

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-528821

(P2009-528821A)

(43) 公表日 平成21年8月13日(2009.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 Z	4 B O 2 4
C O 7 K 1/32 (2006.01)	C O 7 K 1/32	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-555840 (P2008-555840)  
 (86) (22) 出願日 平成19年2月23日 (2007.2.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月20日 (2008.8.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2007/000325  
 (87) 国際公開番号 W02007/096528  
 (87) 国際公開日 平成19年8月30日 (2007.8.30)  
 (31) 優先権主張番号 0601584  
 (32) 優先日 平成18年2月23日 (2006.2.23)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 506315103  
 コミッサリア ア レネルジ アトミック  
 COMMISSARIAT A L' EN  
 ERGIE ATOMIQUE  
 フランス、75015 パリ、リュ レブ  
 ラン イムーブル<レ ポナント ディー  
 >、25  
 25, rue Leblanc Imme  
 uble (Le Ponant D), 7  
 5015 PARIS, France  
 (74) 代理人 100065248  
 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルファ1 a アドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの特性を有するペプチド及びその使用

(57) 【要約】

a) 配列番号2の配列、及び配列番号2の配列全体と少なくとも70%同一性又は80%類似性を有する派生変異型からなる群より選択される配列；b) それぞれ1番目と3番目のシステイン、2番目と4番目のシステイン、5番目と6番目のシステイン、及び7番目と8番目のシステインの間の4つのジスルフィドブリッジにより連結された8つのシステイン残基を含むスリーフィンガー構造；並びにc) アルファ1aアドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性により特徴付けられるペプチド、並びにその治療的及び薬理学的使用。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ペプチドが、

a) 配列番号2の配列、及び配列番号2の全体の配列と少なくとも70%の同一性又は80%の類似性を有する派生変異型からなる群より選択される配列、

b) 1番目と3番目のシステイン、2番目と4番目のシステイン、5番目と6番目のシステイン、及び7番目と8番目のシステインのそれぞれの間の4つのジスルフィドブリッジにより連結された8つのシステイン残基を含むスリーフィンガー構造、及び

c) アルファ1a ( <sub>1a</sub> ) アドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性

により特徴付けられる、医薬として用いるためのペプチド。

**【請求項 2】**

配列番号3の配列を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

**【請求項 3】**

1番目のシステインがa)で定義される前記配列の1若しくは2位にあり、及び/又は8番目のシステインがa)で規定される前記配列の最後若しくは最後から2番目の位置にあることを特徴とする請求項1又は2に記載のペプチド。

**【請求項 4】**

ベクターが、転写及び任意に翻訳のための適切な調節配列の制御下に請求項1~3のいずれか1項で定義されるペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、医薬として用いるための発現ベクター。

**【請求項 5】**

請求項1~3のいずれか1項で定義される少なくとも1つのペプチド、又は請求項4で定義される1つのベクターと、医薬的に許容されるキャリアとを含むことを特徴とする医薬組成物。

**【請求項 6】**

請求項1~3のいずれか1項で定義される少なくとも1つのペプチド、又は請求項4で定義される1つのベクターの、尿生殖器若しくは心臓血管の病理又は癌の治療用の、アルファ1aアドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニスト活性を有する医薬の製造のための使用。

