

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4823067号  
(P4823067)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int. Cl.		F I
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/113</b>	<b>(2010.01)</b>
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/711</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/7105</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>3/04</b>	<b>(2006.01)</b>

請求項の数 17 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-538786 (P2006-538786)	(73) 特許権者	504411214
(86) (22) 出願日	平成16年11月10日(2004.11.10)		ノクソン・フアルマ・アクチエンゲゼルシ
(65) 公表番号	特表2007-513608 (P2007-513608A)		ヤフト
(43) 公表日	平成19年5月31日(2007.5.31)		ドイツ10589ベルリン・マクスドー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/012739		ルン-シュトラ-セ8-10
(87) 国際公開番号	W02005/049828	(74) 代理人	110000741
(87) 国際公開日	平成17年6月2日(2005.6.2)		特許業務法人小田島特許事務所
審査請求日	平成19年11月9日(2007.11.9)	(72) 発明者	クルスマン, スフェン
(31) 優先権主張番号	03025743.0		ドイツ10709ベルリン・パウルスボル
(32) 優先日	平成15年11月10日(2003.11.10)		ナーシュトラ-セ83
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ヘルムリング, シュテフェン
			ドイツ10781ベルリン・ローゼンハイ
			マーシュトラ-セ35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物活性グレリンに特異的に結合する核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物活性グレリンを結合するための核酸の使用であって、核酸がL-核酸であり且つ配列番号2~15よりなる群から選ばれる核酸配列またはそれらに少なくとも85%の同一性を有し、生物活性グレリンに結合する核酸配列を含んでなる使用。

【請求項2】

核酸が生物活性グレリンに特異的に結合し且つ特異的結合がKd値として表され、ここで核酸のKdが10pM~1μMである請求項1に記載の使用。

【請求項3】

核酸のKdが100pM~500nMである請求項2に記載の使用。

10

【請求項4】

核酸のKdが1nM~100nMである請求項2に記載の使用。

【請求項5】

生物活性グレリンがn-オクタノイルグレリンである請求項1~4のいずれかに記載の使用。

【請求項6】

生物活性グレリンの検出用の診断剤の製造のための請求項1~5のいずれかに記載の核酸の使用。

【請求項7】

生物活性グレリンの阻害のための請求項1~5のいずれかに記載の核酸の使用。

20

## 【請求項 8】

以下の段階：

- ( a ) 生物活性グレリンの存在について試験されるべきサンプルを準備する段階、
- ( b ) 請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の核酸を準備する段階、
- ( c ) サンプルを核酸と反応させる段階

ここで、段階 ( a ) は段階 ( b ) の前に行うことができ、または段階 ( b ) は段階 ( a ) の前に行うことができる、  
を含んでなる生物活性グレリンの検出方法。

## 【請求項 9】

さらなる段階 ( d )：

( d ) 核酸とサンプルとの反応を検出する段階  
が設けられる請求項 8 に記載の方法。

10

## 【請求項 10】

段階 ( b ) の核酸が表面に固定される請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の核酸が蛍光部分を含んでなり、そしてここで、蛍光部分の蛍光が、核酸と生物活性グレリンおよび遊離の生物活性グレリンとの間の複合体形成の際に異なる請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 12】

核酸が請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の核酸の誘導体であり、ここで、核酸の誘導体がアデノシンを置換するアデノシンの少なくとも 1 つの蛍光性誘導体を含んでなり、そしてアデノシンの蛍光性誘導体がエテノアデノシンである請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の核酸の誘導体および生物活性グレリンからなる複合体が蛍光を用いて検出される請求項 11 もしくは 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

生物活性グレリンが n - オクタノイルグレリンである請求項 8 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 15】

シグナルが段階 ( c ) もしくは段階 ( d ) において作り出される請求項 8 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 16】

シグナルがサンプル中の生物活性グレリンの濃度と相関性がある請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

サンプルが血液、血漿、血清、液体および組織を含んでなる群から選択される請求項 8 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

40

## 【0001】

本発明は、生物活性グレリンに結合する核酸、ならびに生物活性グレリンの結合および検出のためのそのような核酸の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

グレリンは、成長ホルモン分泌促進物質受容体 1 a ( G H S R 1 a ) の天然リガンドとして同定された。該受容体は、下垂体においてそして脳の視床下部の部分において最も豊富であるが、他の組織においても低濃度で検出されることができる。70年代後期から、分泌促進物質と名付けられた、合成ペプチドおよび他の化合物は、成長ホルモンの放出を刺激することが示されていた。しかしながら、成長ホルモンの放出に關与する天然リガン

50

ドは、1999年におけるグレリンの発見まで不明のままであった。グレリンは、そのN末端の3番目のアミノ酸(セリン3)でオクタノイル酸側鎖を有する非常に塩基性の28アミノ酸のペプチドホルモンである。この特異な修飾は、GHS受容体での相互作用およびその活性に必要とされる。しかしながら、生体サンプルには、生物活性グレリンの形態であるオクタノイルグレリンおよび修飾されていない、すなわちデス-オクタノイルグレリン(des-octanoyl ghrelin)の両方の混合物が存在する。精製されたラットグレリンのアミノ酸配列は、GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR(配列番号19)であるとタンパク質シーケンサーにより決定された。対応するヒト配列は2つの位置においてのみ逸脱し、アミノ酸位置セリン3で同じn-オクタノイル側鎖を保有する(GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR(配列番号16))。

10

## 【0003】

天然に存在するn-オクタノイル残基に加えて、グレリンの位置3で導入される不飽和のもしくは分枝したオクタノイル基、およびより長い脂肪族鎖は、同様に受容体認識を媒介する。受容体相互作用ドメインは、グレリンの非常にN末端に位置し; 欠失研究により、グレリン(1-10)[GSSFLSPEHQ、配列番号17]およびアミノ酸1-5の最小モチーフ(グレリン(1-5)[GSSFL、配列番号18]でさえ、GHSR1aの刺激に十分であるが、両方の場合において、n-オクタノイル残基でのペプチド修飾の強い必要条件が認められることが示される。

## 【0004】

20

グレリンは、アナボリック状態に関連する生理的機能を媒介することが示されている。それは下垂体からの成長ホルモン(GH)の放出を直接刺激するが、視床下部ニューロンに作用することによりGHに依存しない方法で摂食行動を誘導することもまた、げっ歯類における実験によりグレリンに示された。興味深いことに、グレリン生産の主要部位は胃の胃酸分泌腺においてであり、それが胃、下垂体および視床下部の間のホルモンリンク(hormonal link)として働くことを示唆する。ラットにおけるグレリン投与は、エネルギー摂取および/もしくは食糧利用の変化の結果として体重増加をもたらしたという結果は、そのような役割を裏付ける。さらに、ヒトにおける全身グレリン投与は、試験被験体において空腹感を引き起こし、そして過食を誘導する。これらの結果に基づいて、グレリンは食欲および体重の調節において重要な役割を有し、栄養不良状態の急性ならびに慢性シグナルとして働くと考えられる。この仮説のさらなる裏付けは、グレリンレベルならびに食欲が胃バイパス後の個体において低下され、体重減少をもたらすことにおける該処置の効率に少なくとも部分的に寄与するという結果からもたらされる。プラダウイリ症候群にかかっている患者からの臨床データもまた、該疾患と関連する過食症および肥満症が著しい高グレリン血症の結果であることを示唆する。さらに、グレリンは高血糖およびインシュリン放出の阻害を誘導することが見出され、グルコース代謝への関与を示唆する。エネルギー代謝におけるこれらの機能に加えて、グレリンはまた多数の他のプロセスにも関係があるとされている。それは多数の神経内分泌腫瘍において発現されること、および下垂体からのGH放出に加えて、ACTH、PRLおよびコルチゾールの放出を刺激することが見出された。健常人へのグレリンの単回注射は、心拍出量を増加しそして血圧を減少することが見出された。従って、グレリンの作用は、様々な異なる仕事に關与しているように思われる。背景となる情報は、非特許文献1; 非特許文献2; 非特許文献3; 非特許文献4; 非特許文献5; 非特許文献6; 非特許文献7; 非特許文献8; 非特許文献9; 非特許文献10から取り出すことができる。

30

40

【非特許文献1】M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsui, K. Kangawa, "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach", Nature 402: 656-60, 1999

【非特許文献2】M. Tschoep, D. L. Smiley, M. L. Heiman, "Ghrelin induces adiposity in rodents", N

50

ature 407:908-13, 2000

【非特許文献3】A.M.Wren et al., " Ghrelin enhance s appetite and increases food intake in humans ", Journal of Clinical Endocrinolog y Metabolism 86:5992-6, 2001

【非特許文献4】M.Nakazato et al., " A role for gh relin in the central regulation of feedi ng ", Nature 409:194-8, 2001

【非特許文献5】N.Nagaya, et al., Am J Physiol Reg ul Integr Comp Physiol. 2001 May; 280(5): R 1483-7; Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers .

