적으로 활성인 hDRR 단백질은 수개의 상이한 물리적 형태를 가질 수 있다. 본 발명에 따른 폴리펩티드는 발생 초기의 전장 또는 가공되지 않은 폴리펩티드로 존재할 수 있거나, 부분적으로 가공된 폴리펩티드로서 또는 가공된 폴리펩티드의 조합물로서 존재할 수 있다. 발생 초기의 전장 폴리펩티드는 그중에서 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage) 이벤트에 의해 해독후 변형되어 발생 초기의 전장 폴리펩티드의 단편을 형성할 수 있다. 단편 또는 단편의 물리적인 회합은 hDRR4 또는 hDRR7과 관련되는 완전한 생물학적 활성을 가질 수 있지만; 수용체의 활성도는 각개 수용체 단편 및 물리적으로 관련된 수용체 폴리펩티드 단편 사이에 다양할 수 있다.

<108> 그러므로, 다른 일면으로 본 발명은 아미노산이 결실, 첨가 또는 치환되었지만, 본래의(native) hDRR 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생물학적 활성, 즉, EPF 또는 EPF-관련 펩티드 결합을 여전히 유지하고 있는 변형된 hDRR 폴리펩티드를 제공한다. 폴리펩티드가 서열번호 8의 아미노산 서열에 의해 코딩되는 EPF-관련 펩티드에 대하여, 동일한 리간드에 대하여 야생형 hDRR 수용체 폴리펩티드의 EC<sub>50</sub>-값의 10배, 바람직하게는 5개 이상 크지않은 EC<sub>50</sub>-값을 갖는 경우, hDRR 폴리펩티드는 야생형과 "실질적으로 동일한 생물학적 활성"을 갖는다. hDRR4 수용체에 대하여 10,6-12 nM 범위의 EC<sub>50</sub>-값은 서열번호: 8로 구성된 EPF-관련 펩티드에 대하여 측정한다. hDRR7 수용체에 대하여 345-82.9 nM 범위의 EC<sub>50</sub>-값은 서열번호: 8로 구성된 EPF-관련 펩티드에 대하여 측정한다.

<109> 본 발명은 또한 본 발명에 따른 EPF 및 EPF-관련 펩티드의 에피토프에 대한 항체, 예를 들면, 항혈청 및 상기 항체의 폴리클로날 및 모노클로날 일레 및 상기모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드에 대하여 생성된 항체는 통상의 프로토콜을 사용하여 폴리펩티드 또는 에피토프-포함 단편, 또는 세포를 동물, 바람직하게 인간이 아닌 동물에 투여하여 수득할 수 있다.

<110> 상기 기술된 항체는 친화크로마토그래피에 의해 본 발명에 따른 폴리펩티드를 정제하거나 본 발명의 질환을 치료하는데 사용할 수 있다. 항체를 바람직하게는 혈액, 침, 정액, 뇌척수액, 혈장 또는 림프과 같은 체액으로 구성된 시험 샘플과 접촉시키고; 시험 샘플에 대한 상기 항체의 반응성을 측정하는 것을 포함하는, hDRR 활성화와 관련된 질환과 관련되는 대상자에서 병리적 상태를 진단하는 방법에서 상기 언급한 항체의 용도를 제공하는 것 또한 본 발명의 목적이다.

<111> 샘플에 대한 항체의 반응성은 어느 적절한 방법에 의해 측정할 수 있다. 각개 리포터 분자로 태그(tag)할 수 있다. 상기 리포터 분자는 직접 또는 간접적으로 검출가능하고 바람직하게는 측정가능한 시그널을 형성할 수 있다.

<112> 따라서 다른 일면으로 본 발명은

- <113> i) 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 및 서열번호: 21로 구성된 그룹으로 선택되는 폴리펩티드 또는 서열번호:8에 의해 코딩되는 hDRR4 결합 단편; 또는
- <114> ii) 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 및 서열번호: 21로 구성된 그룹으로 선택되는 폴리펩티드 또는 서열번호:8에 의해 코딩되는 hDRR4 결합 단편에 대한 항체를 포함하는 진단용 키트에 관한 것이다.
- <115> 상기 키트에서 i) 또는 ii)가 실질적인 성분을 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상기 키트는 질환, 특히 본 발명의 질환 또는 질환에 대한 감수성을 진단하는데 유용할 것이다.
- <116> *hDRR 수용체 폴리펩티드의 재조합 발현*
- <117> 다수의 에세이에서 중요한 일면은 그의 표면상에 재조합 hDRR 수용체를 발현시키는 숙주 세포를 제공하는 단계이다. 그러므로, 추가의 일면으로 본 발명은 본 발명에 따른 에세이에서 사용할 수 있는 hDRR 발현 벡터에 관한 것이다.
- <118> 발현 벡터는 본 명세서에서 적절한 숙주에서 클로닝된 유전자 카피를 전사시키고 그의 mRNAs를 해독하는데 요구되는 DNA 서열로 정의된다. 다양한 숙주 예를 들면 대장균(*E. coli*), 시아노박테리아를 포함하는 박테리아, 식물 세포, 곤충 세포, 효모 세포를 포함하는 진균 세포, 및 인간 세포를 포함하는 동물 세포에서 진행 유전자를 발현시키기 위하여 그러한 벡터를 사용할 수 있다.
- <119> 특히, 디자인된 벡터는 숙주 사이, 예를 들면, 박테리아-효모 또는 박테리아-동물 세포 또는 박테리아-진균 세포 또는 박테리아 무척추동물 세포 사이에서 DNA를 수송할 수 있다. 적절하게 작제된 발현 벡터는 숙주 세포에서 자동 복제를 위한 복제기원, 선별가능한 마커, 제한된 갯수의 유용한 제한 효소 부위, 고도의 카피수에 대한 포텐셜(potential), 및 활성 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터는 RNA 폴리머라아제를 DNA에 결합시키고 RNA를 합성시키는 DNA 서열로 정의된다. 강력한 프로모터는 mRNAs가 고도로 빈번하게 개시되도록 하는 것이다. 발현 벡터는 제한하는 것은 아니지만 클로닝 벡터, 변형된 클로닝 벡터, 구체적으로 디자인된 플라스미드 또는 바이러스를 포함할 수 있다.
- <120> 본 발명에 따른, hDRR4 또는 hDRR7을 코딩하는, 분리되고 정제된 핵산 분자는 재조합 숙주 세포에서의 발현을 위해 발현 벡터내로 클로닝될 수 있다. 재조합 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있고, 제한하는 것은 아니지만, 대장균(*E. coli*)와 같은 박테리아, 효모와 같은 진균 세포, 제한하는 것은 아니지만 인간, 소, 돼지, 원숭이 및 로텐즈 기원의 세포주를 포함하는 포유동물 세포, 및 제한하는 것은 아니지만 초파리- 및 누에-유래의 세포주를 포함하는 곤충 세포일 수 있다. 적절할 수 있고 상업적으로 이용가능한 포유동물종으로부터 유래된 세포주는, 제한하는 것은 아니지만, CV-1(ATCC CCL 70), COS-1(ATCC CRL 1650), COS-7(ATCC CRL 1651), CHO-K1(ATCC CCL 61), 3T3(ATCC CCL 92), NIH/3T3(ATCC CRL 1658), HeLa(ATCC CCL 2), C127I(ATCC CRL 1616); BS-C-1(ATCC CCL 26), MRC-5(ATCC CCL 171), L-세포, 신경모세포종, 신경아교세포 및 HEK-293(ATCC CRL1573)를 포함한다.
- <121> 그러므로, 추가의 일면으로 본 발명은 본 발명에 따른 에세이에서 hDRR 단백질 또는 그의 단편을 코딩하는 재조합적으로 클로닝된 핵산 분자를 포함하는 재조합 숙주 세포의 용도에 관한 것이다. 추가의 일면으로 재조합 숙주 세포는 게놈 DNA이거나 (서열번호: 1)로 구성된 뉴클레오티드 서열 또는 그의 단편을 갖는 핵산 분자를 포함한다.
- <122> 본 발명의 더욱 바람직한 일면으로 재조합 숙주 세포는 포유동물 발현 벡터 pcDNA3중 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 또는 그의 단편을 포함하는 HEK293 세포로 구성되어 있다. 발현 벡터는 제한하는 것은 아니지만, 형질 전환, 형질감염, 원형질체 융합(Protoplast fusion), 리포펙션(lipofection), 및 일렉트로포레이션을 포함하는 여러 기술중 하나에 의해 숙주 세포내로 도입될 수 있다. 발현 세포를 포함하는 세포는 클로날로 증식시키고 분석하여 그들이 hDRR4 단백질을 생산하는지를 측정한다. 수용체 발현 숙주 세포 클론의 확인은 제한하는 것은 아니지만 본 발명에 따른 폴리펩티드에 대해 지시되는 항체를 사용하는 면역학적 반응, 및 숙주 세포-관련 hDRR4 활성의 존재와 같은 여러 수단에 의해 수행할 수 있다.
- <123> 본 발명의 단백질은 직접 발현되어 합성되거나 해독 융합(translational fusion)으로서 관심의 대상이 되는 단백질을 자가, 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제거될 수 있는 또다른 단백질 또는 펩티드와 함께 포함하는 융합 단백질로서 합성할 수 있다. 그러므로, 특정 일면으로 본 발명은 상기 폴리펩티드가 융합 단백질의 일부인 본 발명에 따른 단백질을 제공한다.

- <124> 추가로, 예를 들면, 상기 기술된 DRR 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 그의 게놈내 이미 포함하고 있는 포유동물을 사용할 수 있고, 동일 물질을 발현시키기 않거나 예를 들면, 약한 프로모터에 의해 적절하지 못한 방식으로 발현시키는 포유동물을 사용할 수 있고, 동일 물질의 발현을 유도하기 위하여 상기 수용체 폴리펩티드를 코딩하는 내인성 핵산 분자에 매우 근접하게 강한 프로모터와 같은 조절 서열을 포유동물 세포내로 도입할 수 있다.
- <125> 이종 전사(heterologous transcription)의 조절하에 DRR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 조절 서열 또는 단백질을 포함하는 재조합 숙주 세포 또한 본 발명의 또 다른 일면일 것이다.
- <126> 본 명세서에서 용어 "조절 서열"은 DRR 수용체 코딩 유전자에 근접한 세포의 게놈내로 통합되기 때문에 DRR 수용체 폴리펩티드의 발현을 증가시키기 위하여 사용될 수 있는 핵산 분자를 언급한다. 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 불활성화된 사이린스 인트론 서열, 3'UTR 및/또는 5'UTR 코딩 영역, 단백질 및/또는 RNA 안정화 요소, 조절 단백질을 코딩하는 핵산 분자, DRR 수용체 유전자 또는 유전자 발현을 활성화시키고/거나 유전자 산물의 양을 증가시키는 것으로 공지되어 있는 다른 유전자 발현 조절 요소의 발현을 유도하거나 일으킬 수 있는 전사 인자를 포함한다. 상기 조절 서열을 도입하여 DRR 수용체 폴리펩티드의 발현을 증가시키고/거나 유도하여 최종적으로는 세포중 DRR 수용체 폴리펩티드의 양을 증가시킨다. 따라서, 본 발명은 DRR 수용체 폴리펩티드를 다시(*de novo*) 발현시키고/거나 그의 발현을 증가시키는 것을 목적으로 하고 있다.
- <127> 작제물을 숙주 세포내로 도입하는 것은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 양이온 리피드 매개 형질감염, 일렉트로포레이션, 트랜스덕션, 감염, 또는 다른 방법에 의해 영향을 받을 수 있다. 그러한 방법은 예를 들면 Davis, Basic Methods In Molecular Biology(1986)과 같이 다수의 표준 실험실 매뉴얼에 기재되어 있다.
- <128> 추가로, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드의 발현은 또한 시험관내에서 합성된 mRNA에 의해 수행될 수 있다. 합성 mRNA 또는 hDRR 생산 세포로부터 분리된 mRNA는 다양한 무세포 시스템, 제한하는 것은 아니지만, 밀배아 추출물 및 망상적혈구 추출물에서 유효하게 해독될 수 있고 세포-기초 시스템, 제한하는 것은 아니지만, 개구리 또는 두꺼비(제노푸스 라비스(*Xenopus laevis*)) 난모세포내로 미세주사, 통상 바람직하게는 두꺼비 난모세포에 미세주사하여 유효하게 해독될 수 있다.
- <129> *에세이*
- <130> 본 발명의 에세이는 생물학적 활성 또는 결합 수용체에 대하여 화합물을 선별하는 분야에서 일반적으로 공지되어 있는 다수의 포맷으로 디자인될 수 있다.
- <131> 본 발명의 폴리펩티드는 하나 이상의 질환 상태, 특히 상기 언급한 질환을 포함하는 하나 이상의 생물학적 작용을 담당하고 있다. 그러므로 hDRR 수용체의 작용을 자극하거나 저해하는 화합물을 확인하는 스크리닝 방법을 디자인하는 것이 바람직할 수 있다.
- <132> 본 발명의 에세이는 이롭게도 EPF 또는 EPF-관련 펩티드는 hDRR 수용체 폴리펩티드에 대하여 고 친화성 리간드이고 그에 결합하였을 때 hDRR 수용체를 활성화시킨다는 사실을 이용한다.
- <133> 그러므로, 본 발명은 hDRR 수용체 폴리펩티드의 리간드, 작용제 또는 길항제일 수 있는 hDRR 수용체 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 화합물을 확인하는 방법을 포함한다. 본 에세이는 EPF 또는 EPF 관련 펩티드와 hDRR 수용체의 상호작용이 에세이에 구체화되어 있는(incorporate) 적어도 하나의 단계를 구체화하고 있기 때문에 본 발명의 에세이 방법은 본 분야에 공지되어 있는 것과 상이하다. 결합 특이성은 그의 표면에 hDRR 수용체 폴리펩티드를 발현시키는 세포에 대한 화합물의 친화도 또는 상기 세포의 막에 대한 친화도를 측정하여 나타낼 수 있다.
- <134> 따라서, 본 발명은
- <135> a) hDRR 또는 그의 단편을 포함하는 공급원을
- <136> i) EPF 또는 EPF-관련 펩티드
- <137> ii) 상기 시험 화합물과 함께 인큐베이션시키고;
- <138> b) 시험 화합물의 수용체에 결합한 EPF 또는 EPF 관련 펩티드의 양에 미치는 영향을 측정하는 것을 포함하는 hDRR 수용체에 결합할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.