**【請求項 7】**

前記病理が、良性前立腺肥大、尿失禁、勃起障害、動脈性高血圧及び前立腺癌からなる群より選択されることを特徴とする請求項6に記載の使用。

**【請求項 8】**

アルファ1aアドレナリン受容体の研究用ツールとしての、請求項1~3のいずれか1項で定義されるペプチドの使用。

**【請求項 9】**

前記ペプチドが、配列番号2の配列の34位のリジンの他のアミノ酸への置換を含む配列番号2の配列の変異型であることを特徴とする請求項8に記載の使用。

**【請求項 10】**

34位のリジンが、アルギニン又はホモアルギニンで置換されていることを特徴とする請求項9に記載の使用。

**【請求項 11】**

前記ペプチドが、適切な標識に結合していることを特徴とする請求項8~10のいずれか1項に記載の使用。

**【請求項 12】**

前記研究が、アルファ1aアドレナリン受容体の組織発現プロファイルを決定することを特徴とする請求項8~11のいずれか1項に記載の使用。

**【請求項 13】**

請求項1~3及び9~11のいずれか1項で定義されるペプチドの、アルファ1aアドレナリン

10

20

30

40

50

受容体のアロステリックリガンドのスクリーニングのための使用。

【請求項 14】

少なくとも以下の：

- アルファ1aアドレナリン受容体を、試験分子のライブラリー及び請求項11で定義される標識ペプチドと接触させ、

- 任意の適切な手段により、前記ペプチドの前記受容体への結合に置き換わり得る分子を同定する

工程を含む、アルファ1aアドレナリン受容体のアロステリックリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項 15】

少なくとも以下の：

- 分析される細胞を、請求項11で定義される標識ペプチドと接触させ、

- 任意の適切な手段により、標識された細胞を検出する

工程を含む、インビトロ又はインビボでアルファ1aアドレナリン受容体を検出する方法。

【請求項 16】

少なくとも以下の：

a) アルファ1アドレナリン受容体を、請求項1～3及び9～11のいずれか1項で定義されるペプチドと、受容体/リガンド複合体を形成するような様式で接触させ、

b) a)で得られた複合体を、結晶が形成されるのに十分な条件下及び時間でインキュベートする

工程を含む、アルファ1アドレナリン受容体の結晶を製造する方法。

【請求項 17】

配列番号2の配列を有することを特徴とする単離ペプチド。

【請求項 18】

請求項9又は10で定義される単離ペプチド。

【請求項 19】

適切な標識に結合していることを特徴とする請求項17又は18に記載のペプチド。

【請求項 20】

受容体がアルファ1aアドレナリン受容体であり、ペプチドが請求項1～3及び9～11のいずれか1項で定義されるペプチドであることを特徴とする単離された受容体/リガンド複合体。

【請求項 21】

請求項17又は18に記載されるペプチドをコードすることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 22】

配列番号4の配列を有することを特徴とする請求項21に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 23】

請求項21又は22に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする組換えベクター。

【請求項 24】

請求項21若しくは22に記載のポリヌクレオチド、又は請求項23に記載のベクターで改変された細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルファ1aアドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性を有するペプチド、並びにその治療的及び薬理的な使用に関する。

【背景技術】

【0002】

従来のアドレナリン受容体(アドレナリン作用受容体又はAR)は、9つの薬理的に特徴付けられた受容体サブタイプに分類される：3つのアルファ1 (  $\alpha_1$  )アドレナリン作用受容

10

20

30

40

50

体：アルファ1a ( $\alpha_{1a}$ )、アルファ1b ( $\alpha_{1b}$ )、アルファ1d ( $\alpha_{1d}$ )；3つのアルファ2 ( $\alpha_2$ ) アドレナリン作用受容体：アルファ2a ( $\alpha_{2a}$ )、アルファ2b ( $\alpha_{2b}$ )、アルファ2c ( $\alpha_{2c}$ )、並びに3つのベータ ( $\beta$ ) アドレナリン作用受容体：ベータ1 ( $\beta_1$ )、ベータ2 ( $\beta_2$ )、ベータ3 ( $\beta_3$ )。全てカテコールアミン、アドレナリン及びノルアドレナリンにより活性化されるこれらの9つの受容体は、Gタンパク質への結合によるシグナル伝達を介して多様な生理的効果を生み出す。

#### 【0003】

アルファ1受容体は、特に、交感神経系のシナプス後位で発現され、それらの活性化は、それらの制御下にある平滑筋の収縮を導く。これらの受容体は、正常又は病理の状態の心臓血管及び尿生殖器において主要な役割を演じる(総説としてPiascikら, Pharmacol. Ther., 1996, 72, 215~241; Michelottiら, Pharmacology & Therapeutics, 2000, 88, 281~309を参照されたい)。さらに、男性及び女性の全ての尿生殖器の筋肉の緊張度(tonicity)は、アルファ1aサブタイプの活性化により主に制御されるが、静脈及び動脈のそれは、アルファ1b及びアルファ1dサブタイプの活性化により特に制御されることが示されている(Barrow J.C.ら, J. Med. Chem., 2000, 43, 2703~2718)。