【非特許文献6】Volante M, et al., J. Clin Endocrin ol Metab. 2002 Mar; 87(3): 1300-8. Expressio n of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and r elated endocrine tumors .

【非特許文献7】Jeffery PL, et al., J Endocrinol. 2 002 Mar; 172(3): R7-11 Expression and acti on of the growth hormone releasing pepti de ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines .

【非特許文献8】Egido EM, et al., Eur J Endocrinol . 2002 Feb; 146(2): 241-4 Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic so matostatin secretion .

【非特許文献9】Broglia F, et al., J Clin Endocrin ol Metab. 2001 Oct; 86(10): 5083-6, Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by th e stomach, induces hyperglycemia and redu ces insulin secretion in humans .

【非特許文献10】Bednarek MA, et al., J. Med Chem. 2 000 Oct. ; 43: 4370-6 Structure-function st udies on the new growth hormone-releasin g peptide, ghrelin: minimal sequence of gh relin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a .

【発明の開示】

【0005】

本発明の根底にある問題は、生物活性グレリンの結合の手段を提供すること、そしてさら に特に生物活性グレリンにより媒介される疾患および障害の処置の方法ならびに生物活 性グレリンの特異的検出の方法を提供することである。

【0006】

本発明によれば、この問題は本明細書に添付する独立請求項の主題により解決される。 好ましい態様は、従属請求項によりもたらされる。

【0007】

ヒトグレリンは、配列番号16に記載のアミノ酸配列を有する塩基性ペプチドであり、 そして脂肪酸側鎖で修飾される。異なる種間の高度のペプチド配列相同性を考慮して、グ レリンという用語は、本明細書において用いる場合、哺乳類グレリンが包含されるがこれ に限定されるものではない任意のグレリンをさす。好ましくは、哺乳類グレリンは、マウ

10

20

30

40

50

ス、ラット、ウサギ、ハムスターおよびヒトグレリンを含んでなる群から選択される。最も好ましくは、グレリンはヒトグレリンである。

【0008】

グレリンの計算されたpIは、11.09である。グレリンのこの非常に塩基性の全体的なpIにもかかわらず、受容体結合モチーフGSSFL[グレリン(1-5)]は、5.5の計算されたpIを有する、むしろ酸性のドメインである。本発明は、酸性の受容体結合ドメインを特異的に認識するが、ペプチドの塩基性の中央およびカルボキシ末端ドメインを認識しない、核酸を全長グレリンで選択することができるという驚くべき結果に基づく。これは、標的分子、すなわちグレリンの電荷および核酸の電荷の両方の静電効果の点において驚くべきことである。標的分子の塩基性ドメインへの負に荷電した核酸の結合は、標的分子の酸性ドメインへの核酸の結合と比較してはるかに有利であるはずである。従って、グレリンの塩基性部分に結合していないが標的分子の酸性ドメインに結合している核酸リガンドを選択することの成功の妥当な予想は、当業者にはなかったことが指摘されなければならない。

10

【0009】

アミノ末端の受容体結合モチーフに加えて、本明細書において生物活性グレリンとも呼ばれる生物学的に活性のグレリンは、アミノ酸セリン3でのn-オクタノイル基でのそのアシル化を特徴とする。本明細書に開示されるアミノ末端モチーフGSSFLの核酸リガンドは、グレリンの生物不活性もしくは非生物活性型からの生物活性型の識別を可能にする。結合は2つの部分、オクタノイル基およびペプチドの存在に厳密に依存し：オクタノイル-グレリンへの核酸の結合は、1000倍過剰のデスオクタノイル-グレリンの存在下で、より好ましくは100倍過剰のデスオクタノイル-グレリンの存在下で、そして最も好ましくは10倍過剰のデスオクタノイル-グレリンの存在下で特異的であるので、これは驚くべきことである。さらに、鏡像異性体のオクタノイル-グレリンは該核酸により認識されず；オクタノイル基は結合に十分ではないということを考えると、結合特性はまたペプチドにも特異的である。

20

【0010】

本明細書において好ましい態様として用いる場合、生物活性グレリンは、好ましい態様として天然に存在するグレリンの特性の本質的に全てを示すグレリンである。特に、生物活性グレリンは、好ましい態様として本明細書において用いる場合、より好ましくはGHS受容体との相互作用を介して、成長ホルモンの放出に関与するかもしれないもしくはそれを引き起こすことができる任意のグレリンおよびグレリン誘導体である。これと対照的に、好ましい態様として、非生物活性グレリンは生物活性グレリンと異なる、より好ましくはGHS受容体との相互作用を介して、より好ましくは成長ホルモンの放出を引き起こさないグレリンである。

30

【0011】

本明細書に記述されるような本発明の核酸の特徴は、単独でもしくは任意の組み合わせのいずれかで、核酸が用いられる本発明の任意の態様において実現されることができる。

【0012】

本発明の核酸はまた、本明細書に開示される特定の配列に本質的に相同である核酸も含んでなる。実質的に相同なという用語は、相同性が少なくとも75%、好ましくは85%、より好ましくは90%であり、そして最も好ましくは95%、96%、97%、98%もしくは99%より大きいように理解されるものとする。

40

【0013】

本発明の核酸はまた、1つの態様として本明細書に開示される特定の配列に由来する核酸も含んでなる。「由来する」という用語は、配列番号1に基づくように理解されるものとする。図1Aに示す挿入部位Ins1~Ins4は、最大30ヌクレオチドの長さの任意の配列により、好ましくは最大20ヌクレオチドの任意の配列により、より好ましくは最大10ヌクレオチドの任意の配列により、そして最も好ましくはIns1では0~3ヌクレオチド、Ins2では0~14ヌクレオチド、Ins3では1~3ヌクレオチドそし

50

て *Ins 4* では 0 ~ 2 ヌクレオチドの任意の配列により表されることができる。 *Ins 2* により表される内部ループ *IL Ia* は、改変の最も重要な部位であると考えられる。

【0014】

本発明の核酸はまた、好ましい態様として以下の一般式

$C G U G Y G N_{(0 \sim 3)} A G G Y A N_{(0 \sim 14)} A A A A C N_{(1 \sim 3)} U A A R W C C G A A G G U A A C C A W U C C U A C N_{(0 \sim 2)} A C G$  (配列番号 1)

(式中、YはUもしくはCを表し、RはAもしくはGを表し、WはUもしくはAを表す。それと関連して、添え字のいずれも、特定される最初の数字から出発して特定される最後の数字までの任意の整数およびその間の任意の整数を表すことに注意すべきである。従って、例えば 0 ~ 3 は 0、1、2 および 3 を表す。)

により表されることもできる。

【0015】

従って、共通配列の配列番号 1 は、可変長の挿入が様々な態様において認められる、4 つの領域を含有する。これらの領域は挿入部位と呼ばれ、そして *Ins 1* ~ *Ins 4* と名付けられる。図 1 A において配列番号 2 として記載する L - NOX - B 1 1 によれば、*Ins 1* はヌクレオチド 6 と 7 の間に位置し、*Ins 2* はヌクレオチド 1 3 と 1 4 の間に位置し、*Ins 3* はヌクレオチド 1 8 と 2 0 の間に位置し、そして *Ins 4* はヌクレオチド 4 4 と 4 5 の間に位置する。表されるクローンにおいて認められる、それぞれの挿入部位の長さは、配列番号 1 および上記の特定の一般式において示される。