- <139> 바람직한 일면으로, 본 발명은
- <140> a) hDRR4 또는 그의 단편을 포함하는 공급원을
- <141> i) EPF 또는 EPF-관련 펩티드
- <142> ii) 상기 시험 화합물과 함께 인큐베이션시키고;
- <143> b) 시험 화합물의 수용체에 결합한 EPF 또는 EPF 관련 펩티드의 양에 미치는 영향을 측정하는 것을 포함하는 hDRR4 수용체에 결합할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.
- <144> 본 발명의 추가의 일면으로 hDRR4를 포함하는 공급원이
- <145> i) 서열번호:2의 아미노산 서열을 갖는 분리되고 정제된 단백질 또는 그의 단편;
- <146> ii) 서열번호: 2의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 폴리펩티드 수용체를 그의 표면에 발현시키는 세포;
- <147> iii) 서열번호: 2의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 폴리펩티드 수용체를 그의 표면에 발현시키는 세포의 막 표본으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- <148> 또다른 일면으로, 본 발명은
- <149> a) hDRR7 또는 그의 단편을 포함하는 공급원을
- <150> i) EPF 또는 EPF-관련 펩티드
- <151> ii) 상기 시험 화합물과 함께 인큐베이션시키고;
- <152> b) 시험 화합물의 수용체에 결합한 EPF 또는 EPF 관련 펩티드의 양에 미치는 영향을 측정하는 것을 포함하는 hDRR7 수용체에 결합할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.
- <153> 본 발명의 추가의 일면으로 hDRR7을 포함하는 공급원이
- <154> i) 서열번호: 12의 아미노산 서열을 갖는, 분리되고 정제된 단백질 또는 그의 단편;
- <155> ii) 서열번호: 12의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 폴리펩티드 수용체를 그의 표면에 발현시키는 세포;
- <156> iii) 서열번호: 12의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 갖는 폴리펩티드 수용체를 그의 표면에 발현시키는 세포의 막 표본으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- <157> 스크리닝 방법은 후보 화합물과 직·간접적으로 연관된 라벨을 사용하여 후보 화합물이 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드를 포함하는 세포 또는 막, 또는 그의 용해 단백질에 결합하는지 측정할 수 있다. 다르게는, 스크리닝 방법은 표지화된 경쟁자와의 경쟁을 포함할 수 있다. 바람직한 일면으로, 이 표지화된 경쟁자는 chaperonin 10으로 공지되어 있는 EPF 또는 EPF 관련 펩티드와 같이 hDRRs에 결합하는 것으로 공지되어 있는 리간드이다. 추가의 일면으로 EPF-관련 펩티드는 서열번호: 8에 의해 코딩된 hDRR 결합 단편으로 구성되거나 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 또는 서열번호: 21에 의해 코딩된 EPF-관련 펩티드로 구성된다.
- <158> 그러므로, 더욱 바람직한 일면으로, 스크리닝 방법은 수용체에 결합하는 EPF 또는 EPF-관련 펩티드의 양에 미치는 시험 화합물의 영향을 측정하기 위하여 사용되는 표지를 사용하여 표지된 EPF 또는 표지된 EPF-관련 펩티드를 포함한다.
- <159> 따라서, 본 발명은
- <160> i) 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 수용체 폴리펩티드를 그의 표면에 발현시키는 세포, 바람직하게 HEK293 세포의 막 제조;
- <161> ii) 상기 막 표본을 서열번호: 8, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 또는 서열번호: 21에 의해 코딩된 아미노산을 포함하는 표지된 EPF-관련 펩티드, 바람직하게는 서열번호: 8로 구성된 요오드화된 EPF-관련 펩티드와 인큐베이션시키고;
- <162> iii) 시험 화합물을 인큐베이션 혼합물에 가하고;
- <163> iv) hDRR4 수용체에 결합하는 표지된 EPF-관련 펩티드의 양에 미치는 시험 화합물의 영향을 측정하는 것을 포함

하는, hDRR4 수용체에 결합할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.

<164> 또한, 본 발명은

<165> i) 서열번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 수용체 폴리펩티드를 그의 표면에 발현시키는 세포, 바람직하게 HEK293 세포의 막 제조;

<166> ii) 상기 막 표본을 서열번호: 8, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 또는 서열번호: 21에 의해 코딩된 아미노산을 포함하는 표지된 EPF-관련 펩티드, 바람직하게는 서열번호: 8로 구성된 요오드화된 EPF-관련 펩티드와 인큐베이션시키고;

<167> iii) 시험 화합물을 인큐베이션 혼합물에 가하고;

<168> iv) hDRR7 수용체에 결합하는 표지된 EPF-관련 펩티드의 양에 미치는 시험 화합물의 영향을 측정하는 것을 포함하는, hDRR7 수용체에 결합할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.

<169> 추가로, 이 스크리닝 방법은 폴리펩티드를 포함하는 세포에 적절한 검출 시스템을 사용하여 후보 화합물이 폴리펩티드를 활성화시키거나 저해하여 시그널을 생성할 수 있는지를 시험할 수 있다. 통상적으로 공지된 작용제의 존재하에 활성화의 저해제를 분석하고 후보 화합물의 존재에 의한 작용제에 의한 활성화에 대한 영향을 관찰한다. 구성상 활성 수용체 폴리펩티드를 후보 화합물이 폴리펩티드를 활성화시키거나 저해하는지 시험하여 작용제 또는 저해제의 부재하에 활성 수용체 폴리펩티드를 역 작용제 또는 저해제에 대한 스크리닝 방법에 사용할 수 있다.

<170> 그러므로, 본 발명은

<171> a) hDRR 또는 그의 작용성 단편을 포함하는 공급원을 상기 시험 화합물과 인큐베이션시키고;

<172> b) hDRR 수용체의 활성화에 대한 시험 화합물의 영향을 측정하고;

<173> c) EPF 또는 EPF-관련 펩티드의 결합시 hDRR 수용체의 활성화와 상기 효과를 비교하는 것을 포함하는, hDRR 수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.

<174> 본 발명의 추가의 일면으로, hDRR 수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법에서 hDRR을 포함하는 공급원은 그의 표면에 서열번호: 2 또는 서열번호: 12의 아미노산을 서열을 갖는 폴리펩티드 수용체를 발현시키는 세포이다. 바람직한 일면으로 상기 세포는 상기 기술된 방법에 따라 제공되는 hDRR4 또는 hDRR7 단백질을 코딩하는 재조합 클로닝 핵산 분자 또는 그의 단편을 포함하는 재조합 숙주 세포일 수 있다. hDRR 수용체에 대한 조절자의 기능은 세포내 칼슘, cAMP 또는 리포터 유전자 산물과 같이 hDRR 수용체에 의해 매개되는 세포내 2차 메신저 형성의 조절일 수 있다. hDRR은 G-단백질 커플링 수용체(GPCRs)로 공지된 단백질 부류에 속한다. GPCRs는 리간드 결합시 세포막을 통해 시그널을 전달한다. 리간드 결합 GPCR는 헤테로트머 G 단백질에 의해 매개되는 세포내 시그널링 이벤트를 활성화시키고, 예를 들면, 아데닐레이트 사이클레이스 경로의 활성화 또는 포스포리파아제 C-β 경로의 활성화이다. 상기 언급한 세포내 시그널링 이벤트의 활성화에 대한 예시는 본 분야에 잘 공지되어 있고, 키메라 리간드-유도 전자 인자를 포함하는 시그널 트랜스덕션을 위한 다른 기초 에세이중 형광 세기 분포 분석을 사용하는 G-단백질-커플링 수용체에 대한 결합 에세이, 루미노포어(luminophores)에 커플링된 사이클릭 뉴클레오티드 또는 다수의 반응 요소를 사용하여 G 단백질 커플링된 수용체로부터의 반응을 측정하는 세포-시그널링 에세이 또는 cAMP 반응 요소-유도 리포터 에세이를 포함한다.

<175> 따라서, 본 발명은

<176> a) hDRR4 또는 그의 작용성 단편을 포함하는 공급원을 상기 시험 화합물과 인큐베이션시키고;

<177> b) hDRR4 수용체의 활성화에 대한 시험 화합물의 영향을 측정하고;

<178> c) EPF 또는 EPF-관련 펩티드의 결합시 hDRR4 수용체의 활성화와 상기 효과를 비교하는 것을 포함하는, hDRR4 수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.

<179> 바람직한 일면으로,

<180> a) 포유동물의 발현 벡터, 바람직하게 서열번호: 2로 구성된 hDRR4 수용체 단백질을 코딩하는 pcDNA3, 및 포유동물의 발현 벡터, 바람직하게 서열번호: 10으로 구성된 Gα16을 코딩하는 pcDNA3으로 숙주 세포, 바람직하게 HEK293 세포를 공-형질감염시키고;

- <181> b) 세포에 Fura-2, FLUO-3 또는 FLUO-4, 바람직하게 FLUO-3 또는 FLUO-4와 같이 칼슘 감수성 형광 염료를 적재하고;
- <182> c) 세포를 시험 화합물과 인큐베이션시키고;
- <183> d) 시험 화합물의 hDRR4 수용체 활성화에 대한 영향을 칼슘 감수성 형광 염료의 상대적인 형광 유니트의 변화로 측정하고;
- <184> e) EPF 또는 EPF-관련 펩티드 결합시 hDRR4 수용체 활성화와 작용을 비교하는 것을 포함하는, hDRR4 수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.
- <185> 또 다른 바람직한 일면으로, hDRR4 수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법은
- <186> a) 포유동물의 발현 벡터, 바람직하게 서열번호: 2로 구성된 hDRR4 수용체 단백질을 코딩하는 pcDNA3로 숙주 세포, 바람직하게 HEK293를 형질감염시키고;
- <187> b) 세포에 Fura-2, FLUO-3 또는 FLUO-4, 바람직하게 FLUO-3 또는 FLUO-4와 같이 칼슘 감수성 형광 염료를 적재하고;
- <188> c) 세포를 시험 화합물과 인큐베이션시키고;
- <189> d) 시험 화합물의 hDRR4 수용체 활성화에 대한 영향을 칼슘 감수성 형광 염료의 상대적인 형광 유니트의 변화로 측정하고;
- <190> e) EPF 또는 EPF-관련 펩티드 결합시 hDRR4 수용체 활성화와 작용을 비교하는 것으로 구성되어 있다.
- <191> 따라서, 본 발명은
- <192> a) hDRR7 또는 그의 작용성 단편을 포함하는 공급원을 상기 시험 화합물과 인큐베이션시키고;
- <193> b) hDRR7 수용체의 활성화에 대한 시험 화합물의 영향을 측정하고;
- <194> c) EPF 또는 EPF-관련 펩티드의 결합시 hDRR7 수용체의 활성화와 상기 효과를 비교하는 것을 포함하는, hDRR7 수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.
- <195> 바람직한 일면으로,
- <196> a) 포유동물의 발현 벡터, 바람직하게 서열번호: 12로 구성된 hDRR7 수용체 단백질을 코딩하는 pcDNA3, 및 포유동물의 발현 벡터, 바람직하게 서열번호: 10으로 구성된 Ga 16을 코딩하는 pcDNA3으로 숙주 세포, 바람직하게 HEK293 세포를 공- 형질감염시키고;
- <197> b) 세포에 칼슘 감수성 형광 염료, 바람직하게 Fura-4를 적재하고;
- <198> c) 세포를 시험 화합물과 인큐베이션시키고;
- <199> d) 시험 화합물의 hDRR7 수용체 활성화에 대한 영향을 칼슘 감수성 형광 염료의 상대적인 형광 유니트의 변화로 측정하고;
- <200> e) EPF 또는 EPF-관련 펩티드 결합시 hDRR7 수용체 활성화와 작용을 비교하는 것을 포함하는, hDRR7수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법을 제공한다.
- <201> 또 다른 바람직한 일면으로, hDRR7수용체의 활성을 조절할 수 있는 시험 화합물을 확인하고 수득하는 방법은
- <202> a) 포유동물의 발현 벡터, 바람직하게 서열번호: 12 구성된 hDRR7수용체 단백질을 코딩하는 pcDNA3로 숙주 세포, 바람직하게 HEK293를 형질감염시키고;
- <203> b) 세포에 칼슘 감수성 형광 염료, 바람직하게 FLUO-4를 적재하고;
- <204> c) 세포를 시험 화합물과 인큐베이션시키고;
- <205> d) 시험 화합물의 hDRR7 수용체 활성화에 대한 영향을 칼슘 감수성 형광 염료의 상대적인 형광 유니트의 변화로 측정하고;
- <206> e) EPF 또는 EPF-관련 펩티드 결합시 hDRR7 수용체 활성화와 작용을 비교하는 것으로 구성되어 있다.