10

#### 【0004】

結果として、アルファ1a受容体を遮断すると、排尿不全及び勃起障害の治療に用い得る、尿生殖路平滑筋の弛緩を得ることが可能になる(Morelandら, The Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 2004, 308, 797~804; Guilianoら, Progres en Urologie [Progress in Urology], 1997, 7, 24~33)。治療できる主要な病理は、以下のものである。

20

- 女性又は男性での尿路の機能的閉塞。40歳代から増加する、前立腺の大きさの通常の変化に相当する前立腺腫又は良性前立腺肥大(BPH)。年齢とともに頻度が増加する(70歳を超える男性の80%)前立腺の肥大は、排尿の問題の原因である尿道の実質的な閉塞を多少伴い得る。

この状態を治療するために、種々のアプローチが構想されている。それぞれの場合において、酵素(5- $\alpha$ -レダクターゼ)、トランスポーター(NET)、又はセロトニン、カンナビノイド、グルタメート、カルシウム若しくはアドレナリンに感受性の受容体の機能を遮断することを含む。しかし、最良の結果は、アルファ1アドレナリン受容体を遮断したときに得られている。これは、これらの受容体の遮断が、平滑筋の弛緩及び正常な尿の流れを可能にするからである。

30

#### 【0005】

- 失禁：失禁は、尿路の保持強度(retention strength)よりも高い膀胱からの圧力によると考えられる。アルファ1aアドレナリン作用受容体の遮断は、膀胱圧の低下を可能にするだろう。

- 勃起障害：いくつかの勃起の問題は、陰核海綿体の灌流を促進するために、アルファ1aアドレナリン作用受容体の活性を阻害することにより治療できる。

#### 【0006】

さらに、アルファ1aアドレナリン作用受容体の遮断は、前立腺腫瘍の予防及び治癒の効果をも有するであろうことが示唆されている(欧州特許EP 0 799 618号及びEP 0 799 619号、Thebaultら, The J. Clin. Invest., 2003, 111, 1691~1701)。

40

尿生殖器でのアルファ1aアドレナリン作用受容体の活性を低下させるために、現在、2つのクラスの分子が利用可能である。

- アルファ1アドレナリン受容体アンタゴニスト

アルファ1アドレナリン受容体のオルトステリック(orthosteric)部位に特異的に結合する多くの競合的アドレナリンアンタゴニストが同定されている：キナゾリン(プラゾシン、テトラゾシン、アルフソジン、ドキサゾシン)、ピペラジン(RWJ-38063、RWJ-68141、RWJ-68157、RWJ 69736)、フェニルアルキルアミン(タムスロシン、インドラミン)、及びシロドシン。しかし、KMD3213(シロドシン)を除くこれらの全ての分子は、これらがアルファ1aアドレナリン受容体サブタイプについてのいずれの選択性も有さないという事実に

50

より、有害副作用(低血圧)を引き起こす。KMD3213 (シロドシン)は、アルファ1aサブタイプに選択性を有する最初の競合的アンタゴニストである(Shibataら, *Mol. Pharmacol.*, 1995, 48-250~258)。この分子は、前立腺肥大の治療のための臨床フェーズにある(*Drugs, R.D.*, 2004, 5, 50~51)。

【0007】

- アルファ1アドレナリン受容体のアロステリックモジュレーター

これらのアドレナリン作用受容体について現在知られているアロステリックモジュレーターは、アミロライド(Leppikら, *Mol. Pharmacol.*, 2000, 57, 436~445)、及びペプチド -TIAに代表されるロー-コノトキシン( -コノトキシン)のみである(Sharpeら, *Nature Neuroscience*, 2001, 4, 902~907; 欧州特許EP 1 117 681号)。アミロライドは、あまり特異的でなく、非常に高い濃度で活性である。 -TIAは、海のイモガイ*Conus tulipa*の毒液から抽出された、2つのジスルフィドブリッジにより架橋された19残基の天然ペプチドである(FNWRCCCLIPACRRNHKKFC; 配列番号1)。このペプチドは、1アドレナリン作用受容体に対して100 nM程度の親和性、及び血管の緊張度を制御する1bサブタイプに対して弱い選択性(10 nMの親和性)を有する。欧州特許EP 1 117 681号は、心臓血管(高血圧)及び泌尿器(前立腺肥大)の病理、疼痛及び炎症の予防及び治療のための -TIAペプチドの使用を構想する。

