

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680047784.7

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)
G12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月7日

[11] 公开号 CN 101341171A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 19/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

[22] 申请日 2006.10.18

[21] 申请号 200680047784.7

[30] 优先权

[32] 2005.10.18 [33] GB [31] 0521139.6

[86] 国际申请 PCT/GB2006/050338 2006.10.18

[87] 国际公布 WO2007/045927 英 2007.4.26

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.18

[71] 申请人 麦迪乐医疗有限公司

地址 英国南约克郡

[72] 发明人 T·M·斯凯瑞 G·O·理查兹

[74] 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司

代理人 郭广迅 刘丹妮

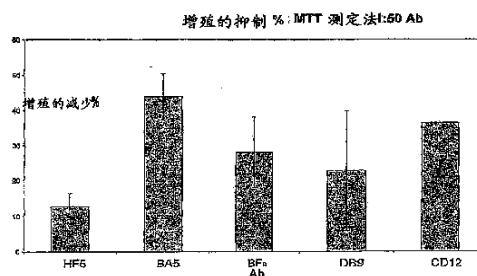
权利要求书6页 说明书48页 附图22页

[54] 发明名称

治疗试剂

[57] 摘要

本发明涉及调节 RAMP(受体活性修饰蛋白)蛋白对于降钙素受体样受体(CRLR)的作用的试剂。本发明中还包括这样的试剂的方法和用途,以及鉴定这样的试剂的测定方法。这里公开的试剂可以用于治疗例如癌症、肥胖以及其他障碍。



1、一种能够结合到或是调节一种或多种RAMP蛋白(受体活性修饰蛋白)对于降钙素受体样受体(CRLR)的作用的试剂,所述的一种或多种RAMP蛋白(受体活性修饰蛋白)选自:(i)RAMP-3、(ii)RAMP-2和(iii)RAMP-1蛋白。

2、根据权利要求1的试剂,所述试剂结合至RAMP蛋白的胞外域。

3、根据权利要求2的试剂,所述试剂能够调节RAMP-3和CRLP的相互作用。

4、根据上述任一项权利要求的试剂,所述试剂特异性地结合至RAMP-3蛋白的胞外域。

5、根据上述任一项权利要求的试剂,所述试剂与至少一种选自如下的配体结合:

(a) 1-31个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括在如图3中所示的人RAMP-3蛋白的第1位到第31位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列;

(b) 1-15个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括如图3中所示的人RAMP-3蛋白的第32位到第46位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列;和

(c) 1-53个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括如图3中所示的人RAMP-3蛋白的第47位到第99位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列。

6、根据上述任一项权利要求的试剂,所述试剂与至少一种选自如下的配体结合:

(a) 1-32个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括如图3中所示的人RAMP-3蛋白的第1位到第32位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列;

(b) 1-14个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括如图3中所示的人RAMP-3蛋白的第33位到第46位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列;

(c) 1-53个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括如图3中所示的人RAMP-3蛋白的第47位到第99位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列。

7、根据权利要求6或7的试剂，其中所述肽段是5-15个氨基酸长度。

8、根据上述任一项权利要求的试剂，所述试剂结合至人的RAMP-3片段，其中该片段是使用人的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3和人的钙蛋白酶-1来酶消化RAMP-3的胞外域而产生。

9、根据上述任一项权利要求的试剂，所述试剂能够抑制人SW-13细胞至少10%的增殖，其中所述的抑制是使用MTT细胞增殖测定法来测量的。

10、根据权利要求9的试剂，所述试剂能够抑制至少12%的增殖。

11、根据权利要求9的试剂，所述试剂能够抑制至少20%的增殖，任选地为至少25%。

12、根据权利要求9的试剂，所述试剂能够抑制至少30%的增殖，进一步任选地为至少40%。

13、根据上述任一项权利要求的试剂，其能够降低或抑制当用肾上腺髓质素刺激时人MG63骨肉瘤细胞中cAMP至少约15%的生成。

14、根据权利要求13的试剂，所述试剂能够抑制cAMP至少约20%的生成。

15、根据权利要求1的试剂，其中所述RAMP-1蛋白选自：

i) 多肽或其变体，由图1所示的核酸序列组成的核酸分子编码；

ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子是在严谨条件下杂交至如以上(i)所定义的核酸分子并且调节CRLR的功能；和

iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的，其特征在于，所述试剂是用作药物，

并且，其中所述RAMP-2蛋白是选自：

i) 多肽或其变体，由图2所示的核酸序列组成的核酸分子编码；

ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子是在严谨条件下杂交至如以上(i)所定义的核酸分子并且调节CRLR的功能；和

iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的，其特征在于，所述试剂是用作药物，

并且进一步地，其中所述RAMP-3蛋白选自：

i) 多肽或其变体，由图3所示的核酸序列组成的核酸分子编码；

ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子是在严谨条件下杂交至如以上(i)定义的核酸分子并且调节CRLR的功能；和

iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸

序列是简并的。

16、一种调节多肽对于降钙素受体样受体(CRLR)功能的作用的试剂，其中所述多肽是选自：

- i) 多肽或其变体，由图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子编码；
- ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子是在严谨条件下杂交至如以上(i)所定义的核酸分子并且调节 CRLR 的功能；和
- iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的，其特征在于，所述试剂是用作药物。

17、根据上述任一项权利要求的试剂，其中所述试剂是拮抗剂并且该试剂任选地干扰 RAMP 蛋白和所述 CRLR 之间的结合，和/或干扰配体与 CRLR 和/或 RAMP 蛋白之间的结合。

18、根据权利要求 1-15 的试剂，其中所述试剂是激动剂。

19、根据上述任一项权利要求的试剂，所述试剂是选自以下的抗体产品：抗体和抗体片段、蛋白质、多肽、融合蛋白、适配子和化合物。

20、根据上述任一项权利要求的试剂，其中所述试剂是抗体或抗体的活性结合部分。

21、根据权利要求 20 的试剂，其中所述抗体产品是单克隆抗体或其活性结合部分。

22、根据权利要求 20 或 21 的试剂，其中所述抗体产品是嵌合抗体。

23、根据权利要求 20 或 21 的试剂，其中所述抗体是人源化抗体。

24、根据权利要求 20-23 任一项的试剂，其中所述抗体产品是抗体片段。

25、根据权利要求 24 的试剂，其中所述抗体片段选自：单链抗体、单链可变片段(scFv)、域抗体(dAB)和纳米体 (nanobody)。

26、根据权利要求 20-25 任一项的试剂，其中所述抗体产品是结合体，例如结合至 PEG 分子。

27、根据上述任一项权利要求的试剂，其中所述试剂与化疗剂结合或交联至化疗剂上。

28、根据上述任一项权利要求的试剂，其中所述试剂含有可检测的标记。

29、根据权利要求 1-19 任一项的试剂，其中所述试剂是核酸分子。

30、权利要求 29 的试剂，其中所述核酸是反义核酸、适配子或小型干扰 RNA。

31、根据上述任一项权利要求的试剂，所述试剂是用作药物。

32、一种药物制剂，该药物制剂包含上述任一项权利要求的试剂和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

33、一种载体，所述载体适合于表达根据权利要求 19-25 中任一项所述的抗体并且任选地适合于表达根据权利要求 21 所述的嵌合抗体或根据权利要求 22 所述的人源化抗体。

34、一种细胞，所述细胞已经用权利要求 33 中的载体转化或转染。

35、一种用于制备根据权利要求 20-25 任一项所述的抗体或抗体片段、以及任选地制备根据权利要求 22 所述的嵌合抗体或根据权利要求 23 所述的人源化抗体的方法，所述方法包括：

i) 在有助于生产该抗体的条件下，使得经载体转化或转染的细胞生长，所述载体包含编码所述抗体或抗体片段的核酸分子；和

ii) 从所述细胞或其生长环境中纯化所述抗体。

36、一种杂交瘤细胞系，所述杂交瘤细胞系产生如权利要求 20 所述的单克隆抗体。

37、一种用于制备杂交瘤细胞系的方法，所述杂交瘤细胞系产生如权利要求 21 中所述的单克隆抗体，所述方法包括以下步骤：

i) 用免疫原来免疫免疫活性的哺乳动物，所述免疫原包含至少一种具有如图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列的多肽或者本文定义的其片段或其变体；

ii) 用骨髓瘤细胞融合经过免疫的免疫活性的哺乳动物的淋巴细胞以形成杂交瘤细胞；

iii) 针对与(i)的多肽的结合活性，筛选由步骤(ii)的杂交瘤细胞产生的单克隆抗体；

iv) 培养所述杂交瘤细胞以增殖和/或分泌所述单克隆抗体；和

v) 从所述培养上清液中回收所述的单克隆抗体。

38、如权利要求 36 所述的方法，其中(i)中的所述多肽包含选自图 7、8 或 9 中所示的那些氨基酸序列。

39、一种用于测定 RAMP 蛋白或核酸分子的表达水平的方法，所述的 RAMP 蛋白具有如图 1、2 或 3 中所示的序列，所述的核酸分子是在严谨杂交条件下杂交至该核酸分子上并编码含有如图 1、2 或 3 中所示的氨基酸序列的变体多肽，所述方法包括以下步骤：

i) 使分离的细胞样本与结合到编码 RAMP 蛋白的核酸分子的结合试剂接触；和

ii)将所述样本中所述核酸分子的表达与标准品相比较。

40、如权利要求 39 所述的测定方法，其中所述结合试剂是选自寡核苷酸引物和特异性地结合如图 1、2 或 3 中氨基酸序列所示的多肽的抗体。

41、如权利要求 40 所述的测定方法，其中所述测定方法包含聚合酶链反应。

42、一种调节 RAMP 蛋白活性的试剂的筛选方法，所述 RAMP 蛋白由选自如下的核酸分子编码：

a) 如图 1、2 或 3 中所示的核酸序列组成的核酸分子；

b) 在严谨杂交条件下杂交至上述(i)中的核酸分子上并且调节 CRLR 功能的核酸分子；

所述方法包括使在细胞表面上表达 RAMP 蛋白的细胞接触被测化合物，并且测定该被测化合物调节 RAMP 蛋白活性的能力。

43、多肽在用于鉴定调节 CRLR 功能的试剂中的应用，其中所述多肽选自：

i) 多肽或其变体，由如图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子来编码；

ii) 多肽，由在严谨条件下杂交至上述(i)中所定义的核酸分子并且调节 CRLR 功能的核酸分子来编码；和

iii) 包含核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的。

44、CRLR 在鉴定调节 CRLR 和多肽的相互作用的试剂中的应用，所述多肽选自：

i) 多肽或其变体，由如图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子来编码；

ii) 多肽，由在严谨条件下杂交至上述(i)中所定义的核酸分子并且调节 CRLR 功能的核酸分子来编码；和

iii) 包含核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的。

45、根据权利要求 1-30 中任一项所述的试剂或根据权利要求 31 所述的药物制剂在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

46、根据权利要求 1-31 中任一项所述的试剂或根据权利要求 32 所述的药物制剂在制备用于治疗骨质疏松的药物中的应用。

47、根据权利要求 1-31 中任一项所述的试剂或根据权利要求 32 所述的药物制剂在制备用于治疗或降低肥胖症的药物中的应用。

48、根据权利要求 1-31 中任一项所述的试剂或根据权利要求 32 的药物制剂在制备用于治疗或降低炎性障碍和/或炎性应答的药物中的应用。

49、权利要求 47 所述的方法，其中所述炎性障碍是选自动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、骨性关节炎、脓毒病和多关节炎。

50、根据权利要求 1-31 中任一项的试剂或根据权利要求 32 的药物制剂在制备用于治疗或减少血管病例如选自糖尿病性血管病、微血管病和大血管病的血管病的药物中的应用。

51、根据权利要求 1-31 中任一项的试剂或根据权利要求 32 的药物制剂在制备用于治疗心力衰竭的药物中的应用。

52、根据权利要求 1-31 中任一项的试剂或根据权利要求 32 的药物制剂在制备用于治疗创伤的药物中的应用。

治疗试剂

本发明涉及基于与肾上腺髓质素介导的信号传导有关的细胞表面多肽的治疗试剂以及鉴定治疗试剂的筛选测定方法。

背景

细胞信号传导对于存活是关键性的；没有细胞信号传导，物理上或化学上隔离的细胞要经历细胞凋亡。在癌细胞中，很多接触依赖性的过程是异常的，但是已经显示肾上腺髓质素-介导的信号传导的接受对于肿瘤中 80% 细胞的存活是必需的。由于许多激素和细胞因子结合特异性的受体，肾上腺髓质素 (AM) 通过称为降钙素受体样受体 (CRLR) 的受体来起作用。

生物活性的降钙素肽家族包括降钙素、糊精、两种降钙素-基因相关肽 (CGRP1 和 CGRP2) 及肾上腺髓质素 (AM)。降钙素是在哺乳动物及大量的非哺乳动物的甲状腺滤泡旁“C”细胞中发现的 32 个氨基酸的肽。降钙素调节矿物质(钙和磷酸盐)的平衡。降钙素通过作为诱导骨再吸收的破骨细胞的抑制剂起作用引起高钙血症。CGRP 是由降钙素基因的组织特异性的加工而产生的 37 个氨基酸的肽。降钙素是甲状腺中的主要产物，而 CGRP 是神经组织中的主要产物。CGRP 是有效的心血管药物而且具有与糊精结构的相似性。CGRP 是在仅仅相差 3 个氨基酸的两种异构体 (CGRP-I 和 CGRP-II) 中发现。

肾上腺髓质素 (AM) 是 52 个氨基酸的降血压肽。其与 CGRP 具有与糊精的结构相似性。AM 在外周组织、肾上腺髓质、肺和肾中产生，并且其在局部缺血中不被调节。AM 的受体存在于多种组织中，例如，存在于中枢神经系统中的星形胶质细胞、眼内的虹膜肌、骨、血管、心脏、肾和皮肤 (Uchikawa 等人, *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 年 8 月, 第 32 卷 (第 8 期): 第 675-80 页; Sumanas 等人, *Blood*. 2005 年 7 月 15 日, 第 106 卷 (第 2 期): 第 534-41 页; Cornish J, Reid J *Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001 年 9 月, 第 2 卷 (第 1 期): 第 15-24 页; Yoshihara 等人, *Regul. Pept*. 2005 年 4 月 15 日, 第 127 卷 (第 1-3 期): 第 239-44 页; Matsumoto 等人, *Clin Exp Nephrol*. 2004 年 11 月, 第 8 卷 (第 4 期): 第 316-21 页; Muller 等人, *Br J Dermatol*. 2003 年 1 月, 第 148 卷 (第 1 期): 第 30-8 页)。通常地，降钙素肽家族具有 6-7 个氨基酸的包含二硫键的 N-末端环状结构以及酰胺化 C-末端。

降钙素肽家族通过 G-蛋白偶联的膜受体 (GPCRs) 来起作用。降钙素受体

的基因已经被克隆。其与“B”家族中的通常识别调节肽(胰泌素、胰高血糖素、VIP)的 GPCRs 是同源的。已经鉴定出降钙素受体的同源物: 降钙素受体样受体(CRLR, 也称为 CL)(人: 461 个氨基酸; 大鼠/小鼠: 463 个氨基酸), 并且该降钙素受体样受体与降钙素受体具有 55% 的同源性(Njuki 等人, Clin. Sci. 第 85 期, 第 385-388 页(1993 年); Chang 等人, Neuron 第 11 期, 第 1187-1195 页 (1993 年); Fluhmann 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 第 206 期, 第 341-347 页 (1995 年); Kapas 等人, J. Biol. Chem. 第 270 期, 第 25344- 25347 页(1995 年))。经鉴定, GPCR “A”家族的两个相关成员: RDC1 和 G10D 分别为 CGRP 和 AM 的受体。

CRLR 不能够单独地传导应答 AM 的信号, 因为 RAMP(受体活性修饰蛋白)的存在对于引发配体的特异性、CRLR 的结合与激活是必要的。RAMPs 是小内源性膜蛋白族, 具有 14,000-17,000 Kd 的预定大小。RAMPs 由约 120 个氨基酸组成, 具有约 100 个氨基酸的大型胞外域、单独的跨膜区和约 10 个氨基酸的短的胞内区。

已经显示, CRLR 可以作为 CGRP 受体或 AM 受体来实现, 取决于 RAMP 家族的成员即 RAMPs1-3 中的哪些被表达。RAMP1、2 和 3 含有 N-末端信号肽、胞外的 N-末端、靠近 C-末端的单独的跨膜区和胞浆 C-末端。RAMP1-3 显示了 31% 的同一性。RAMP-2 和 RAMP-3 具有大约 30% 的同一性。RAMPs 可能涉及 CRLR 到质膜的转运。

RAMP 家族的三个成员, 即 RAMP1、2 和 3, 造成了如下的 CRLR 的不同配体的特异性:

RAMP1 + CRLR = CGRP 受体

RAMP2 + CRLR = AM 受体

RAMP3 + CRLR = AM 受体

RAMP1 使质膜上的 CRLR 呈现为末端糖基化的、成熟的糖蛋白和 CGRP 受体, 而 RAMP2 和 RAMP3 使 CRLR 呈现为不成熟的、核心糖基化的 ADM 受体(McLatchie 等人, 1998 年)。

本发明涉及通过对 RAMP-CLRL 相互作用的影响能力来鉴定治疗试剂。这样的试剂为尤其是癌症治疗的靶点。

发明简述

在本发明的第一方面, 提供了能够结合到或是调节一种或多种 RAMP 蛋白(受体活性修饰蛋白)的降钙素受体样受体(CRLR)的作用的试剂, 所述的

一种或多种 RAMP 蛋白选自: (i)RAMP-3、(ii)RAMP-2 和(iii)RAMP-1 蛋白。

在一种实施方案中, 所述试剂结合至 RAMP 蛋白的胞外域。在一种特定的实施方案中, 所述 RAMP 蛋白是人的 RAMP 蛋白。尤其是, 所述试剂可以是能够调节 RAMP-3 和 CRLP 的相互作用。

在一种实施方案中, 本发明的制剂与至少一种选自如下的配体结合:

(a) 1-31 个氨基酸残基的肽段, 所述肽段包括在如图 3 中所示的人 RAMP-3 蛋白的第 1 位到第 31 位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列;

(b) 1-15 个氨基酸残基的肽段, 所述肽段包括如图 3 中所示的人 RAMP-3 蛋白的第 32 位到第 46 位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列; 和

(c) 1-53 个氨基酸残基的肽段, 所述肽段包括如图 3 中所示的人 RAMP-3 蛋白的第 47 位到第 99 位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列。

在一种实施方案中, 所述试剂与至少一种选自如下的配体结合:

(a) 1-32 个氨基酸残基的肽段, 所述肽段包括如图 3 中所示的人 RAMP-3 蛋白的第 1 位到第 32 位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列;

(b) 1-14 个氨基酸残基的肽段, 所述肽段包括如图 3 中所示的人 RAMP-3 蛋白的第 33 位到第 46 位的连续氨基酸序列中所包含的连续氨基酸残基的序列;

(c) 1-53 个氨基酸残基的肽段, 所述肽段包括如图 3 中所示的人 RAMP-3 蛋白的第 47 位到第 99 位的连续氨基酸序列中所含的连续氨基酸残基的序列。

所述肽段通常为 5-15 个氨基酸的长度。肽段(a)、(b)和(c)各自独立地具有 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 个氨基酸残基。它们可以具有 5-13 个、5-11 个或 5-9 个残基例如 13 个氨基酸残基、11 个氨基酸残基或 9 个残基。也在本发明范围之内的是(各自独立地)具有 5、6、7、8、10、12、14 或 15 个氨基酸残基的肽段(a)、(b)和(c)。更多氨基酸残基数目的肽段(a)、(b)和(c)可能是包含 17、18、19、20、25 或 30 个残基。肽段(c)可以具有的更多氨基酸残基数目包括, 例如 31、32、35、40、45、50 和 53 个氨基酸残基。本发明的试剂可以结合至包含至少一个本文所述的肽段的抗原表位上。