【0016】

本発明の核酸はまた、1 つの態様として、好ましくは当該部分がオクタノイル - グレリンに結合することおよびデスオクタノイルグレリンを識別することに関与する限りにおいて、本明細書に開示される特定の配列に構造的に相同である核酸も含んでなる。構造的相同性は、本発明の好ましい態様と関連して用いられる場合、配列が図 1 B に表されるような基底ステム (basal stem) および内部ループおよび末端ステムループを含んでなる特徴的な二次構造モデルにフォールディングし、好ましくはステム領域に代償的塩基交換が存在する該構造にフォールディングし、そして好ましくは一本鎖の範囲に置換、欠失および/もしくは挿入が存在する該構造にフォールディングし、そして最も好ましくはサイズが図 1 B にそして配列が配列番号 1 に対応する該構造にフォールディングするように理解されるものとする。

【0017】

本発明の核酸 (inventive nucleic acid) もしくは本発明の核酸 (nucleic acid according to the present invention) という用語はまた、好ましくは当該部分がグレリンへの結合および非生物活性グレリンから生物活性グレリンを、すなわち、特にデスオクタノイル - グレリンからオクタノイル - グレリンを識別することに関与する限りにおいて、本明細書に開示される核酸配列の一部を含んでなる核酸も含んでなるものとする。そのような核酸は、例えばランケーションにより、本明細書に開示されるものから得ることができる。ランケーションは、本明細書に開示されるような核酸の末端のいずれかもしくは両方に関係していることができる。また、ランケーションは、ヌクレオチドの内部配列に関係していることもでき、すなわち、それは、それぞれ、5' および 3' 末端ヌクレオチドの間のヌクレオチド (1 つもしくは複数) に関係していることができる。さらに、ランケーションは、本明細書に開示される核酸の配列からのわずか 1 個のヌクレオチドほどの欠失を含んでなるものとする。ランケーションはまた、本発明の核酸 (1 つもしくは複数) の 1 つより多い範囲に関係していることもでき、ここで、該範囲は、わずか 1 個のヌクレオチドほどの長さであることができる。

【0018】

本発明の核酸は、D - 核酸もしくは L - 核酸のいずれかであることができる。好ましくは、本発明の核酸は L - 核酸である。さらに、核酸の 1 つもしくはいくつかの部分は D - 核酸として存在し、または核酸の少なくとも 1 つもしくはいくつかの部分は L - 核酸であ

10

20

30

40

50

ることが可能である。核酸の「部分」という用語は、わずか1個のヌクレオチドほどを意味するものとする。そのような核酸は、それぞれ、D - および L - 核酸と本明細書において一般的に呼ばれる。

【0019】

本発明の核酸もしくは本発明の核酸という用語はまた、好ましくは当該部分もしくは核酸がオクタノイル - グレリンへの結合およびデスオクタノイル - グレリンを識別することに関与する限りにおいて、本明細書に開示される核酸配列およびそれに結合している他の配列を含んでなる核酸も含んでなるものとする。伸長、すなわち、本明細書に開示される特定の核酸配列に結合している追加配列は、該配列が5'末端もしくは3'末端または両方のいずれかで伸長されるようにでき、そしてそれはどちらの側にも100ヌクレオチド程度、好ましくはどちらの側にも50ヌクレオチド程度、より好ましくはどちらの側にも20ヌクレオチド程度、そして最も好ましくは配列番号20として本明細書に開示される完全なもしくは部分的5'-隣接配列および/または配列番号21として本明細書に開示される完全なもしくは部分的3'-隣接配列を含んでなることができる。本明細書において用いる場合、部分的という用語は、本発明の好ましい態様としてそれぞれの配列の単一ヌクレオチドまたはそれが関連する配列、さらに特に配列番号20および21のいずれかに記載の隣接配列において相互に隣接するそのような配列の2個もしくはそれ以上のヌクレオチドの配列を意味する。

10

【0020】

本発明の核酸はさらに長い核酸の一部であり、ここで、このさらに長い核酸はいくつかの部分を含んでなり、ここで、少なくとも1つの部分は本発明の核酸もしくはその一部であることもまた本発明の範囲内である。これらのさらに長い核酸の他の部分は、D - 核酸もしくはL - 核酸のいずれかであることができる。任意の組み合わせを本発明に関連して用いることができる。さらに長い核酸のこれらの他の部分(1つもしくは複数)は、結合することと異なる機能を示すことができる。1つの可能な機能は、例えば、固定化、架橋、検出もしくは増幅のためのような他の分子との相互作用を可能にすることである。

20

【0021】

L - 核酸は、本明細書において用いる場合、L - ヌクレオチドからなる、好ましくはL - ヌクレオチドから完全になる核酸である。

【0022】

D核酸は、本明細書において用いる場合、D - ヌクレオチドからなる、好ましくはD - ヌクレオチドから完全になる核酸である。

30

【0023】

本発明の核酸がD - ヌクレオチド、L - ヌクレオチドもしくは両方の組み合わせ(該組み合わせは、例えば、少なくとも1個のL - ヌクレオチドおよび少なくとも1個のD - 核酸からなる範囲のランダムな組み合わせもしくは定義された配列である)からなるかどうかにかかわらず、該核酸はデオキシリボヌクレオチド(1個もしくは複数)、リボヌクレオチド(1個もしくは複数)もしくはその組み合わせからなることができる。

【0024】

本発明の核酸をL - 核酸として設計することは、いくつかの理由で有利である。L - 核酸は、天然に存在する核酸の鏡像異性体である。D - 核酸は、しかしながら、ヌクレアーゼの広範囲に及ぶ存在のために水溶液においてそして特に生体系もしくは生体サンプルにおいてあまり安定ではない。天然に存在するヌクレアーゼ、特に動物細胞からのヌクレアーゼは、L - 核酸を分解することができない。このために、L - 核酸の生物学的半減期は、動物および人体を包含する、そのような系において著しく増加される。L - 核酸の分解性を欠くことのために、いかなるヌクレアーゼ分解産物も生成されず、従って、それに起因するいかなる副作用も認められない。この特徴は、グレリンの存在を伴う疾患および/もしくは障害の治療において用いられる事実上全ての他の化合物からL - 核酸を画する。

40

【0025】

本発明の核酸は、それらがD - 核酸、L - 核酸もしくはD , L - 核酸として存在するか

50

どうかまたはそれらがDNAもしくはRNAであるかどうかにかかわらず、一本鎖もしくは二本鎖核酸として存在し得ることもまた本発明の範囲内である。典型的に、本発明の核酸は、一次配列に起因する特定の二次構造を示し、従って3次構造を形成することもできる一本鎖核酸である。しかしながら、本発明の核酸はまた、相互に相補的である2本の鎖が相互にハイブリダイズしているという意味において二本鎖であることもできる。これは核酸に安定性を与え、それは、核酸がL型よりむしろ天然に存在するD型で存在する場合に有利である。

**【0026】**

本発明の核酸は、改変することができる。そのような改変は、核酸の単一のヌクレオチドに関係していることができ、そして当該技術分野において周知である。そのような改変の例は、とりわけ、Kusser, W. (2000) *J Biotechnol*, 74: 27-38; Aurup, H. et al. (1994) *Nucleic Acids Res*, 22, 20-4; Cummins, L. L. et al. (1995) *Nucleic Acids Res*, 23, 2019-24; Eaton, B. E. et al. (1995) *Chem Biol*, 2, 633-8; Green, L. S. et al., (1995) *Chem Biol*, 2, 683-95; Kawasaki, A. M. et al., (1993) *J Med Chem*, 36, 831-41; Lesnik, E. A. et al., (1993) *Biochemistry*, 32: 7832-8; Miller, L. E. et al., (1993) *J Physiol*, 469, 213-43に記述されている。