【0008】

アルファ1アドレナリン受容体のこれらの2つのアロステリックモジュレーターは、それぞれがアルファサブタイプに対する選択性を有さないので、血管(低血圧)に関して特に、有害副作用を生み出す傾向がある。

多くのニューロトキシンが、アフリカのマンバ、デンドロアスピス・アングスティセプス(*Dendroaspis angusticeps*) (グリーンマンバ)及びデンドロアスピス・ポリレプシス(*Dendroaspis polylepsis*) (ブラックマンバ)から単離されている(総説としてBradley, N; *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 85, 87~109; Jolkkonen M.ら, *Eur. J. Biochem.*, 1995, 234, 2, 579~85を参照されたい)。「スリーフィンガー毒素」ファミリー又は「コリン作動性毒素」ファミリーの毒素は、4つのジスルフィドブリッジ(システイン1と3、2と4、5と6、及び7と8の間:ブリッジ1-3, 2-4, 5-6 及び7-8)と、ループI、II及びIIIが手の3本の中央の指を形成し、ジスルフィドブリッジが手のひらを形成する特徴的なスリーフィンガー構造とを有する63~66アミノ酸のペプチドである。これらの毒素は、それらの活性に応じていくつかの群に分けられる:ムスカリン型アセチルコリン受容体に結合するムスカリン様毒素(MT)、ニコチン型シナプス後アセチルコリン受容体に結合するアルファ-ニューロトキシン( -ニューロトキシン)、及び非競合的アセチルコリンエステラーゼ阻害剤であるファシクリン(*fasciculins*)。さらに、これらの毒素の配列の系統発生的研究(Fryら, *J. Mol. Evol.*, 2003, 57, 110~129)は、これらの種々の官能基、特にムスカリン様毒素及びアルファ-ニューロトキシン(PCT国際出願WO 99/24055号)が、独特の配列に相当することを示す。

【0009】

6つのムスカリン様毒素が、デンドロアスピス・アングスティセプスから[MTX1 (MT1)、MTX2 (MT2)、MTX3 (MT3又はm4-tox)、MTX4 (MT4)、MTX5 (MT5)、MTX7 (MT7、m1-tox)]、そしてデンドロアスピス・ポリレプシスから2つ[MT-アルファ (MT )及びMT-ベータ(MT )]が単離されている。強い配列相同性にもかかわらず、これらのペプチドは、種々のムスカリン様受容体サブタイプとの相互作用の点での特異性と、独特の薬理学的効果とを有する。

【0010】

この特異性により、これらのペプチドは、いくつかのムスカリン様受容体サブタイプの生理的役割を決定するためのツールとして用いられている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

10

20

30

40

50

本発明者らは、デンドロアスピス・アングスティセプスの毒液から新しい毒素を単離した。AdTx1とよばれるこの毒素は、アルファ1aアドレナリン受容体に選択的に結合し、オルトステリックリガンドの親和性をアロステリックに減少する。

AdTx1は、65アミノ酸の配列を有する(配列番号2)：LTC<sub>1</sub>VTSKSI FGIITTEDC<sub>2</sub>PDGQNLC<sub>3</sub>FKRRH YVVPKIIYDSTRGC<sub>4</sub>AATC<sub>5</sub>PIPENYDSIHC<sub>6</sub>C<sub>7</sub>KTDKC<sub>8</sub>NE。

【0012】

AdTx1の構造は、コリン作動系に作用するスリーフィンガー毒素のファミリーの特徴である、3位と24位(システイン1と3：ブリッジ1-3)、17位と42位(システイン2と4：ブリッジ2-4)、46位と57位(システイン5と6：ブリッジ5-6)、及び58位と63位(システイン7と8：ブリッジ7-8)のシステイン間の4つのジスルフィドブリッジを含む。AdTx1の配列は、スリーフィンガー毒素ファミリーの中のムスカリン様毒素の群のいくつかの配列と非常に強い相同性を示す。