肽段(b)可包括全部或部分推定的 CRLR 结合结构域。所述试剂可以结合至人的 RAMP-3 片段,该片段是通过使用人半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 和人钙蛋白酶-1 来酶消化 RAMP-3 细胞外区域而制备的。

本发明公开内容中还包括结合到至少一种选自如下的肽段上的试剂:

(a) 1-15 个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括在以下氨基酸序列中包含的连续氨基酸残基的序列:

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNL;

(b) 1-15 个氨基酸残基的肽段,所述肽段包括在以下氨基酸序列中包含的连续氨基酸残基的序列:

ESFT NCTEMEANW GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH
LEDPPDEVL。

上面示出的序列包含在 RAMP-3 蛋白中,所述 RAMP-3 蛋白包括例如图 3 的氨基酸序列。

本发明的试剂任选地具有下面的两种能力的一种或多种:

1、能够抑制表达所述 RAMP 和 CRLR 蛋白的 SW-13 细胞至少 10% 的增殖,其中所述增殖是使用 MTT 细胞增殖试验来测量的;

2、与缺乏所述试剂而给药肾上腺髓质素相比较,就肾上腺髓质素的给药,能够抑制人 MG63 骨肉瘤细胞中 cAMP 至少约 15% 的生成。

所述试剂可以是能够结合至 RAMP 蛋白例如 RAMP-3 上。在一种实施方案中,所述试剂与 RAMP-3 的胞外域相结合,例如含有图 3 的氨基酸残基 1-99 的序列。

在此公开的数据可以表明,无论是在 RAMP-3 和 CRLR 之间相互作用的抑制剂或者是在 RAMP-3/CRLR 结合复合物及配体如肾上腺髓质素之间相互作用的抑制剂均可以用于预防癌症或血管生成。这样的制剂还可以用于治疗糖尿病,包括缓解糖尿病症状例如糖尿病微血管病。

根据本发明的一个方面,提供了调节多肽对于降钙素受体样受体(CRLR)功能的作用的试剂,其中所述多肽选自:

i)多肽或其变体,由图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子编码;

ii)由核酸分子编码的多肽,所述核酸分子在严谨条件下杂交至如以上(i)所定义的核酸分子并调节 CRLR 功能;和

iii)含有核酸的多肽,所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的,其特征在于,所述试剂是作为药物使用。

本文所使用的“CRLR 的功能或活性”是指 CRLR 的任意生物学活性。具体“功能”包括在应答配体中的 CRLR 激活，所述配体的例子包括肾上腺髓质素(AM)和 CGRP。应答 AM 或 CGRP 的 CRLR 激活通常引起 cAMP 的表达以及其它第二信使系统的激活。

由于配体如 AM 或 CGRP 会结合至本发明的多肽，即 RAMP 蛋白，因此，只有当所述多肽与 CRLR 相结合时，本发明的试剂可用于调节例如干扰 RAMP 蛋白与 CRLR 的结合。通过干扰 RAMP 蛋白例如 RAMP-1、RAMP-2 和 RAMP-3 与 CRLR 的结合，可以影响例如降低或甚至是阻止 CRLR 的激活。所述的干扰可以是例如直接或间接地阻断位于 RAMP 蛋白上、CRLR 上和/或 RAMP/CRLR 复合物内的配体的结合位点的结果。在一种实施方案中，所述试剂结合至 RAMP-3 蛋白的胞外域的氨基酸序列，该氨基酸序列不是 CRLR 结合区域。在一种选择性的实施方案中，所述试剂可以是激动剂，这就是说，模拟所述 RAMP/CRLR 受体与配体的相互作用，并且因此可以导致 CRLR 受体的兴奋以及由受体产生的增加的或异常的信号传导。

在一种优选的实施方案中，所述试剂是抗体产品。在一种实施方案中，所述抗体产品结合至 RAMP-3 蛋白。所述抗体可以特异性地结合至 RAMP-3。

本发明公开的范围内包括用作药物的所述试剂。

在本发明的进一步的方面，当所述试剂为例如抗体产品或蛋白如融合蛋白时，提供适合于表达本发明试剂的载体。本发明还提供了已经以在此所述的载体转化或转染的细胞。

在本发明的进一步的方面，提供了制备本文所述的试剂例如抗体的方法。

若干实施例的详细说明

在本说明书中使用以下术语和缩略语：

定义

除非另外指出，技术术语是根据其常规的用法来使用。分子生物学中常见术语的定义可以在 Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press 出版，1994 年 (ISBN 0-19- 854287-9); Kendrew 等人(编辑), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd 出版，1994 年 (ISBN 0-632-02182-9); 和 Robert A. Meyers (编辑), Molecular Biology and Biotechnology : a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc. 出版，1995 年 (ISBN 1-56081-569-8)中找出。免疫学领域的技术人员已知的定义和

附加信息可以在例如 Fundamental Immunology, W. E. Paul 编辑, 第四版, Lippincott-Raven Publishers, 1999 年中找出。

抗体片段(与特异性抗原结合的片段): 已经定义了抗体的不同片段, 包括 Fab、(Fab')₂、Fv、dsFV、单链 Fv(scFv)和域抗体包括单域抗体。将这些抗体片段定义如下: (1)Fab, 包含抗体分子的单价抗原结合片段的片段, 由所述片段是用木瓜蛋白酶消化整个抗体或是通过基因工程的等效方法来得到完整的轻链和重链的一部分; (2)Fab', 抗体分子片段, 通过以胃蛋白酶处理整个抗体, 然后还原以产生完整的轻链以及重链的一部分; 每个抗体分子均获得两个 Fab'片段; (3)(Fab')₂, 抗体片段, 通过以胃蛋白酶处理整个抗体但不经过随后的还原或基因工程等效方法来获得; (4)F(Ab')₂, 通过二硫键将两个 FAB'片段连在一起形成的二聚体; (5) Fv, 基因工程产生的片段, 包含表达为两条链的轻链可变区和重链可变区; dsFV, 其为通过二硫键连接的轻链可变区和重链可变区, 和(6)单链抗体(“SCA”), 基因工程产生的分子, 包含通过适宜的多肽接头如基因融合的单链分子来连接的轻链可变区、重链可变区。单链抗体还可以称为单链可变片段(scFv)。

单域抗体是其互补决定区为单域多肽一部分的抗体。其例子包括但不限于重链抗体、轻链天然缺失抗体、衍生自常规的 4 链抗体的单域抗体、工程抗体和非衍生自抗体的单域支架。单域抗体可以是任何现有技术中的或任何未来的单域抗体。单域抗体可以衍生自任何种类的包括但不限于鼠、人、骆驼、驴马、山羊、兔子、牛。单域抗体可以是称为无轻链的重链抗体的天然存在的单域抗体。例如, 这样的单域抗体公开于 WO 9404678 中。制备这些片段的方法均是现有技术中常规的。

dAB(域抗体)是抗体的最小功能性结合单元, 其对应于人抗体的重链(VH)或轻链(VL)的可变区。域抗体具有约 13kDa 的分子量, 或者少于整个抗体 1/10 的大小。域抗体可包括结合至两个治疗靶点的 dAbs。这些靶点包括: IgG-样分子、聚乙二醇化的(PEGylated)融合蛋白和抗血清白蛋白的融合蛋白。在所述 IgG-样抗体中, 两个可变区结合至 IgG 每条臂上的两个治疗靶点。

细胞系/细胞培养物 “细胞系”或“细胞培养物”表示更高的真核细胞的体外生长或保持。理解的是, 细胞的子代可以与亲代细胞不完全相同(形态学上、基因型上或表型上)。“异源的”是指衍生自基因型上不同于与其比较的其余主体的主体。例如, 多核苷酸可以通过基因工程技术置入衍生自不同来源的质粒或载体, 并且其是异源的多核苷酸。从其天然编码序列中除去的启动

子以及有效地连接到未发现有天然连接的编码序列上的启动子是异源启动子。“分离的”多核苷酸或多肽是基本上不含与其天然结合的物质。基本上不含是指不含有至少 50%，优选为至少 70%，更优选为至少 80%，而且甚至更优选为至少 90%的与其天然结合的物质。

互补性决定区(CDR): CDRs 是在抗体分子各个轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)之内的三个高度可变区,所述抗体分子形成与所结合抗原的三维结构互补的抗原结合表面。从重链或轻链的 N-末端开始,这些互补性决定区是分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。CDRs 涉及抗原-抗体的结合,并且所述 CDR3 包含有专门用于抗原-抗体结合的独特区域。因此,抗原结合位点可以包括六个 CDRs,该 CDR 区域包括各个重链和轻链可变区(V region)。CDR 区域内单个氨基酸的变更可以改变抗体对特异性抗原的亲合力(参见 Abbas 等人, *Cellular and Molecular Immunology*, 第 4 版, 143-5, 2000 年)。例如由 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunologic Interest*, (免疫的蛋白质序列) U.S. Department of Health and Human Services, 1983 年已经精确定义了 CDRs 的位置。Ig 的轻链和重链各自具有三个 CDRs, 分别定义为 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3 以及 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。通过定义,轻链的 CDRs 通过 24 和 34 位(L-CDR1)、50 和 56 位(L-CDR2)、89 和 97 位(L-CDR3)的残基来结合;重链的 CDRs 通过 31 和 35b 位(H-CDR1)、50 和 65 位(H-CDR2)、95 和 102 位(H-CDR3)的残基来结合,使用由 Kabat 等人, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda (NIH 公开号 91-3242)所描述的编号规定。

参考 Kabat, E. A 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)和(1991)的编号方案。在这些纲要中, Kabat 列出了各个亚类的抗体的许多氨基酸序列,并且列出了所述亚类中各个残基位置的最常存在的氨基酸。Kabat 使用了将残基数分配到所列出序列中的各个氨基酸的方法,并且这种用于分配残基数的方法已经成为本领域的标准。就本发明的目的而言,将残基数分配给未包括在 Kabat 的纲要中的候选抗体的氨基酸序列,然后进行以下步骤。通常地,所述候选序列是用 Kabat 中的任何免疫球蛋白序列或任何共有序列来排列(aligned)。排列可以通过手工进行,或者通过使用常规认可的电脑程序由电脑进行;这种程序的例子是本说明书中所讨论的排列程序 2。排列可以通过使用对大多数

Fab 序列是常见的一些氨基酸残基来促进。例如，轻链和重链通常各自具有两个具有相同残基数的半胱氨酸；在 VL 域中，所述两个半胱氨酸通常在残基数 23 和 88 上；而在 VH 域中，所述两个半胱氨酸通常在残基数 22 和 92 上。框架残基通常地但并不是总是具有大约相同数量的残基，然而，所述 CDRs 会在大小上改变。例如，在来自候选序列的 CDR 比 Kabat 中排列的序列中 CDR 长的情况下，通常在残基数上加后缀以表明插入另外的残基(参见，例如图 5 中的残基 100abcde)。对于候选序列而言，例如，所述候选序列以 Kabat 序列来排列残基 34 和 36 但是在它们之间没有以残基 35 来排列的残基，则简单地将数目 35 不分配给残基。

CDR 和 FR 的残基还根据结构定义来确定(如在 Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)中)。当这两种方法导致 CDR 的鉴定略有不同时，优选结构定义，但是由序列定义方法所鉴定的残基被认为是对于确定以哪种框架残基输入共有序列而言重要的 FR 残基。

恒定区：抗体分子赋予效应物功能的部分。在本发明的公开内容中，使用的变异抗体可以包括来源于人免疫球蛋白类的恒定区。所述重链恒定区可以选自五个种型中的任何种型： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。不同亚类的重链(如 IgG 亚类的重链)是造成不同效应物功能的原因。因此，通过选择所期望的重链恒定区，可以制得具有所期望的效应物功能的人源化抗体。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 型。

表位：抗原上的位点是通过试剂来识别如通过氨基酸序列的特异性来确定。如果例如在竞争性结合试验中测量到两种试剂中的每种试剂竞争地抑制(阻断)另一种试剂结合至所述抗原，则该两种试剂被认为是结合至相同的表位(参见，例如 Junghans 等人，Cancer Res. 50:1495-1502, 1990)。选择性地，如果降低或消除一种抗体结合的所述抗原中的大多数氨基酸的突变，也降低或消除另一种抗体的结合，则两种抗体具有相同的表位。如果两种抗体中的每一种均部分地抑制另一种与所述抗原的结合，和/或如果降低或消除一种抗体结合的一些氨基酸的突变也降低或消除另一种抗体的结合，则认为两种抗体具有重叠的表位。

框架区(FR)：在抗体的重链和轻链的可变区内的三个高度差异性互补决定区(CDRs)的旁侧是相对保守的序列。因此，抗体的重链或轻链的可变区是由 FR 和三个 CDRs 组成的。某些 FR 残基可以接触结合的抗原；然而，FR 的主要作用是将所述可变区折叠进入抗原结合位点，特别是与 FR 残基直接

相邻的 CDRs。不受理论限制，框架区用于将所述 CDRs 保持在抗原结合的适宜定位上。所述轻链和重链框架区内的残基编号遵循 Kabat 等人(1991, 上述的)所描述的编号规定。不同的轻链或重链的框架区序列在物种内是相对保守的。“人”的框架区是与天然存在的人免疫球蛋白的框架区基本相同(约 85% 或更多，通常是 90-95% 或更多)的框架区。

抑制：延缓、阻断或防止例如以下的相互作用的种类，被认为是抑制相互作用：(i)RAMP 蛋白和配体之间的结合或(ii)RAMP 蛋白和 CRLR 之间的结合或(iii)RAMP/CRLR 复合物和配体之间的结合。抑制一般不导致 100% 的阻断，而是减少相互作用的量和/或速度。

免疫原性：在对受试者给药时，靶向蛋白、治疗性部分或试剂引发免疫应答(体液或细胞)能力的测量值。

免疫球蛋白：免疫球蛋白(Ig)分子和 Ig 分子的免疫活性部分，例如，含有特异性地与抗原结合(发生免疫反应)的抗原结合位点的分子。也可以使用术语“抗体”。

天然存在的抗体或免疫球蛋白(例如，IgG)包括四条多肽链：通过二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)。所述的两条重链通过二硫键彼此连接并且每条重链均通过二硫键与轻链相连接。存在两种类型的轻链，兰姆达(λ)和卡帕(κ)。存在五种主要的重链类型(或种型)，其决定了抗体分子的功能活性：IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。全长的免疫球蛋白轻链长度通常为约 25 Kd 或 214 个氨基酸的长度。全长的免疫球蛋白重链长度通常为约 50 Kd 或 446 个氨基酸的长度。轻链是由 NH₂-末端(约 110 个氨基酸的长度)的可变区基因及 COOH-末端的 κ 或 λ 恒定区基因来编码的。类似地，重链是由可变区基因(约 116 个氨基酸的长度)及其他恒定区基因之一来编码的。

抗体的基本结构单元通常是由两对相同的免疫球蛋白链组成的四聚体，每对具有一条轻链和一条重链。在每一对中，所述轻链和重链的可变区结合至抗原，并且所述恒定区调节效应物的功能。免疫球蛋白还以包括例如 Fv、Fab 和(Fab')₂ 在内的各种其他形式以及双功能杂交抗体和单链存在(例如，Lanzavecchia 等人，Eur. J. Immunol. 17:105, 1987; Huston 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883, 1988; Bird 等人，Science 242:423-426, 1988; Hood 等人，Immunology, Benjamin, N.Y., 第二版，1984 年; Hunkapiller 和 Hood, Nature 323:15-16, 1986 年)。

每条链含有不同序列的结构域。所述轻链包括两个结构域：可变域(VL)

和恒定域(CL)。所述重链包括四个结构域：一个可变域(VH)和三个恒定域(CH1、CH2和CH3，全部称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)的可变区均确定了对所述抗原的结合识别和特异性。所述轻链(VL)和重链(VH)的恒定区结构域赋予重要的生物学活性，如抗体链的结合、分泌、经胎盘迁移、补体结合以及与Fc受体的结合。免疫球蛋白的轻链或重链的可变区包括被三个高度可变区隔断的框架区，所述的三个高度可变区也称为互补决定区(CDR's)(参见，Sequences of Proteins of Immunological Interest, E. Kabat 等人, U.S. Department of Health and Human Services, 1983年)。如上面指出的，CDRs的主要作用是与抗原表位的结合。抗体的特异性存在于抗体结合位点和抗原决定子之间的结构互补性中。

嵌合抗体为其轻链和重链基因通常已经通过基因工程构建好的抗体，所述基因是由属于不同物种的免疫球蛋白的可变区和恒定区基因构建的。例如，可以将来自小鼠单克隆抗体的基因的可变片段加入到人恒定片段如 κ 和 $\gamma 1$ 或 $\gamma 3$ 。在一个实施例中，由此治疗性的嵌合抗体是由来自于小鼠抗体的可变域或抗原结合域以及来自于人抗体的恒定域或效应物域所组成的杂交蛋白，尽管可以使用其它的哺乳动物物种或者可以由分子技术产生可变区。制备嵌合抗体的方法是本领域公知的，例如参见美国专利 No.5,807,715，该专利在此引入作为参考。

“人源化的”免疫球蛋白或抗体是包括人框架区和来自非人类(如小鼠、大鼠或合成的)免疫球蛋白的一个或多个 CDRs 的免疫球蛋白。将提供 CDRs 的非人类的免疫球蛋白称为“供体”，而将提供框架的人类免疫球蛋白称为“受体”。在一个实施方案中，人源化免疫球蛋白中所有的 CDRs 均是来自于供体免疫球蛋白。恒定区不需要存在，但是如果其存在，它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本相同，即至少相同约 85-90%，如约 95% 或更多。因此，可能除了 CDRs 之外，人源化免疫球蛋白的所有部分与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。“人源化抗体”是包含具有人源化的轻链和人源化的重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体与提供 CDRs 的供体抗体结合至相同的抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体框架具有由取自供体框架的氨基酸进行的有限取代。

人源化的或其他单克隆抗体可以具有另外的保守氨基酸的取代，所述保守氨基酸的取代基本不影响抗原的结合或其他免疫球蛋白的功能。示例性的保守取代是那些例如甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸

酸、谷氨酸；天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；和苯丙氨酸、酪氨酸的取代(参见美国专利 No. 5,585,089, 其在此引入作为参考)。人源化免疫球蛋白可以利用基因工程来构建, 例如参见美国专利 No. 5,225,539 和美国专利 No. 5,585,089, 其在此引入作为参考。

人抗体是其中轻链和重链基因是人源的抗体。人抗体可以使用本领域已知的方法来产生。人抗体可以通过无限增殖化的人 B 细胞分泌目标抗体来产生。无限增殖化可以例如是通过 EBV 感染或是以骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞融合人 B 细胞产生三源杂交瘤细胞来实现。人抗体也可以通过噬菌体展示法产生(参见, 例如 Dower 等人的 PCT 专利申请公开说明书 No. WO91/17271; McCafferty 等人的 PCT 专利申请公开说明书 No. WO92/001047; Winter, PCT 专利申请公开说明书 No. WO92/20791, 上述文献在此引入作为参考), 或是选自人组合单克隆抗体文库(参见, Morphosys website)。人抗体也可以使用携带人免疫球蛋白基因的转基因动物来制备(例如, 参见 Lonberg 等人的 PCT 专利申请公开说明书 No. WO93/12227; 和 Kucherlapati 的 PCT 专利申请公开说明书 No. WO91/10741, 上述文献在此引入作为参考)。

抗体也可以使用噬菌体展示技术来获得。噬菌体展示技术是在本领域中已知的, 例如在 Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222: 第 581-597 页和 Ckackson 等人, *Nature* 352: 第 624-628 页, 上述两篇文献在此引入作为参考。噬菌体展示技术也可以用于增加抗体的亲合力。为了增加抗体亲合力, 抗体序列是多变化的, 构造噬菌体抗体库, 更高亲合力结合试剂是选自抗原(参见例如 Marks 等人的 *Bio/ Technology* 10: 第 779-783 页; Barbas 等人的 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 第 3809-3813 页及 Schier 等人的 *J. Mol. Biol.* 263: 第 551-567 页), 所有上述文献在此引入作为参考。