- <207> 본 분야의 기술자는 hDRR과 EPF 또는 EPF-관련 펩티드의 상호작용에 대한 발견을
- <208> a) EPF 또는 EPF 유도체를 사용하여 hDRR상의 리간드 결합 부위의 구조를 조사하고;
- <209> b) 결합시 EPF 리간드와 상호작용하는 hDRR 수용체의 리간드 결합 부위내 접촉 원자를 확인하고;
- <210> c) (b)에서 확인된 원자들과 상호작용하는 시험 화합물을 hDRR 수용체의 활성을 조절하도록 디자인하고;
- <211> d) 상기 디자인된 시험 화합물과 hDRR 또는 그의 작용성 단편을 포함하는 공급원을 접촉시켜 hDRR 활성을 조절하는 상기 화합물의 능력을 측정하여, 그 폴리펩티드의 작용제 또는 길항제를 구조에 기초하거나 추론적으로 디자인하는 방법에 사용할 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- <212> 추가로 이는 보통 반복적인 공정이라는 것을 이해할 것이다.
- <213> 치료 용도
- <214> 통상, 작용제 또는 길항제를 상기 언급한 질환에 대한 치료 및 예방 목적으로 사용할 수 있다. 화합물을 다양한 공급원, 예를 들면, 세포, 무세포 표본, 화학적 라이브러리, 및 천연산물의 혼합물로부터 확인할 수 있다. 그렇게 확인된 작용제 또는 길항제는 수용체 폴리펩티드의 경우 마찬가지로 자연발생되거나 변형된 펩티드, 리간드, 효소 등일 수 있거나; 그의 구조상 또는 작용상 유사체(mimetic)일 수 있다(참조 Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5(1991)).
- <215> 그러므로, 본 발명은 동통의 치료 또는 류마티스관절염, 다발경화증 또는 면역억제성 작용이 IBD에서와 같이 바람직한 다른 이상과 같은 자가면역 질환의 치료 또는 이식거부를 예방하기 위한 용도의 약제로서 hDRR 수용체의 작용제인 EPF, EPF 단편 또는 EPF-관련 펩티드의 용도에 관한 것이다. 바람직한 일면으로 EPF, EPF 단편 또는 EPF관련 펩티드는 서열번호: 8에 의해 코딩되는 hDRR 단편으로 구성되거나 본 발명에 따른 EPF-관련 펩티드는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20 및 서열번호: 21로 구성된 그룹으로부터 선택되는 폴리펩티드로 구성되어 있다.
- <216> 그러므로, 본 발명은 추가로 상기 기술된 에세이 중 어느 하나에서 상기 화합물이 수용체의 작용제 또는 길항제이고, 화합물이 hDRR 수용체에 결합할 수 있고/거나 hDRR 수용체 활성을 조절할 수 있는, 본 발명에 따른 에세이에서 확인된 화합물의 용도에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 동통의 치료 또는 류마티스관절염, 다발경화증 또는 면역억제성 작용이 IBD에서와 같이 바람직한 다른 이상과 같은 자가면역 질환의 치료 또는 이식거부를 예방하기 위한 용도의 약제로서 hDRR 수용체의 작용제인 화합물의 용도에 관한 것이다. 상기 화합물이 hDRR 수용체 폴리펩티드의 길항제인 경우 이 화합물을 피임제로서, 태아 손질의 예방에서 또는 암과 같은 세포 증식성 질환의 치료에서 사용할 수 있다.
- <217> 또한, 상기 기술된 에세이중 어느 하나에서 상기 화합물이 수용체의 작용제 또는 길항제이고, 화합물이 hDRR4 수용체에 결합할 수 있고/거나 hDRR4 수용체 활성을 조절할 수 있는, 본 발명에 따른 에세이에서 확인된 화합물의 용도에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 동통의 치료하기 위한 작용제이고 약제로서 상기 화합물 hDRR 특이적 화합물의 용도에 관한 것이다.
- <218> 유사하게, 본 발명은 추가로 상기 기술된 에세이 중 어느 하나에서 상기 화합물이 수용체의 작용제 또는 길항제이고, 화합물이 hDRR7 수용체 결합할 수 있고/거나 hDRR7 수용체 활성을 조절할 수 있는, 본 발명에 따른 에세이에서 확인된 화합물의 용도에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 동통의 치료 또는 류마티스관절염, 다발경화증 또는 면역억제성 작용이 IBD에서와 같이 바람직한 다른 이상과 같은 자가면역 질환의 치료 또는 이식거부를 예방하기 위한 용도의 약제로서 hDRR7 수용체의 작용제인 화합물의 용도에 관한 것이다. 상기 화합물이 hDRR7 수용체 폴리펩티드의 길항제인 경우 이 화합물을 피임제로서, 태아 손질의 예방에서 또는 암과 같은 세포 증식성 질환의 치료에서 사용할 수 있다.
- <219> 따라서, 추가의 일면으로, 본 발명은 포유 동물 대상자에게 EPF-관련 펩티드를 포함하는 상기 기술된 hDRR 조절 화합물을 hDRR 수용체 활성을 조절하는데 유효한 치료학적 유효량으로, 임의로는 약제학적으로 허용가능한 담체와 배합물로서 투여하는 것을 포함하는, 치료학적 유효량의 hDRR 활성 질환과 관련되는 의학적 증상을 예방, 치료 또는 호전시키는 방법을 제공한다. 상기 담체는 제한하는 것은 아니지만, 염수, 완충 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및 그의 배합물을 포함한다. 본 발명은 추가로 상기 언급한 본 발명의 조성물의 성분중 하나 이상으로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 키트 및 약제학적 팩에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드 및 다른 화합물은 단독으로, 또는 예를 들면, 치료학적 화합물과 같은 다른 화합물과 함께 사용될 수 있다.

<220> 따라서, 본 발명의 목적은 포유 동물 대상자에게 상기 기술된 에세이중 하나를 사용하여 확인된 hDRR7 수용체 작용제를 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 류마티스관절염, 다발경화증 또는 면역억제성 작용이 IBD에서와 같이 바람직한 다른 이상과 같은 자가면역 질환을 예방, 치료 또는 호전시키거나 이식거부를 예방하는 방법을 제공하는 것이다. 따라서, 본 발명은 포유 동물 대상자에게 상기 기술된 에세이중 하나를 사용하여 확인된 hDRR7 수용체 작용제를 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 세포 증식성 질환, 예를 들면, 암을 예방, 치료 또는 호전시키는 방법을 제공한다. 추가로, 본 발명의 목적은 포유 동물 대상자에게 상기 기술된 에세이중 하나를 사용하여 확인된 hDRR4 수용체 작용제를 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 동통의 전달, 조절 및 감각을 예방, 치료 또는 호전시키는 방법을 제공하는 것이다.

<221> 조성물은 투여 경로, 예를 들면, 전신 또는 경구 경로에 적절할 것이다. 전신 투여의 바람직한 형태는 전형적으로 정맥내 주사에 의해 주사를 포함한다. 예를 들면, 피하, 근육내, 또는 복강내와 같은 다른 주사 경로를 사용할 수 있다. 전신 투여를 위한 대체 방법은 침투제, 예를 들면, 담즙산염 또는 후시딘산 또는 다른 세제를 사용하는 경점막(transmucosal) 및 경피 투여를 포함한다. 추가로, 본 발명의 폴리펩티드 또는 다른 화합물이 장용 또는 캡슐화된 제제로 제형화될 수 있는 경우에는 경구 투여 또한 가능할 수 있다. 이들 화합물을 패치, 연고, 페스트, 젤 등의 형태로 국소 및/또는 국부적으로 투여할 수 있다.

<222> 본 발명의 펩티드 또는 다른 화합물의 선택, 투여 경로, 제형의 성질에 따라 필요한 투여량 범위는 달라질 수 있다. 그러나, 적절한 투여량은 대상자의 0.1-100 µg/kg 범위이다. 이용가능한 화합물이 다양하고 다양한 투여 경로에 따라 효능이 상이하다는 것과 관련하여 피용한 투여량은 광범위하게 다양하다는 것이 예상된다. 예를 들면, 경구 투여가 정맥내 주사로 투여하는 것보다 더욱 많은 투여량을 필요로 한다는 것을 예상할 수 있다. 본 분야에서 잘 이해되는 바와 같이 표준 실험실상의 작업을 사용하여 이들 투여량 수준의 차이는 조절될 수 있다.

**효 과**

<223> 본 발명은 초기임신인자(EPF) 및 EPF 관련 펩티드에 대한 수용체와 상호작용하는 화합물에 대한 에세이 분야 및 그의 치료적 용도를 제공한다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

<224> 본 발명은 하기의 실험상 상세한 설명을 참고로 하여 더욱 상세히 이해될 것이지만, 본 분야의 기술자는 이는 이하 기술되는 청구범위에서 더욱 전체적으로 기술되는 본 발명의 일례임을 이해할 것이다. 추가로, 본 명세서에 다양한 문헌이 인용된다. 이들 문헌의 개시는 본 발명이 속하는 분야의 상태를 더욱 완전하게 기술하기 위하여 본 명세서에 참고문헌으로서 인용된다.

**<225> 실시예 1: GPCR HRRR4의 클로닝 및 작용상 특성**

**<226> 재료 및 방법**

**<227> 재료**

<228> 고충실도 익스팬드(Expand high fidelity) 폴리머라아제, PCR 완충액, T4 DNA 리가아제, 및 제한 엔도뉴클레아제를 베링거사(Mannheim, Germany)로부터 입수하였다. 올리고뉴클레오티드를 Eurogentec사(eraing, Belgium)로부터 구입하였다. 플라스미드 표본 키트 및 Qiaquick PCR 증폭 키트를 Qiagen사(Hilden, Germany)로부터 입수하였다. PRISM Ready Reaction Dye Terminator cycle Sequencing 키트 및 ABI 377 또는 373A 서열화 기기를 Applied Biosystems사(Foster City, CA, U. S. A.)로부터 입수하였다. Geneamp PCR System 9600를 Perkin-Elmer사(Norwalk, CT, U. S. A.)로부터 입수하였다. 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3를 Invitrogen 사(Carlsbad, CA, U. S. A.)로부터 입수하였다. Dulbecco's modified Eagle 배지(DMEM), 우태아 혈청, 및 투석된 우태아 혈청을 Life Technologies(Gaithersburg, MD, U. S. A.)로부터 입수하였다.

**<229> DNA 서열화**

<230> PTC-200 PCR 기기(MJ Research)상에서 ABI PRISM BigDye Terminator cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Biosystems)으로부터 시약을 사용하여 DNA 서열화를 수행하였다. 반응 산물을 SEQueaky Kleen 96 well Terminator Removal Kit 칼럼(BioRad)상에서 정제하고 ABI377 DNA 서열화 기기상에서 분할하였다. 서열 분석을 위해 본 발명자는 GeneCodes사(Ann Harbor, MI)의 Sequencher 소프트웨어를 사용하였다.

**<231> hDRR4의 클로닝**

- <232> 전향 프라이머(GGAATTCGCCACCATGGATCCAACGGTCTCAACCTTGG) 및 역향 프라이머(GTCTCGAGTCACTGCTCCAATCTGCTTCCC)를 사용하여 인간 계놈 코스미 라이브러리(Clontech, Palo Alto, CA, USA)상에서 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 산물을 TOPO™ TA Cloning 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)의 도움으로 클로닝하였다. 전장의 리딩 프레임은 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)에 삽입하고 계속되는 스크리닝 시험에 사용하였다.
- <233> *hDRR7*의 클로닝
- <234> *hDRR7* 전향 프라이머(CGAATTCGCCACCATGGATCCAACACCCCGG) (서열번호: 13) 및 *hDRR7* 역향 프라이머(GCTCTAGAGGCTGTCCATCTCTACACCAGACTGC) (서열번호: 14)를 사용하여 인간 계놈 코스미 라이브러리(Clontech, Palo Alto, CA, USA)상에서 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 산물을 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)에 삽입하고 계속되는 스크리닝 시험에 사용하였다.
- <235> 포유동물 세포에서의 일시적(*transient*) 발현 및 FLIPR 에세이
- <236> *hDRR4* 발현 플라스미드 또는 *hDRR7* 발현 플라스미드를 일시적으로 FuGENE 6 시약(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 사용하여 Gα16-pcDNA3 작제물로 HEK293 세포내로 공-형질감염시켰다. 세포를 제조사의 권고에 따라 Fluo-4(Molecular probes, Eugene, OR, U. S. A.)로 로딩하였다. 연속하여 세포를 FLIPR 기기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U. S. A.)에서  $Ca^{2+}$  일시성에 대하여 분석하였다.
- <237> 조직 추출물의 제조 및 추출물 분획화
- <238> 5kg의 돼지 시상하부를 균질화하고 메탄올/물/아세트산, 90/9/1, v/v/v에서 추출하였다. 상층액을 n-헥산 추출법에 의해 탈지질화하고 수층을 Megabondelute 분획법에 의해 분획화하였다. 50% 아세토니트릴/ $H_2O$ 에서 용출하는 물질을 추가로 HPLC C18 칼럼상에서 분획화하였다. 그로부터 유래된 분획을 FLIPR 에세이에서 *hDRR4* GPCR의 활성화에 대하여 시험하였다. 수성 프리플루오로아세트산(0.1%)중 0 내지 60% 아세토니트릴에서 용출한 Megabondelute 분획을 추가로 분취용 DeltaPak C18 칼럼(Waters Ass., 25x100mm, 15 μm, 300 Å)상에서 분획화하였다. 그로부터 유래된 분획을 FLIPR 에세이에서 *hDRR4* GPCR의 활성화에 대하여 시험하였다. 연속하여 분취용 Hypersil C18, 분석용 Symmetry C18 칼럼(4.6 x 250 mm), narrow bore Xterra C8 칼럼(2.1 x 250 mm), narrow bore Xterra C18 칼럼(2.1 x 250 mm) 칼럼 및 최종적으로 narrow bore Symmetry C18 칼럼(2.1 x 150 mm) 상에서의 정제 단계는 *hDRR4* 형질감염된 세포를 활성화시키는 분획에 대한 FLIPR 기초 활성 에세이에 따르도록 하였다.
- <239> 질량 분광법 및 Edman 분해 기초 서열화
- <240> 전기분무 이온화(Electrospray ionisation) (ESI) 이중 사중극(double quadrupole) (Qq) 직교 가속(orthogonal acceleration) (oa) 비행시간형(time-of-flight) (ToF) 질량 분광법을 Q-ToF 시스템(Micromass UK)상에서 수행하였다. 활성 분자는 충돌에 의한 분열(collision induced dissociation) (CID)을 사용하여 단편 이온의 분석을 통해 확인하였다. 활성 분획을 포함하는 1 μl의 아세토니트릴/물/포름산(50/49.9/0.1, v,v,v)을 금이 코팅된 모세관(Protana L/Q 니들)에 적재하였다. 니들 전압을 900 V로 세팅하고 샘플링 콘(sampling cone)은 25 V에 세팅하였다. MS 및 MS/MS 스펙트럼을 포착할 수 있는 연장된 분석 시간동안 약 25 nl/min의 유속으로 샘플을 분무하였다. MS/M 또는 탠덤(tandem) 질량 분광법 단편 이온은 충돌에 의한 분열(CID)에 의해 선택된 전구체 이온으로부터 형성되고, 충돌 에너지는 전형적으로 20 내지 35 V이고, 아르곤을 충돌 가스로서 사용하였다. 펄스 모드로 흐르는 Perkin Elmer/Applied Biosystems Procise 492 미세-서열기상에서 정제된 펩티드의 N-말단 아미노산 서열화를 수행하였다.
- <241> 막 제조
- <242> 막은 총 미립자 분획으로서 제조하였다. 세포주를 145 mm 페트리 디쉬상에 90% 융합시까지 배양하고 수집 24시간 전에 5 mM 소듐 부티레이트로 처리하였다. 배양 배지를 제거하고 세포를 냉각된 인산-완충용액(PBS w/o  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ )으로 세척하고, 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4) 중에서 플레이트로부터 스크래핑하고, 원심분리(10분, 16,000 RPM, 4°C)하여 수집하였다. 세포 펠릿을 저장성(hypotonic) 5 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 재현탁시키고 Ultra Turrax 균질화기로 균질화하였다. 균질액을 4°C에서 20분 동안 18,000 RPM에서 원심분리하였다. 최종 펠릿을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 재현탁시키고 -70°C에서 분취량으로 저장하였다. 기준으로서

소혈청알부민(BSA)을 사용하는 Bradford 단백질 에세이(Biorad)를 사용하여 단백질 측량을 수행하였다.