【0013】

【表1】

**表I: AdTx1 と、いくつかのスリーフィンガームスカリン様毒素との間の相同性**

ペプチド	アミノ酸の数	SwissProt アクセシ ョンNo.	同一性	類似性
MT-ベータ	65	P80495	96% (63/65)	96% (63/65)
相乗作用様毒液 タンパク質 CM- 3	65	P25518	95% (61/65)	96% (62/65)
MT3	65	P81031	81% (53/65)	89% (58/65)
ムスカリン様毒 素様タンパク質 2 (MTLP-2)	65	P82463	76% (49/65)	79% (51/65)
MT4	66	Q9PSN1	74% (49/66)	86% (57/66)
MT2	65	P18328	70% (46/75)	80% (52/65)
MT1	66	P81030	72% (48/66)	84% (56/66)
MT7	65	Q8QGRO	67% (44/65)	78% (51/65)
MT-アルファ	66	P80494	71% (47/66)	83% (55/66)

【0014】

この新たな毒素は、アルファ1aアドレナリン受容体のアロステリックなアンタゴニストの特性により特徴付けられる、スリーフィンガームスカリン様毒素の群のペプチドのサブグループを規定する。さらに、アルファ1aアドレナリン受容体のアロステリックアンタゴニストのこの特性は新しく、従来技術に記載されるスリーフィンガームスカリン様毒素の特性に、明らかに従っていない。

【課題を解決するための手段】

【0015】

10

20

30

40

50

よって、本発明は、医薬として用いるためのペプチドに関し、該ペプチドは：

- a) 配列番号2の配列、及び配列番号2の全体の配列と少なくとも70%の同一性又は80%の類似性を有する派生変異型からなる群より選択される配列、  
 b) 1と3、2と4、5と6、及び7と8 (ブリッジ1-3、2-4、5-6及び7-8)のシステインのそれぞれの間の4つのジスルフィドブリッジにより連結された、8つのシステイン残基を含むスリーフィンガー構造(システイン1~8)、並びに  
 c) アルファ1a (  $\alpha_1$ ) アドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性を特徴とする。

【0016】

本発明において規定されるペプチドは、アルファ1aアドレナリン受容体サブタイプに対するそれらの選択性のために、アルファ1aアドレナリン受容体を特に遮断し得る。さらに、阻害剤(競合的アンタゴニスト)とは違って、これらは、アゴニスト親和性のモジュレーターとして作用する。このようなモジュレーターは、受容体の機能を遮断せずに、それらの天然のアゴニストにより活性化されたときにこれらの受容体の応答を調節するだけであるという利点を有する。この調節は、競合的アンタゴニストを用いるよりも簡単に制御されるようである。さらに、アロステリックアンタゴニストの大規模な使用の間にプラトー効果がなく、このことは、よって、毒性効果の可能性を低下させる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

定義：

- 本発明の目的のために、用語「スリーフィンガー構造」とは、上記で定義されるスリーフィンガー毒素のファミリーに特徴的な構造を意味することを意図し、該構造は4つのジスルフィドブリッジ(ブリッジ1-3、2-4、5-6、7-8)により維持される3つのループ(ループI、II、III)を含む。

【0018】

- 参照配列としての配列番号2の配列に関する配列の同一性は、2つの配列を、それらの間で最大の一致が得られるように整列させたときに、同一であるアミノ酸残基のパーセンテージに従って評価される。

パーセンテージ同一性は、例えばBLASTシリーズ(Altschulら, NAR, 1997, 25, 3389~3402)のもののような配列比較コンピュータプログラムを用いて、当業者により算出され得る。

BLASTプログラムは、参照配列として示される配列番号2全体からなる比較ウィンドウについて用いられる。

【0019】

参照配列と少なくともX%の同一性を有するアミノ酸配列を有するペプチドは、本発明において、その配列が参照配列の100アミノ酸あたり100-X個までの変更を含み得るが、同時に、該参照ペプチドの機能的特性を保持している(この場合、アルファ1aアドレナリン受容体サブタイプに選択的なアンタゴニストの活性の点で)ペプチドとして定義される。本発明の目的のために、用語「変更」は、参照配列中のアミノ酸の連続的又は散在する欠失、置換又は挿入を含む。この定義は、ヌクレオチド配列についても同様に当てはまる。