核酸适配子: 本发明的试剂也可以是适配子。已经将适配子定义为可以产生抗氨基酸、药物、蛋白质和其他分子的人工核酸配体。所述适配子是通过反复地吸附、回收和再扩增的过程从合成核酸的复合文库中分离的。

RNA 适配子是具有对具体的靶分子的亲合力的核酸分子。因为它们的配体结合性质, 其已经被结合至 (likened) 抗体。由于多种理由, 可以将它们认为是有用的试剂。具体地, 在广泛的各种溶解条件和浓度下其是可溶的, 并且其结合特异性是在很大程度上不受试剂如去污剂和其他温和变性剂的破坏。此外, 它们的分离和制备是相对便宜的。它们也可以容易地被修饰以产生具有改善性能的物种。广泛的研究显示核酸在很大程度上是无毒的以及

非免疫原性的并且已经发现适配子的临床应用。此外，如何通过互补性 RNA 单链存在下产生无活性的 dsRNA 分子来调节生物样本中的适配子活性是已知的(Rusconi 等人, 2002 年)。

从现有技术获知，如何通过反复的结合、筛析和扩增的循环从简并的序列范围中分离适配子。这样的方法描述于 US 5,475,096、US 5,270,163 和 EP0533 38 中，并且通常称为 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) 通过指数富集的配体系统进化。例如，已经使用光-SELEX 来修正基础的 SELEX 系统，其中适配子含有能够结合至和/或光交联至靶分子上的和/或光激活或钝化靶分子的光反应性基团。其它的修饰包括嵌合-SELEX、掺和-SELEX、反-SELEX、溶液-SELEX、化学-SELEX、组织-SELEX 及无转录的 SELEX，所述无转录的 SELEX 描述为用于连接结合至 DNA 模板上的 RNA 随机片段以形成寡核苷酸文库的方法。然而，这些方法虽然产生富集的配体结合性的核酸分子，但是仍然产生不稳定的产物。为了克服稳定性的问题，已知创造了对映性的“镜像异构体”(enantiomeric “spiegelmer”)(WO 01/92566)。此过程包括起初创造所述靶点的化学镜像，然后选择针对该镜像的适配子并且最终创造经 SELEX 选择的适配子的化学镜像。基于 D-核糖的糖单元，通过选择抗最后的靶分子例如 D-氨基酸制得的肽的非天然的对映异构体的天然 RNAs，创造了针对天然 L-氨基酸靶点的镜像异构体。一旦将针对非天然对映异构体靶点的紧密结合性适配子分离和测序，分子对称性的规律意味着基于 L-核糖化学合成的 RNAs 将要结合天然的靶点，也就是说所述选择靶点的镜像。将该方法方便地称为反射选择或镜像选择并且所产生的 L-核糖的种类在生物学环境中是显著地更加稳定，因为其极少受正常酶分裂的影响即其是核酸酶耐受性的。

免疫反应性：试剂有时是抗体的识别与结合至特异性抗原上的能力的衡量值。“特异性结合”是指个别的试剂或抗体与抗原发生特异性免疫反应的能力。该结合是试剂例如但不限于抗体分子与所述抗原之间的非随机的结合反应。结合特异性通常是从所述试剂对感兴趣的抗原与无关抗原的差异性结合能力的参考点来确定的，并且由此区别两种不同抗原，特别是当两种抗原具有唯一的表位时。

通常，特异性可以利用结合试验例如使一组抗原的 ELISA 来测定。根据本发明的试剂可以识别 RAMP 蛋白例如细胞上的 RAMP-1、RAMP-2 或 RAMP-3。

单克隆抗体：是由 B-淋巴细胞的单独克隆或是由细胞产生的抗体，所述细胞已经被单独抗体的轻链和重链基因转染进入其中。单克隆抗体是通过本领域技术人员已知的方法来产生，例如是通过以免疫的脾细胞融合的骨髓瘤细胞所制备杂交抗体形成性细胞。通常地，单克隆抗体是通过特异性杂交瘤细胞或在培养基中增殖产生的杂交瘤细胞的子代。可以将产生抗体的杂交瘤或其它细胞进行基因突变或其他改变，其可以改变或不改变所产生的抗体的结合特异性。

核酸：“核酸”是任意长度的核苷酸的聚合形式，其包括脱氧核糖核酸、核糖核酸以及任意组合的类似物。核酸可以具有任意的三维结构，并且可以完成已知或未知的任何功能。术语“核酸”包括双链的、单链的及三联螺旋分子。除非另外指出或要求，在此描述的本发明的核酸的任何实施方案是包括双链形式及已知的或预测的用于构成所述双链形式的两个互补性单链形式中的每一条。

多肽：术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在此可互换使用，指的是任意长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可以是直链或支链的，其可以包含修饰的氨基酸或氨基酸类似物，其可以由非氨基酸插入。该术语还包括天然修饰或插入修饰的氨基酸聚合物；例如二硫键的形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他的处理或修饰，如与标记成分的结合。

氨基酸取代可以从改变或修饰一个或多个氨基酸直至整个区域如可变区的重新设计。氨基酸的取代优选是保守取代，所述保守取代不会对所述肽的折叠或功能性质产生有害影响。其中可以进行保守取代的功能上相关的氨基酸的组是甘氨酸/丙氨酸、缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸、天冬酰胺/谷氨酰胺；天冬氨酸/谷氨酸、丝氨酸/苏氨酸/甲硫氨酸、赖氨酸/精氨酸和苯基丙氨酸/酪氨酸/色氨酸。本发明的多肽可以是糖基化或非糖基化的形式，可以是翻译后修饰的(例如，乙酰化和磷酸化)或者可以是合成修饰的(例如，标记基团的连接)。

如在此使用的，“变体”多肽在氨基酸序列上可以区别于一个或多个可以任何组合存在的取代、添加、缺失、平截。在优选的变体中，那些是通过保守氨基酸取代从参照多肽变化的。这样的取代是将给定的氨基酸用性质相似的另一个氨基酸所取代。下面非限制性地列出被认为是保守取代(相似)的氨基酸：a)丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸；b)谷氨酸和天冬氨酸；c)天冬酰胺和谷氨酰胺；d)精氨酸和赖氨酸；e)异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸以及

f)苯基丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

如上面提到地，本发明的第一方面提供了一种能够结合至和调节作用于一种或多种 RAMP 蛋白(受体活性修饰蛋白)的降钙素受体样受体(CRLR)的试剂，所述的一种或多种 RAMP 蛋白(受体活性修饰蛋白)选自：(i)RAMP-3、(ii)RAMP-2 和(iii)RAMP-1 蛋白。

在一个实施方案中，所述试剂结合至 RAMP 蛋白的胞外域。通常地，试剂能够调节 RAMP-3 和 CRLP 的相互作用。

在一个实施方案中，所述试剂能够抑制至少 10% 的人 SW-13 细胞的增殖，其中所述抑制使用 MTT 细胞增殖试验来测量。优选地，所述试剂能够调节例如干扰或相互作用于 RAMP-3 和 CRLP。

通常地，所述试剂能够抑制至少 12% 的增殖。在某些实施方案中，所述试剂可以是能抑制至少 20% 以及任选地至少 25% 的增殖。在进一步的实施方案中，所述试剂可以是能抑制至少 30% 并且进一步任选为至少 40% 的增殖。

在一个实施方案中，当以肾上腺髓质素刺激时，所述试剂能够减少或抑制人 MG63 骨肉瘤细胞中 cAMP 的产生，所述减少或抑制 cAMP 的产生至少约 15% 例如至少 15%、16%、17%、18% 和 19%。在某些实施方案中，所述试剂可以是能够抑制 cAMP 的产生至少约 20% 例如 21%、22% 或 25%。通常地，所述试剂能够调节 RAMP-3 和 CRLP 的相互作用。

本发明公开的试剂可以调节 RAMP 蛋白的作用，所述 RAMP 蛋白选自：

i) 多肽或其变体，由图 1 表示的核酸序列组成的核酸分子编码；

ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子是在严谨条件下杂交至如以上(i)所定义的核酸分子并且调节 CRLR 功能；和

iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由遗传密码简并为(i)和(ii)中所定义的核酸序列，其特征在于，该试剂是用作药物，

并且其中所述 RAMP-2 蛋白选自：

i) 多肽或其变体，由图 2 所示的核酸序列组成的核酸分子编码；

ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子在严谨条件下杂交至如以上(i)所定义的核酸分子并且调节 CRLR 功能；和

iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由遗传密码简并为(i)和(ii)中所定义的核酸序列，其特征在于，该试剂是用作药物，

并且进一步地，其中所述 RAMP-3 蛋白选自：

- i) 多肽或其变体, 由图 3 所示的核酸序列组成的核酸分子编码;
- ii) 由核酸分子编码的多肽, 所述核酸分子是在严谨条件下杂交至如以上(i)定义的核酸分子并且调节 CRLR 功能; 和
- iii) 含有核酸的多肽, 所述核酸由遗传密码简并为(i)和(ii)中所定义的核酸序列。

优选地, 所述试剂调节以上所定义的 RAMP-3 蛋白的作用。

本发明公开的试剂可以是选自如下的抗体产品: 抗体和抗体片段、蛋白质、多肽、融合蛋白、适配子或化合物。

在本发明的一个优选的实施方案中, 所述试剂是拮抗剂。选择性地, 所述试剂是激动剂。

根据本发明进一步的方面, 提供调节多肽对于降血钙素受体样受体 (CRLR) 功能的作用的试剂, 其中所述多肽包含如图 1、2 或 3 中所示的氨基酸序列或变体多肽, 其中所述变体是由存在于图 1、2 或 3 中的氨基酸序列进行至少一个氨基酸残基的加入、缺失或取代来修饰的, 其中所述多肽调节 CRLR 的功能, 其特征在于, 所述试剂是用作药物。

此外, 本发明公开特征为具有与在此披露的多肽序列的同一性至少为 75% 的多肽序列或其片段和功能上等效的多肽。在一个实施方案中, 所述多肽与本文所说明的氨基酸序列具有至少 85% 的同一性, 更优选为至少 90% 的同一性, 甚至更优选为至少 95% 的同一性, 进一步更优选为至少 97% 的同一性, 并且最优选为至少 99% 的同一性。

本发明的公开内容包括含有如图 4、5 或 6 所示的氨基酸序列或其片段或变体, 其中所述变体是通过存在于图 4、5 或 6 中的氨基酸序列的至少一个氨基酸残基的添加、缺失或取代来修饰的, 其中所述多肽调节 CRLR 的功能。特别地, 所述试剂调节如上所述的 RAMP 蛋白对 CRLR 功能的作用。

本文所使用的“含有如图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列的多肽片段”包括包含 1-99 个氨基酸例如 1-50 个氨基酸如 1-30 个氨基酸或 10-30 个氨基酸的片段。优选地, 所述片段是所述 RAMP 蛋白的 N-末端序列。例如, 所述片段可以包含在图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列的 N-末端的 1-10、10-20 或 20-30 个氨基酸。所述 RAMP 蛋白的其他片段可以是例如 11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸残基的长度。

包括在本发明公开内容中的是, 含有如图 7、8 或 9 中所示的一个或多个氨基酸序列或变体多肽的多肽片段, 其中所述变体是通过添加、缺失或取

代存在于图 7、8 或 9 中的氨基酸序列的至少一个氨基酸残基来修饰的，其中该多肽调节 CRLR 的功能。

在一种实施方案中，本发明的试剂是多肽。所述多肽可以包含如图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列或其片段或变体，其中该多肽结合至所述 RAMP 蛋白的配体和/或 CRLR 的配体。

所述试剂可以是含有图 4、5 或 6 所示的氨基酸序列 N-末端的 1-30 个氨基酸的多肽片段，以及任选含有 N-末端 5-30 个氨基酸，进一步任选含有 N-末端约 10-30 个氨基酸的多肽片段。在一个实施方案中，所述片段是由选自图 7、8 或 9 的氨基酸序列组成。

在一个实施方案中，其中所述试剂不限于多肽，所述试剂包含可检测的标记物。优选地，所述试剂提供有标记物，所述标记物包括常规的标签或标志例如放射性和/或荧光的和/或表位标签或标志。

在一个实施方案中，所述试剂是抗体产品，例如抗体或抗体的活性结合部分。在本发明的一种实施方案中，所述抗体是单克隆抗体或其活性结合部分。

在本发明的一个优选的实施方案中，该抗体是嵌合抗体或人源化抗体例如通过重组方法产生的含有所述抗体的可变区与人抗体的非可变区或恒定区的抗体。

如上面详细描述地，嵌合抗体是重组抗体，其中所有小鼠或大鼠抗体的 V-区与人抗体的 C-区结合。人源化抗体是重组杂交抗体，其将来自啮齿动物抗体 V-区的互补决定区和来自人抗体 V-区的框架区融合。所述互补决定区 (CDRs) 是抗体的重链和轻链的 N-末端结构域中的区域，大多数的 V-区变异限于其中。这些区域在抗体分子的表面成环。这些环提供了抗体和抗原之间的结合表面。来自非人动物的抗体激发对外源抗体的免疫应答，并将其从循环中除去。因为在重组杂交抗体中存在减量的啮齿动物(即，外源)抗体，而所述人的抗体区不禁止免疫应答，当嵌合抗体和人源化抗体注入人受试者中时，均具有减小的抗原性。这导致较弱的免疫应答以及抗体清除率的降低。当使用治疗性抗体治疗人的疾病时，这显然是应当期望的。将人源化抗体设计成具有较少的“外源”抗体区域，并且从而认为较嵌合抗体是更少免疫源性的。在本发明的一个实施方案中，本发明的试剂是嵌合抗体。任选地，所述试剂是结合至 RAMP-3 的嵌合的或人源化的抗体或抗体片段。

在一个实施方案中，所述抗体产品是如本文所述的抗体片段，例如单链

抗体、单链可变片段(scFv)、域抗体(dAB)或纳米体(nanobody),其结合至如本文所述的例如在图1、2和3中所述的RAMP-1、RAMP-2和RAMP-3蛋白中的至少一种。优选地,所述抗体产品调节RAMP蛋白对CRLR蛋白的作用。这种调节可以是例如抑制RAMP/CRLR异源二聚体对配体的结合。同时不受理论束缚,本发明人相信由RAMP/CRLR异源二聚体所形成的受体是作为特异性配体例如肾上腺髓质素和CGRP的受体来起作用的。本发明的试剂可以用于干扰RAMP蛋白与CRLR的结合和/或干扰配体对受体的结合。在一个实施方案中,所述RAMP蛋白是RAMP-3。在本发明优选的实施方案中,该试剂是抗体片段。

如上面所指出地,免疫球蛋白或抗体的各种片段是本领域已知的,即,Fab、Fab₂、F(Fab')₂、Fv、Fc、Fd、scFvs等。Fab片段是由共价偶联在一起的免疫球蛋白重链可变区的免疫活性部分与免疫球蛋白轻链可变区的免疫活性部分所组成的多亚基蛋白,并且能够特异性地结合至抗原。Fab片段是通过完整的免疫球蛋白分子的蛋白水解分裂(proteolytic cleavage)(例如,使用木瓜蛋白酶)产生。Fab₂片段含有两个结合的Fab片段。当这两个片段是通过免疫球蛋白铰链区连接时,产生F(Fab')₂片段。Fv片段是由共价偶联在一起的免疫球蛋白重链可变区的免疫活性部分和免疫球蛋白轻链可变区的免疫活性部分所组成的多亚基蛋白,并且能够特异性地结合至抗原。片段还可以是单链多肽,所述单链多肽只含一个轻链可变区或其含有轻链可变区的三个CDRs而没有结合重链可变区的片段,或其含有重链可变区的三个CDRs而没有结合轻链部分的片段;以及由抗体片段形成的多特异性抗体,该种抗体已经描述于例如美国专利No. 6,248,516中。Fv片段或单区(域)片段一般是通过有关的经鉴定区域在宿主细胞系中的表达来产生。这些和其他免疫球蛋白或抗体片段均在本发明的范围之内,并描述于标准的免疫学教科书如Paul, *Fundamental Immunology* 或Janeway等人, *Immunobiology* (引用如上)。分子生物学目前使得这些片段被直接合成(通过细胞中的表达或通过化学方式),以及合成其组合。

有可能产生单独的可变区,也称为单链抗体可变区片段(scFv's)。如果用于特异性单克隆抗体的杂交瘤存在,将scFv's从通过RT-PCR由该杂交瘤中提取的mRNA中分离是在本领域技术人员知识范围内。选择性地,可以采取噬菌体展示筛选来鉴定表达scFv's的克隆。选择性地,所述片段是“域抗体片段”。域抗体是抗体的最小结合部分(约13kDa)。该技术的例子公开于

US6,248,516、US6,291,158、US6,127,197 和 EP0368684 中，上述文献全部在此以全文引入作为参考。

在本发明的一个实施方案中，所述抗体片段是单链抗体可变区片段。抗体或免疫球蛋白的片段也可以具有双特异性功能，即结合两种不同抗原的两个不同表位。

在一个实施方案中，可以将针对 RAMP 蛋白的嵌合/人源化的单克隆抗体制备为合适地适于原核细胞或真核细胞的转染或转化的表达载体中的融合多肽。

在本发明进一步优选的实施方案中，该抗体是调理抗体。吞噬作用是由巨噬细胞和多形态白细胞介导的并且涉及微生物、受损或死亡的细胞、细胞碎片、不溶性颗粒及激活的凝固因子的摄取和消化。调理素是促进以上异源体的吞噬的试剂。因此调理抗体是提供了上述相同功能的抗体。调理素的实例是抗体或补体 (compliment) C3 的 Fc 部分。

本发明的一个实施方案中，所述的抗体或抗体片段与治疗试剂结合或交联至治疗试剂。优选地，该治疗试剂是化学治疗试剂。优选地，该治疗试剂选自：顺铂、卡铂、环磷酰胺、美法仑、卡莫司汀、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、巯嘌呤、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、长春碱、长春新碱、更生霉素、丝裂霉素 C、紫杉酚、L-天冬酰胺酶、G-CSF、表鬼白毒素吡喃葡萄糖苷、秋水仙素、去铁敏(deferoxamine mesylate)和喜树碱。在一个实施方案中，所述抗体产品可以连接至例如 PEG 分子。

所述试剂对例如 RAMP 蛋白如 RAMP-3 的结合任选地以大于 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M 或 10^{-12} M 的亲合力来结合。所述结合可以是特异于配体的或是非特异性的，尽管在某些实例中，存在对某些与 RAMP-1、RAMP-2 或 RAMP-3 无关的其他配体的较低亲合程度的非特异性结合。

因此，本发明的试剂可以是例如抗体或其片段，例如 Fab 片段。然而，也可能是如上面所定义的适配子、化合物、融合蛋白、蛋白质、肽或其组合。特定的抗体和片段是 Fab 片段或 scFv。自然地在本发明的试剂的范围之内的是抗体或片段，所述片段为单克隆的、多克隆的、嵌合的、人的或人源化的。其他结合至 RAMP 蛋白的试剂是包括在本发明之内，其中所述结合为在此所述的。

抗体分离的方法是本领域公知的。参见，例如，Harlow 和 Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。所

述分离方法可以取决于所述免疫球蛋白的种型。纯化方法可以包括盐沉淀法(例如,使用硫酸铵)、离子交换色谱法(例如,在中性 pH 下经过阳离子或阴离子交换柱,并采用增加离子浓度的分阶段梯度洗脱)、凝胶过滤色谱法(包括凝胶过滤 HPLC)以及在亲和树脂上的色谱法如 A 蛋白、G 蛋白、羟基磷灰石和抗免疫球蛋白。特别地,本发明的试剂是通过使用 G 蛋白-琼脂糖柱来纯化的。

对于大多数的应用而言,通常优选将多肽例如抗体至少部分地从其他细胞组分中纯化。优选地,以总蛋白质重量百分比计,所述多肽为至少约 50% 纯度。更优选地,所述蛋白为至少约 50-75% 纯度。对于临床使用而言,所述多肽优选为至少约 80% 纯度。