<243> [<sup>3</sup>H]아데닌 결합

<244> 일시적으로 형질감염된 세포주를 특징화하기 위하여 [<sup>3</sup>H]아데닌 결합 시험을 수행하였다. 얼음상에서 막을 냉동시키고 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 1 mM EGTA로 보충된 50 mM HEPES 완충액(pH 7.4)에서 희석하였다. 비-특이성 결합은 1 μM의 아데닌의 존재하에 25°C에서 [<sup>3</sup>H]아데닌 1시간동안 인큐베이션 시켰을 때로 정의되고(30.4 Ci/mmol의 특이적 활성), 경쟁 결합 에세이에 대하여 최적인 것으로 밝혀졌다. 형질감염된 세포 및 야생형 COS 세포에 대하여 20 μg의 막 단백질을 사용하여 최종 용적을 500 μl으로하여 에세이를 수행하였다. Brandel 다중 채널 세포 수확기(96 웰)를 사용하여 Whatman GFIB 필터를 통해 신속하게 여과하여 반응을 종결시켰다. 필터를 3 ml의 냉각된 50 mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 3회 세척하고 액체 섬광 바이알에 옮기고 3 ml의 섬광액(Ultima Gold MV)을 가하였다. 유리 섬유 필터가 균일하게 반투명하게 되도록 적어도 6시간 후에 β-섬광 계수기에서 샘플을 계수하였다.

<245> 15 nM의 [<sup>3</sup>H]아데닌을 사용하여 아데닌에 의한 15 nM의 경쟁적 저해에 대한 시험을 수행하였다.

<246> 특정 결합을 1 μM의 표지되지 않은 아데닌의 존재 및 부재하에서의 계수의 차이로서 산출하였다.

<247> 실시간 측량 PCR에 의한 유전자 발현 수준 확인

<248> Analytical Biological Services로부터 입수한 후근 Ganglis RNA를 제외하고 Clontech로부터 다양한 조직으로부터의 RNA를 입수하였다. hDRR4 유전자에 대한 TaqMan 프로브 및 SDS 프라이머 PrimerExpress 1.0 소프트웨어(Perkin Elmer, MA, USA)를 사용하여 디자인하였다. hDRR4 유전자에 대한 SDS 전향 및 역향 프라이머는 각각 5'-GCGCAGGAACGCCTTCT-3'(서열번호: 22) 및 5'-CGGCCGCTGAGGAAGAG-3'(서열번호: 23)이었다. hDRR4에 대한 TaqMan 프로브(5'-TCCTCAACTGGCCGAGCAGA-3'(서열번호: 24))를 PrimerExpress 1.0 소프트웨어(Perkin Elmer, MA, USA)를 사용하여 디자인하였고 표적 서열의 상부 스트랜드 또는 하부 스트랜드로부터 선택할 수 있다. TagMan hDRR4 프로브를 5' 말단에서 리포터 형광 염료, 6-카복시플루오레세인(FAM)으로 표지화하였다. cDNA는 Superscript II 역전사 효소를 사용하여 제조하였다. 물 욕조중 42°C에서 60분 동안 RT를 수행하였다. 10분 동안 70°C에서 가열하여 반응을 종결시켰다. 이어서 MicroAmp Optical 96-웰 반응 플레이트에서 각 사이클을 15초 동안 95°C 및 1분 동안 60°C으로 50 사이클하여 PCR 증폭을 수행하였다. 모든 반응은 ABI Prism 7700 SDS를 사용하여 3회 수행하였다. 시험한 조직 내 hDRR4의 상대적인 발현을 CyclophilinA 발현과 비교하였다.

<249> 결과

<250> hDRR4의 생성 및 cDNA 서열

<251> 인간 계놈 코스미 라이브러리상에서 PCR을 수행한 후 단일 PCR 산물을 수득하였다. PCR 산물의 서열화는 hDRR3(97% aa 일치도) 및 hDRR4(99% aa 일치도) 서열과 현저하게 유사하였다(Patent W9932519). 그러나, 상기 서열은 EMBL 데이터베이스 목록상의 서열 스트레치(AC023078)와는 일치하였다. 본 발명자는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 1에 도시화하는데 이르렀다.

<252> 도 1에 도시화한 서열을 BLAST(Altschul et al., 1997) 서치에 의해 분석하여 공지된 리간드로 관련된 GPCRs를 밝혀낼 수 있는지 조사하였다. 검색된 오픈(오픈) GPCR의 가장 근접한 동족체는 최근 본 실험실에서 아데닌 수용체로서 확인된 GPCR RC56.3. 1이었다. hDRR4와 관련된 다른 수용체에 대한 리간드는 보고되어 있지 않다. 이는 GPCR hDRR4과 공통으로 79% 내지 99%의 잔기를 갖는 후근절로부터 클로닝된 인간 GPCRs(Derwent 서열 데이터베이스 수탁번호 Z10067, Z10068, Z10069, Z10070, Z10071 및 Z10072) 패밀리이다. 잘 공지되어 있는 또 다른 동족체는 hDRR4과 38%의 잔기를 공유하는 mas 원발암유전자이다.

<253> 첫번째 접근법은 FLIPR-기초 세포 에세이에서 hDRR4상의 아데닌 및 다른 구조적으로 관련된 화합물, 특히 퓨린을 시험하는 것이었다. 키메라 G 단백질 또는 불규칙적인(promiscuous) Gα16 G 단백질로 공-형질감염되거나 되지 않은 HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염시켜 수행하였다. 이 에세이에서 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 삼중수소 아데닌을 사용한 결합 시험에서는 hDRR4에 대한 비특이적 아데닌 결합을 검출할 수 없었지만 RC56.1. 3 형질감염된 세포는 특이적 아데닌 결합을 명확하게 나타내었다. 이러한 접근법은 이 수용체의 자연발생된 리간드에 대한 힌트를 제시하지 않았기 때문에 본 발명자는 자연발생된 리간드를 확인하기 위하여 '역 약물학(reverse pharmacology)'적 방법을 적용하였다.

- <254> *돼지 시상하부로부터 hDRR4의 자연발생된 작용제의 정제*
- <255> 분비되는 펩티드의 풍부한 공급원으로 공지되어 있는 조직, 예를 들면 시상하부로부터 추출물을 제조하고 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 오픈 GPCR의 활성화에 기초하여 세포 에세이에 따라 자연발생된 리간드를 정제하였다.
- <256> 제 1차 분획화 후 C18 칼럼상에서의 돼지 시상하부 추출물의 스크리닝은 hDRR4 발현 작제물로 일시적으로 형질 감염된 세포에 대하여 일시적으로 세포내 Ca<sup>42</sup>를 방출하는 분획 범위를 제시하였다. 이는 야생형 HEK293 세포(테이타를 제시하지 않음)가 아닌 Gα16 발현 작제물로 일시적으로 공-형질감염된 HEK293 세포의 경우였다. 이들 분획들중 가장 강력한 자극성을 나타내는 65번 및 66번 이들 두 개를 추가로 부-분획화(subfractionation)하기 위하여 선택하고 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 공정하였다. FLIPR 기초 활성 에세이에 따라 정제하고 최종 칼럼 흐름( runs)으로 활성을 나타내는 분획을 질량 분광법에 적용시켜 그를 포함하는 화합물의 구조 및 순도를 측정하였다.
- <257> *질량 분광법에 의한 hDRR4 활성화 물질의 확인*
- <258> Symmetry C18(4.6 x 250 mm; 5 μm, 물)로부터 활성의 정제된 분획을 질량 분석하여 2163 Da(2164.7 M+H<sup>+</sup>)에서 주요 질량-피크를 수득하였다. 상이한 HPLC 칼럼상에서 활성 분획의 용출 프로파일은 수용체-활성화 화합물은 펩티드라는 것을 제시하였다. 그러므로, 이 질량을 연속하여 Edman 분해 기초 서열화에 의해 분석하였다. 서열은
- <259> AFRKFLPLFDRVLVERSA(아미노산을 1문자로 표기)으로 결정되었다.
- <260> *FLIPR 에세이에 기초한 hDRR4 활성화 물질의 세포에 대한 영향*
- <261> 시험 농도 150 nM으로 EPF의 hDRR 결합 단편(서열번호: 8)에 의한 오픈 GPCR hDRR4(서열번호: 2)을 활성화는 Gα16-pcDNA로 공-형질감염된 Hek293 세포에서 측정하였다. 상대적인 형광 유니트(RFU)는 세포에 Fluo-4(Molecular Probes, Eugene, OR, U. S. A.)을 로딩하여 측정하였다. 도 3에 나타내는 바와 같이 Gα16-pcDNA 발현 벡터로 형질감염된 Hek 293 세포만 hDRR 결합 단편에 반응을 나타내지 않았다. 서열번호: 8로 구성된 hDRR 활성화 펩티드를 상이한 시험 농도로 FLIPR 에세이를 사용하여 12 nM의 EC<sub>50</sub> 값이 측정되었다(도 7).
- <262> *hDRR4 유전자 발현*
- <263> 실시간 측량 PCR을 통해 후근 신경절(DRG) 및 삼차신경절에서 hDRR4 발현한다는 것이 밝혀졌다. 이러한 발견으로 동통의 지각 또는 조절시의 수용체의 강력한 역할이 입증되었다. 다른 조직에서의 발현 수준을 후근 신경절 및 삼차신경절에서 관찰된 발현 수준과 비교한 도 6에 나타낸 바와 같이 시험된 모든 조직중 후근 신경절 및 삼차신경절에서 hDRR4이 거의 배타적으로 발현되었다.
- <264> **실시예 2 : GPCR HDRR7의 클로닝 및 작용상 특성**
- <265> **재료 및 방법**
- <266> *재료*
- <267> 고충실도 익스팬드(Expand high fidelity) 폴리머라아제, PCR 완충액, T4 DNA 리가아제, 및 제한 엔도뉴클레아제를 베링거사(Mannheim, Germany)로부터 입수하였다. 올리고뉴클레오티드를 Eurogentec사(eraing, Belgium)로부터 구입하였다. 플라스미드 표본 키트 및 Qiaquick PCR 증폭 키트를 Qiagen사(Hilden, Germany)로부터 입수하였다. PRISM Ready Reaction Dye Terminator cycle Sequencing 키트 및 ABI 377 또는 373A 서열화 기기를 Applied Biosystems사(Foster City, CA, U. S. A.)로부터 입수하였다. Geneamp PCR System 9600를 Perkin-Elmer사(Norwalk, CT, U. S. A.)로부터 입수하였다. 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3를 Invitrogen 사(Carlsbad, CA, U. S. A.)로부터 입수하였다. Dulbecco's modified Eagle 배지(DMEM), 우태아 혈청, 및 투석된 우태아 혈청을 Life Technologies(Gaithersburg, MD, U. S. A.)로부터 입수하였다.
- <268> *DNA 서열화*
- <269> PTC-200 PCR 기기(MJ Research)상에서 ABI PRISM BigDye Terminator cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Biosystems)으로부터 시약을 사용하여 DNA 서열화를 수행하였다. 반응 산물을 SEQueaky Kleen 96 웰 Terminator Removal Kit 칼럼(BioRad)상에서 정제하고 ABI377 DNA 서열화 기기상에서 분할하였다. 서열 분석을

위해 본 발명자는 GeneCodes사(Ann Harbor, MI)의 Sequencher 소프트웨어를 사용하였다.

<270> *hDRR7*의 클로닝

<271> *hDRR7* 전향 프라이머(CGAATTCGCCACCATGGATCCAACACCCCGG) (서열번호: 13) 및 *hDRR7* 역향 프라이머(GCTCTAGAGGCTGTCCATCTCTACACCAGACTGC) (서열번호: 14) (GGAATTCGCCACCATGGATCCAACGGTCTCAACCTTGG)를 사용하여 인간 게놈 코스미 라이브러리(Clontech, Palo Alto, CA, USA)상에서 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 산물을 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)에 삽입하고 계속되는 스크리닝 시험에 사용하였다.