【0020】

参照配列に関する配列の類似性は、2つの配列を、それらの間で最大の一致が得られるように整列させたときに、同一であるか又は同類置換により異なるアミノ酸残基のパーセンテージに従って評価される。本発明の目的のために、用語「同類置換」とは、類似の化学的又は物理的特性(サイズ、電荷又は極性)を有する別のアミノ酸とのあるアミノ酸の置換を意味することを意図し、これは、通常、ペプチドの機能的特性を修飾しない。

【0021】

参照配列と少なくともX%の類似性を有するアミノ酸配列を有するペプチドは、本発明において、その配列が参照配列の100アミノ酸あたり100-X個までの非同類変更を含み得るべ

10

20

30

40

50

プチドとして定義される。本発明の目的のために、用語「非同類変更」は、参照配列中のアミノ酸の連続的又は散在する欠失、非同類置換又は挿入を含む。

【0022】

- 本発明の目的のために、「アルファ1aアドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニスト」の表現は、アルファ1aアドレナリン受容体に選択的に結合し、該受容体についてのオルトステリックリガンドの親和性をアロステリックに減少させ得るペプチドを意味する。

【0023】

従来の命名法によると、オルトステリック部位は、受容体の内因性アゴニスト(アルファ1aアドレナリン受容体の場合のアドレナリン)についての結合部位である。この部位は、いくつかのアンタゴニスト(アルファ1aアドレナリン受容体の場合のプラゾシン)についての結合部位でもある。アロステリック調節とは、受容体が、2つの位置的に異なる結合部位により、2つのリガンドに同時に結合し得ることを意味する；オルトステリックリガンドはオルトステリック部位に結合し、モジュレーターは別の部位(アロステリック部位)に結合する。2つの結合部位は、部位1へのリガンドの結合が部位2の構造の邪魔をして、部位2自体のリガンドに対するその親和性を修飾するような程度に、構造的に連結している。

10

【0024】

本発明による調節ペプチドの場合、アルファ1aアドレナリン受容体へのペプチドの結合は、受容体への特異的アンタゴニスト、例えばプラゾシンの親和性を減少させ、その逆もある。

20

【0025】

アルファ1aアドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性は、当業者に知られる任意の従来の方法により示し得る。

- 通常のリガンド/受容体結合アッセイにより、アロステリックリガンド(ペプチド)の存在下でオルトステリックリガンド(プラゾシン)の結合を測定することによる。ペプチドの濃度を増加させることにより、アルファ1aアドレナリン受容体へのオルトステリックリガンドの結合が置き換わることは、ペプチドがアルファ1aアドレナリン受容体の阻害剤であることを示す。完全な置き換えがないことは、アロステリック調節を示す。アルファ1アドレナリン受容体への選択性は、他のアドレナリン受容体サブタイプ(アルファ1b、アルファ1d)及びタイプ(アルファ2、ベータ)の存在下での結合アッセイにより示される。

30

【0026】

- Ellis J.及びSeidenberg M, Mol. Pharmacol., 2000, 58: 1451~1460に記載される原理に従って、アロステリックリガンドの存在下で、標識されたオルトステリックリガンド/受容体複合体の解離の動態を測定することによる。

【0027】

- そのアンタゴニストの性質を示すために、真核細胞で発現されたアルファ1a受容体の活性化の阻害を測定することによる。アドレナリン受容体、例えばアルファ1aを発現する例えばCOS又はHEKタイプの真核細胞は、例えばアドレナリンによる受容体の活性化の間に、サイトソルにカルシウムを放出する能力を有する。よって、アドレナリンがそのオルトステリック部位に結合すると、受容体が活性化される。これは、細胞質Gタンパク質に結合可能になるために、構造を変化させる。この結合が、とりわけ、ジアシルグリセロール及びイノシトール3リン酸(IP3)の合成を可能にする事象のカスケードを導く。IP3受容体に結合することにより、IP3は、サイトソルへのカルシウムの放出を可能にする。このカルシウム濃度の変動を蛍光により追跡する。この方法により、生成物のアゴニスト又はアンタゴニストとしての性質を示すことが可能になる。