本发明的试剂可以通过任何适宜的方法包括通过重组方法或化学合成方法来制得。然后将产生的肽通过本领域已知的技术来彼此分离,所述本领域已知的技术包括但不限于凝胶过滤色谱法、凝胶电泳和反相 HPLC。选择性地,可以使用本文公开内容中所提供的信息结合蛋白合成的标准方法来化学合成本发明的试剂。适宜的方法是固相多肽合成(solid-phase Merrifield)技术。自动化的肽合成仪是可商业购得的,如由 Applied Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.) 所生产的那些。

还包括在本发明中的是用于生产抗体产品的方法,所述抗体产品是例如本文所述的抗体或抗体片段以及任选的本文所定义的嵌合抗体或人源化抗体,所述方法包括:

i) 在有助于生产该抗体的条件下,使得经载体转化或转染的细胞生长,所述载体包含编码所述抗体或抗体片段的核酸分子; 和

ii) 从所述细胞中或抗体的生长环境中纯化所述抗体。

而在本发明的更进一步的方面,提供一种杂交瘤细胞系,所述杂交瘤细胞系产生如前所述的单克隆抗体。

在本发明的进一步方面,提供一种使用本发明的杂交瘤细胞系来生产本发明的单克隆抗体的方法。使用杂交瘤细胞来生产单克隆抗体是本领域公知的。用于生产单克隆抗体的方法由 Kohler 和 Milstein 公开于 Nature 256, 495-497 (1975) 中,并且还公开于 Donillard 和 Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas", Compendium of Immunology V.II ed. by Schwartz, 1981, 上述文献在此引入作为参考。

在本发明进一步的方面,提供一种用于制备产生本发明单克隆抗体的杂

交瘤细胞系的方法，所述方法包括以下步骤：

i) 用含有至少一种多肽的免疫原来免疫免疫活性的哺乳动物，所述免疫使用包含至少一种具有如图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列的多肽或是在此定义的其片段或其变体的免疫原；

ii) 用骨髓瘤细胞融合经过免疫的免疫活性的哺乳动物的淋巴细胞以形成杂交瘤细胞；

iii) 筛选由步骤(ii)的杂交瘤细胞生产的单克隆抗体针对(i)的多肽的结合活性；

iv) 培养所述杂交瘤细胞以扩增和/或分泌所述单克隆抗体；和

v) 从所述培养上清液中回收所述的单克隆抗体。

在本发明的一个实施方案中，(i)中所述的多肽含有如图 7、8 或 9 中所示的氨基酸序列或变体多肽，其中所述变体是通过添加、缺失或取代存在于图 7、8 或 9 中氨基酸序列的至少一个氨基酸残基来修饰的，其中所述多肽调节 CRLR 的功能。

优选地，所述免疫活性哺乳动物是小鼠。选择性地，所述免疫活性哺乳动物是大鼠。

在本发明的一个选择性的实施方案中，所述试剂是核酸分子。所述核酸可以例如是反义核酸、适配子或小型干扰性 RNA。

在本发明的一个实施方案中，所述核酸分子可以是小型干扰性 RNA。

小型干扰性 RNA 可以选自如下的序列(1)-(5)：

TGCCCCATCACCTCTTCATGA (1)

CTGGCTGCTCCTGGCCCATCA (2)

TCCTGGCCCATCACCTCTTCA (3)

CUAUGAGACAGCUGUCCAA (4)

GUUCUUCUCCAACUGCACC (5)

特定地切除基因功能的技术是通过将双链 RNA 也称为小型抑制性或干扰性的 RNA(siRNA)引入细胞，其导致针对 siRNA 分子中所包含序列 mRNA 互补性的破坏。所述 siRNA 分子含有两条互补性的 RNA 链(有义链和反义链)，彼此退火来形成双链 RNA 分子。所述 siRNA 分子通常是衍生自所述基因的外显子，该外显子是要切除的。

即将解释 RNA 干扰的机理。很多生物体应答双链 RNA 的存在，通过激活导致 siRNA 形成的级联。双链 RNA 的存在激活含有 RNase III 的蛋白复

合物,所述 RNase III 将双链 RNA 加工成更小的片段(siRNAs,长度为约 21-29 核苷酸),该更小的片段成为核糖核蛋白(ribonucleoprotein)复合物的部分。所述 siRNA 作为 RNase 复合物将互补的 mRNA 分裂为 siRNA 反义链的从而导致 mRNA 破坏的指标。

在本发明的另一个方面,提供含有核酸序列的经分离的核酸,所述序列编码本文所述的试剂,所述试剂是抗体、抗体片段、融合蛋白、肽或蛋白质。

本发明的试剂,如果含有肽序列例如抗体、融合蛋白、肽或蛋白质,可以是由核酸序列编码的。本发明包括编码如本文所定义试剂的任意核酸序列。本发明还包括编码本发明试剂但由于遗传密码的简并性而不同于野生型核酸的核酸序列。

本发明还包括与编码本发明试剂的核酸序列至少具有 90%同源性的核酸。特别地,所述核酸可以与编码本发明抗体或其片段的核酸具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同源性。

在本发明的一个方面,提供了当所述试剂是抗体或其片段或融合蛋白时,在严谨条件下与编码本发明试剂的核酸分子杂交的核酸分子。

当两个互补性的核酸分子彼此进行大量的氢键结合时,发生核酸分子的杂交。杂交的严谨性可以根据围绕所述核酸的环境条件、杂交方法的性质以及所用核酸分子的组成和长度来变化。关于获得特定程度的严谨性所需的杂交条件的计算讨论于 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001); 和 Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes* 第 I 部分, 第 2 章 (Elsevier, New York, 1993) 中。 T_m 是 50% 的核酸分子的给定链杂交至其互补链时的温度。以下是已经发现的示例性而不是限制性的杂交条件:

非常高严谨性(允许具有至少 90% 同一性的序列杂交)

杂交: 5x SSC, 在 65°C 下 16 小时

洗涤两次: 2x SSC, 在室温(RT)下每次 15 分钟

洗涤两次: 0.5x SSC, 在 65°C 下每次 20 分钟

高严谨性(允许具有至少 80% 同一性的序列杂交)

杂交: 5x-6x SSC, 在 65°C-70°C 下 16-20 小时

洗涤两次: 2x SSC, 在 RT 下每次 5-20 分钟

洗涤两次: 1x SSC, 在 55°C-70°C 下每次 30 分钟

低严谨性(允许具有至少 50% 同一性的序列杂交)

杂交: 6x SSC, 在 RT-55°C 下 16-20 小时

洗涤至少两次: 2x-3x SSC, 在 RT-55°C 下每次 20-30 分钟

在进一步的方面, 本发明提供含有如上所述的核酸的表达载体, 并且所述表达载体结合有用于在宿主细胞中表达蛋白或多肽所必需的调节序列。这样的调节序列包括例如启动子、终止序列及增强子。

在另一个有关方面, 本发明提供了含有如上述的核酸或载体的宿主细胞。这样的宿主细胞是经转染或转化的, 它们因此以这样的方式含有所述核酸或载体: 当在必要的生长条件下培养于合适的培养基中时, 其对表达所期望的多肽/蛋白质是有效的。所使用的宿主细胞不特别限制, 只要其可以通过所使用的载体来转染并且可以表达本发明的 DNA。例如, 可以使用细菌如大肠杆菌, 酵母菌如酿酒酵母, 及动物细胞如 COS 细胞、CHO 细胞等。适用本发明的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌 (E.coli)。真核宿主细胞的例子包括禽类、昆虫、植物和动物细胞如 COS7、HeLa 和 CHO 细胞。

通过培养转化体或转染细胞, 本发明的试剂例如融合蛋白、抗体或抗体片段可以在细胞或培养基中产生。然后, 通过收集所产生的抗体(或抗体片段), 可以获得本发明第一方面的试剂。得到的抗体或蛋白可以分离和纯化, 通过适当地组合方法例如离心分离、硫酸铵分馏法、盐析、超滤、亲和色谱法、离子交换色谱法或凝胶过滤色谱法。

例如, 细胞可以在适宜的培养基中培养, 并且用过的培养基可以作为抗体源来使用。任选地, 可以包括涂敷基质的通道或珠粒以及细胞共培养物从而增加抗体产生性细胞的生长。对于大量抗体的产生而言, 获得腹水通常是更加方便的。产生腹水的方法通常包括: 将杂交瘤细胞注射进入免疫的首次用于实验的组织相容性的或免疫耐受的哺乳动物特别是小鼠中。将所述哺乳动物任选地接触抗原以产生腹水, 通过先给予适宜的组合物例如姥鲛烷。本发明的抗体也可以使用常规重组方法如在上面的 Sambrook 等人(1989)中所述的那样获得。例如, 可以将本发明的核酸序列克隆进入适宜的表达载体(其含有用于转录的控制序列如启动子)中。将所述表达载体依次引入宿主细

胞。所述宿主细胞在适宜的条件下生长，从而将所述多核苷酸转录并翻译成为蛋白。本发明抗体的重链和轻链可以分别产生，然后通过二硫键的重排来组合。选择性地，可以将具有编码本发明抗体每条链的分离多核苷酸的载体，或具有编码作为分离的转录物的两条链的单独多核苷酸的载体，转染进入单独的宿主细胞，该单独的宿主细胞随后产生并且组装整个分子。优选地，所述宿主细胞是更高级的真核细胞，其可以提供所述分子的正常糖类补体。所述融合蛋白或抗体因此产生于宿主细胞中，可以使用本领域的标准技术来纯化。

根据本发明进一步的方面，提供用于测定 RAMP 蛋白或核酸分子的表达水平的测定方法，所述的 RAMP 蛋白是例如具有如图 1、2 或 3 中所示的序列的 RAMP 蛋白，所述的核酸分子是在严谨杂交条件下杂交至该核酸分子上并编码含有如图 1、2 或 3 中所示的氨基酸序列的变异多肽，所述方法包括以下步骤：

i) 用结合到编码 RAMP 蛋白的核酸分子上的结合试剂来接触分离的细胞样本；和

ii) 将所述样本中所述核酸分子的表达与标准品相比较。

所述结合试剂可以选自寡核苷酸引物及特异性地结合如图 1、2 或 3 中氨基酸序列所表示的多肽的抗体。在一个实施方案中，所述测定方法包括聚合酶链反应。

在本发明的一个方面，提供了确定受试者中的癌症的诊断测定方法，所述方法包括以下步骤：

i) 提供经分离的细胞样品；

ii) 用结合试剂来接触(i)中的样品，所述结合试剂结合至编码含有如图 1、2 或 3 中所示氨基酸序列的多肽或在此定义的其片段或变体的核酸分子，或在严谨杂交条件下杂交至所述核酸分子并且编码含有如图 1、2 或 3 中所示的氨基酸序列的变体多肽的核酸分子；和

iii) 当与正常配对的对照样本相比较时，确定该核酸分子在所述样本中的表达。

在本发明的一个优选的实施方案中，该结合试剂是寡核苷酸引物。优选地，该测定法是聚合酶链反应。在本发明的一个选择性的优选实施方案中，该结合试剂是抗体，所述抗体特异性地结合图 1、2 或 3 中的氨基酸序列所示的多肽，或是含有通过添加、缺失或取代至少一个氨基酸残基而从参考氨

基酸序列中变化而来的氨基酸序列的多肽变体。

本发明进一步的方面提供了筛选调节 RAMP 蛋白活性的试剂的方法，所述 RAMP 蛋白由选自如下的核酸分子来编码：

a) 由图 1、2 或 3 中所示的核酸序列组成的核酸分子；

b) 在严谨杂交条件下杂交至以上(i)中所述核酸分子上并且调节 CRLR 功能的核酸分子；

所述方法包括用被测化合物接触在细胞表面上表达 RAMP 蛋白的细胞，并且测定该被测化合物调节 RAMP 蛋白活性的能力。

本发明的公开内容还提供 RAMP 蛋白在鉴定用于调节 CRLR 功能的试剂中的应用，其中所述 RAMP 蛋白选自：

i) 多肽或其变体，由如图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子来编码；

ii) 多肽，由在严谨条件下杂交至上述(i)中所定义的核酸分子并且调节 CRLR 功能的核酸分子来编码；和

iii) 多肽，所述多肽包含由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的核酸。

本发明公开内容还提供了 CRLR 在鉴定用于调节 CRLR 和多肽相互作用的试剂中的应用，其中所述多肽选自：

i) 多肽或其变体，由如图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子来编码；

ii) 多肽，由在严谨条件下杂交至上述(i)中所定义的核酸分子并且调节 CRLR 功能的核酸分子来编码；和

iii) 多肽，所述多肽包含由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的核酸。

根据本发明进一步的方面，提供包括与核酸分子特异性反应的结合试剂或是与含有如图 1、2 或 3 所示氨基酸序列的多肽或在此定义的其片段或变体特异性反应的试剂的试剂盒，所述核酸分子编码含有如图 1、2 或 3 所示氨基酸序列的多肽，或在此定义的其片段或变体。

在本发明一个优选的实施方案中，该试剂盒进一步含有与该核酸分子或该多肽特异性反应的寡核苷酸或抗体。

优选地，该试剂盒含有热稳定性的 DNA 聚合酶和用于进行核酸扩增所需的成分。优选地，该试剂盒包括用于进行所述聚合酶链反应的一套说明以

及对照核酸。

在本发明一个选择性的优选实施方案中，该试剂盒含有与多肽特异性反应的抗体，所述多肽含有图 1、2 或 3 中所示的氨基酸序列，或在此定义的其片段或变体。

优选地，该试剂盒含有用于进行免疫测定所需要的成分，包括例如与第一抗体特异性反应的抗体和检测所述第二抗体与所述第一抗体结合所需的酶试剂，所述第一抗体特异性地结合所述多肽。

根据本发明进一步的方面，提供一种筛选用于调节核酸分子编码多肽活性的试剂的方法，所述核酸分子选自如下：

a) 核酸分子，由图 1、2 或 3 中所示的核酸序列组成；

b) 核酸分子，在严谨杂交条件下杂交至以上(i)中定义的核酸分子上并且调节 CRLR 的功能；其中该方法包括：

i) 形成含有多肽或者其序列变体以及至少一种待检测试剂的制剂；

ii) 测定与所述多肽活性有关的该试剂的活性。

图 4-6 中所示的氨基酸序列包括图 7-9，其对应于 RAMP 的胞外域 (ECDs)，可用于分子基于结构的设计，所述分子调节 CRLR 功能如调节 RAMP-CRLR 的结合。这种“基于结构的设计”也称为“合理药物设计”。RAMP ECDs 可以通过例如 X-射线晶体照相术、核磁共振或同源性建模来三维分析，所有这些都是公知的方法。在分子建模软件系统中结构信息的使用也是本发明包括的。这种计算机辅助的建模和药物设计可以使用信息如化学构象分析、分子的静电势、蛋白折叠等。本发明一个特别的方法可以包括分析 RAMP ECD 的三维结构得出靶点可能的结合位点、合成引入推测反应位点的新分子以及如上所述测定新分子。

在本发明优选的方法中，该试剂是拮抗剂。由本发明筛选方法鉴定的试剂可以包括：抗体、siRNA、适配子、小有机分子(例如肽、环肽)和在此公开的多肽的显性失活变体。

如上面提到地，在某些实施方案中，本发明还提供衍生自在此公开的多肽的“显性失活”多肽。显性失活多肽是蛋白质的无活性变体，通过和细胞机器(cellular machinery)的相互作用，由其与细胞机器的相互作用而取代活性蛋白或与活性蛋白竞争，从而降低活性蛋白的作用。例如，显性失活受体结合配体但是不在配体结合的应答中不传输信号，会降低所述配体表达的生物学效应。同样地，显性失活的催化无活性激酶正常地与靶蛋白相互作用但是不

磷酸化所述靶蛋白，会降低细胞信号应答中靶蛋白的磷酸化。类似地，显性失活转录因子结合到基因控制区的另一个转录因子或启动子位点上，但却不增加基因转录，由于占据启动子结合位点却不增加转录会降低正常转录因子的作用。

对本领域技术人员来说，显然地，对于本发明公开肽试剂的氨基酸序列的修饰可以增强所述肽与其靶序列有关的结合和/或稳定性。此外，所述肽的修饰还可以增加肽的体内稳定性，从而降低对抑制在此公开多肽的活性所需肽的有效量。这将有利地减少在体内可能产生的所不希望的副作用。修饰包括，作为举例而不是限制性的，乙酰化和酰胺化。选择性地或优选地，所述修饰包括经修饰的氨基酸在重组或合成形式的肽的生产中的使用。对本领域技术人员来说，显然地，经修饰的氨基酸包括例如：4-羟基脯氨酸、5-羟基赖氨酸、N⁶-乙酰基赖氨酸、N⁶-甲基赖氨酸、N⁶,N⁶-二甲基赖氨酸、N⁶,N⁶,N⁶-三甲基赖氨酸、环己基丙氨酸、D-氨基酸、鸟氨酸。其他修饰包括具有任选取代的 C₂、C₃ 或 C₄ 烷基 R 基团的氨基酸，所述取代是以 1、2 或 3 个选自如下的取代基来取代的：卤素(例如，F、Br、I)、羟基或 C₁-C₄ 烷氧基。对于本领域技术人员而言，保持 p53 结合活性的肽可以通过环化来修饰，这也是显然的。环化是本领域中已知的(参见 Scott 等人, *Chem Biol* (2001), 8:801-815; Gellerman 等人, *J. Peptide Res* (2001), 57: 277-291; Dutta 等人, *J. Peptide Res* (2000), 8: 398-412; Ngoka 和 Gross, *J Amer Soc Mass Spec* (1999), 10:360-363)。

在本发明进一步的方面，提供多肽在鉴定调节 CRLR 功能的试剂中的应用，其中所述多肽选自：

- i) 多肽或者其变体，由图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子编码；
- ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子在严谨条件下杂交至以上(i)所定义的核酸分子并调节 CRLR 的功能；和
- iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中所定义的核酸序列是简并的。

在本发明进一步的方面，提供 CRLR 在鉴定调节 CRLR 与多肽的相互作用的试剂中的应用，其中所述多肽选自：

- i) 多肽或其变体，由图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成的核酸分子编码；
- ii) 由核酸分子编码的多肽，所述核酸分子在严谨条件下杂交至以上(i)

所定义的核酸分子并调节 CRLR 的功能；和

iii) 含有核酸的多肽，所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中所定义的核酸序列是简并的。

药学方法、应用和产品

在本发明的其他方面，提供如前所述的试剂作为药物的应用。在进一步的方面，提供含有如前所述试剂的药物制剂。所述制剂可以含有至少一种另外的药学上可接受的成分，例如赋形剂、稀释剂或载体。优选地，所述制剂是意在用于胃肠外给药。在特定的实施方案中，所述制剂含有抗体产品试剂，例如结合至 RAMP-3 蛋白的抗体。

本发明的保护范围包括含有或声称含有本发明试剂的伪造品或欺作品，而不论其实际上是否含有这样的试剂并且不论这样的试剂是否是以治疗有效量含有的。因此，包括在本发明保护范围内的是含有描述或说明的包装，所述描述或说明指出所述包装包括本发明的种类或药物制剂以及是或含有或声称是或声称含有这样的制剂或种类的产品。

根据本发明进一步的方面，提供了含有本发明试剂的药物组合物。在优选的实施方案中，所述试剂是抗体特别是结合至 RAMP-3 蛋白的抗体。

包括在本发明公开内容中的是含有多肽或其片段或变体多肽的组合物，所述多肽含有如图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列，其中该变体是通过添加、缺失或取代来修饰存在于图 4、5 或 6 中的氨基酸序列的至少一个氨基酸残基，其中该变体多肽调节 CRLR 功能。

在此使用的“含有如图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列的多肽的片段”包括含有 1-50 个氨基酸例如 1-30 个氨基酸如 10-30 个氨基酸的片段。含有如图 4、5 或 6 中所示的氨基酸序列的多肽片段可以含有如图 7、8 或 9 中所示的氨基酸序列或变体多肽，其中所述变体是通过添加、缺失或取代存在于图 7、8 或 9 中氨基酸序列的至少一个氨基酸残基来修饰的，其中该多肽调节 CRLR 的功能。