10

20

**【0027】**

本発明の核酸は、多くの部分に分かれた核酸であることができる。多くの部分に分かれた核酸は、本明細書において用いる場合、少なくとも2本の核酸鎖からなる核酸である。これらの少なくとも2本の核酸鎖は機能単位を形成し、ここで、該機能単位は標的分子に対するリガンドである。少なくとも2本の核酸鎖は、2本の鎖を生成するように核酸を切断することによりもしくは本発明の、すなわち全部の核酸の第1の部分に対応する1つの核酸および全部の核酸の第2の部分に対応するもう1つの核酸を合成することにより本発明の核酸のいずれかから得ることができる。切断および合成の両方とも、上記に例示するような2本より多い鎖がある多くの部分に分かれた核酸を作製するために適用することができることと認識されるべきである。言い換えれば、少なくとも2本の核酸鎖は、様々な核酸部分の間である程度の相補性は存在し得るが、相補的でありそして相互にハイブリダイズする2本の鎖と典型的に異なる。

30

**【0028】**

結合定数を決定する可能性は、いわゆるピアコア装置の使用であり、それもまた当業者に既知である。親和性もまた、本明細書において用いる場合、実施例5に記述されるような「ビーズアッセイ」の使用により測定された。本発明の場合にはグレリンである標的による核酸との間の結合の強さを表すために適切な尺度は、いわゆるKd値であり、それはそのようなものとしてその決定の方法と同様に当業者に周知である。

**【0029】**

本発明の核酸は、ある種のKd値を特徴とする。好ましくは、本発明の核酸により示されるKd値は1 $\mu$ M未満である。約1 $\mu$ MのKd値は、標的への核酸の非特異的な結合に特徴的であると言われる。当業者により認識されるように、本発明の核酸のような一群の化合物のKd値は、ある範囲内である。約1 $\mu$ Mの上記のKdは、Kd値の好ましい上限値である。標的に結合する核酸のKdの好ましい下限値は、約10ピコモル以上であることができる。非生物活性グレリンから生物活性グレリンを、すなわち、好ましくはデオクタノイル-グレリンからオクタノイル-グレリンを識別する個々の核酸のKd値は、10pM~1 $\mu$ Mのこの範囲内、より好ましくは100pM~500nMの範囲内、そして最も好ましくは1nM~100nMの範囲内であることは、本発明の範囲内である。

40

**【0030】**

本発明の核酸分子は、それらが標的分子に結合し、そして非生物活性グレリンから生物

50

活性グレリンを、すなわち、好ましくはデソクタノイル - グレリンからオクタノイル - グレリンを識別することが依然としてできるならば任意の長さを有することができる。本発明の核酸の好ましい長さがあることは、当該技術分野において認識される。典型的に、該長さは15 ~ 120ヌクレオチドの間である。15 ~ 120の間の任意の整数は本発明の核酸の可能な長さであることは、当業者により認識される。本発明の核酸の長さのさらに好ましい範囲は、約20 ~ 100ヌクレオチド、約20 ~ 80ヌクレオチド、約20 ~ 60ヌクレオチド、約20 ~ 50ヌクレオチドおよび約30 ~ 50ヌクレオチドの長さである。

#### 【0031】

本発明の生物活性および生物不活性グレリンの識別のためのアッセイは、当業者が既知であるような標準的技術を用いて行われることができる。好ましい態様として、該アッセイは96ウェルプレートにおいて行われることができ、ここで、成分は請求項に従って開示されるような反応容器に固定される。場合により、複合体は複合体形成後に反応容器から取り除かれることができる。

10

#### 【0032】

1つの態様として、本発明の核酸分子は第二の検出手段により分析され、ここで、該検出手段は分子ビーコンである。分子ビーコンの方法論は、当業者に既知である。簡潔に言えば、分子ビーコンとも呼ばれる核酸プローブは、検出される核酸サンプルの逆相補物であり、そしてこのために、検出される核酸サンプルの一部にハイブリダイズする。核酸サンプルに結合すると、分子ビーコンのフルオロフォア基は分離され、それは蛍光シグナルの変化、好ましくは強度の変化をもたらす。この変化は、存在する核酸サンプルの量と相関性がある。

20

#### 【0033】

本明細書において本発明の核酸とも呼ばれる本発明の核酸、および/もしくは本発明のアンタゴニストは、薬剤の作製もしくは製造に用いることができる。そのような薬剤は、場合により追加の製薬学的に活性の化合物と一緒に、本発明の核酸の少なくとも1つを含有し、ここで、本発明の核酸は、好ましくは、製薬学的に活性の化合物自体として作用する。そのような薬剤は、好ましい態様として少なくとも1つの製薬学的に許容しうる担体を含んでなる。そのような担体は、例えば、水、バッファー、澱粉、糖、ゼラチンもしくは任意の他の許容しうる担体物質であることができる。そのような担体は、一般的に既知である。そのような薬剤をその処置および/もしくは予防に用いることができる疾患および/もしくは障害および/もしくは病的症状には、肥満症、エネルギーバランス、食欲および体重の調節、摂食障害、糖尿病、グルコース代謝、腫瘍、血圧ならびに心臓血管疾患が包含されるが、これらに限定されるものではない。当業者により認識されるように、本発明の核酸は、グレリンに対するアンタゴニストをそのようなアンタゴニストを必要とする患者に投与することができそしてそのようなアンタゴニストが疾患もしくは障害の原因を取り除くためにまたは少なくとも疾患もしくは障害からの影響を減らすために適当である任意の疾患において事実上用いることができる。そのような影響には、肥満症、エネルギーバランス、食欲および体重の調節、摂食障害、糖尿病、グルコース代謝、腫瘍処置、血圧ならびに心臓血管疾患が包含されるが、これらに限定されるものではない。本発明の目的のために、エネルギーバランスの調節は疾患と見なされる。さらに特に、該使用は、エネルギーバランスの調節がグレリンにより直接的にもしくは間接的に影響を受け、そしてグレリンの生物学的利用能の減少が所望される任意の疾患の処置のためである。同じことが糖代謝、血圧ならびに食欲および体重に当てはまる。場合により全身もしくは局所使用で、本発明の核酸を用いて処置することができるさらなる疾患は、下垂体腫瘍、先端巨大症、中心性(central)クッシング症候群、副腎性クッシング症候群、腫瘍随伴性クッシング症候群、異所性クッシング症候群、副腎腫瘍、ストレス、副腎皮質機能亢進症、心不全、心筋梗塞、卒中、副腎皮質不全、低血圧症、大動脈弁狭窄症、肺緊張亢進(pulmonary hypertension)、収縮性心内膜炎、感染症、感染性中毒性低血圧症、血液量減少および低ナトリウム血症を含んでなる群から選択することが

30

40

50

できるものである。

【0034】

本発明の核酸ならびにアンタゴニストは、薬剤としてもしくは薬剤の製造のためにだけでなく、美容目的のために、特に肥満症におけるグレリンの関与に關しても使用することができる。同じ目的で、本発明の核酸ならびにアンタゴニストは、食品添加剤、体重管理の手段および/もしくは食欲制御の手段として用いることができる。本発明の核酸ならびにアンタゴニストを含んでなる組成物は、上記の目的のいずれかのために用いることができる。

【0035】

本発明の核酸はさらに、薬剤設計の出発材料として用いることができる。基本的に、2つの可能な方法がある。1つの方法は化合物ライブラリーのスクリーニングであり、一方、そのような化合物ライブラリーは、好ましくは低分子量化合物ライブラリーである。そのようなライブラリーは、当業者に既知である。あるいはまた、本発明の核酸は、薬剤の合理的設計に用いることができる。

10

【0036】

薬剤の合理的設計は、本発明の核酸のいずれかから開始することができ、そして本発明の核酸の構造と同様であるかもしくは本発明の核酸の構造の結合媒介部分と同一である構造、好ましくは3次元構造を含む。いずれの場合でもそのような構造は、本発明の核酸と同じもしくは同様の結合特性を依然として示す。薬剤の合理的設計におけるさらなる段階においてもしくは代替段階として、神経伝達物質に結合する核酸の部分の好ましくは3次元構造は、ヌクレオチドおよび核酸と異なる化学基で模倣される。この模倣により核酸と異なる化合物を設計することができる。そのような化合物は、好ましくは小分子もしくはペプチドである。