<272> 포유동물 세포에서의 일시적(*transient*) 발현 및 FLIPR 에세이

<273> *hDRR7* 발현 플라스미드를 일시적으로 FuGENE 6 시약(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 사용하여 Ga 16-pcDNA3 작체물로 HEK293 세포내로 공-형질감염시켰다. 세포를 제조사의 권고에 따라 Fluo-4(Molecular probes, Eugene, OR, U. S. A.)로 로딩하였다. 연속하여 세포를 FLIPR 기기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U. S. A.)에서  $Ca^{2+}$  일시성에 대하여 분석하였다.

<274> 막 제조

<275> 막은 총 미립자 분획으로서 제조하였다. 세포주를 145 mm 페트리 디쉬상에 90% 융합시까지 배양하고 수집 24시간 전에 5 mM 소듐 부티레이트로 처리하였다. 배양 배지를 제거하고 세포를 냉각된 인산-완충용액(PBS w/o  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ )으로 세척하고, 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4) 중에서 플레이트로부터 스크램핑하고, 원심분리(10분, 16,000 RPM, 4°C)하여 수집하였다. 세포 펠릿을 저장성(hypotonic) 5 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 재현탁시키고 Ultra Turrax 균질화기로 균질화하였다. 균질액을 4°C에서 20분동안 18,000 RPM에서 원심분리하였다. 최종 펠릿을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 재현탁시키고 -70°C에서 분취량으로 저장하였다. 기준으로서 소혈청알부민(BSA)을 사용하는 Bradford 단백질 에세이(Biorad)를 사용하여 단백질 측량을 수행하였다.

<276> 실시간 측량 PCR에 의한 유전자 발현 수준 확인

<277> Analytical Biological Services로부터 입수한 후근 Ganglis RNA을 제외하고 Clontech로부터 다양한 조직으로부터의 RNA를 입수하였다. *hDRR7* 유전자에 대한 TaqMan 프로브 및 SDS 프라이머 PrimerExpress 1.0 소프트웨어(Perkin Elmer, MA, USA)를 사용하여 디자인하였다. *hDRR7* 유전자에 대한 SDS 전향 및 역향 프라이머는 각각 5'-TGGAAATGACCAAGCCCTTCT-3'(서열번호: 15) 및 5' GAAAAGGATCAGGAAGACCGG-3'(서열번호: 16)이었다. *hDRR7*에 대한 TaqMan 프로브(5'-ATCAGGGTCTCCTTGCCACAAAGCAGT-3'(서열번호: 17)를 PrimerExpress 1.0 소프트웨어(Perkin Elmer, MA, USA)를 사용하여 디자인하였고 표적 서열의 상부 스트랜드 또는 하부 스트랜드로부터 선택할 수 있다. TagMan *hDRR7* 프로브를 5' 말단에서 리포터 형광 염료, 6-카복시플루오레세인(FAM)으로 표지화하였다. cDNA는 Superscript II 역전사 효소를 사용하여 제조하였다. 물 욕조중 42°C에서 60분 동안 RT를 수행하였다. 10분 동안 70°C에서 가열하여 반응을 종결시켰다. 이어서 MicroAmp Optical 96-웰 반응 플레이트에서 각 사이클을 15초 동안 95°C 및 1분 동안 60°C으로 50 사이클하여 PCR 증폭을 수행하였다. 모든 반응은 ABI Prism 7700 SDS를 사용하여 3회 수행하였다. 시험한 조직내 *hDRR7*의 상대적인 발현을  $\beta$ -액틴 발현과 비교하였다.

<278> 결과

<279> *hDRR7*의 생성 및 cDNA 서열

<280> 인간 게놈 코스미 라이브러리상에서 PCR을 수행한 후 단일 PCR 산물을 수득하였다. 상기 서열은 EMBL 데이터베이스 목록상의 서열 스트레치(AX099247)와는 일치하였다. 본 발명자는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 11에 도시화하는데 이르렀다.

<281> FLIPR 에세이에 기초한 *hDRR7* 활성화 물질의 세포에 대한 영향

<282> 시험 농도 150 nM으로 EPF의 *hDRR* 결합 단편(서열번호: 8)에 의한 오픈 GPCR *hDRR7*(서열번호: 12)을 활성화는 Ga 16-pcDNA로 공-형질감염된 HEK293 세포에서 측정하였다. 상대적인 형광 유니트(RFU)는 세포에 Fluo-4(Molecular Probes, Eugene, OR, U. S. A.)을 로딩하여 측정하였다. 도 4에 나타내는 바와 같이 Ga 16-pcDNA 발현 벡터로 형질감염된 Hek 293 세포만 *hDRR* 결합 단편에 반응을 나타내지 않았다. 서열번호: 8로 구성된 *hDRR* 활성화 펩티드를 상이한 시험 농도로 FLIPR 에세이를 사용하여 354nM의  $EC_{50}$  값이 측정되었다(도 8).

- <283> *hDRR7* 유전자 발현
- <284> 실시간 측량 PCR을 통해 림프절에서 *hDRR7* 발현한다는 것이 밝혀졌다. *hDRR* 수용체의 자연발생된 작용제로서 조기 임신 인자를 확인한 것과 같이 상기의 발견으로 임신중 관찰되는 EPF의 면역억제성 작용에서 이 수용체가 강력한 역할을 한다고 입증되었다. 다른 조직에서의 발현 수준을 림프절에서 관찰된 발현 수준과 비교한 도 5에 나타낸 바와 같이 시험된 모든 조직중 림프절에서 *hDRR7*이 거의 배타적으로 발현되었다.
- <285> **실시예 3: EPF-관련 펩티드의 정제 및 확인**
- <286> **재료 및 방법**
- <287> *재료*
- <288> 고충실도 익스팬드(Expand high fidelity) 폴리머라아제, PCR 완충액, T4 DNA 리가아제, 및 제한 엔도뉴클레아제를 베링거사(Mannheim, Germany)로부터 입수하였다. 올리고뉴클레오티드를 Eurogentec사(eraing, Belgium)로부터 구입하였다. 플라스미드 표본 키트 및 Qiaquick PCR 증폭 키트를 Qiagen사(Hilden, Germany)로부터 입수하였다. PRISM Ready Reaction Dye Terminator cycle Sequencing 키트 및 ABI 377 또는 373A 서열화 기기를 Applied Biosystems사(Foster City, CA, U. S. A.)로부터 입수하였다. Geneamp PCR System 9600를 Perkin-Elmer사(Norwalk, CT, U. S. A.)로부터 입수하였다. 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3를 Invitrogen 사(Carlsbad, CA, U. S. A.)로부터 입수하였다. Dulbecco's modified Eagle 배지(DMEM), 우태아 혈청, 및 투석된 우태아 혈청을 Life Technologies(Gaithersburg, MD, U. S. A.)로부터 입수하였다.
- <289> *DNA* 서열화
- <290> PTC-200 PCR 기기(MJ Research)상에서 ABI PRISM BigDye Terminator cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Biosystems)으로부터 시약을 사용하여 DNA 서열화를 수행하였다. 반응 산물을 SEQueaky Kleen 96 웰 Terminator Removal Kit 칼럼(BioRad)상에서 정제하고 ABI377 DNA 서열화 기기상에서 분할하였다. 서열 분석을 위해 본 발명자는 GeneCodes사(Ann Harbor, MI)의 Sequencher 소프트웨어를 사용하였다.
- <291> *hDRR4*의 클로닝
- <292> 전향 프라이머(GGAATTCGCCACCATGGATCCAACGGTCTCAACCTTGG) 및 역향 프라이머(GTCTCGAGTCACTGCTCCAATCTGCTCCC)를 사용하여 인간 게놈 코스미 라이브러리(Clontech, Palo Alto, CA, USA)상에서 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 산물을 TOPO™ TA Cloning 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)의 도움으로 클로닝하였다. 전향의 리딩 프레임을 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)에 삽입하고 계속되는 스크리닝 시험에 사용하였다.
- <293> *hDRR7*의 클로닝
- <294> *hDRR7* 전향 프라이머(CGAATTCGCCACCATGGATCCAACCCCGG) (서열번호: 13) 및 *hDRR7* 역향 프라이머(GCTCTAGAGGCTGTCCATCTCTACACCAGACTGC) (서열번호: 14)를 사용하여 인간 게놈 코스미 라이브러리(Clontech, Palo Alto, CA, USA)상에서 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 산물을 포유동물의 발현 벡터 pcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA, U. S. A.)에 삽입하고 계속되는 스크리닝 시험에 사용하였다.
- <295> *포유동물 세포에서의 일시적(transient) 발현 및 FLIPR* 에세이
- <296> *hDRR4* 발현 플라스미드 또는 *hDRR7* 발현 플라스미드를 일시적으로 FuGENE 6 시약(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 사용하여 Ga 16-pcDNA3 작제물로 HEK293 세포내로 공-형질감염시켰다. 세포를 제조사의 권고에 따라 Fluo-4(Molecular probes, Eugene, OR, U. S. A.)로 로딩하였다. 연속하여 세포를 FLIPR 기기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U. S. A.)에서  $ca^{2+}$  일시성에 대하여 분석하였다.
- <297> *감상샘 추출물의 정제*
- <298> 2.5kg의 돼지 감상샘을 균질화하고 메탄올/물/아세트산, 90/9/1, v/v/v에서 추출하였다. 상층액을 n-헥산 추출법에 의해 탈지질화하고 수층을 Megabond Elute 고체상 추출법에 의해 분획화하였다. 수성 프리플루오로아세트산(0.1%)중 0 내지 50% 아세토니트릴에서 용출한 물질을 추가로 분취용 DeltaPak C18 칼럼(40x100 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 분획화하였다. 그로부터 유래된 분획을 FLIPR 에세이에서 *hDRR4* GPCR의 활성화에 대하여 시험하였다. 연속하여 분취용 Deltapak C4 칼럼(25x10 mm), 분석용 C18 칼럼(4.6x250 mm), narrow bore X-terra C18 칼럼(2. 1x250 mm) 및 최종적으로 모세관 Symmetry C18 칼럼(0.32x150 mm) 상에서의 정제 단계는 *hDRR4* 형질감

염된 세포를 활성화시키는 분획에 대한 FLIPR 기초 활성 에세이에 따르도록 하였다.

<299> **결과**

<300> 돼지 갑상샘으로부터 hDRR4의 자연발생된 작용제의 정제

<301> 분비되는 펩티드의 풍부한 공급원으로 공지되어 있는 조직, 예를 들면 갑상샘으로부터 추출물을 제조하고 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 오픈 GPCR의 활성화에 기초하여 세포 에세이에 따라 자연발생된 리간드를 정제하였다.

<302> 제 1차 분획화 후 C18 칼럼상에서의 돼지 시상하부 추출물의 스크리닝은 hDRR4 발현 작제물로 일시적으로 형질 감염된 세포에 대하여 일시적으로 세포내 Ca<sup>42</sup>를 방출하는 분획 범위를 제시하였다. 두개의 인접한 분획을 균일하게 정제하고 ESI-Qq-TOF MS에 의해 분석하였다. 두개의 분획은 1918.77 Da 질량에 상응하는 m/z 640.59 및 2146. 89 Da 질량에 상응하는 m/z 716.63에서 두개의 우세한 삼중 대전된 이온 피크를 나타내었다. 이들 피크를 탠덤 MS 시험에서 선택하였고 Q-TOF 시스템상에서 충돌에 의한 분열에 의해 단편하였다. 2146. 8 Da 화합물에 대하여 4개의 가능한 서열: LGX<sub>1</sub>AFRX<sub>2</sub>FLPLFDRVLE(X<sub>1</sub> 및 X<sub>2</sub>는 K 또는Q이다)을 수득하고, 첫번째 펩티드보다 짧은 이소폼인 1918.77 Da 펩티드에 대한 4개의 가능한 서열: LGX<sub>1</sub>AFRX<sub>2</sub>FLPLFDRVL(X<sub>1</sub> 및 X<sub>2</sub>는 K 또는Q이다) (서열번호 18-21)을 수득하였다.

<303> 이들 서열 중 아미노산 2-19 및 2-17이 각각 chaperonin10(Hsp10) 2-18 및 chaperonin10(Hsp10) 2-16에 상응한다. 현재까지 연구되어진 바에 따르면 모든 척추동물의 chaperonin에서 7번상의 아미노산 잔기는 리신(K)이다. 3번상의 아미노산 잔기는 래투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*), 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 및 호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 모든 포유동물 중에서 Q이고, 갈루스 갈루스(*Gallus gallus*) (조류)에서는 K이다.

<304> FLIPR 측정

<305> 정제된 펩티드 또는 건조된 조직 분획을 칼슘 완충액에 용해시키고 정해진 멀티-웰 96 플레이트에 로딩하였다. 이어서 세포를 FLIPR 기기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U. S. A.)에서 ca<sup>2+</sup> 일시성에 대하여 분석하였다. EPF-관련 펩티드에 대하여 하기 pEC<sub>50</sub> 값이 측정되었다:

명칭	서열	MrgX1 (pEC50)	MrgX2 (pEC50)	
EPF 1-16	LGQAFRKFLPLFDRVL (서열번호:21)	7.821 ± 0.1538	6.059 ± 0.916	Fig. 9
EPF 1-18	LGQAFRKFLPLFDRVLE (서열번호:19)	7.003 ± 0.0462	6.086 ± 0.105	Fig 10

<306>



<307>

참고문헌

- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang, J., Zhang,Z., Miller,W., and Lipman,D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Athanasas-Platsis, S., Corcoran, C.M., Kaye, P.L., Cavanagh, A.C., and Morton, H. early pregnancy factor is required at two important stages of embryonic development in the mouse. *American J. of Reproductive Immunology* 43 (4), 2000, 223 –233.
- Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M.M., Cortinovic-Tourniaire, P., and Moreau, T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. pregnancy in multiple sclerosis group. *New England J. of Medicine* 339 (5), 1998, 285 – 291.
- Davis, R.K., and Maslow, A.S. Multiple sclerosis in pregnancy: a review. *Obstetrical & Gynecological Survey* 47 (5), 1992, 290 – 296.
- Hickey, R.W., Zhu, R.L., Alexander, H.L., Jin, K.L., Stetler, R.A., Chen, J., Kochanek, P.M., and Graham, S.H. 10 kD mitochondrial matrix heat shock protein mRNA is induced following global brain ischemia in the rat. *Brain Research. Molecular Brain Research* 79 (1-2), 2000, 169 – 173.
- Hinuma, S. et al (1998) A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393, 272-276.
- Lau, S., Patnaik, N., Sayen, M.R., and Mestril, R. Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia – induced injury. *Circulation* 96 (7), 1997, 2287 – 2294.