还包括在本发明公开内容中的是含有选自如下的核酸分子的用作疫苗的药物组合物：

- i) 核酸分子，含有图 4、5 或 6 所示核酸序列的全部或部分；
- ii) 核酸分子，在严谨杂交条件下杂交至以上(i)所定义的核酸分子上，并且编码多肽，其中该多肽调节 CRLR 的功能。

本发明公开内容还包括含有核酸分子的组合物，所述核酸分子含有如图

4、7、8或9所示的核酸序列。

在本发明进一步的方面，该组合物包含佐剂和/或载体。

佐剂是通过调节免疫细胞活性来增强对抗原的特异性免疫应答的物质或产品。佐剂的例子包括仅作为举例的，弗氏佐剂 (Freunds adjuvant)、胞壁酰二肽、脂质体。载体是免疫原性的分子，当结合至第二种分子时，其增强对于后者的免疫应答。一些抗原本质上是非免疫原性的，然而当与外源性蛋白分子如钥孔虫戚血蓝蛋白或破伤风毒素结合时，却可能产生抗体应答。这样的抗原含有 B-细胞表位但不含 T-细胞表位。这种结合物的蛋白部分(“载体”蛋白)提供了刺激辅助 T-细胞的 T-细胞表位，辅助 T-细胞依次刺激抗原-特异性 B-细胞分化为浆细胞并产生抵抗抗原的抗体。辅助 T-细胞也可以刺激其他免疫细胞如细胞毒素 T-细胞，并且载体可以在细胞介导的免疫性以及抗体的产生中发挥类似作用。

在给药时，本发明的药物组合物及制剂是以药学上可接受的试剂给药。这样的试剂可以常规含有药学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容性的载体、补充免疫增效剂如佐剂和细胞因子和任选的其他治疗试剂(例如，顺铂、卡铂、环磷酰胺、美法仑、卡莫司汀、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、巯嘌呤、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、长春碱、长春新碱、更生霉素、丝裂霉素 C、紫杉酚、L-天冬酰胺酶、G-CSF、表鬼白毒素吡喃葡萄糖苷、秋水仙素、去铁敏和喜树碱。

本发明的组合物和制剂可以任何常规途径给药，所述常规途径包括注射或随时间的逐渐输注。所述给药可以是例如口服、静脉内、腹膜内、肌肉内、腔内、皮下或经皮给药。当抗体是在治疗上使用时，一种特定的给药途径是肺用气雾剂。制备包括抗体的气雾剂递送系统的技术是本领域技术人员公知的。通常地，这样的系统应当使用不显著地削弱所述抗体的生物学性质如互补结合能力的成分(参见，例如 Sciarra 和 Cutie, “Aerosols”, Remington's Pharmaceutical Sciences 中，第 18 版，1990 年，第 1694-1712 页；该文献引入作为参考)。本领域技术人员可以容易地确定生产抗体气雾剂的不同参数和条件，无需借助于过度的实验。

本发明的组合物和制剂通常是以有效量来给药。“有效量”是组合物单独地或者与进一步的药剂联用时产生所期望的应答的量。在治疗特定疾病如癌症的情况下，所期望的应答是抑制疾病的发展。其可以仅仅涉及疾病发展的暂时减缓，虽然更优选地，其涉及永久性地停止疾病的发展。其可以通过常

规方法来监测或者可以根据本发明在此讨论的诊断方法来监测。

所述试剂给予受试者的剂量可以根据不同的参数尤其是根据所使用的给药方式以及所述受试者的状态来选择。其他因素包括所期望的治疗时间。在使用初次剂量受试者的应答不足时，可以使用该患者耐受允许的程度内的更高剂量(或由不同的、更为局部的递送途径的更高的有效剂量)。

通常地，抗体的剂量是根据本领域的任何标准工艺以约 1ng- 1mg 的剂量来配制和给药的，所述剂量优选为 10 ng-100 μ g。在使用核酸或其变体时，根据标准工艺通常以 1ng-0.1mg 的剂量来配制和给药。用于所述组合物给药的其他规定对于本领域普通技术人员将是已知的，其中剂量、注射时间表、注射位点、给药方式(例如，骨内)等根据上述变化。向非人类的哺乳动物给药所述组合物(例如，试验目的或兽医治疗目的)，基本上是在与上述相同的条件下进行的。在此使用的受试者是哺乳动物，优选人类，包括非人灵长类、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物。

在给药时，本发明的药物配制品及制剂是以药学上可接受的量并在药学上可接受的组合物中应用。术语“药学上可接受的”是指不干扰所述活性成分的生物学活性作用的非毒性物质。这样的配制品可以常规地含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容性的载体以及任选的其他治疗试剂。当在药物中使用时，所述的盐应当是药学上可接受的，但是非药学上可接受的盐可以方便地用于制备其药学上可接受的盐并且不排除在本发明的范围之外。这样的药理学上和药学上可接受的盐包括但不限于那些由以下的酸制得的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等等。药学上可接受的盐还可以制备成碱金属或碱土金属盐，如钠盐、钾盐或钙盐。

如果需要，药物组合物和制剂可以包含药学上可接受的载体。在此使用的术语“药学上可接受的载体”是指一种或多种适于向人体内给药的相容性的固体或液体的填充剂、稀释剂或包封物质。术语“载体”表示有机或无机的、天然或合成的成分，所述活性成分与之结合以便于应用。所述药物组合物的成分还可以与本发明的分子共混，并且彼此共混，以这样的方式从而不存在会实质上削弱所期望的药效的相互作用。

所述药物组合物和制剂可以含有适宜的缓冲剂，所述缓冲剂包括：乙酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐、磷酸盐。所述药物组合物和制剂也可以任选地含有适宜的防腐剂如：苯扎氯铵、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸酯和乙基汞硫代水

杨酸钠。

适于口服给药的组合物可以呈现为离散的单元如胶囊、片剂、锭剂，所述离散单元各自地含有预定量的所述活性化合物。其他组合物包括水性液体或非水性液体形式的混悬剂如糖浆剂、酏剂或乳剂。

适于胃肠外给药的组合物方便地含有抗体或核酸的无菌的水性或非水性制剂，所述制剂优选与接受者的血液等渗。该制剂可以根据已知方法使用适宜的分散剂或润湿剂和助悬剂来配制。所述无菌注射剂也可以是无菌注射溶液或混悬液，所述溶液或混悬液是在非毒性的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂例如 1,3-丁二醇溶液中。在所述可接受的载体和溶剂中，可使用的是水、林格氏溶液和氯化钠等渗溶液。此外，无菌的不挥发性油通常是作为溶剂或混悬介质使用。就此目的，可以使用任何混合的不挥发性油包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外，脂肪酸如油酸可用于注射剂。适于口服、皮下、静脉内、腔内、肌肉内等给药的载体制剂可以在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 中找到。

本发明进一步的方面提供了在此定义的用作药物的试剂或组合物。用作药物的优选试剂是抗体产品例如抗体或抗体片段。特定的试剂是结合至 RAMP-3 的抗体产品。特别地，所述抗体产品结合至人的 RAMP-3 蛋白。

在本发明的一个方面，本发明公开的试剂可以用于治疗癌症。根据本发明进一步的方面，提供在受试者中治疗癌症的方法，所述方法包括给予治疗有效量的本发明的试剂。在本发明优选的方法中，所述受试者是人。

根据本发明进一步的方面，提供了将动物免疫的抗癌方法，所述方法包括给予有效量的根据本发明的组合物。在本发明优选的方法中，该动物是人。

在此使用的术语“癌症 (cancer)”是指具有自主生长能力的细胞，即，由快速增殖细胞生长来表征的异常状态或情形。该术语意在包括不论组织病理学类型或侵袭的阶段，所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性的组织或恶变的细胞、组织或器官。术语“癌症”包括不同器官系统的恶性肿瘤，如那些侵袭性的，所述的器官系统是例如肺、胸、甲状腺、淋巴、胃肠和泌尿生殖道以及包括恶性肿瘤如大多数的结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌的腺癌。术语“癌 (carcinoma)”是本领域公认的并且是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤，包括呼吸系统癌症、胃肠系统癌症、泌尿生殖系统癌症、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。示例性的癌包括由宫颈、肺、前列腺、胸、头和颈、结肠和卵

巢组织所形成的那些。

术语“癌”还包括癌性肉瘤，例如其包括由癌组织和肉瘤组织所组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指衍生自腺组织的癌或者其中所述肿瘤细胞来自可辨别的腺体结构的癌。术语“肉瘤”是本领域公认的并且是指间质衍生物的恶性肿瘤。癌的进一步类型包括白血病、皮肤癌、颅内癌症和脑癌。

癌症病理学中的 AM 的具体活动落入到 5 个方面的作用，称为刺激癌细胞的增殖、间接抑制免疫应答、促进血管生成、助长侵袭性的肿瘤表型和细胞凋亡存活因子。因此，本发明的试剂或组合物可以是在治疗、阻止和/或预防癌性病征上有用的，例如抑制血管的发生或癌细胞的增殖。

可以将包含本发明试剂的药物制剂作为化学治疗试剂联合给药或顺序给药或是在基本上相近的时间给药。

在本发明的一个方面，本发明的试剂和/或含有所述试剂的组合物或制剂可用于治疗骨质疏松症。因此，根据本发明的一个方面，提供了一种在受试者中治疗骨质疏松症的方法，所述方法包括给予有效量的根据本发明的试剂。在本发明优选的方法中，该受试者是人。

在本发明进一步的方面，本发明的试剂和/或含有所述试剂的组合物或制剂可用于治疗例如降低肥胖水平。所述试剂也可以用于治疗肥胖的药物的制备。因此，根据本发明的一个方面，提供了在受试者中治疗肥胖症的方法，所述方法包括给予有效量的根据本发明的试剂。在本发明优选的方法中，该受试者是人。

作为本发明的一方面，还包括本文所述的试剂在制备用于治疗或减缓血管病的药物中的用途，例如选自如下的血管病：糖尿病性血管病、微血管病和大血管病。治疗血管病例如糖尿病性血管病的方法，所述方法包括将本发明的试剂给予受试者是作为本发明的一个方面包括于本发明。

在本发明进一步的方面，可以将本发明的试剂和/或含有该试剂的组合物或制剂用于治疗炎性障碍和/或炎性应答。因此，根据本发明进一步的方面，提供了一种在受试者中治疗炎性障碍的方法，所述方法包括给予治疗有效量的本发明的试剂。在本发明优选的方法中，该受试者是人。

所述炎性障碍可以选自：动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、骨性关节炎、痛风、红斑狼疮、硬皮病、干燥综合征（Sjorgen syndrome）、多发性肌炎和皮肌炎（poly- and dermatomyositis）、血管炎、腱炎、滑膜炎、细菌性心内膜炎、骨髓炎、银屑病、肺炎、纤维化肺泡炎、慢性支气管炎、支气管扩张症、

肺气肿、矽肺、尘肺、结核病、溃疡性结肠炎、节段性回肠炎(Crohn's disease)、慢性炎症性脱髓鞘多神经根神经瘤、慢性炎症性脱髓鞘多神经病、多发性硬化症、格林-巴利综合征(Guillan-Barre Syndrome)和重症肌无力、乳腺炎、蹄叶炎、喉炎、慢性胆囊炎、桥本(氏)甲状腺炎及炎性乳房疾病。在一个实施方案中,所述炎性障碍可以是移植之后组织或器官排斥反应的结果。在特定的实施方案中,所述炎性障碍选自动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、骨性关节炎、脓毒和多关节炎。

在实施方案中,所述患者患有的、或者处于危险的或怀疑患有的疾病选自:血栓形成、心肌梗死、卒中、短暂性缺血发作、闭塞性外周血管疾病、外周动脉闭塞,由炎性疾病例如动脉粥样硬化引起的其并发症。

本说明书还公开了将本发明的试剂向动脉粥样硬化障碍的实际位点或可疑位点局部给药的方法。这样的给药方法可以在患有或怀疑患有动脉粥样硬化障碍的患者的治疗中是有用的,所述障碍是例如可能破裂的动脉粥样硬化斑块。所述给药可以通过导管进行。

本发明的试剂可以用于治疗心力衰竭。还提供本文所述的试剂在制备用于治疗心力衰竭的药物中的应用。

在本发明进一步的方面,本发明的试剂,和/或含有该试剂的组合物或制剂可以用于治疗脓毒。所述试剂还可以用于治疗脓毒的药物的制备。因此,根据本发明的一个方面,提供一种在受试者中治疗脓毒的方法,所述方法包括给予有效量的根据本发明的试剂。在本发明优选的方法中,该受试者是人。

在本发明的实施方案中,所述试剂可能在治疗创伤中是有用的,也就是说用于辅助伤口的愈合。本发明进一步的方面,提供了一种在受试者中治疗创伤的方法,所述方法包括给予有效量的根据本发明的试剂。在本发明优选的方法中,所述受试者是人。还提供本发明的试剂在制备用于治疗创伤的药物中的应用。

这里使用的“创伤”的治疗包括,尤其是溃疡和损伤的治疗,例如皮肤创伤如割伤或烧伤,及其伴随症状。

这里使用的“治疗”是指试图改变所治疗个体或细胞的天然进程的临床介入,并且可以用于预防或是在临床病理学的过程中进行。所期望的效果包括:预防疾病的发生或复发、症状的减轻、减小所述疾病的任何直接或间接病理结果、降低疾病发展的速率、改善或缓解所述疾病的状态以及减轻或改进的预后。这里使用的术语“治疗”意在包括所指明的病症/障碍的治疗和预

防。

进一步提供各部分的包装或试剂盒，所述的包装或试剂盒包括：

- (1) 在此描述的试剂；连同
- (2) 在此所述的方法中使用所述试剂的说明。

在此定义的包装可以包括超过一种的剂量单位，以提供用于重复的定量给药。如果存在超过一种的剂量单位，在活性试剂组合物的剂量和/或外形方面，这样的单位可以是相同的或可以是不同的。

贯穿于本文的说明书和权利要求书，词语“包含 (comprise)”和“含有 (contain)”及其变形例如“包含有 (comprising)”和“包含着 (comprises)”是指“包括但不限于”，并且不意在排除(且不排除)其他部分、添加剂、成分、整体或步骤。

贯穿于本文的说明书和权利要求书，所述单数包括复数，除非上下文另外要求。特别地，当使用不定冠词时，将其描述内容理解为包含复数和单数，除非上下文另外要求。

与本发明的特定方面、实施方案或实施例相结合的所描述的特征、整体、性质、化合物、化学部分或基团被理解为应用于本文所述的任何其他的方面、实施方案或实施例，除非与其不相容。

现在将对本发明的实施方案仅仅通过实施例的方式并参考以下的附图以及材料和方法来描述：

图 1 显示了 RAMP 1 的 DNA 序列(上方) (SEQ. ID. No. 1); 和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方) (SEQ. ID. No 2);

图 2 显示了 RAMP 2 的 DNA 序列(上方) (SEQ. ID. No 3); 和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方) (SEQ. ID. No 4.);

图 3 显示了 RAMP 3 的 DNA 序列(上方) (SEQ. ID. No 5); 和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方) (SEQ. ID. No 6);

图 4 显示了对应于 RAMP1 胞外域(ECD)的区域的 DNA 序列(上方) (SEQ. ID. No 7); 和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方) (SEQ. ID. No 8);

图 5 显示了对应于 RAMP2 胞外域(ECD)的区域的 DNA 序列(上方) (SEQ. ID. No 9); 和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方) (SEQ. ID. No 10);

图 6 显示了对应于 RAMP 3 胞外域(ECD)的区域的 DNA 序列(上方) (SEQ. ID. No 11); 和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方) (SEQ. ID. No 12);

图 7A-H 显示了对应于 RAMP1 胞外域(ECD)的 N-末端截短区域的 DNA

序列(上方)(SEQ. ID. No 13、14、15、16、17、18、19 和 SEQ. ID. No 20);
和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方)(SEQ. ID. No 21、22、23、24、
25、26、27 和 SEQ. ID. No 28): 片段长度以粗体显示;

图 8A-J 显示了对应于 RAMP2 胞外域(ECD)的 N-末端截短区域的 DNA
序列(上方)(SEQ. ID. No 29、30、31、32、33、34、35、36 和 SEQ. ID. No 37);
和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方)(SEQ. ID. No. 38、39、40、41、
42、43、44、45、46 和 SEQ. ID. No 47): 片段长度以粗体显示;

图 9A-H 显示了对应于 RAMP3 胞外域(ECD)的 N-末端截短区域的 DNA
序列(上方)(SEQ. ID No. 48、49、50、51、52、53、54 和 SEQ. ID. No 55);
和由所述 DNA 序列编码的氨基酸序列(下方)(SEQ. ID. No 56、57、58、59、
60、61、62 和 SEQ ID No. 63): 片段长度以粗体显示;

图 10 显示了 CRLR(SEQ. ID. No 65)的 DNA 序列(上方)(SEQ. ID. No 64)
和 CRLR 的氨基酸序列(下方);

图 11 显示了小鼠抗-RAMP 3 多克隆抗体的 ELISA 数据。

图 12: 将多克隆抗-RAMP-3 抗体检测其在人 MG63 骨肉瘤细胞中调节
肾上腺髓质素增加环腺苷酸(cyclic AMP)作用的能力。所有抗体均降低了
肾上腺髓质素的所述作用,

图 13: 将单克隆抗-RAMP-3 抗体检测其诱导增殖抑制的能力(基于线粒
体的琥珀酸盐脱水作用的 MTT 测定法, 其相对于增殖作图)。1:50 的浓度等
同于约 5ng/孔的最终浓度。

图 14 是来源于小鼠 1 的多克隆抗体的蛋白质印迹;

图 15 是来源于小鼠 2 的多克隆抗体的蛋白质印迹;

图 16 是来源于小鼠 3 的多克隆抗体的蛋白质印迹。

实施例

RAMP 胞外域(ECD)蛋白的产生

所述 RAMP 的 ECD 区域是使用来自于 Novagen Toyobo 的 KOD 热启动
DNA 聚合酶试剂盒进行高保真度的 PCR 反应来产生的。所述模板 DNA 是
从购得的人脑 cDNA 的样本(Ambion)获得。

对于每个 50 μ l 反应, 以下是在室温下或在冰上的 0.5 ml PCR 管中进行:

27.5 μ l	PCR 级的 H ₂ O
2.5 μ l	DMSO
5 μ l	用于 KOD 热启动 DNA 聚合酶的 10X PCR 缓冲液

5 μ l	dNTPs (最终浓度 0.2 mM)
2 μ l	MgSO ₄ (最终浓度 1 mM)
1 μ l	模板 DNA
3 μ l	5'引物(5 pmol/ μ l, 最终浓度 0.3 μ M)
3 μ l	3'引物(5 pmol/ μ l, 最终浓度 0.3 μ M)
1 μ l	KOD 热启动 DNA 聚合酶(1 U/ μ l)

50 μ l **总体积**

将该反应进行两次，第一次反应用于分离出大于整个 RAMP ECD 的区域，所述反应使用以下引物进行：

RAMP1

正向

CGAGCGGACTCGACTCGGCAC

反向

CTTCCTAGGGTGGCGGTGGCC

RAMP2

正向

GTC CGC CTC CTC CTT CT GCT

反向

AAG TGG AGT AAC ATG GTT ATT GT

RAMP3

正向

AGC CAT GGA GAC TGG AGC GCT GC

反向

GTG GCC CAG TAG CTG GAG ATT GGC

所述反应是使用台式离心机，以 QIAGEN QiA 快速 PCR 纯化试剂盒的标准方案来纯化的。

第二次 PCR 反应使用来自于使用以上引物反应的产物。使用以下的引物，这些引物具有已经引入其中的 EcoRI 和 BamHI 限制性位点：

RAMP1

正向

GC**GAATTC**TGCCAGACCACCAG

反向

GTGGATCCTACCGGGCCCGGGACA

RAMP2

正向

GCG AAT TCA ATC CCC ACG AGG CCC TGG CTC AGC C

反向

CAG GAT CCT ACA AGA GTG ATG AGG AAG GGG ATG (原文没有空格)