20

【0037】

当業者に既知である競合アッセイを用いることによるような、化合物ライブラリーのスクリーニングの場合、適切なグレリンアナログ、グレリンアゴニストもしくはグレリンアンタゴニストを見出すことができる。そのような競合アッセイは、下記のように設定することができる。本発明の核酸、好ましくは標的に結合するL-核酸であるシュピーゲルマー(*spiegelmer*)を固相に連結する。グレリンアナログを同定するために、標識したグレリンをアッセイに加えることができる。潜在的アナログは、シュピーゲルマーに結合するグレリン分子と競合し、それはそれぞれの標識により得られるシグナルの減少に同調する。アゴニストもしくはアンタゴニストのスクリーニングは、当業者に既知であるような細胞培養アッセイの使用を含むことができる。

30

【0038】

本発明のキットは、本発明の核酸の少なくとも1つもしくはいくつかを含んでなることができる。さらに、該キットは、少なくとも1つもしくはいくつかの陽性もしくは陰性コントロールを含んでなることができる。陽性コントロールは、例えばグレリン、好ましくは液状で、特にそれに対して本発明の核酸が選択されるかもしくはそれに結合するものであることができる。陰性コントロールは、例えば、グレリンと同様の生物物理学的性質に關して定義されるが、本発明の核酸により認識されないペプチドであることができる。さらに、該キットは、1つもしくはいくつかのバッファーを含んでなることができる。様々な成分は、乾燥もしくは凍結乾燥形態でキットに含有されるかまたは液体に溶解されるることができる。キットは1つもしくはいくつかの容器を含んでなることができ、それらはまたキットの1つもしくはいくつかの成分を含有することができる。

40

【0039】

それぞれ、実施例および図面に開示される配列のいずれも、そのようなものとして開示され、そして任意のそのような配列を本発明の任意の態様および実施形態において使用することができる。と理解されるべきである。

【0040】

本発明は、図面、実施例および配列表によりさらに説明され、それらからさらなる特徴

50

、実施形態および利点を理解することができる。

【0041】

以下の表は、配列番号を本明細書に記述される様々なクローンおよび識別名にそれぞれ結び付ける。逆の形で示されない場合、核酸配列は(+)鎖として表され、そして2'OH-リボヌクレオチドにより構築される。

【0042】

【表1】

表:

配列	配列タイプ	配列番号
共通配列 L-NOX-B11 群	核酸	1
L-NOX-B11	核酸	2
L-NOX-G2	核酸	3
L-NOX-E12	核酸	4
L-NOX-B7	核酸	5
L-NOX-A8	核酸	6
L-NOX-B12	核酸	7
L-NOX-E3	核酸	8
L-NOX-C12	核酸	9
L-NOX-C11	核酸	10
L-NOX-A3	核酸	11
L-NOX-F5	核酸	12
L-NOX-A12	核酸	13
L-NOX-F12	核酸	14
L-NOX-G5	核酸	15
グレリン (ヒト)	ペプチド	16
ヒト グレリン (1-10)	ペプチド	17
ヒト グレリン (1-5)	ペプチド	18
グレリン (ラット)	ペプチド	19
5'-隣接配列	核酸	20
3'-隣接配列	核酸	21

10

20

30

【実施例】

【0043】

実施例1 グレリンに結合する核酸リガンド

欧州特許出願EP 020 23 627.8および国際特許出願PCT/EP03/08542にグレリンに結合する核酸リガンドの作製は記述されている。選択プロセスにおいて得られる、そのような核酸リガンドの1つの群を図1Aに示す。クローンL-NOX-B11は、この群における最も豊富な配列であり、そして該群の他のメンバー全てのように、長いバージョンおよび欠失バージョン(L-NOX-B11[86]およびL-NOX-B11[47])において機能性である。欠失クローンの伸長のために、示すコア配列に5'-隣接配列および3'-隣接配列を付加することができる。

5'-隣接 5'-GGAGCUCAGACUUCACU-3' 配列番号20

3'-隣接 5'-UACCA CUGUCGGUUCAC-3' 配列番号21

図1Aに欠失バージョンのみを要約し、そして本特許出願では、これらの欠失クローンに関する結果を提示するだけである。しかしながら、本明細書に開示されるL-NOX-B11[47]の特性はまた、全ての欠失配列の全ての伸長バージョンにも関する。

【0044】

L-NOX-B11群における個々のクローンは非常に保存されており、そして長い範

50

囲の配列同一性を示す。以下の共通配列は、図1Aに示すクローンから得られることができる：

CGUGYGN<sub>(0-3)</sub>AGGYAN<sub>(0-14)</sub>AAAACN<sub>(1-3)</sub>UAARW  
CCGAAGGUAAACCAWUCCUACN<sub>(0-2)</sub>ACG(配列番号1)  
(式中、YはUもしくはCを表し、RはAもしくはGを表し、WはUもしくはAを表す)

#### 【0045】

示すように、ヌクレオチド置換は数箇所においてのみ見られる。さらに、配列挿入が存在する、4つの特定の領域があり；これらの挿入部位はIns1~Ins4と呼ばれ、そして配列番号1における文字「N<sub>(x-y)</sub>」に対応する。これらの位置で任意の数の、好ましくは配列番号1の括弧中に示す数の任意のヌクレオチドが挿入されることができる。挿入部位2において、挿入される好ましいヌクレオチドはアデノシン残基である。

10

#### 【0046】

L-NOX-B11の配列は、基底ステム、内部ループおよび末端ステムループ構造を含んでなる、図1Bに示す特徴的な二次構造にフォールディングする。該群内の全ての配列の詳細な分析により、配列の挿入部位は主に内部ループ(Ins2)の領域に該当することが示される。末端ステムループならびに基底ステムはいつも同一であり、そしてグレリンに結合する分子のこのファミリーおよびそれらの特定の特性に非常に特徴的であるように思われる。図1Bに示す二次構造を破壊しないかもしくはほんのわずかし破壊しない、当業者に明らかな、いくつかの配列置換は、核酸の特定の機能、すなわち、生物活性グレリンを生物不活性のものから識別することの損失なしに、実施できることを記載する必要がある。欧州特許出願EP 020 23 627.8および国際特許出願PCT/EP 03/08542に開示されるいくつかの選択において、これらの種類の改変配列は見出された。L-NOX-B11に記述されている特徴は、配列および構造に関して十分に保存されている配列に移しかえることができる。

20

#### 【0047】

実施例2 グレリンに誘発されるカルシウム放出を分析する方法

グレリンに結合するシュピーゲルマーの機能的特性化は、グレリンとヒト成長ホルモン分泌促進物質受容体(GHS-R)との相互作用をモニターする細胞アッセイ系において行われる。受容体-リガンド相互作用に起因する細胞内カルシウム放出は、蛍光カルシウム指示薬を用いて視覚化される。

30

#### 【0048】

ヒトグレリン受容体(GHS-R1a)を発現する安定なトランスフェクションされたCHO細胞(Euroscreen, Gosselies, Belgiumから入手)を透明な底を有するブラック96ウェルプレート(Greiner)にウェル当たり5~7x10<sup>4</sup>個の細胞で接種し、そして100ユニット/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、400μg/mlのジェネティシンおよび2.5μg/mlのファンギゾンを含するUltraCHO培地(Cambrex)において37および5% CO<sub>2</sub>で一晩培養する。

#### 【0049】

カルシウム指示薬色素fluo-4を負荷する前に、細胞を200μlのCHO-U+(UltraCHO培地中5mMのプロベネシド、20mMのHEPES)で1回洗浄する。次に、50μlの指示薬色素溶液(CHO-U+中10μMのfluo-4(Molecular Probes)、0.08%のpluronic 127(Molecular Probes))を加え、そして細胞を37で60分間インキュベーションする。その後で細胞を180μlのCHO-U+で3回洗浄する。最後にウェル当たり90μlのCHO-U+を加える。

40

#### 【0050】

刺激アッセイにおいて、オクタノイル型もしくはデスオクタノイル型のいずれかの、ヒトもしくはラットL-グレリンの全長もしくは欠失バージョンを示すように用いる[L-

50

グレリンおよびデスオクタノイル-L-グレリンは、Bachem (Basel, Switzerland) から入手し、そしてL-グレリン(1-5)、L-グレリン(1-10)およびデスオクタノイル-L-グレリン(1-5)は、Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA) からであった]。