<308>

- Morton, H. Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue. *Immunology & Cell Biology* 76 (6), 1998, 483 – 496.
- Reinscheid R.K. et al., (1995) Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioidlike G-protein-coupled receptor. *Science* 270, 792-794.
- Sakurai T. et al., (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptide and G-protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell* 92, 573-585.
- Stadel, J.M., Wilson, S., and Bergsma, D.J. (1997) Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *TiPS* 18, 430-437.
- Summers, K.M., Fletcher, B.H., Macaranas, D.D., Somodevilla-Torres, M.J., Murphy, R.M., Osborne, M.J., Spurr, N.K., Cassady, A.I., and Cavanagh, A.C. Mapping and characterization of the eukaryotic early pregnancy factor/chaperonin 10 gene family. *Somatic Cell & Molecular Genetics* 24(6), 1998, 315 –326.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 251, 471-476.
- Wilson S., Bergsma D.J., Chambers J.K., Muir A.I., Fantom K.G., Ellis C., Murdock P.R., Herrity N.C., Stadel J.M. (1998) Orphan G-protein-coupled receptors: the next generation of drug targets? *Br. J. Pharmacol.* 125, 1387-1392.

<309>

도면의 간단한 설명

- <310> 도 1 A는 hDRR4의 뉴클레오티드 코딩 서열(서열번호: 1)을 나타낸다(굵은체: 개시 및 종결 코돈)
- <311> 도 1 B는 hDRR4의 아미노산 서열(서열번호: 2)을 나타낸다.
- <312> 도 2. Hek293 세포내로 Ga 16-pcDNA로 일시적으로 공-형질감염시킨 후 배지의 시상하부 추출물 C18 분획에 의한 오픈 GPCR hDRR4의 활성화. 상대적인 형광 유니트(RFU)는 세포에 Fluo-4(Molecular probes, Eugene, OR, U. S. A.)를 적재하고 FLIPR 기기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U. S. A.)에서  $ca^{2+}$  일시성에 대하여 세포를 분석하여 측정하였다.
- <313> 도 3. Hek293 세포내로 Ga 16-pcDNA로 일시적으로 공-형질감염시킨 후 150nM의 시험 농도로 EPF의 결합 단편(서열번호: 8)에 의한 오픈 GPCR hDRR4(서열번호: 2)의 활성화. 상대적인 형광 유니트(RFU)는 세포에 Fluo-4(Molecular probes, Eugene, OR, U. S. A.)를 적재하여 측정하였다.
- <314> 도 4. Hek293 세포내로 Ga 16-pcDNA로 일시적으로 공-형질감염시킨 후 150nM의 시험 농도로 EPF의 결합 단편(서열번호: 8)에 의한 오픈 GPCR hDRR7(서열번호: 12)의 활성화. 상대적인 형광 유니트(RFU)는 세포에 Fluo-4(Molecular probes, Eugene, OR, U. S. A.)를 적재하여 측정하였다.
- <315> 도 5. 100%로 나타낸 림프절 발현과 비교한 여러 조직에서의 hDRR7의 상대적인 발현. 발현 수준을 실시간 측정 PCR을 사용하여 측정하였다.
- <316> 도 6. 평균한 조직중 인간 사이클로필린 A의 상대적인 발현과 비교한 여러 조직에서의 hDRR4의 상대적인 발현. 발현 수준을 실시간 측정 PCR을 사용하여 측정하였다.
- <317> 도 7. FLIPR 칼슘 에세이를 사용하여 측정한 hDRR4에 대한 EPF의 결합 단편(서열번호: 8)의 투여 반응 곡선
- <318> 도 8. FLIPR 칼슘 에세이를 사용하여 측정한 hDRR7에 대한 EPF의 결합 단편(서열번호: 8)의 투여 반응 곡선
- <319> 도 9. FLIPR 칼슘 에세이를 사용하여 측정한 hDRR4에 대한 EPF-관련 펩티드 EPF1-16(서열번호: 19) 및 EPF1-18(서열번호: 21)의 투여 반응 곡선
- <320> 도 10. FLIPR 칼슘 에세이를 사용하여 측정한 hDRR7에 대한 EPF-관련 펩티드 EPF1-16(서열번호: 19) 및 EPF1-18(서열번호: 21)의 투여 반응 곡선

**도면**

**도면1**

**>hDRR4**

```

ATGGATCCAACCATCTCAACCTTGGACACAGAAGTACACCAATCAACGGAAGTGGAGAGACTCTTTGCT
ACAAGCAGACCTTGAGCCTCAGCGTGCATCGTTCCCTTGTGGGCTGACAGGAAACGCAGT
TGTGCTCTGGCTCCTGGGCTGCCGATGCGCAGGAACGCCTTCTCCATCTACATCCTCACTGGCCGCA
GCAGACTTCCTCTCTCAGCGGCCCTTATATATTCCTGTAAAGCTTCAATCAGTATCCCCCATACCA
TCTCTAAAATCCTCTATCCTGTGATGATGTTTTCCTACTTTGCAGGCTGAGCTTTCGAGTGCCGTGAG
CACCGAGCGCTGCCTGTCCGTCTGTGGCCATCTGGTACCGCTGCCACCGCCACACACCTGTGACGG
GTGGTGTGTCTCTGCTCTGGGCCCTGTCCCTGCTGCGAGCATCTGGAGTGGATGTTATGTGGCTCC
TGTTTCAGTGGTGTGATCTGCTTGGTGTCAAACATCAGATTTTCATCACAGTGCCTGGCTGATTTTTTT
ATGTGTGGTCTCTGTGGGTCCAGCCTGGTCTGCTGATCAGGATCTCTGTGGATCCCGGAAGTACCG
CTGACCGGCTGTACGTACCATCTGCTACAGTACTGGTCTCCCTCTGTGGCCTGCCCTTTGGCA
TTCAAGTTTTCTATTTTTATGGATCCAGTGGACAGGGAAGTCTTATTTTGTATGTTTCATCTAGTTTC
TATTTTCTGTCCGCTCTAACAGCAGTGCACCCATCATTTACTTCTCGTGGGCTCCTTTAGGCAG
CGTCAAAATAGGCAGAACCTGAAGCTGGTCTCCAGAGGGCTCTGCAGGACGCTCTGAGGTGGATGAAG
GTGGAGGGCAGCTTCTGAGGAAATCTGGAGCTGTCCGGGAGCAGATTGGAGCAGTGA
    
```

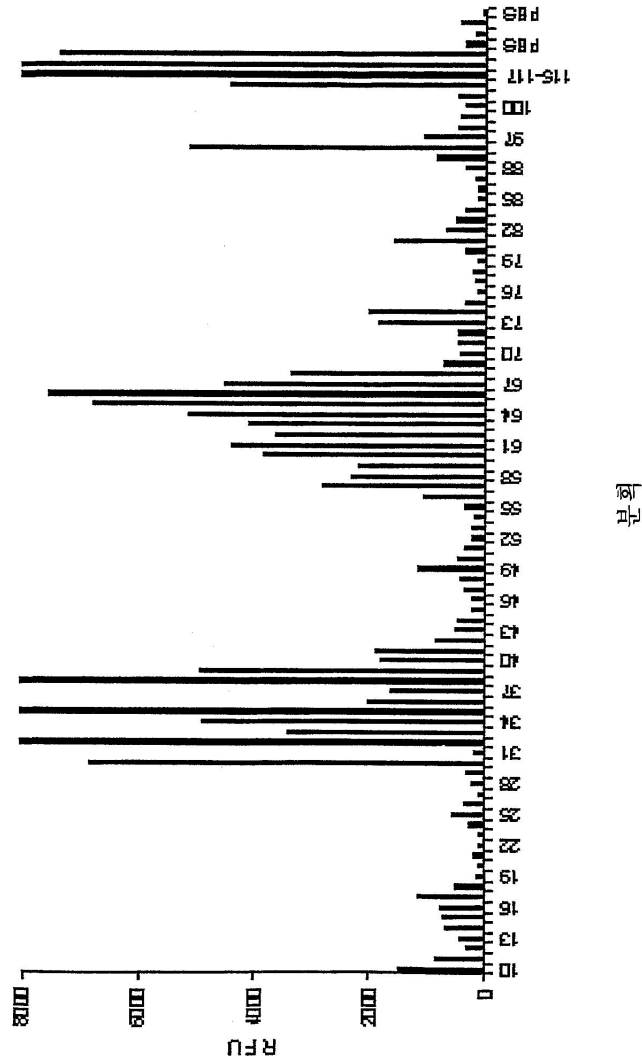
Fig.1.B

**>hDRR4**

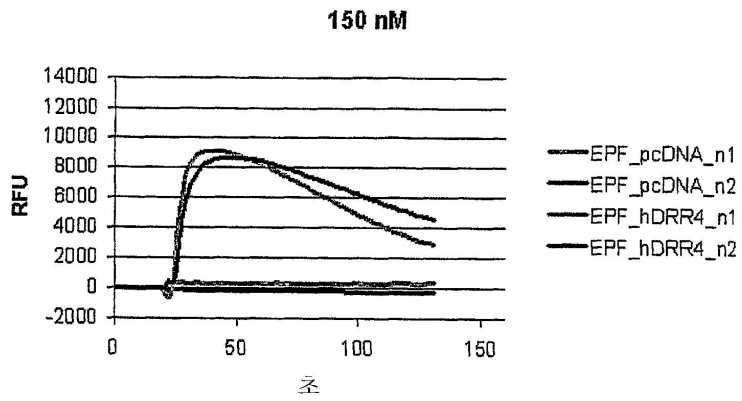
```

MDPTISTLDTELPINGTEETLCYKQTLSTLVTLCIVSLVGLTGNVAVLWLLGCRMRNNAFSIYLNLAA
ADFLFLSGRLIYSLLSFISIPHTISKILYPMFVSFVAGLSFLSAVSTERCLSVLWPIWYRCHRPHLSA
VVCLLWALSLRSLILEWMLCGPLFSGADSAWCQTSDFITVAVLIFLVCVVLGSSSLVLLIRILCGSRKIP
LTRLVYVITLLTVLVFLCGLPFGIQFFLFLWLVHVDREVLVCHVHLVSIPLSALNSSANPIIYFFVGSFRQ
RQNRQNLKLVLRALQDASEVDEGGQLPFEIILELSGSRLBQ*
    
```