RAMP3

正向

CAG AATT TCC AGA GCA GGC CGC TGC AAC CAG ACA G

反向

GTG GAT CCC ACC ACC AGG CCA GCCATG GCG ACA GT

来自该反应的样品是使用台式离心机，以 QIAGEN QiA 快速 PCR 纯化试剂盒来纯化的。

为初次筛选所述产物的大小，将所述产物在 200V 下含有 1.5% 溴乙啡啶的 1.5% 琼脂糖凝胶上进行 30 分钟电泳。将所述产物与可获得自 Sigma 的标准标记物相比较。

所述产物的基因组测序以最终的待测产物来进行。

除非另外指出，将来自该点前的 ECD 蛋白称为“插入片段”。

插入片段和载体的制备

1. 限制性

(这些量是基于 1 μ g 的 DNA 浓度)

所述限制性反应是在插入片段和载体(pGEX-6P1)二者上使用以下方案来进行。

1 μ l	DNA
2 μ l	10 倍的缓冲液 E
2 μ l	10X BSA
1 μ l	BamH-1
1 μ l	EcoR-1
13 μ l	无 DNase 的水
20μl	总体积

该反应是在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时或者在 16 $^{\circ}$ C 下孵育整夜。

来自该反应的样品是使用台式离心机的标准方案，以 QIAGEN QiA 快速 PCR 纯化试剂盒来纯化的。

2. 载体脱磷酸化

这些量是基于 1 μ g 的 DNA 浓度。

1 μ l	DNA
1 μ l	10 倍的 Antarctic 磷酸酶反应缓冲液
1 μ l	Antarctic 磷酸酶
7 μ l	无 DNase 的水
10μl	总体积

在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。

3. 连接 (质粒 + 插入片段)

这些量是基于 1 μ g 的 DNA 浓度。

1 μ l	载体
1 μ l	插入 DNA
5 μ l	2 倍的连接缓冲液
1 μ l	T4 连接酶
2 μ l	无 DNase 的水
10 μl	总体积

在 16 $^{\circ}$ C 下孵育整夜。

转化

将来自连接反应的总体积用于以下步骤：

1 μ l	DNA
10 μ l	10 倍的转化缓冲液
100 μ l	E-Coli (TOP10)感受态细胞
70 μ l	无 DNase 的水
200μl	总体积

10 倍的转化缓冲液。(300mM MgCl₂, 100mM CaCl₂)

6.5ml	蒸馏水
0.5ml	2M CaCl ₂

3.0ml	1M MgCl ₂
10ml	总体积

1. 冰上放置 20 分钟。
2. 室温下放置 10 分钟。
3. 加入 1ml 的 LB 肉汤培养基(LENNOX L 肉汤培养基)。
4. 在 37°C 下孵育 1 小时。
5. 在含有 10µg/ml 氨苄西林的 LB 琼脂板上涂敷所述样本。
6. 在 37°C 下孵育整夜。

培养

采集来自平板上的菌落，放置入含有 10µg/ml 氨苄西林的 5ml LB 肉汤培养基(LENNOX L 肉汤培养基)中，然后放入 37°C 的恒温摇床中过夜。

所述培养物使用台式离心机以 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒(Qiagen)的标准方案来净化。

为了确保转化已经有效地发生，对于所述质粒的样本进行基因组测序。

蛋白质表达

进行用于蛋白质表达的以下方案：

转化

1µl	DNA(1~10ng)
10µl	10 倍转化缓冲液
100 µl	E-Coli (BL21)感应细胞
89 µl	蒸馏水
200µl	总量

1. 冰上放置 20 分钟。
2. 室温下放置 10 分钟。
3. 加入 1ml 的 LB 肉汤培养基(LENNOX L 肉汤培养基)。
4. 在 37°C 下孵育 1 小时。
5. 在含有 10µg/ml 氨苄西林的 LB 琼脂板上涂敷样本。
在 37°C 下孵育过夜。

使用以下方案来培养所述细胞:

培养

采集菌落并放入 5ml 2 倍的 YTA 培养基(10 μ g/ml 氨苄西林)中。

2 倍的 YTA 培养基

16g	胰蛋白胨
10g	酵母提取物
5g	NaCl
900ml	蒸馏水

用 NaOH 调节到 pH7。用蒸馏水调节总体积到 1L，并且通过高压灭菌法来灭菌。加入 10 μ g/ml 浓度的氨苄西林。进行以下方案步骤:

- 1、在 37 $^{\circ}$ C 的恒温摇床中孵育 2 小时。
- 2、向所述培养物中加入 150 μ l 100mM 的 IPTG。
- 3、在 37 $^{\circ}$ C 的恒温摇床中孵育另外 4-8 小时。

蛋白提取

将所述蛋白质使用采用标准方案的 Bug Buster 蛋白提取试剂(Novagen)来提取。这包括加入蛋白酶抑制剂的另外阶段。保存并分析所述的可溶部分和不溶部分。

蛋白确认 (Conformation of Protein)

该过程是采用蛋白质印迹法，使用抗-GST 抗体(Amersham Biosciences)来进行的。所述蛋白质印迹法是按照抗-GST 抗体方案中所规定来进行的。

蛋白纯化

大规模的蛋白质生产是在 2L 培养物中进行的。

所述蛋白质是使用谷胱甘肽 S-转移酶(GST)基因融合系统来纯化的。GST 在 Mr 26,000 下天然产生,其可以在大肠杆菌中具有全部酶活性的表达。GST 融合蛋白是从细菌溶菌产物中通过使用固定化谷胱甘肽的亲合层析来纯化。GST 融合蛋白是通过亲合性介质来获得,洗涤除去杂质。在温和、非变性的条件下,使用还原的谷胱甘肽来洗脱融合蛋白。使用 GSTrap HP 5ml 柱(Amersham Biosciences)来纯化所述样本。

所述纯化过程保持蛋白的抗原性和功能。一旦洗脱,使用位点特异性蛋白酶,可以将所述 GST 从蛋白上切下。此过程将按照 GST 基因融合系统手册(Amersham Biosciences)中所规定的来完成。

以上的纯化方法还通过分级纯化过程来补充。一旦所述蛋白已经被纯化，将结合形式的肽用于单克隆抗体的产生。将残余的蛋白溶液用特异性的蛋白酶处理以除去 GST 标签。

功能性检测 ECD 蛋白

将 MG63 人成骨细胞样细胞通过 siRNA 来处理，以制备各种 RAMP 细胞表型：

- RAMP 1、2 和 3 阴性细胞，CRLR 阳性细胞 (系 1).
- RAMP 2 和 3 阴性细胞，RAMP 1 和 CRLR 阳性细胞 (系 2).
- RAMP 1 和 3 阴性细胞，RAMP 2 和 CRLR 阳性细胞 (系 3).
- RAMP 1 和 2 阴性细胞，RAMP 3 和 CRLR 阳性细胞 (系 4).

RAMP1: TGGCCCATCACCTCTTCATGA (Qiagen)

CTGGCTGCTCCTGGCCCATCA (Qiagen)

TCCTGGCCCATCACCTCTTCA (Qiagen)

由于 RAMP1 基因的性质，没有一个 siRNA 显然是最终的，因此有若干 siRNA 将被检测。

RAMP2: CUAUGAGACAGCUGUCCAA (MWG)

RAMP3: GUUCUUCUCCAACUGCACC (MWG)

所述 siRNA 的转染将使用在所述手册中规定的 HiPerFect 转染试剂盒 (Qiagen) 的标准方案来进行。

功能测试 1

第一个实验将是确定所述 ECD 片段是否能够在 RAMP 原初细胞(细胞系 1)上产生 RAMP 的表型。

·在固体的黑色 96-孔微培养板(Corning)中的培养物(体积为 50 μ l)，细胞浓度为 10⁴-10⁶ 个细胞/ml

·在 37 $^{\circ}$ C 下孵育过夜(5% 的 CO₂ 和 95% 的湿度)，抽吸所述细胞培养基。

·加入体积为 50 μ l 的 ECD 或 PBS 中或激动剂，并且暴露 5 分钟。

o 将进行对于 ECD 的剂量应答来确定有效的浓度。

o 还将进行对于激动剂(肾上腺髓质素 AM、降钙素基因相关肽 CGRP)的剂量应答来确定是否能够由激动剂引发应答。

·在逐一加入 ECD 和激动剂的情况下，将使用 cAMP 荧光极化 (FP)Biotrak 免疫测定法(Amersham Biosciences)来测量 cAMP 应答。

·将联合使用的 ECD 和相应的激动剂的剂量(例如 RAMP1 和 CGRP)，

将要测量所述的第二信使(如上)。

功能测试 2

该实验将测定 RAMP ECD 的能力,以重新定义先前定义的 RAMP 细胞表型例如从 RAMP1 表型的细胞变为 RAMP2 表型的细胞(细胞系 2、3 和 4)。

·将使用与 RAMP 结合的配体来进行剂量应答曲线。将测量第二信使的应答。测定 EC_{50} 浓度。

·ECD 剂量应答曲线将全部在 EC_{50} 浓度的所述配体存在下产生。将测量第二信使应答。

·第二信使的减少应当看成是对配体的应答,所述配体为要施加 ECD 的对应配体 ECD,并将测量第二信使应答。

这两个起始实验将帮助确定 ECD 区域是否具有生物学活性。

抗体产生

将所述 ECD 肽类如上所述地表达和随后纯化。抗体使用以下方案来产生。

小鼠和大鼠免疫方案

进行以下免疫方案以产生抗 RAMP-3 胞外域的抗体:

免疫接种之前,从所述小鼠抽取预先免疫的血清。将四只小鼠注射以对应于 RAMP-3 胞外域的肽:

10 20 30 40 50 60
 GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS
 EFIVYYESFT NCTEMEANVV

70 80 90 99
 GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEVL (也参见图

6)

在大约每间隔一月时,将注射增加 4 次进一步的注射。将取血自小鼠的样品采集以用于分离含多克隆抗体的血清。

所使用的佐剂是弗氏佐剂 (Freunds) (全部用于首次注射,随后部分地用于剩余的注射)。

抗原和佐剂通常在注射前就地混合。理想地,在开始时应当补充用于完成所述过程的足够的抗原,尽管这可能不总是必需的。其应当允许的是,高达 20% 的抗原可能在混合时损失。

可以注射进入啮齿动物的总体积是 0.2ml(并且对于小鼠优选不超过

0.1ml)。其一半将是抗原而另一半是佐剂，因此所述抗原应当是足够浓度的从而在以 0.1ml 或 0.05ml 的最大值注射时提供所需的毫克数。

包括用于参考的是以下的方案：

兔免疫法方案

如果需要，可以采集预先免疫的血清。兔子通常以 4 周间隔来注射。注射可以是不少于两周和不超过 8 周。可以将五次注射的最大值一起给予，并且理想地，所述操作应当在 6 个月内完成。血样通常是在第三次注射之后采集以评估免疫状态。

在所述操作结束时，通常将兔子处死并放血取血清。选择性地，可以将所述动物放血至所允许的最大值，然后释放。最通常所用的佐剂是弗氏佐剂 (Freunds) (全部用于首次注射，随后部分地用于剩余的注射)。如果愿意，可以使用较少刺激的佐剂(或者根本没有刺激) 来代替。

抗原和佐剂通常在注射前就地混合。理想地应当将用于至少四次注射(并且优选五次)的足够抗原在操作开始时补充。应当允许的是，高达 20% 的抗原可能在混合时损失。通常地每次将不超过 0.5ml 的总体积注射进入每只动物。其一半是抗原，另一半是佐剂。因此所述抗原应当是足够浓度的从而在以 0.25ml 的最大值注射时提供所需的毫克数。

蛋白质印迹方案

将所述抗体的蛋白质印迹用于探测图 6 的原始 ECD 肽的印记，在带有大小标记的双道中电泳。抗体 1 和 2 清楚地显示了结合至所期望的 14KDa 大小处的蛋白带。抗体 3 在相同的大小下显示了非常强的结合，同时在此实验中 AB4 是未检测到的。

蛋白制备

(基于蛋白提取产率(根据 Bradford 测定法来测定))

所使用的蛋白是 RAMP ECD。向微量管中加入 10 μ l 的 Laemlli 缓冲液。加入 DTT(总体积为 5%)。将含有 100 - 150 μ g 蛋白的蛋白样本体积与其他试剂一起加入微量管中。然后将所述微量管在 70 $^{\circ}$ C 下加热 2 分钟，然后放置在冰上。

分离

使用 15% 的丙烯酰胺凝胶。

根据以下配方制备电泳缓冲液：

电泳缓冲液：

Tris 碱 60.55

甘氨酸 288.27 g

SDS 20 g dH₂O -补足至 2L。

将凝胶放置入放在水槽内的电极室中，并用电泳缓冲液淹没。然后使所述凝胶保持 20 分钟。将所述样品装入泳道并在 200v 下凝胶电泳 10 分钟。

转移

滤纸(通常是层析用纸) 为大约 7 x 20 cm 的片并且将 vPVDF 膜切割成 7 x 20 cm。将所述 PVDF 膜使用 100% 甲醇预湿润 10 秒钟，并浸入 dH₂O。将所述过滤垫在包含以下成分的转移缓冲液中浸湿：

转移缓冲液

Tris 碱 12.11 g

甘氨酸 57.65 g

甲醇- 100 ml dH₂O -补足至 4L

根据试剂盒说明书来组装所述夹层膜。将所述夹层膜置于转移器中并在转移槽中充满转移缓冲液。

将冷却块从-20℃的储藏室中取出并且放置进入所述转移装置中。在 100 V 下凝胶电泳 1 小时。

探测 PDVF

将所述印记在 5% 牛奶中阻断 1 小时。将所述抗-RAMP-3 ECD 的抗体在 5% 牛奶中稀释 1:100 并且在使用 PBS 5% Tween-20 洗涤 3x5 分钟之前与印记孵育整夜。加入在 5% 牛奶中 1:1000 稀释的第二抗体 HRP 抗小鼠，并孵育 1 小时。在 PBS 5% Tween-20 中进一步洗涤 3x5 分钟，接着用水洗 3x5 分钟。

为了将所述印记成像，将 ECL 溶液加入所述印记中，确保两边均浸透。(ECL 可购自 Santa Cruz)。使用来自于 Amersham Biosciences 的照相膜来显示所述印记。

抗体阻断潜力

进行抗体结合至 RAMP 能力的检测分析以测定抗体的阻断潜力：

·将人 MG63 骨肉瘤细胞用 10pmol 的 AM 来处理并测量 cAMP 的应答(方法如上面说明地，例如使用 cAMP 荧光极化(FP) Biotrak 免疫测定法(Amersham Biosciences))。(如果检测 RAMP-1 试剂，此分析还可以使用 CGRP 作为配体来进行，以检测所述试剂的阻断能力)

·将所述细胞使用抗体预处理 1 小时。

· 使用 EC_{50} 剂量的 AM(10pmol)并且测量 cAMP 应答。

将所述多克隆用于测试其调节肾上腺髓质素增加人 MG63 骨肉瘤细胞中环腺苷酸作用的能力。所有经检测的多克隆抗体均降低了肾上腺髓质素对于 cAMP 生成的作用。图 12 中所示的结果表明所产生的抗 RAMP-3 的多克隆抗体抑制 MG63 细胞的 cAMP 至少 15% 的产生。

单克隆抗体的制备

尽管抗体 4 给出了最高的抑制率，因为其未在所述蛋白质印迹中看见并且因为 AB3 的结合曲线是在低稀释度时更强，使用第三只小鼠来制备单克隆抗体。用于制备单克隆抗体的方法是由 Kohler 和 Milstein 在 Nature 256, 495-497 (1975)中披露，还由 Donillard 和 Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas", Compendium of Immunology, 第 V.II 版, Schwartz 出版, 1981 中披露，上述文献在此引入作为参考。

进行所述克隆的筛选并且基于不结合至所述肽上的 GST 标记，从大约 1000 个克隆中选择出 576 个。从这些克隆中获得 ELISA 数据并选择最好的 5 个用于进一步的研究。

抗体功能

检测五个单克隆抗体对于 AM 功能的作用。使用 MTT 测定法来测定 SW-13 细胞的增殖/存活(测定的细节参见 www.lqcpromochem-atcc.com)。使用以下的方案：

培养基

DMEM

20% FCS

5% 抗生素/抗有丝分裂试剂

5% 丙酮酸钠

将所述细胞以 1×10^6 置于 96 孔平板中，每孔中使用 50 μ l 的培养基。在此方法中使用 SW-13 细胞(人肾上腺皮质的肾上腺癌 (adrenocarcinoma) 细胞系)。在每孔中以 1:50 的稀释度施加抗体并孵育过夜。

将 10 μ l MTT 试剂加入各个孔且随后孵育约 2-4 小时直至可见紫色沉淀。加入 100 μ l 洗涤试剂以裂解细胞和溶解所述沉淀，并且随后在室温下避光 2 小时。使用 ELISA 平板读数器在 570 nm 下记录吸光度。

所产生的各个单克隆抗体引起抑制范围为 12-45% 的增殖，参见图 13。(1:50 的浓度等同于约 5 毫微克/孔的最终浓度)。

本发明还包括以下段落的主题:

1、一种调节多肽对于降钙素受体样受体(CRLR)功能的作用的试剂,其中所述多肽选自:

i) 多肽或其变体,由图1、2或3所示的核酸序列组成的核酸分子来编码;

ii) 多肽,由在严谨条件下杂交至如上(i)中所定义的核酸分子上并且调节CRLR功能的所述核酸分子来编码;和

iii) 含有核酸的多肽,所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中定义的核酸序列是简并的,

其特征在于所述试剂是用作药物。

2、1段的试剂,其中所述试剂是拮抗剂。

3、1段的试剂,其中所述试剂是激动剂。

4、1段的试剂,其中所述试剂是多肽。

5、1段的试剂,其中所述试剂是含有如图4、5或6中所示的氨基酸序列的多肽或其变体。

6、5段的试剂,其中所述的含有如图4、5或6中所示的氨基酸序列的多肽片段包含如图4、5或6所示的氨基酸序列的N-末端的含有1-30个氨基酸的片段。

7、5段的试剂,其中含有如图4、5或6中所示的氨基酸序列的多肽片段包含由选自图7、8或9的氨基酸序列所组成的片段。

8、5段的试剂,其中所述试剂提供有可检测的标记。

9、1段的试剂,其中所述试剂是抗体或者抗体的活性结合部分。

10、9段的试剂,其中所述抗体是单克隆抗体或其活性结合部分。

11、9段的试剂,其中所述抗体是嵌合抗体。

12、9段的试剂,其中所述抗体是由重组方法产生的人源化抗体,含有所述抗体的可变区和人抗体的非可变区或恒定区。

13、9段的试剂,其中所述抗体是抗体片段。

14、13段的试剂,其中所述抗体片段是单链抗体可变区片段。

15、9-14段任一段的试剂,其中所述抗体是提供可检测的标记。

16、9-14段任一段的试剂,其中所述抗体或抗体片段结合化疗剂或交联化疗剂。

17、1段的试剂,其中所述试剂是核酸分子。

18、17段的试剂,其中所述核酸是反义核酸、适配子或小型干扰性RNA。

19、一种药物组合物,含有前述任意一段的试剂以及佐剂或药学上可接受的载体。

20、一种用作疫苗的药物组合物,含有选自如下的核酸分子:

i) 含有如图4、5或6中所示的核酸序列的全部或部分的核酸分子;

ii) 在严谨杂交条件下杂交至以上(i)中的核酸分子上并编码多肽的核酸分子,其中该多肽调节CRLR的功能。

21、20段中的组合物,其中所述核酸分子含有图4、7、8或9中所示的核酸序列。

22、一种适于表达11段的嵌合抗体或12段的人源化抗体的载体。

23、一种已经由22段的载体转化或转染的细胞。

24、一种制备11段的嵌合抗体或12段的人源化抗体的方法,所述方法包括:

iii) 提供经载体转化或转染的细胞,所述载体含有编码人源化抗体或嵌合抗体的核酸分子;

iv) 在有助于制备该抗体的条件下生长所述细胞;和

v) 从该细胞中或抗体的生长环境中纯化该抗体。

25、一种产生10段的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

26、一种使用25段的杂交瘤细胞系来生产25段的单克隆抗体的方法。

27、一种制备生产10段的单克隆抗体的杂交瘤细胞系的方法,所述方法包括以下步骤:

i) 用含有至少一种多肽的免疫原来免疫免疫活性哺乳动物,所述多肽具有如图4、5或6所示的氨基酸序列或者在此定义的其片段或变体;

ii) 用骨髓瘤细胞来融合被免疫的免疫活性哺乳动物的淋巴细胞以形成杂交瘤细胞;

iii) 筛选由步骤(ii)的杂交瘤细胞产生的单克隆抗体结合至(i)的多肽的活性;

iv) 培养所述杂交瘤细胞以增殖和/或分泌所述单克隆抗体;和

v) 从所述培养物上清液中回收所述单克隆抗体。

28、27段的方法,其中(i)中的多肽含有选自图7、8或9中所示的那些氨基酸序列。

29、一种用于在受试者中确定癌症的诊断分析方法,所述方法包括以下

步骤:

iii) 提供分离的细胞样品;

iv) 用结合试剂接触(i)中的样品, 所述结合试剂结合至编码含有如图 1、2 或 3 中氨基酸序列所示多肽的核酸分子, 或其片段或变体, 或在严谨杂交条件下杂交至该核酸分子并且编码含有如图 1、2 或 3 中所示氨基酸序列的变体多肽的核酸分子; 和

v) 当与正常配对的对照样品相比较时, 测定该样品中该核酸分子的表达。

30、29 段的分析方法, 其中结合试剂是寡核苷酸引物。

31、30 段的分析方法, 其中分析方法是聚合酶链反应。

32、29 段的分析方法, 其中结合试剂是特异地结合图 1、2 或 3 中氨基酸序列表示的该多肽的抗体。

33、一种筛选调节多肽活性的试剂的方法, 所述多肽由选自如下的核酸分子编码:

a) 核酸分子, 由如图 1、2 或 3 所示的核酸序列组成;

b) 核酸分子, 在严谨杂交条件下杂交至以上(i)中的核酸分子上并调节 CRLR 功能;

i) 形成含有多肽或其序列变体的制剂, 并将至少一种制剂用于检测;

ii) 测定该试剂与该多肽活性有关的活性。

34、多肽在鉴定调节 CRLR 功能的试剂中的应用, 所述多肽选自:

i) 多肽或其变体, 由图 1、2 或 3 所示核酸序列组成的核酸分子编码;

ii) 由核酸分子编码的多肽, 所述核酸分子在严谨条件下杂交至如以上(i)所定义的核酸分子并且调节 CRLR 的功能; 和

iii) 含有核酸的多肽, 所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中所定义的核酸序列是简并的。

35、CRLR 在鉴定调节 CRLR 和多肽相互作用的试剂中的应用, 所述多肽选自:

i) 多肽或其变体, 由图 1、2 或 3 所示核酸序列组成的核酸分子编码;

ii) 由核酸分子编码的多肽, 所述核酸分子在严谨条件下杂交至如以上(i)定义的核酸分子上并且调节 CRLR 功能; 和

iii) 含有核酸的多肽, 所述核酸由于遗传密码而与(i)和(ii)中所定义的核酸序列是简并的。

36、1-18 段中任一段的试剂或 21 段中的任一组合物作为药物的应用。

37、一种在受试者中治疗癌症的方法，所述方法包括给予有效量的 1-18 段中任一段的试剂。

38、一种对动物免疫抗癌的方法，所述方法包括给予有效量的 20 或 21 段的组合物。

39、一种在受试者中治疗骨质疏松症的方法，所述方法包括给予有效量的 1-18 段中任一段的试剂。

40、一种在受试者中治疗肥胖症的方法，所述方法包括给予有效量的 1-18 段中任一段的试剂。

41、一种在受试者中治疗炎性障碍的方法，所述方法包括给予有效量的 1-18 段中任一段的试剂。

42、41 段的方法，其中所述炎性障碍选自动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、骨性关节炎和多关节炎。

43、一种在受试者中治疗创伤的方法，所述方法包括给予有效量的 1-18 段中任一段的试剂。

DNA

CGAGCGEACT CGACTCGGCA CCGCTGTGCA CCATGGCCCG GGCCCTGTGC CGCCTCCCGC
 GGGCGGSCCT CTGGCTGCTC CTGGCCCATC ACCTCTTCAT GACCACTGCC TGCCAGGAGG
 CTAACTACGG TGCCCTCCTC CGGGAGCTCT GCCTCACCCA GTTCASSTA GACATGGAGG
 CCCTCGGGGA GACGCTGTGG TGTGACTGGG GCAGGACCAT CAGGAGCTAC AGGGAGCTGG
 CCGACTGCAC CTGGCACATG GCGGAGAAGC TGGGCTGCTT CTGGCCCAAT GCAGAGGTGG
 CAGGTTCTT CCTGGCAGTG CATGEGCGCT ACTTCAGGAG CTGCCCCATC TCAGGCAGGG
 CCGTGCGGGA CCCGCCCCGC AGCATCCTCT ACCCCTTCAT CGTGGTCCCC ATCACGGTGA
 CCTTGCTGST GACGGCACTG GTGGTCTGGC AGAGCAAGCG CACTGAGGGC APTGTGTAGG
 CGGGGCCCCAG GCTGCCCGCG GGTGCACCCA GGCTGCAGGG TGAGGCCAGG CAGGCCTGGG
 TAGGGGCAGC TTCTGGAGCC TTGGGACAGA GCAGGCCAC AATGCCCCC TTCTTCCAGC
 CAAGAAGAGC TCACAGGAGT CCAGAGTAGC CGAGGCTCTG GTATTAACCT GGAAGCCCC
 CTGGCTGGAG GCCACCGCCA CCTAGGAAG GGGGCAGGA CGTGACCTTG ACTTACCTCT
 GGAAAGGGTC CCAGCCTAGA CTGCTTACC CATAGCCACA TTTGTGGATG AGTGGTTTTGT
 GATTAAGG GATGTTCTT

蛋白质

MARALCRLPR RGLWLLLAHH LFMTTACQEA NYGALLRELC LTQFQVDMEA VGETLWCDWG
 RTIRSYRELA DCTWHMAEKL GCFWPNAEVD RFFLAVHGRY FRSCPISGRA VRDPPGSILY
 PFIVVPIIVT LLVTALVVWQ SKRTEGIV

图1

DNA

GGATATAGGC GCCCCACAC CCGGGCCCGG CTAAGCGCCG CCGCCGCTCC TCGCCTCCTT
GCTGCACGAT GGCTCGCTC CEGGTGAGC GCGCCGCGG CCGCGCTCTC CCTAGGACCC
GAGTCGGGCG GCCGGCAGCC GTCCGECTCC TCCTTCTGCT GGGCGCTGTC CTGAATCCCC
ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCCACCA CAGGCACACC AGGGTCAGAA GGGGGGACGG
TGAAGAACTA TSAGACAGCT GTCCAATTTT GCTGGAATCA TTATAAGGAT
CAAATGGATC CTATCGAAA GGATTGGTGC GACTGGGCCA TGATTAGCAG GCCTTATAGC
ACCTGCGAG ATTGCCTGGA GCACTTTGCA GAGTTGTTG ACCTGGGCTT CCCCAATCCC
TTGGCAGAGA GGATCATCTT TGAGACTCAC CAGATCCACT TTGCCAACTG CTCCTTGGTG
CAGCCCACCT TCTCTGACCC CCCAGAGGAT GFACTCCTGG CCATGATCAT AGCCCCATC
TGCCTCATCC CCTTCCTCAT CACTCTTGTG GTATGGAGGA GTAAAGACAG TGAGGCCCCAG
GCCTAGGGGG CACGAGCTTC TCAACAACCA TGTTACTCCA CTTCCCACC CCCACCAGGC
CTCCCTCCTC CCCTCCTACT CCCTTTTCTC ACTCTCATCC CCACCACAGA TCCCTGGATT
GCTGGGAATG GAAGCCAGGG TTGGGCATGG CACAAGTTCT GTAATCTTCA
AAATAAACT TTTTTTTGA

蛋白质

MASLRVERAG GPRLPRTVVG RFAAVRLLLL LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT FGSEGGTVKN
YETA VQFCWN HYKQMDPIE KDWCDWAMIS RPYSTLRDCL EHFALFDLG FPNPLAERII
EETHQIEFAN CSLVQPTFSD PFEDVLLAMI IAPICLIPFL ITLVVWRSKD SEAQA

图2

DNA

GAGCGTGACC CAGCTGCGGC CGGCCAGCCA TGGAGACTGG AGCGGTGCGG CGCCCGCAAC
 TTCTCCCGTT GCTGCTGCTG CTCTGCGGTG GGTGTCCCAG AGCAGGCGGC TGCAACGAGA
 CAGGCATGTT GGAGAGGCTG CCCCTGTGTG GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG
 TGGACGTCTG GAAGTGGTGC AACCTGTCCG AGFTCATCGT GTACTATGAG AGTTTCACCA
 ACTGCACCGA GATGGAGGCC AATGTGCTGG GCTGCTACTG GCCCAACCCC CTGGGCCAGG
 GCTTCATCAC CGGCATCCAC AGGCAGTTCT TCTCCAATG CACCSTGGAC AGGFTCCACT
 TGGAGGACCC CCCAGACGAG GTTCTCATCC CGCTGATCGT TATACCCGTC GTTCTGACTG
 TCGCCATGGC TGGCCTGGTG GTGTGGCGCA GCAAACGCAC CGACACGCTG CTGTGAGGT
 CCCGGTGAGA TGGAGTGGGT CACACCTGGC AAGCTGGAAG AAAGTTCCCT GGGGATGGGA
 GATCGGGTGG GTGCTGCCAA TCTCCAGCTA CTGTGGCCAC ACCCCACCTG GTCATGGGCA
 GACCCCTCCC TTCCTGGGCT GACCTGCTCC CTCGAGGCCA GCCTGCTCCC TGGCTGAGGC
 TCAGGCTATC CGCCCAAGCT CTTTGCTCAT TCTAGGGCCA GTGGAGGAAA ATGTGATAAG
 GCCAGAGCTT GTGTGCTGGG CAAGAAATCA CCTGCTGCAT CCTGTGCTCC GCAGGCTGGG
 CCGGAAGCCT CTGCTGTCAG GTTTCTATGC TGTTCCTTAG CACAGAATCC AGCCTAGCCT
 TAGCCGCACT CTAGGCCCTG CTTGGAAGTAG GACTCCTTGC TTGACCCCAT CTCTGTTCC
 TGCCCTGGCT CCTGCACCAG CCCAGCTCC TGCCCTACATC CAGGCAGAAA TATAGGCAGG
 GGCTCTTGGG AGACGTTCCG TGCTGTGACC TCCGAGCCCT CCTGGTGGGA AGACAGCTGG
 AAAGGCTGGG AGCAGAAGGG AGGGGCTGGG GGTTCCCAGG AGCCATGCGT GGCTGCAGA
 GTCCATTCCA TCATGATGCT GTGCCCGCTA TGGGCTGTGT CCATGACCAG AGGCTGGAGT
 GGGGTTGTGT TATAGCCCT CACCGGGACT TGCTGTGCGG ATGGGGCCTG GGCTCCTTC
 CTACAGGGG TCCTCTGTGG GTGAGGGGCC CTCTGGAATG GCATCCCATG AGCTGTGGC
 CTCTATCTGC TACCATCTGT GTTTATCTG AGTAAAGTTA CCTACTTCT GG

蛋白质

METGALRRPQ LLPLLLLLCG GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS
 EFIVYYESFT NCTEMEANVV GCYWPNFLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPEDEVLI
 PLIVIPVVLV VAMAGLVVWR SKRTDTLL

图 3

RAMP1**DNA**

CTGCC TGCCAGGAGG CTAACIACGG TCCCTCCTC CCGGAGCTCT GCCTCACECA
GTTCCAGGTA GACATGGAGG CCGTCGGGGA GACGCTGTGG TGTGACTGGG GCAGGACCAT
CAGGAGCTAC AGGGAGCTGG CCGACTGCAC CTGGCACATG GCGGAGAAGC TGGGCTGCTT
CTGCCCCAAT GCAGAGGTGG CAGGTTCTT CCTGGCAGTG CATGGCCGGT ACTTCAGGAG
CTGCCCCATC TCAGGCAGGG CCGTCCGGGA CCCGCCGGC AGCAT

蛋白质

ACQEA NYGALLRELC LTQFQVDMEA VGETLWCDWG RTIRSYRELA DCTWHMAEKL
GCFWPNAEVD RFFLAVHGRY FRSCPISGRA VRDPPGSI

图4

RAMP2**DNA**

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTCCCACCA CAGGCACACC AGGGTCAGAA
GGGGGGACGG TGAAGAACTA TGAGACAGCT GTCCAATTTT GCTGGAATCA
TTATAAGGAT CAAATGGATC CTATCGAAAA GGATTGGTGC GACTGGGCCA TGATTAGCAG
GCCTTATAGC ACCCTGCGAG ATTGCCTGGA GCACTTTGCA GAGTIGTTTG ACCTGGGCTT
CCCCAATCCC TTGGCAGAGA GGATCATCTT TGAGACTCAC CAGATCCACT TTGCCAACTG
CTCCCTGGTG CAGCCCACCT TCTCTGACCC CCCAGAGGAT GTA

蛋白质

LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN YETAVQFCWN HYKDQMDPIE KDWCDWAMIS
RFYSTLRDCL EHFAELFDLG FPNPLAERII EETHQIHFAN CSLVQPTFSD PPEDVL

图5

RAMP3**DNA**

CAG AGCAGGCGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGCTG CCCCTGTGTG
GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGTCG GAAGTGGTGC AACCTGTCCG
AGTTCATCGT GTACTATGAG AGTTCACCA ACTGCACCGA GATGGAGGCC AATGTCGTGG
GCTGCTACTG GCCCAACCCC CTGGCCCAGG GCTTCATCAC CGGCATCCAC AGSCAGTTCT
TCTCCAACTG CACCGTGGAC AGGGTCCACT TGGAGGACCC CCCAGACGAG GTTCTCATCC
GGCTGATCGT TATACCCGTC GTTCTGACTG TCGCCATGGC TGGCCTGGTG GTG

蛋白质

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKCWNLK EFIVYYESFT NCTEMEANVV
GCYWFNPLAQ GFTTGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEV

图6

(A)
1-50

DNA

CTGCC TGCCAGGAGG CTA ACTACGG TGCCCTCCTCCGGGAGCTCT
GCCTCACCCAGTTCAGGTAGACATGGAGGCCGTCGGGGAGACGCTGTGG
TGTGACTGGG GCAGGACCAT CAGGAGCTACAGGGAGCTGG
CCGACTGCACCTGGC

蛋白质

ACQEANYGALLRELCLTQFQVDMEAVGETLWCDWGR TIRSYRELADCTWH

(B)
1-30

DNA

CTGCC TGCCAGGAGG CTA ACTACGG TGCCCTCCTC CGGGAGCTCT
GCCTCACCCA GTTCCAGGTA GACATGGAGG CCGTCGGGGA GACGC

蛋白质

ACQEANYGALLRELCLTQFQVDMEAVGETL

(C)
1-20

DNA

CTGCC TGCCAGGAGG CTA ACTACGG TGCCCTCCTC CGGGAGCTCT
GCCTCACCCA GTTCC

蛋白质

ACQEANYGALLRELCLTQFQ

(D)
10-50

DNA

CCCTCCTC CGGGAGCTCT GCCTCACCCA GTTCCAGGTA GACATGGAGG
CCGTCGGGGA GACGCTGTGG TGTGACTGGG GCAGGACCAT CAGGAGCTAC
AGGGAGCTGG CCGACTGCAC CTGGC

图7

蛋白质

LRELCLTQFQVDMEAVGETLWCDWGR TIRSYRELADCTWH

(E)
20-50

DNA

TCCAGGTA GACATGGAGG CCGTCGGGGA GACGCTGTGG TGTGACTGGG
GCAGGACCAT CAGGAGCTAC AGGGAGCTGG CCGACTGCAC CTGGC

蛋白质

MEA VGETLWCDWG RTIRSYRELA DCTWHM

(F)
30-90

DNA

CGCTGTGG TGTGACTGGG GCAGGACCAT CAGGAGCTAC AGGGAGCTGG
CCGACTGCAC CTGGCACATG GCGGAGAAGC TGGGCTGCTT CTGGCCCAAT
GCAGAGGTGG CAGGTTCTT CCTGGCAGTG CATGGCCGCT ACTTCAGGAG
CTGCCCCATC TCAGGCAGGG CCGTGCGGGA CCCGCCCGGC AG

蛋白质

VGETLWCDWG RTIRSYRELA DCTWHMAEKL GCFWPNAEVD RFFLA VHGRY
FRSCPISGRA VRDPP

(G)
40-80

DNA

GGAGCTAC AGGGAGCTGG CCGACTGCAC CTGGCACATG GCGGAGAAGC
TGGGCTGCTT CTGGCCCAAT GCAGAGGTGG CAGGTTCTT CCTGGCAGTG
CATGGCCGCT ACTTCAGGAG CTGCCCC

蛋白质

RTIRSYRELA DCTWHMAEKL GCFWPNAEVD RFFLA VHGRY FRSCP

(H)
50-93

DNA

图7

GGCACATG GCGGAGAAGC TGGGCTGCTT CTGGCCCAAT GCAGAGGTGG
CAGGTCTT CCTGGCAGTG CATGGCCGCT ACTTCAGGAG CTGCCCCATC
TCAGGCAGGG CCGTGCGGGA CCCGCCCGGC AGCAT

蛋白质

AEKL GCFWPNAEVD RFFLA VHGRY FRSCPISGRA VRDPPGSI

图7

(A)

1-50

DNA

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCCACCA CAGGCACACC
AGGGTCAGAA GGGGGGACGG TGAAGAATA TGAGACAGCT GTCCAATTTT
GCTGGAATCA TTATAAGGAT CAAATGGATC CTATCGAAAA GGATTGGTGC
GAC

蛋白质

LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN YETA VQFCWN HYKDQMDPIE

(B)

1-30

DNA

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCCACCA CAGGCACACC
AGGGTCAGAA GGGGGGACGG TGAAGAATA TGAGACAGCT GTC

蛋白质

LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN

(C)

1-20

DNA

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCCACCA CAGGCACACC
AGGGTCAGAA GGG

蛋白质

LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT

(D)

10-50

DNA

CTTCCCACCA CAGGCACACC AGGGTCAGAA GGGGGGACGG TGAAGAATA
TGAGACAGCT GTCCAATTTT GCTGGAATCA TTATAAGGAT CAAATGGATC
CTATCGAAAA GGATTGGTGC GAC

蛋白质

LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN YETA VQFCWN HYKDQMDPIE

图 8

(E)
20-50
蛋白质
PGSEGGTVKN YETA VQFCWN HYKDQMDPIE

(F)
30-100
DNA
GTCCAATTTT GCTGGAATCA TTATAAGGAT CAAATGGATC CTATCGAAAA
GGATTGGTGC GACTGGGCCA TGATTAGCAG GCCTTATAGC ACCCTGCGAG
ATTGCCTGGA GCACTTTGCA GAGTTGTTTG ACCTGGGCTT CCCCAATCCC
TTGGCAGAGA GGATCATCTT TGAGACTCAC CAGATCCACT TTGCCAACTG
CTCCCTGGTG CAGC