【0051】

それぞれのペプチドを0.2mlの薄型96チューブプレートにおいて室温で15~60分間CHO-U+中でインキュベーションする。これらの刺激溶液において、ペプチドはアッセイと比較して10倍濃縮される。カルシウム放出の検出のために、刺激溶液を細胞に加え(10 $\mu$ l/ウェル)、そして蛍光シグナルの変化をモニターする。蛍光シグナルの測定は、Fluostar Optimaマルチディテクションプレートリーダー(BMG)において485nmの励起波長および520nmの発光波長で行われる。

10

【0052】

いくつかのサンプルの平行測定では、96ウェルプレートの1(垂直)列のウェルを一緒に記録する。4秒の時間差を有する最初の3回の読み取りは、ベースラインの決定のために行われる。次に記録を中断し、そしてプレートを装置から取り出す。マルチチャンネルピペットを用いて、10 $\mu$ lの刺激溶液をウェルに加え、次にプレートを再び装置に入れ、そして測定を続ける。4秒の時間間隔で全部で20回の記録を行う。

【0053】

各ウェルについて最大蛍光とベースライン値との差( $F_{max} - F_{min}$ )を決定し、そしてグレリン濃度に対してプロットする。図2に、ヒトオクタノイル-およびデスオクタノイル-グレリン(全長および欠失ペプチド)の用量反応曲線を示す。全長および欠失オクタノイル-グレリンは、両方とも、しかしながら異なる程度に、カルシウム放出を誘発し：全長オクタノイル-グレリンは30nMの濃度で最大活性を示し、一方、オクタノイル-グレリン1-5のみはさらに高いペプチド濃度で刺激し、そして観察される濃度範囲で最大シグナル強度に到達しないことが判明する。両方のペプチドのデスオクタノイル型は、アッセイにおいて分析するあらゆる濃度でヒトグレリン受容体を刺激しない。この実験は、グレリンの5個のN末端アミノ酸がヒトグレリン受容体の刺激に十分であること、およびオクタノイル基がグレリンの生物活性に必須であることを裏付ける。

20

【0054】

実施例3 グレリンに結合するシュピーゲルマーによるグレリン誘発性カルシウム放出の阻害

30

グレリンに誘発されるカルシウム放出の阻害を実施例2に記述する細胞アッセイを用いて測定した。方法の改変として、阻害アッセイにおける刺激溶液に様々な量のシュピーゲルマーL-NOX-B11を補足した。コントロールとして、ペプチドのみを有するサンプル(最大カルシウム放出)およびペプチドなしのサンプル(最小カルシウム放出)を分析した。室温で15~60分間のインキュベーション後に、10 $\mu$ lの刺激溶液を細胞に加え、5nMのペプチド最終濃度をもたらした。通常、0.1nM、1nM、3nM、10nM、30nMおよび100nMのシュピーゲルマー最終濃度を選択した。

【0055】

各ウェルについて最大蛍光とベースライン値との差( $F_{max} - F_{min}$ )を決定する。100%の活性(阻害なし)および0%の活性(完全な阻害)の値は、コントロールサンプル(「ペプチドのみ」および「ペプチドなし」のサンプル)から得ることができる。全ての他のサンプルでは、対応する活性を「パーセント」単位で計算し、そしてシュピーゲルマー濃度に対してプロットし(阻害曲線)、最大の半分の(half-maximal)阻害定数(IC50)の決定を可能にする。

40

【0056】

図3は、オクタノイル-グレリンの全長および欠失型でL-NOX-B11の阻害活性を分析する、実験から得られる阻害曲線を示す。シュピーゲルマーは、試験するオクタノイル-グレリンの全ての型：全長ペプチド、グレリン1-10およびグレリン1-5の活性を阻害することが判明する。IC<sub>50</sub>値は、全ての3種のペプチドで有意な偏差を示さ

50

ない（全長グレリン：7 nM、グレリン1-10：9 nM、グレリン1-5：5 nM）。シュピーゲルマーの結合領域は、アミノ酸1～5を含んでなる、グレリンのN末端に位置すると結論付けることができる。この最小モチーフへのL-NOX-B11の結合は、細胞アッセイにおけるグレリン生物活性の効率のよい阻害をもたらす。

【0057】

実施例4 グレリンに結合するシュピーゲルマーによるオクタノイル-グレリンおよびデスオクタノイル-グレリンの識別

グレリンへのシュピーゲルマーL-NOX-B11の結合の特性を実施例3に記述する方法に基づいて競合アッセイにおいてさらに分析した。これらのアッセイでは、シュピーゲルマーを細胞の刺激の前に刺激溶液においてグレリンペプチドの異なる組み合わせとインキュベーションした。

10

【0058】

ペプチドの組み合わせのスキームおよび全長グレリンでの実験の結果を図4に要約する（棒は左から右に番号が付けられる）：グレリンなしに、もしくは300 nMの最終濃度のデスオクタノイル-グレリンで、細胞の刺激を検出することはできず（棒1および2）、一方、10 nMの濃度のオクタノイル-グレリンはすでにカルシウム放出を媒介するのに十分であり（棒3）；300 nMのデスオクタノイル-グレリンのさらなる添加（棒4）は細胞刺激を妨げず、生物学的に不活性のデスオクタノイル-グレリンは受容体アンタゴニストではないことを示す。10 nMのオクタノイル-グレリンにより媒介されるカルシウム放出は、3倍過剰のL-NOX-B11により阻害することができ（棒5）、そしてオクタノイル-グレリンより30倍過剰（300 nM）のデスオクタノイル-グレリンの存在でさえ阻害に競合しない（棒6）。対照的に、300 nMのオクタノイル-グレリンおよび30 nMのシュピーゲルマーのアッセイ濃度は、増加したカルシウム放出を示し（棒7）、アッセイ条件下でオクタノイル-グレリンでの刺激増強を達成できるという証拠を与える。この実験は、L-NOX-B11が、オクタノイル型およびデスオクタノイル型のグレリンを特異的に識別することを示す。

20

【0059】

実験を全長ペプチドの代わりにグレリン1-5で繰り返し、同じ結果が示された（図5）。しかしながら、グレリン1-5のより弱い刺激活性に応じて、シグナルは比較上低い。

30

【0060】

実施例5 オクタノイル-グレリンへのL-NOX-B11の結合の必要条件

オクタノイル-グレリン上のL-NOX-B11の結合部位は、ペプチドのN末端に位置し（実施例3を比較）、そしてオクタノイル基を含む（実施例4を比較）。結合事象のための両方の成分、ペプチドおよび脂肪酸基の重要性および関与を以下の実験において示す。

【0061】

この実験の論理的根拠は、シュピーゲルマーがエナンチオ特異的にそれらの標的ペプチドに結合し、そしてオクタノイル基自体がアキラル基であることである。グレリンの脂肪酸部分だけでシュピーゲルマーを結合するのに十分である場合、結合事象はペプチド部分に関してエナンチオ選択的ではなく；その場合、D-NOX-B11およびL-NOX-B11は、同様にD-オクタノイル-グレリンに結合するはずである。

40

【0062】

NOX-B11をL-およびD-RNAとして化学的に合成し、そしてT4-ポリヌクレオチドキナーゼ（Invitrogen, Karlsruhe）を用いて<sup>32</sup>[P]-ATP（Hartmann Analytic, Braunschweig）で放射性標識した。RNAを10%変性ポリアクリルアミドゲル上で精製し、そして0.5～5 pmolのRNAを5 μMのピオチニル化D-グレリンと結合バッファー[20 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.1% Tween-20]において37 °Cで2 hインキ

50

ュベーションした。弱いシュピーゲルマー相互作用でもモニタリングを可能にするために比較的高いペプチド濃度を選択した。次に、一定量のストレプトアビジン結合Ultra Linkマトリックスを加えた。マトリックスに結合したグレリン-RNA複合体を結合バッファーで洗浄し、シンチレーションカウンター（Beckman LS6500）において計数し、そしてD-グレリンへの全結合のパーセンテージとしてプロットした。各実験群を三重反復で分析した。実験の結果を図6に示す。