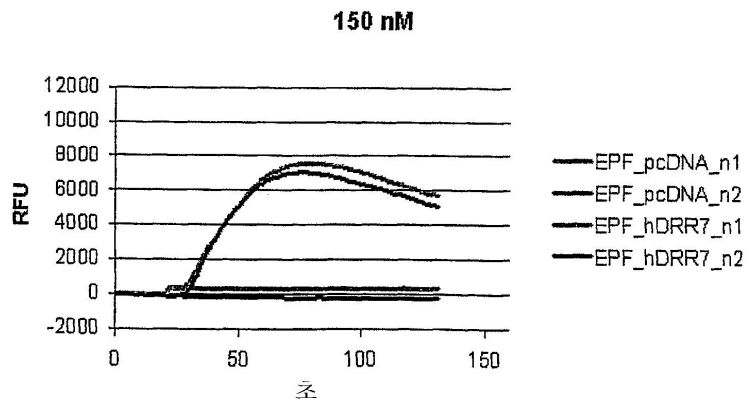
도면2



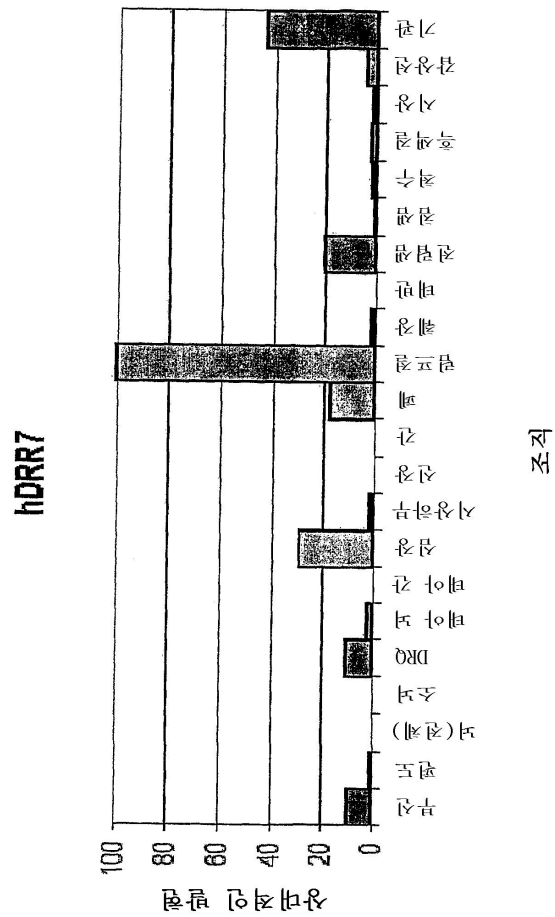
도면3



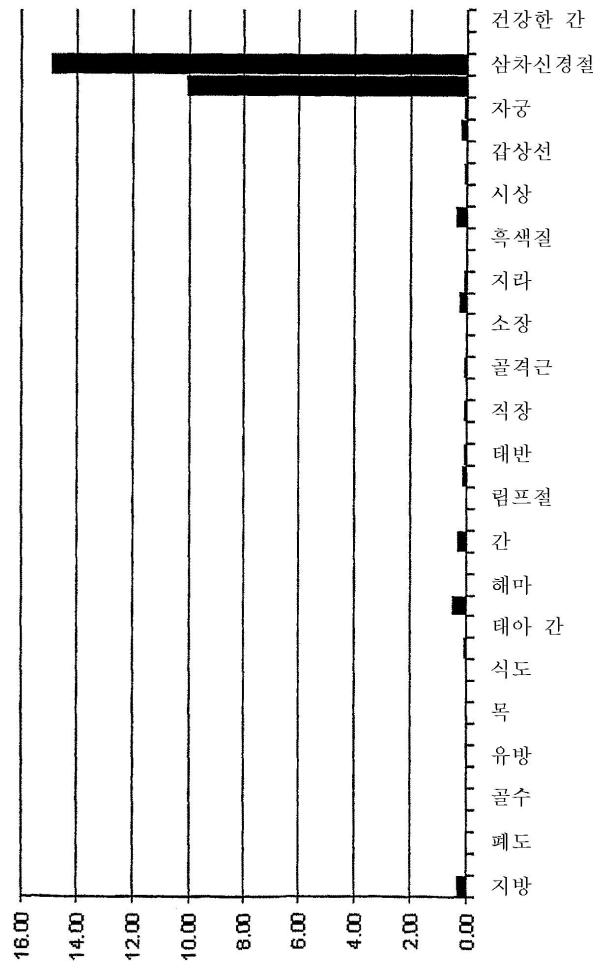
도면4



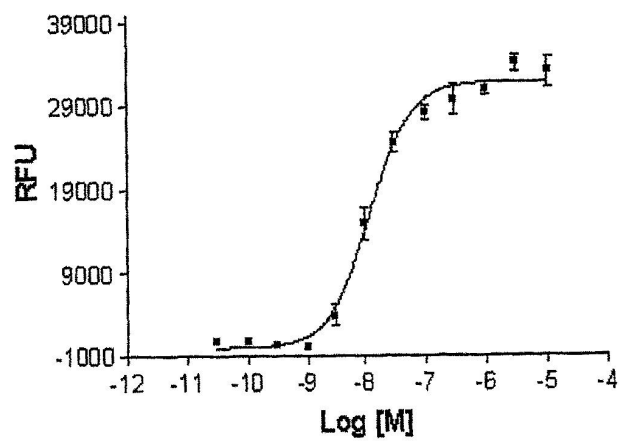
도면5



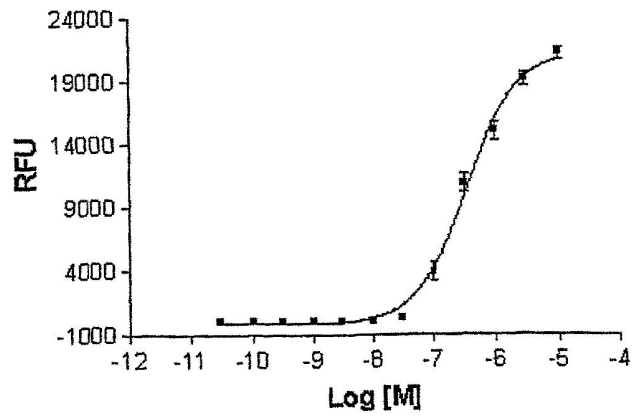
도면6



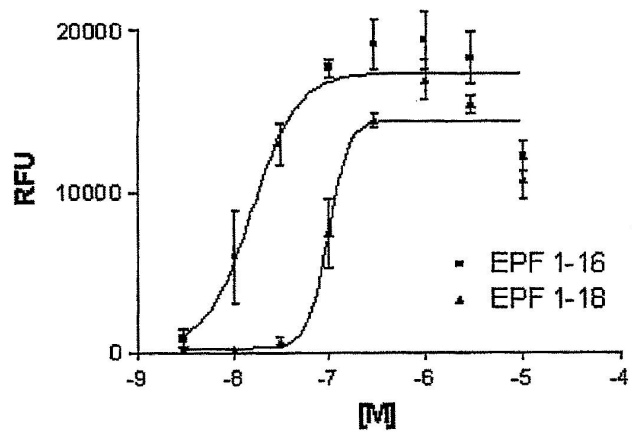
도면7



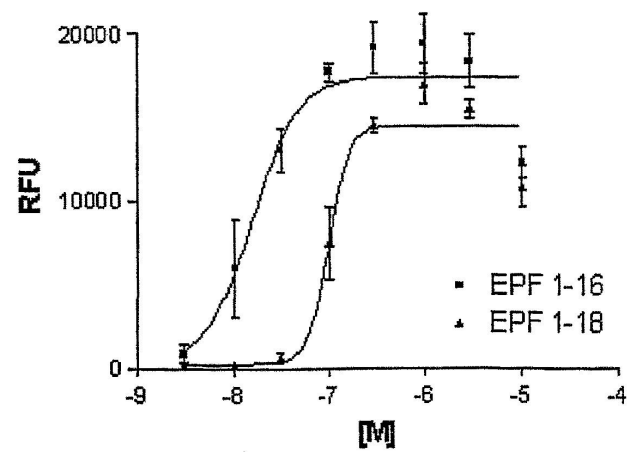
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> Janssen Pharmaceutica N.V.

<120> EPF receptor assays, compounds and therapeutic compositions

<130> J2655  
 <150> European Patent Application No. 01202474.1  
 <151> 2001-06-27  
 <160> 24  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 969  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(966)  
 <223>  
 <400> 1  
 atg gat cca acc atc tca acc ttg gac aca gaa ctg aca cca atc aac 48  
 Met Asp Pro Thr Ile Ser Thr Leu Asp Thr Glu Leu Thr Pro  
 Ile Asn  
 1 5 10 15  
 gga act gag gag act ctt tgc tac aag cag acc ttg agc ctc acg gtg 96  
 Gly Thr Glu Glu Thr Leu Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Leu Thr Val  
 20 25 30  
 ctg acg tgc atc gtt tcc ctt gtc ggg ctg aca gga aac gca gtt gtg 144  
 Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Gly Leu Thr Gly Asn Ala Val Val  
 35 40 45  
  
 ctc tgg ctc ctg ggc tgc cgc atg cgc agg aac gcc ttc tcc atc tac 192  
 Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe Ser Ile Tyr  
 50 55 60  
 atc ctc aac ttg gcc gca gca gac ttc ctc ttc ctc agc ggc cgc ctt 240  
 Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly Arg Leu  
 65 70 75 80  
 ata tat tcc ctg tta agc ttc atc agt atc  
 ccc cat acc atc tct aaa 288  
 Ile Tyr Ser Leu Leu Ser Phe Ile Ser Ile Pro His Thr Ile Ser Lys  
 85 90 95  
 atc ctc tat cct gtg atg atg ttt tcc tac ttt gca ggc ctg agc ttt 336  
 Ile Leu Tyr Pro Val Met Met Phe Ser Tyr Phe Ala Gly Leu Ser Phe  
 100 105 110  
 ctg agt gcc gtg agc acc gag cgc tgc ctg tcc gtc ctg tgg ccc atc 384  
 Leu Ser Ala Val Ser Thr Glu  
 Arg Cys Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile  
 115 120 125  
 tgg tac cgc tgc cac cgc ccc aca cac ctg tca gcg gtg gtg tgt gtc 432  
 Trp Tyr Arg Cys His Arg Pro Thr His Leu Ser Ala Val Val Cys Val  
 130 135 140  
 ctg ctc tgg gcc ctg tcc ctg ctg cgg agc atc ctg gag tgg atg tta 480  
 Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Leu  
 145 150  
  
 155 160  
 tgt ggc ttc ctg ttc agt ggt gct gat tct gct tgg tgt caa aca tca 528  
 Cys Gly Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Ala Trp Cys Gln Thr Ser  
 165 170 175  
 gat ttc atc aca gtc cgc tgg ctg att ttt tta tgt gtg gtt ctc tgt 576  
 Asp Phe Ile Thr Val Ala Trp Leu Ile Phe Leu Cys Val Val Leu Cys  
 180 185 190  
 ggg tcc agc  
 ctg gtc ctg ctg atc agg att ctc tgt gga tcc cgg aag 624  
 Gly Ser Ser Leu Val Leu Leu Ile Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys

195                      200                      205  
 ata ccg ctg acc agg ctg tac gtg acc atc ctg ctc aca gta ctg gtc      672  
 Ile Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val  
 210                      215                      220  
 ttc ctc ctc tgt ggc ctg ccc ttt ggc att cag ttt ttc cta ttt tta      720  
  
 Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Phe Phe Leu Phe Leu  
 225                      230                      235                      240  
 tgg atc cac gtg gac agg gaa gtc tta ttt tgt cat gtt cat cta gtt      768  
 Trp Ile His Val Asp Arg Glu Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val  
 245                      250                      255  
 tct att ttc ctg tcc gct ctt aac agc agt gcc aac ccc atc att tac      816  
 Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr  
  
 260                      265                      270  
 ttc ttc gtg ggc tcc ttt agg cag cgt caa aat agg cag aac ctg aag      864  
 Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys  
 275                      280                      285  
 ctg gtt ctc cag agg gct ctg cag gac gcg tct gag gtg gat gaa ggt      912  
 Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Ala Ser Glu Val Asp Glu Gly  
 290                      295                      300  
  
 gga ggg cag ctt cct gag gaa atc ctg gag ctg tcg gga agc aga ttg      960  
 Gly Gly Gln Leu Pro Glu Glu Ile Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu  
 305                      310                      315                      320  
 gag cag tga      969  
 Glu Gln  
 <210> 2  
 <211> 322  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Asp Pro Thr Ile Ser Thr Leu Asp Thr Glu Leu Thr Pro Ile Asn  
  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Thr Glu Glu Thr Leu Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Leu Thr Val  
  
 20                      25                      30  
 Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Gly Leu Thr Gly Asn Ala Val Val  
  
 35                      40                      45  
 Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe Ser Ile Tyr  
  
 50                      55                      60  
 Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly Arg Leu  
  
 65                      70                      75                      80  
 Ile Tyr Ser Leu Leu Ser Phe Ile Ser Ile Pro His Thr Ile Ser Lys  
  
 85                      90                      95  
 Ile Leu Tyr Pro Val Met Met Phe Ser Tyr Phe Ala Gly Leu Ser Phe  
  
 100                      105                      110  
 Leu Ser Ala Val Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile  
  
 115                      120                      125



Trp Tyr Arg Cys His Arg Pro Thr His Leu Ser Ala Val Val Cys Val  
 130 135 140  
 Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Leu  
 145 150 155 160  
 Cys Gly Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Ala Trp Cys Gln Thr Ser  
 165 170 175  
 Asp Phe Ile Thr Val Ala Trp Leu Ile Phe Leu Cys Val Val Leu Cys  
 180 185 190  
 Gly Ser Ser Leu Val Leu Leu Ile Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys  
 195 200 205  
 Ile 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 Phe Phe Leu Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Trp Ile His Val Asp Arg Glu 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 Ala Ser Glu Val Asp Glu Gly  
 290 295 300  
 Gly Gly Gln Leu Pro Glu Glu Ile Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Glu Gln  
 <210> 3  
 <211> 538  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (42)..(347)  
 <223>  
 <400> 3  
 gctacactag agcagagtac gagtctgagg cggagggagt a atg gca gga caa gcg 56  
 Met Ala Gly Gln Ala  
 1 5  
 ttt aga aag ttt ctt cca ctc ttt gac cga gta ttg gtt gaa agg agt 104  
 Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu Val Glu Arg Ser  
 10 15 20  
 gct gct gaa  
 act gta acc aaa gga ggc att atg ctt cca gaa aaa tct 152  
 Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys Gly Gly Ile Met Leu Pro Glu Lys Ser  
 25 30 35  
 caa gga aaa gta ttg caa gca aca gta gtc gct gtt gga tcg ggt tct 200  
 Gln Gly Lys Val Leu Gln Ala Thr Val Val Ala Val Gly Ser Gly Ser  
 40 45 50

aaa gga aag ggt gga gag att caa cca gtt agc gtg aaa gtt gga gat 248  
  
 Lys Gly Lys Gly Gly Glu Ile Gln Pro Val Ser Val Lys Val Gly Asp  
 55 60 65  
 aaa gtt ctt ctc cca gaa tat gga ggc acc aaa gta gtt cta gat gac 296  
 Lys Val Leu Leu Pro Glu Tyr Gly Gly Thr Lys Val Val Leu Asp Asp  
 70 75 80 85  
 aag gat tat ttc cta ttt aga gat ggt gac att ctt gga aag tac gta 344  
 Lys Asp Tyr Phe Leu Phe Arg Asp Gly Asp Ile Leu Gly Lys Tyr Val  
  
 90 95 100  
 gac tgaataagt cactattgaa atggcatcaa catgatgctg cccattccac 397  
 Asp  
 tgaagtctg aaatctttcg tcatgtaa atttccata tttctctttt ataataaact 457  
 aatgataact aatgacatcc agtgtctcca aaattgtttc cttgtactga tataaacact 517  
 tccaaataaaa aatatgtaaa t 538  
 <210> 4  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 4  
 Met Ala Gly Gln Ala Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val  
  
 1 5 10 15  
 Leu Val Glu Arg Ser Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys Gly Gly Ile Met  
  