蛋白质
YETA VQFCWN HYKDQMDPIE KDWCDWAMIS RPYSTLRDCL EHFAELFDLG
FPNPLAERII FETHQIHFAN

(G)
40-100
DNA
CAAATGGATC CTATCGAAAA GGATTGGTGC GACTGGGCCA TGATTAGCAG
GCCTTATAGC ACCCTGCGAG ATTGCCTGGA GCACTTTGCA GAGTTGTTTG
ACCTGGGCTT CCCCAATCCC TTGGCAGAGA GGATCATCTT TGAGACTCAC
CAGATCCACT TTGCCAACTG CTCCCTGGTG CAGC

蛋白质
HYKDQMDPIE KDWCDWAMIS RPYSTLRDCL EHFAELFDLG FPNPLAERII
FETHQIHFAN

(H)
50-100
DNA
GACTGGGCCA TGATTAGCAG GCCTTATAGC ACCCTGCGAG ATTGCCTGGA
GCACTTTGCA GAGTTGTTTG ACCTGGGCTT CCCCAATCCC TTGGCAGAGA
GGATCATCTT TGAGACTCAC CAGATCCACT TTGCCAACTG CTCCCTGGTG
CAGC

蛋白质
KDWCDWAMIS RPYSTLRDCL EHFAELFDLG FPNPLAERII FETHQIHFAN
CSLVQPTFSD

图8

(I)

60-100

DNA

ACCCTGCGAG ATTGCCTGGA GCACTTTGCA GAGTTGTTG ACCTGGGCTT
CCCCAATCCC TTGGCAGAGA GGATCATCTT TGAGACTCAC CAGATCCACT
TTGCCAACTG CTCCTGGTG CAGC

蛋白质

RPYSTLRDCL EHF AELFDLG FPNPLAERII FETHQIHFAN CSLVQPTFSD

(J)

70-100

DNA

GAGTTGTTG ACCTGGGCTT CCCCCAATCCC TTGGCAGAGA GGATCATCTT
TGAGACTCAC CAGATCCACT TTGCCAACTG CTCCTGGTG CAGC

蛋白质

EHFAELFDLG FPNPLAERII FETHQIHFAN

图8

(A)

1-50

DNA

CAG AGCAGGCGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGCTG
 CCCCTGTGTG GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGTCTG
 GAAGTGGTGC AACCTGTCCG AGTTCATCGT GTACTATGAG AGTTTCACCA
 ACTGCAC

蛋白质

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS EFIVYYESFT

(B)

1-40

DNA

CAG AGCAGGCGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGCTG
 CCCCTGTGTG GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGTCTG
 GAAGTGGTGC AACCTGTCCG AGTTCAT

蛋白质

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS

(C)

1-30

DNA

CAG AGCAGGCGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGCTG
 CCCCTGTGTG GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGT

蛋白质

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK

(D)

40-60

DNA

CATCGT GTACTATGAG AGTTTCACCA ACTGCACCGA GATGGAGGCC
 AATGTCGTGG GCTGCTA

蛋白质

EFIVYYESFT NCTEMEANVV

图9

(E)

50-70

CACCGA GATGGAGGCC AATGTCGTGG GCTGCTACTG GCCCAACCCC
CTGGCCCAGG GCTTCAT

蛋白质

NCTEMEANVV GCYWPNPLAQ

(F)

50-80

DNA

CACCGA GATGGAGGCC AATGTCGTGG GCTGCTACTG GCCCAACCCC
CTGGCCCAGG GCTTCATCAC CGGCATCCAC AGGCAGTT

蛋白质

NCTEMEANVV GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF

(G)

50-90

DNA

CACCGA GATGGAGGCC AATGTCGTGG GCTGCTACTG GCCCAACCCC
CTGGCCCAGG GCTTCATCAC CGGCATCCAC AGGCAGTTCT TCTCCAACCTG
CACCGTGGAC AGGGTCCA

蛋白质

NCTEMEANVV GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH

(H)

50-93

DNA

CACCGA GATGGAGGCC AATGTCGTGG GCTGCTACTG GCCCAACCCC
CTGGCCCAGG GCTTCATCAC CGGCATCCAC AGGCAGTTCT TCTCCAACCTG
CACCGTGGAC AGGGTCCACT TGGAGGACCC CCCAGACGAG GTTCTCATCC
CGCTGATCGT TATACCCGTC GTTCTGACTG TCGCCATGGC TGGCCTGGTG
GTG

蛋白质

NCTEMEANVV GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEV

图9

CRLR cDNA

```

gaacaacctc  tctctctcca  gcagagagtg  tcaoctcctg  ctttaggacc  atcaagctct
gctaactgaa  tctcatccta  attgcaggat  cacattgcaa  agctttcact  ctttcccacc
ttgcttggg  gtaaatctct  tctgcggaat  ctcagaaagt  aaagttccat  cctgagaata
tttcacaaag  aatttccotta  agagctggac  tgggtcttga  cccctgaatt  taagaaattc
ttaaagacaa  tgtcaaatat  gatccaagag  aaaatgtgat  ttgagctctg  agacaattgt
gcataatcgtc  taataataaa  aacccatact  agcctataga  aaacaatatt  tgaaagattg
ctaccactaa  aaagaaaact  actacaactt  gacaagactg  ctgcaaactt  caatttgtca
accacaactt  gacaagggtg  ctataaaaca  agattgctac  aacttctagt  ttatgttata
cagcatattt  ctttttggct  taatgatgga  gaaaaagtg  accctgtatt  ttctggttct
cttgcctttt  tttatgatc  ttgttacagc  agaattagaa  gagagtctct  aggactcaat
tcagttggga  gttactagaa  ataaaatcat  gacagotcaa  tatgaatgtt  accaaaagat
tatgcaagac  cccattcaac  aagcagaagg  cgtttactgc  aacagaacct  gggatggatg
gctctgctgg  aacgatgttg  cagcaggaac  tgaatcaatg  cagctctgcc  ctgattactt
tcaggacttt  gatccatcag  aaaaagttac  aaagatctgt  gaccaagatg  gaaactgggt
tagacatcca  gcaagcaaca  gaacatggac  aaattatacc  cagtgtaatg  ttaacaccca
cgagaaagtg  aagactgcac  taattttgtt  ttacotgacc  ataattggac  accgattgtc
tattgtaata  ctgettatat  cgttggcat  attcttttat  ttaagagcc  taagttgcca
aaggattacc  ttacacaaaa  atctgttctt  ctcatttgtt  tgaactctg  ttgtaacaat
cattcacctc  actgcagtgg  ocaacaacca  ggccttagta  gccacaaac  ctgttagttg
caaagtgtcc  cagttoattc  atctttacct  gatgggtgt  aattactttt  ggatgctctg
tgaaggcatt  tacctacaca  cactcattgt  ggtggccgtg  tttgcagaga  agcaacattt
aatgtggtat  tttttcttg  gctggggatt  tccactgatt  cctgcttcta  tacatgccat
tgotagaagc  ttatattaca  atgacaattg  ctggatcagt  tetgatacc  atctctctta
cattatccat  ggcccaattt  gtgctgcttt  actggtgaat  cttttttct  tgttaaatat
tgtaccgggt  ctcatcacca  agttaaaagt  tacacaccaa  gcggaatcca  atctgtacat
gaaagtgtg  agagctacte  ttatcttgg  gccattgctt  gccattgaat  ttgtgctgat
tccatggcga  cctgaaggaa  agattgcaga  gagggtatat  gactacatca  tgacatcct
tatgcacttc  caggtcttt  tggctcttac  cattttctgc  tcttttaatg  gagaggttca
agcaattctg  agaagaaact  ggaatcaata  caaaatccaa  tttgaaaca  gcttttccaa
ctcagaagct  cttcgtagt  cgtcttacac  agtgtcaaca  atcagtgatg  gtccaggtta
tagtcatgac  tgtcctagt  aacacttaaa  tggaaaaagc  atccatgata  ttgaaaatgt
tctctteaaa  ccagaaaatt  tatataattg  aaaatagaag  gatggtgtc  tcactgtttt
gtgcttctcc  taactcaagg  acttggacc  atgactctgt  agccagaaga  cttcaatatt
aatgactttt  ttgaatgtca  taagaagag  ccttcacatg  aaattagtag  tgtgttgata
agagtgtaac  atccagctct  atgtgggaaa  aagaaatcc  tggtttgtaa  tgtttgtcag
taaatactcc  cactatgcct  gatgtgacgc  tactaacctg  acatcaccaa  gtgtggaatt
ggagaaaagc  acaatcaact  tttctgagct  ggtgtaagcc  agttccagca  caccattgca
tgaattcaca  acaaatggc  tgtaaaaact  aacatacatg  ttggccatga  ttctaccctt
attgccccaa  gagaactagc  taaggtctat  aaacatgaag  ggaaattag  ctttttagtt
taaaactctt  tatcccatct  tgattggggc  agttgacttt  ttttttggcc  agagtgcctg
agtccftttt  gtaactacc  tctcaaatgg  acaataccag  aagtgaatta  tccctgctgg
ctttcttttc  tctatgaaaa  gcaactgagt  acaattgtta  tgatctactc  atttgctgac
acatcagtta  tatcttgtgg  catatccatt  gtggaaactg  gatgaacagg  atgtataata
tgcaatceta  cttctatctc  attaggaaaa  catcttagtt  gatgctaaa  aacacattgt
caacctcttc  ctgtcttacc  aaacagttgg  agggaattcc  tagctgtaa  tataaatttt
gtcccttcca  tttctactgt  ataacaat  tagcaatcat  tttatataaa  gaaaatcaat
gaaggatttc  ttattttctt  ggaattttgt  aaaaagaaat  tgtgaaaaat  gagcttgtaa
atactccatt  atttttttt  atagtctcaa  atcaaataca  tacaacctat  gtaattttta

```

图 10

```

aagcaaatat ataatgcaac aatgtgtgta tgttaatatc tgatactgta tctgggctga
tttttaaat azaatagagt ctggaatgct aaaaaaaaaa aaaa

```

CRLR 蛋白质

```

mekkctlyfi vilpffmilv faeleesped siqlgvtrnk lmtaqyecyq kimqdpicqa
egvycnrtdw gwlcwndvaa gtesmqlopd yfqdfpsek vtkicdqdn wfrhpasnr
wnrytqcnvn thekvktain ifylliighg lsiasllsl giffyfxsls cqritihknl
ffsvcnswv tilhitavan nqalvatnpv sckvsqfihl ylmgcnyfwm lcegiylhtl
ivvavfaekq hlmwyyfigw gfpilpacih alarslyynd nowissdihl lyiihgplca
alvnlffil nivrvlitkl kvthqaesnl ymkavratli lvpflgiefv lipwrpegki
aeevydyimh ilmhfqgllv stlfcffnge vqallrnwn gykiqfgnsf sseairsas
yvtvstsdgp gyshdcpseh lngksihdie nvlkpenly n

```

图 10

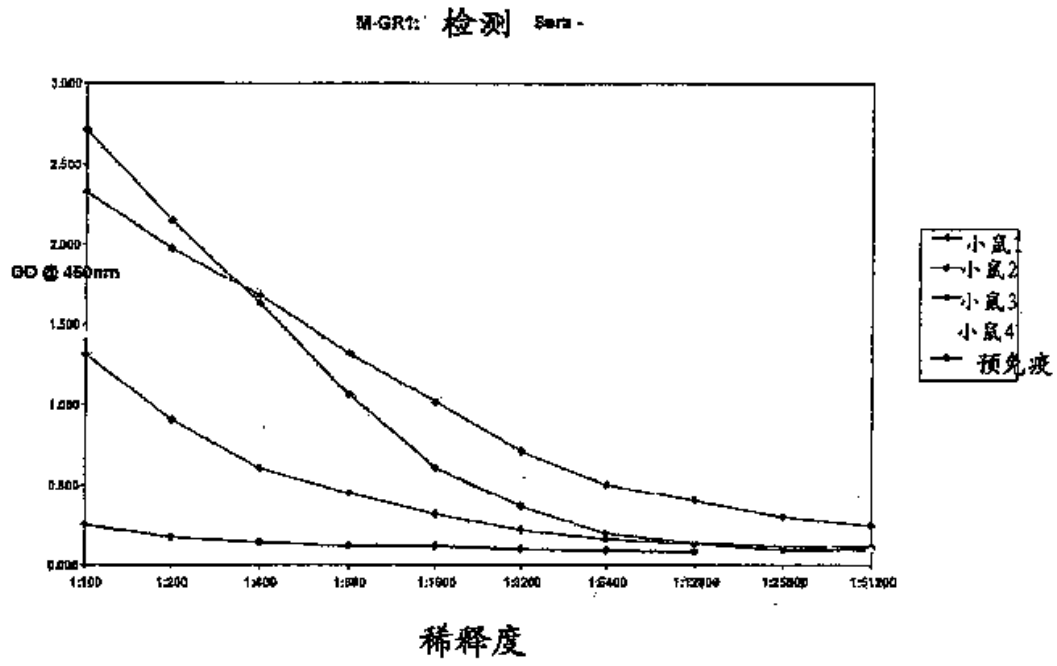


图 11

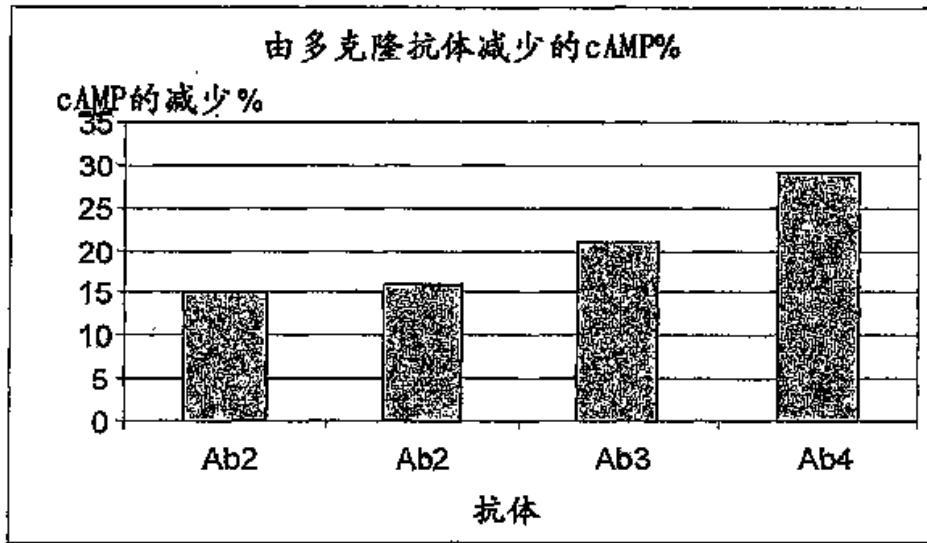


图12

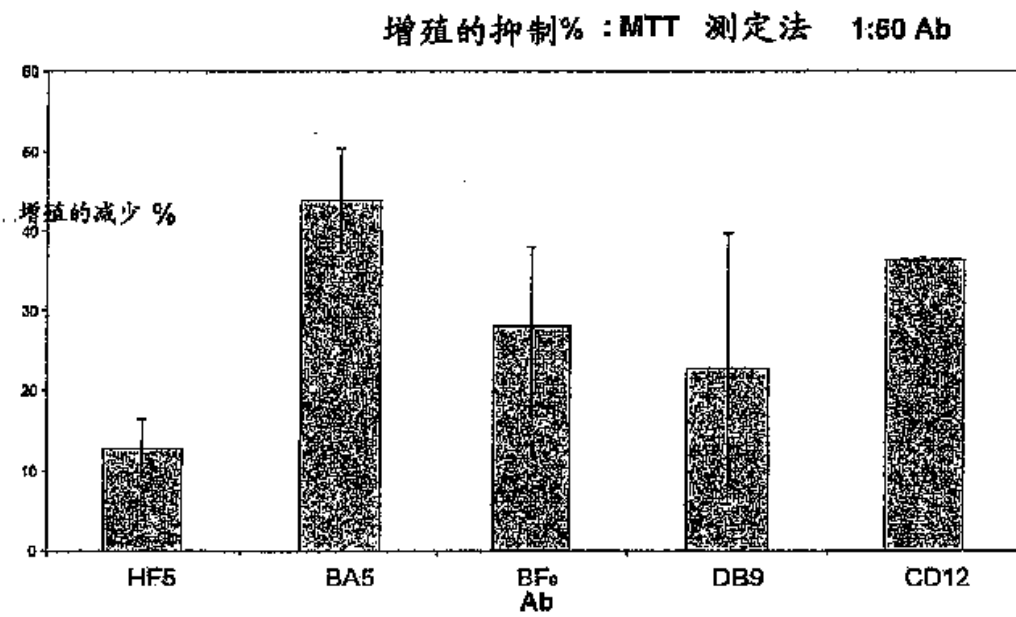


图 13

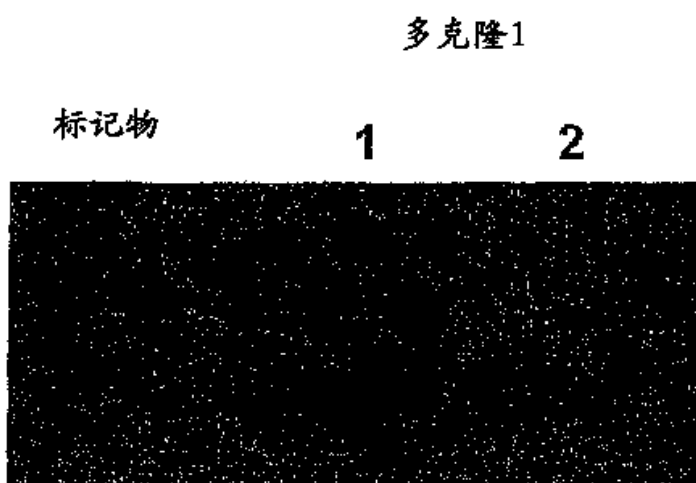


图14

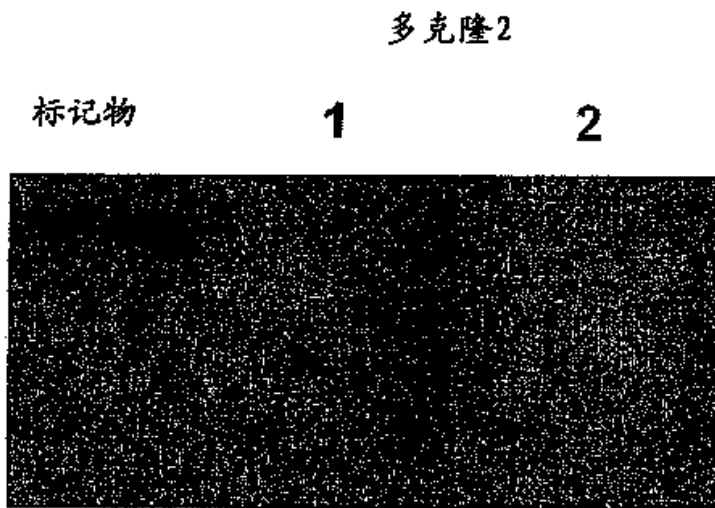


图15

多克隆3

1

2



图16

专利名称(译)	治疗试剂		
公开(公告)号	CN101341171A	公开(公告)日	2009-01-07
申请号	CN200680047784.7	申请日	2006-10-18
[标]发明人	TM斯凯瑞 GO理查兹		
发明人	T·M·斯凯瑞 G·O·理查兹		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 A61K39/395 C12Q1/68 G01N33/53 A61P3/04 A61P19/02 A61P35/00 A61P19/10 A61P9/04 A61P29/00 A61P9/00		
CPC分类号	A61K39/39558 A61K39/3955 C07K2317/76 C07K16/2869 A61P1/04 A61P11/00 A61P15/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/28 C07K2317/56 C07K2317/569		
代理人(译)	刘丹妮		
优先权	2005021139 2005-10-18 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及调节RAMP(受体活性修饰蛋白)蛋白对于降钙素受体样受体(CRLR)的作用的试剂。本发明中还包括这样的试剂的方法和用途，以及鉴定这样的试剂的测定方法。这里公开的试剂可以用于治疗例如癌症、肥胖以及其他障碍。

增殖的抑制%: MTT 测定法: 50 Ab