【0063】

D-NOX-B11はD-オクタノイル-グレリンに特異的に結合し（棒1および2）、一方、対応するL-鏡像異性体は機能しない（棒3および4）ことが判明した。この結果は、オクタノイル残基が主に疎水性基として働き、シュピーゲルマーL-NOX-B11が効率よく結合する構造でL-オクタノイル-グレリンのN末端のGSSFLモチーフを提示することを示す。L-オクタノイル-グレリンのペプチドおよびオクタノイル部分は、両方とも、L-NOX-B11を結合するために必要である。

10

【0064】

本明細書、請求項および/もしくは図面に開示される本発明の特徴は、別個にそしてその任意の組み合わせの両方で本発明をその様々な形態で実現するための材料であることができる。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1A】5'-隣接 5'-GGAGCUCAGACUUCACU-3'（配列番号20）および3'-隣接 5'-UACCACUGUCGGUUCAC-3'（配列番号21）によりあるいは伸長されることができる、L-NOX-B11群のメンバー、それらの名称、それらが選択された頻度およびそれらの欠失配列を示し、そして挿入部位Ins1~Ins4を示す。

20

【図1B】欠失クローンL-NOX-B11の二次構造モデルを示し、そして基底ステム、内部ループの5'-および3'-部分（IL Ia、IL Ib）、ならびに末端ステムループの領域を示す。

【図2】ヒトグレリン受容体を発現するCHO細胞を用いる細胞アッセイにおける全長もしくは欠失型のオクタノイル-もしくはデスオクタノイル-グレリンにより媒介される用量依存的カルシウム放出を示す（用量反応滴定）。

30

【図3】シュピーゲルマーL-NOX-B11による全長および欠失オクタノイル-グレリンにより媒介されるカルシウム放出の阻害を示す（阻害曲線）。

【図4】棒の下に要約する成分の組み合わせおよび濃度を有する、オクタノイル-グレリン、デスオクタノイル-グレリンおよびL-NOX-B11での細胞競合アッセイの結果を示す。

【図5】棒の下に要約する成分の組み合わせおよび濃度を有する、オクタノイル-グレリン（1-5）、デスオクタノイル-グレリン（1-5）およびL-NOX-B11での細胞競合アッセイの結果を示す。

【図6】ピオチニル化したD-オクタノイル-グレリンへの放射性標識したD-NOX-B11およびL-NOX-B11の結合を分析する、インビトロ結合アッセイの結果を示す。

40

【 図 1 A 】

名称	配列	長さ	配列番号
B-11	CGUGUG--AGGCAAU-----AAAACU--UAAAGUCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	65	2
G-7	CGUGUG--AGGCAGU-----AAAACU--UAAAGUCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	1	3
E-2	CGUGUG--AGGCAAU-----AAAACU--UAAAGUCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	1	4
B-7	CGUGUG--AGGCAAU-----AAAACU--UAAAGUCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	2	5
A-8	CGUGUG--AGGCAAU-----AAAACG--UAAAGUCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	2	6
B-2	CGUGUG--AGGCAAU-----AAAACU--UAAAGUCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	1	7
B-3	CGUGUG--AGGCAAU-----AAAACU--UAAAGUCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	5	8
C-2	CGUGUGGAGGCA-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAAACCAUCCUACCG	1	9
A-1	CGUGUG--AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	2	10
F-5	CGUGUG--AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	2	11
A-2	CGUGUG--AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	1	12
F-2	CGUGUG--AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	1	13
G-5	CGUGUG--AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	2	14
	CGUGUG--AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAAACCAUCCUAC--ACG	1	15