 20 25 30  
 Leu Pro Glu Lys Ser Gln Gly Lys Val Leu Gln Ala Thr Val Val Ala  
  
 35 40 45  
 Val Gly Ser Gly Ser Lys Gly Lys Gly Glu Ile Gln Pro Val Ser  
  
 50 55 60  
 Val Lys Val Gly Asp Lys Val Leu Leu Pro Glu Tyr Gly Gly Thr Lys  
  
 65 70 75 80  
 Val Val Leu Asp Asp Lys Asp Tyr Phe Leu Phe Arg Asp Gly Asp Ile  
  
 85 90 95  
 Leu Gly Lys Tyr Val Asp  
  
 100  
 <210> 5  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
  
 <223> hDRR4 forward primer  
 <400> 5  
 cagaattcgc caccatggat ccaacgtct caac 34  
 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> hDRR4 reverse primer

<400> 6

gtctcgagtc actgctccaa tctgcttccc 30

<210> 7

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(54)

<223>

<400> 7

gcg ttt aga aag ttt ctt cca ctc ttt gac cga gta ttg gtt gaa agg 48

Ala Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu Val Glu Arg

1 5 10 15

agt gct 54

Ser Ala

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Phe Arg Lys Phe

Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu Val Glu Arg

1 5 10 15

Ser Ala

<210> 9

<211> 2060

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (220)..(1344)

<223>

<400> 9

tgttcccagc acicaagcct tgccaccgcc gagccgggct tcctgggtgt ttcaggcaag 60

gaagtctagg tccttggggg gtgaccccca aggaaaaggc agcctccctg cgcaccgggt 120

tgcccggagc cctctccagg gccggctggg ctgggggttg ccctggccag caggggccccg 180

ggggcgatgc caccgggtgc cgactgaggc caccgcacc atg gcc cgc tcg ctg 234

Met Ala Arg Ser Leu

1 5

acc tgg

cgc tgc tgc ccc tgg tgc ctg acg gag gat gag aag gcc gcc 282

Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu Asp Glu Lys Ala Ala

10 15 20

gcc cgg gtg gac cag gag atc aac agg atc ctc ttg gag cag aag aag 330

Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu Leu Glu Gln Lys Lys

25 30 35

cag gac cgc ggg gag ctg aag ctg ctg ctt ttg ggc cca ggc gag agc 378

Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu Gly Pro Gly Glu Ser

40 45 50

ggg aag agc acc ttc atc aag cag atg cgg atc atc cac ggc gcc ggc 426

Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ala Gly  
55 60 65  
tac tcc gag gag gag cgc aag ggc ttc cgg ccc ctg gtc tac cag aac 474  
Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro Leu Val Tyr Gln Asn

70 75 80 85  
atc ttc gtg tcc atg cgg gcc atg atc gag gcc atg gag cgg ctg cag 522  
Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala Met Glu Arg Leu Gln  
90 95 100  
att cca ttc agc agg ccc gag agc aag cac cac gct agc ctg gtc atg 570  
Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His Ala Ser Leu Val Met  
105 110 115

agc cag gac ccc tat aaa gtg acc acg ttt gag aag cgc tac gct gcg 618  
Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu Lys Arg Tyr Ala Ala  
120 125 130  
gcc atg cag tgg ctg tgg agg gat gcc ggc atc cgg gcc tgc tat gag 666  
Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile Arg Ala Cys Tyr Glu  
135 140 145  
cgt cgg cgg gaa ttc cac ctg ctc gat tca gcc  
gtg tac tac ctg tcc 714  
Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Leu Ser  
150 155 160 165  
cac ctg gag cgc atc acc gag gag ggc tac gtc ccc aca gct cag gac 762  
His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val Pro Thr Ala Gln Asp  
170 175 180  
gtg ctc cgc agc cgc atg ccc acc act ggc atc aac gag tac tgc ttc 810  
Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr  
Thr Gly Ile Asn Glu Tyr Cys Phe  
185 190 195  
tcc gtg cag aaa acc aac ctg cgg atc gtg gac gtc ggg gcc cag aag 858  
Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp Val Gly Gly Gln Lys  
200 205 210  
tca gag cgt aag aaa tgg atc cat tgt ttc gag aac gtg atc gcc ctc 906  
Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asn Val Ile Ala Leu  
215 220

225  
atc tac ctg gcc tca ctg agt gaa tac gac cag tgc ctg gag gag aac 954  
Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Cys Leu Glu Glu Asn  
230 235 240 245  
aac cag gag aac cgc atg aag gag agc ctc gca ttg ttt ggg act atc 1002  
Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala Leu Phe Gly Thr Ile  
250 255 260  
ctg gaa cta ccc  
tgg ttc aaa agc aca tcc gtc atc ctc ttt ctc aac 1050  
Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val Ile Leu Phe Leu Asn  
265 270 275  
aaa acc gac atc ctg gag gag aaa atc ccc acc tcc cac ctg gct acc 1098  
Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr Ser His Leu Ala Thr  
280 285 290  
tat ttc ccc agt ttc cag ggc cct aag cag gat gct gag gca gcc aag 1146  
Tyr  
Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp Ala Glu Ala Ala Lys  
295 300 305  
agg ttc atc ctg gac atg tac acg agg atg tac acc ggg tgc gtg gac 1194  
Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr Thr Gly Cys Val Asp  
310 315 320 325

ggc ccc gag ggc agc aag aag ggc gca cga tcc cga cgc ctt ttc agc 1242  
 Gly Pro Glu Gly Ser Lys Lys Gly Ala Arg Ser Arg Arg Leu Phe Ser

330 335 340  
 cac tac aca tgt gcc aca gac aca cag aac atc cgc aag gtc ttc aag 1290  
 His Tyr Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Ile Arg Lys Val Phe Lys

345 350 355  
 gac gtg cgg gac tcg gtg ctc gcc cgc tac ctg gac gag atc aac ctg 1338  
 Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu Asp Glu Ile Asn Leu  
 360 365 370

ctg tga cccagggccc acctggggca ggcggcaccg gcgggcgggt gggaggtggg 1394  
 Leu

agtggctgca gggaccctag tgtcctggtc tatctctcca gcctcggccc acacgcaagg 1454

gagtcggggg acggcccgt gctggccgct ctcttctctg cctctcacca ggacagccgc 1514

ccccagggt actcctgccc ttgcttgact cagtttcct cctttgaaag ggaaggagca 1574

aaacggccat ttgggatgcc agggatgatg aaaaggtgaa gaaatcaggg gattgagact 1634

tgggtgggtg ggcactcttc aggagcccca tctccgggcg tgtcacctcc tgggcagggt

1694

tctgggaccc tctgtgggtg acgcacaccc tgggatgggg ctagtagagc cttcaggcgc 1754

cttcgggcgt ggactctggc gcactctagt ggacaggaga aggaacgcct tcagggaacc 1814

tgtggactag ggggtgcaggg acttccttt gcaaggggta acagaccgct ggaaaacact 1874

gtcactttca gagctcgggt gctcacagcg tgtcctgccc cggittgcgg acgagagaaa 1934

tcgcggccca caagcatccc ccatcccttg caggctgggg gctgggcatg ctgcacttta 1994

accttttgta ttattccct cacttctgc agggctccgt gcgggctgaa attaaagatt 2054

tcttag 2060

<210> 10

<211> 374

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu

1 5 10 15  
 Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu

20 25 30  
 Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu

35 40 45  
 Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile

50 55 60  
 Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro

65 70 75 80  
 Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala

85 90 95  
 Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His

100 105 110  
 Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu

115 120 125

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

370  
 <210> 11  
 <211> 1176  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>

<221> CDS  
 <222> (149)..(1141)  
 <223>  
 <400> 11

ttaatctctt caagcctctg atttctcttc ctgtaaaca ggggcggtaa ttaccacata 60  
 acaggctggt catgaaaatc agtgaacatg cagcaggtgc tcaagtcttg tttttgtttc 120  
 caggggcacc agtggaggtt ttctgagc atg gat cca acc acc ccg gcc tgg 172  
 Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp

1 5  
 gga aca gaa agt aca aca gtg aat gga aat gac caa gcc ctt ctt ctg 220  
 Gly Thr  
 Glu Ser Thr Thr Val Asn Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu  
 10 15 20  
 ctt tgt ggc aag gag acc ctg atc ccg gtc ttc ctg atc ctt ttc att 268  
 Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile  
 25 30 35 40  
 gcc ctg gtc ggg ctg gta gga aac ggg ttt gtg ctc tgg ctc ctg ggc 316  
 Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly  
 45 50 55  
 ttc cgc atg cgc agg aac gcc ttc tct gtc tac gtc ctc agc ctg gcc 364  
 Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala  
 60 65 70  
 ggg gcc gac ttc ctc ttc ctc tgc ttc cag att ata aat tgc ctg gtg 412  
 Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val  
 75 80 85  
 tac ctc agt aac ttc ttc tgt tcc atc tcc atc aat ttc cct agc ttc 460  
 Tyr Leu Ser Asn Phe Phe Cys Ser Ile Ser Ile Asn Phe Pro Ser Phe  
 90 95 100  
 ttc acc act gtg atg acc tgt gcc tac ctt gca ggc ctg agc atg ctg 508  
 Phe Thr Thr Val Met Thr Cys Ala Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Met Leu  
 105 110 115 120  
 agc acc gtc agc acc gag cgc tgc ctg tcc gtc ctg tgg ccc atc tgg  
 556  
 Ser Thr Val Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile Trp  
 125 130 135  
 tat cgc tgc cgc cgc ccc aga cac ctg tca gcg gtc gtg tgt gtc ctg 604  
 Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Val Val Cys Val Leu  
 140 145 150  
 ctc tgg gcc ctg tcc cta ctg ctg agc atc ttg gaa ggg aag ttc tgt 652  
 Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Ser Ile Leu Glu Gly  
 Lys Phe Cys  
 155 160 165  
 ggc ttc tta ttt agt gat ggt gac tct ggt tgg tgt cag aca ttt gat 700  
 Gly Phe Leu Phe Ser Asp Gly Asp Ser Gly Trp Cys Gln Thr Phe Asp  
 170 175 180  
 ttc atc act gca gcg tgg ctg att ttt tta ttc atg gtt ctc tgt ggg 748  
 Phe Ile Thr Ala Ala Trp Leu Ile Phe Leu Phe Met Val Leu Cys Gly  
 185 190 195  
 200  
 tcc agt ctg gcc ctg ctg gtc agg atc ctc tgt ggc tcc agg ggt ctg 796  
 Ser Ser Leu Ala Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Gly Leu  
 205 210 215  
 cca ctg acc agg ctg tac ctg acc atc ctg ctc aca gtg ctg gtg ttc 844  
 Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Leu Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val Phe  
 220 225 230  
 ctc ctc tgc ggc ctg ccc ttt ggc  
 att cag tgg ttc cta ata tta tgg 892  
 Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Phe Leu Ile Leu Trp  
 235 240 245  
 atc tgg aag gat tct gat gtc tta ttt tgt cat att cat cca gtt tca 940  
 Ile Trp Lys Asp Ser Asp Val Leu Phe Cys His Ile His Pro Val Ser  
 250 255 260  
 gtt gtc ctg tca tct ctt aac agc agt gcc aac ccc atc att tac ttc 988

Val Val Leu Ser Ser  
 Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Phe  
 265 270 275 280  
 ttc gtg ggc tct ttt agg aag cag tgg cgg ctg cag cag ccg atc ctc 1036  
 Phe Val Gly Ser Phe Arg Lys Gln Trp Arg Leu Gln Gln Pro Ile Leu  
 285 290 295  
 aag ctg gct ctc cag agg gct ctg cag gac att gct gag gtg gat cac 1084  
 Lys Leu Ala Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Ile Ala Glu Val Asp His  
 300  
 305 310  
 agt gaa gga tgc ttc cgt cag ggc acc ccg gag atg tcg aga agc agt 1132  
 Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser  
 315 320 325  
 ctg gtg tag agatggacag cctctacttc catcagatat atgtg 1176  
 Leu Val  
 330  
 <210  
 > 12  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn  
  
 1 5 10 15  
 Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile  
  
 20 25 30  
 Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn  
  
 35 40 45  
 Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe  
  
 50 55 60  
 Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys  
  
 65 70 75 80  
 Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val Tyr Leu Ser Asn Phe Phe Cys Ser  
  
 85 90 95  
 Ile Ser Ile Asn Phe Pro Ser Phe Phe Thr Thr Val Met Thr Cys Ala  
  
 100 105 110  
 Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Met Leu Ser Thr Val Ser Thr Glu Arg Cys  
  
 115 120 125  
 Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Arg His  
  
 130 135 140  
 Leu Ser Ala Val Val Cys Val Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu  
  
 145 150 155 160  
 Ser Ile Leu Glu Gly Lys Phe Cys Gly Phe Leu Phe Ser Asp Gly Asp  
 165 170 175  
 Ser Gly Trp Cys Gln Thr Phe Asp Phe Ile Thr Ala Ala Trp Leu Ile  
  
 180 185 190



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

<210> 13  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> hDRR7 forward primer  
 <400> 13  
 cgaattccgc caccatggat ccaaccaccc cgg 33  
 <210> 14  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> hDRR7 reverse primer  
 <400> 14  
 gctctagagg ctgtccatct ctacaccaga ctgc 34  
 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> hDRR7 forward QPCR primer  
 <400> 15  
 tggaaatgac caagcccttc t 21  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> hDRR7 reverse primer QPCR  
 <400> 16  
 gaaaaggatc aggaagaccg g 21  
 <210> 17  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> hDRR7 FAM-probe QPCR  
 <400> 17  
 atcagggtct ccttgccaca aagcagt 27  
 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
 Leu Gly Lys Ala Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu

1 5 10 15  
 Val Glu

<210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
 Leu Gly Gln Ala Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu

1 5 10 15  
 Val Glu

<210> 20  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
 Leu Gly Lys Ala Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu

1 5 10 15  
 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 21  
 Leu Gly Gln Ala Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu

1 5 10 15  
 <210> 22  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> hDRR4 forward primer QPCR  
 <400> 22  
 gcgcaggaac gccttct 17

<210> 23

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hDRR4 reverse primer QPCR

<400> 23

cggccgctga ggaagag

17

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hDRR4 FAM-probe QPCR

<400> 24

tcctcaactt ggccgcagca ga

22