Figure 1A

【 図 4 】

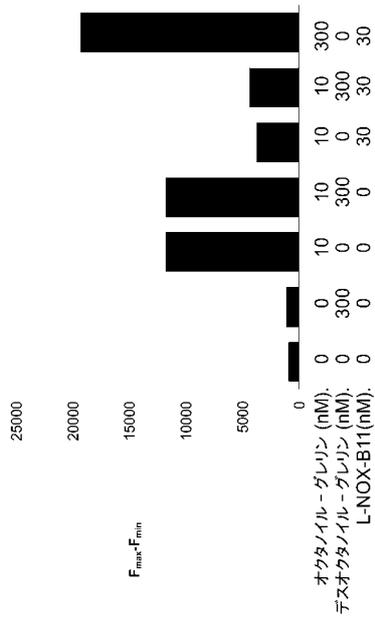


Figure 4

【 図 5 】

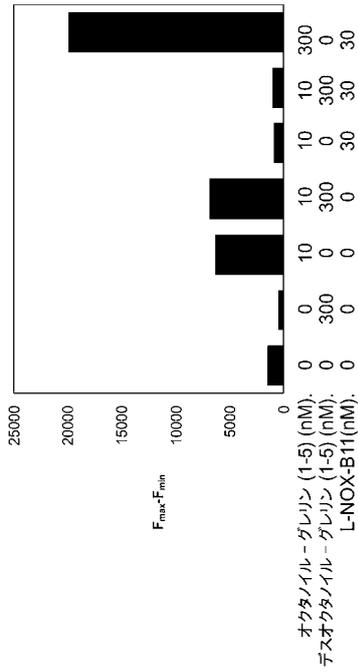


Figure 5

【図 1 B】

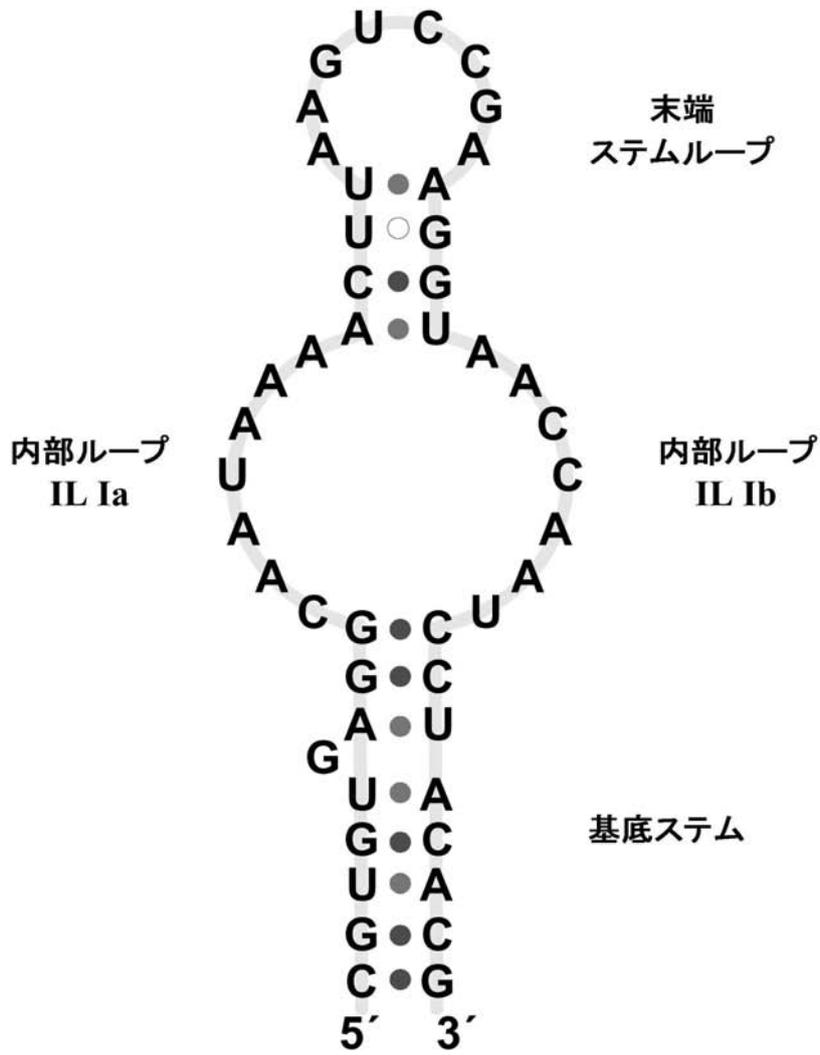


Figure 1B

【 図 2 】

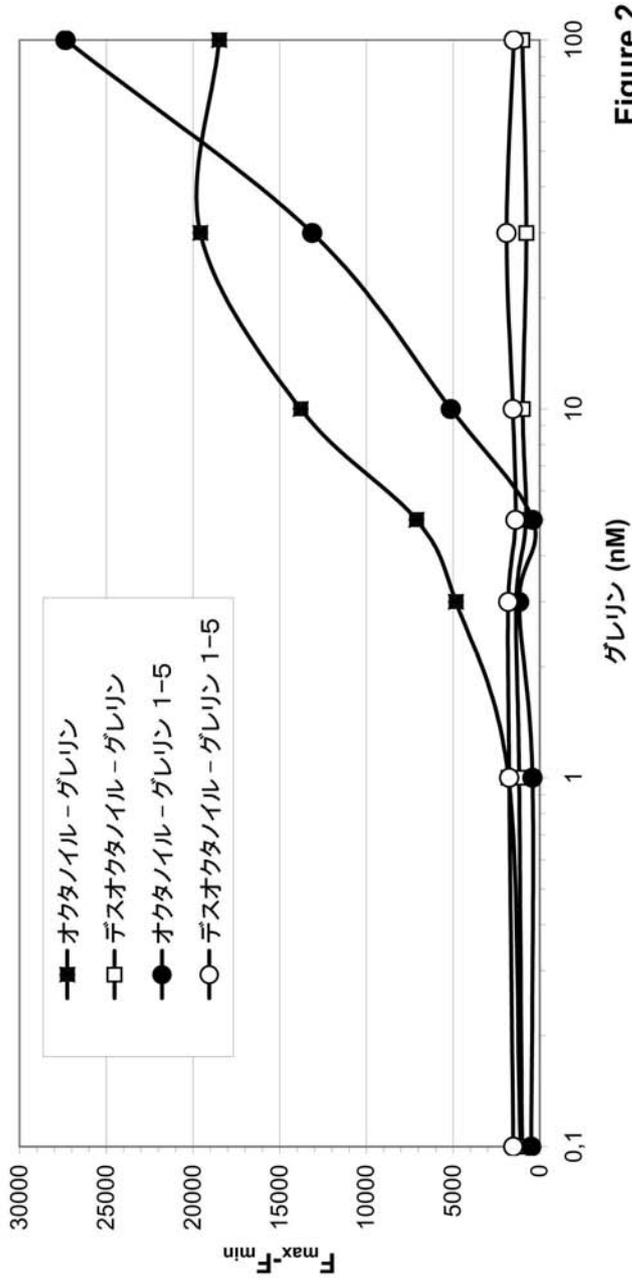


Figure 2

【 図 3 】

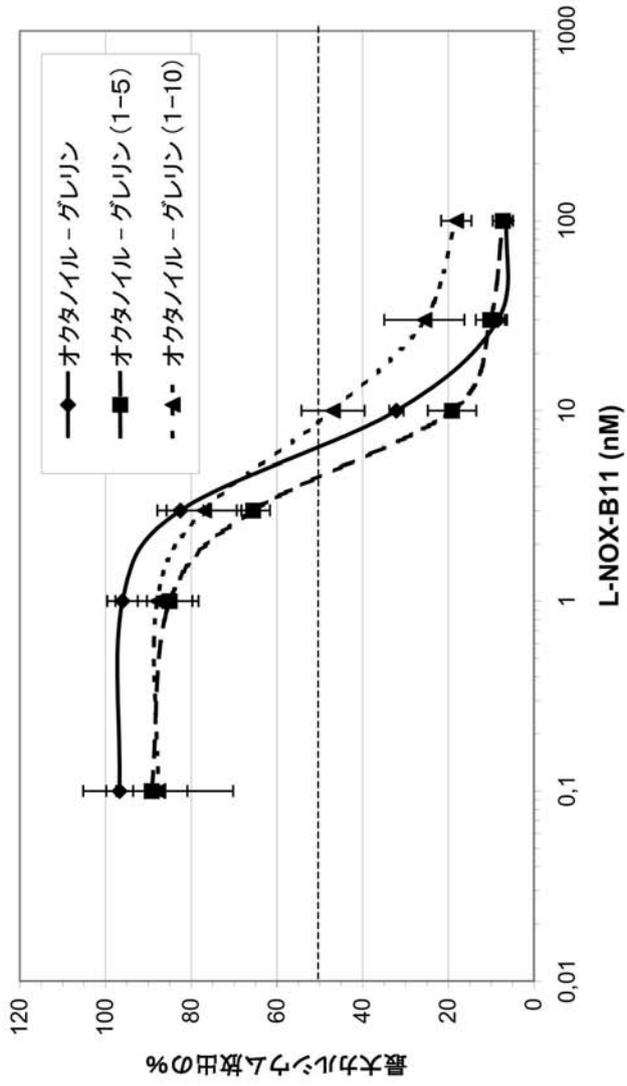


Figure 3

【 図 6 】

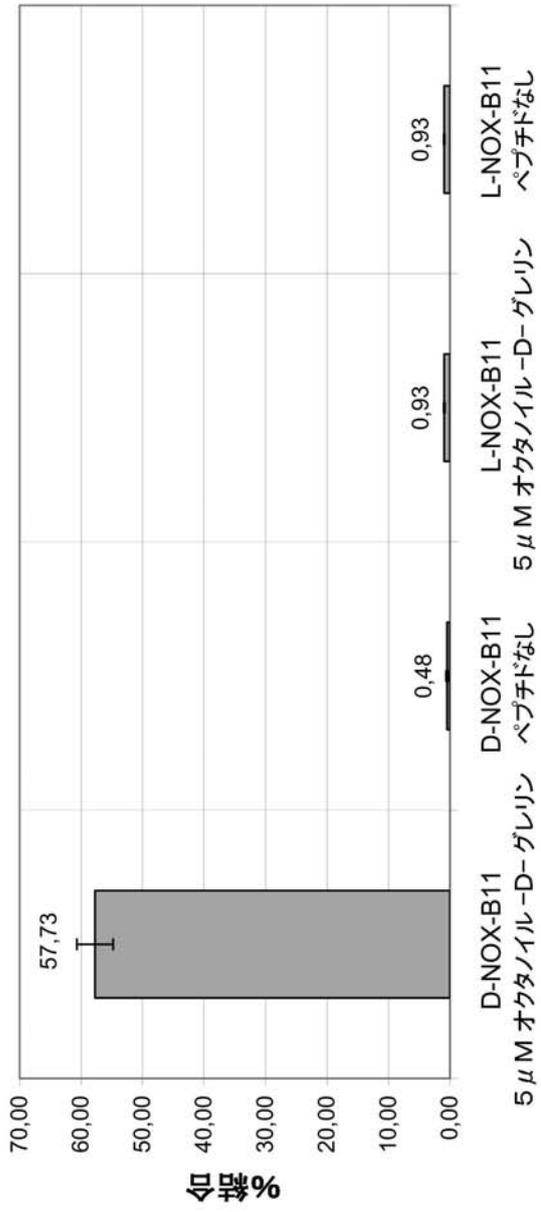


Figure 6

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 1/14
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 9/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/02
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 5/10 (2006.01)	A 6 1 P 5/10
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 25/22 (2006.01)	A 6 1 P 25/22
A 6 1 P 5/38 (2006.01)	A 6 1 P 5/38
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/78 C
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 B
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 2 5 U
A 6 1 K 38/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 4 1 B
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 7 5
	G 0 1 N 33/53 U
	A 6 1 K 37/43
	A 6 1 K 31/713

(72)発明者 オイルベルク , デイルク  
ドイツ 1 0 4 3 7 ベルリン・シュリーマンシュトラーセ 1 7

(72)発明者 マーシュ , クリステイアン  
ドイツ 1 3 5 0 9 ベルリン・エルンストシュトラーセ 2 7

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 8 7 3 3 5 ( W O , A 1 )  
特表平 1 1 - 5 0 5 5 2 7 ( J P , A )  
Chemistry & Biology, 2002, Vol.9, p.351-359

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12N 15/00-15/90  
C12Q 1/00-1/70  
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
WPI