40

【0028】

本発明は、アルファ1aアドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性を有する天然、合成又は組換えペプチドの使用を包含する。

本発明は、特に、配列番号2の配列の1又は複数のアミノ酸の変異(挿入、欠失、置換)に

50

より得られる変異型の使用を包含するが、但し、該変異型はアルファ1aアドレナリン受容体を選択的なアロステリックアンタゴニストの活性を保持する。

【0029】

本発明は、アミノ酸残基、ペプチド結合又はペプチドの末端のレベルでの任意の改変の導入により、上記のペプチドから誘導される改変ペプチドの使用も包含するが、但し、該改変ペプチドは、アルファ1aアドレナリン受容体を選択的なアロステリックアンタゴニストの活性を保持する。当業者に知られる従来の方法によりペプチドに導入されるこれらの改変は、限定されないが、以下のものを含む：天然アミノ酸の、非タンパク質構成アミノ酸(Dアミノ酸又はアミノ酸アナログ)での置換；反応性官能基、特に側鎖Rへの化学団(脂質、オリゴ糖又は多糖)の付加；ペプチド結合(-CO-NH-)の、特にレトロ若しくはレトロインバーソ型の結合(-NH-CO-)、又はペプチド結合ではない結合での改変；環化；該ペプチドの配列の、興味のあるペプチド又はタンパク質の配列(免疫検出のために興味があるエピトープ)との融合；ペプチドの精製に用い得る、特にプロテアーゼにより切断できる形でのタグ(特にビオチン、ペプチド、フラッグ)、蛍光タンパク質；適切な分子、特に標識、例えば蛍光色素への結合。これらの改変は、特に、安定性、より具体的にはタンパク質溶解への耐性、及び溶解性を増加すること、又は本発明によるペプチド又はアルファ1アドレナリン受容体のいずれかの精製若しくは検出を促進することを意図する。

10

【0030】

医薬的な使用のために、ペプチドは、その生理的特性を変更するため、特に生物におけるその半減期(グリコシル化：HAUBNER R.ら、J. Nucl. Med., 2001, 42, 326~36; PEGとのコンジュゲート：KIM TH.ら、Biomaterials, 2002, 23, 2311~7)、その溶解性(アルブミンとのハイブリッド形成：KOEHLER MF.ら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, 12, 2883~6)、そのプロテアーゼ耐性(非天然アミノ酸(例えばLコンホメーション))、及び/又はその腸吸収(Lienら、TIB, 2003, 21, 556~)を改善するために、当業者に公知の手段により改変されるのが有利である。

20

【0031】

用語「天然又は合成アミノ酸」は、タンパク質で一般的に見出される20個の天然アミノ酸(A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y及びV)、タンパク質ではほとんど遭遇しないアミノ酸(ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、メチルリジン、ジメチルリジンなど)、タンパク質に存在しないアミノ酸、例えば -アラニン、 -アミノ酪酸、ホモシステイン、オルニチン、シトルリン、カナバニン、ノルロイシン、シクロヘキシルアラニンなど、並びに上記のアミノ酸のエナンチオマー及びジアステレオマーを意味することを意図する。

30

【0032】

上記のペプチドの有利な実施形態によると、これは、MT-ベータ毒素(SWISSPROT P80495, 配列番号3)、蛇デンドロアスピス・ポリレプシス(ブラックマンバ)の毒液から抽出される天然ペプチドである。MT-ベータ及びAdTx1毒素の配列は、38位及び43位の残基で異なるだけであり、これらはそれぞれI<sub>38</sub>及びV<sub>43</sub> (MT-ベータ)、並びにS<sub>38</sub>及びA<sub>43</sub> (AdTx1)である。

【0033】

上記のペプチドの別の有利な実施形態によると、システイン1は、該ペプチドの配列の1番目又は2番目のアミノ酸残基であり、及び/又はシステイン8は、該ペプチドの配列の最後から2番目又は最後のアミノ酸残基である。このペプチドは、システイン1の上流又はシステイン8の下流に位置する少なくとも1つのN-及び/又はC-末端残基の欠失により、上記のペプチドから導かれた短縮(truncated)ペプチドを表す。

40

【0034】

本発明の主題は、医薬として用いるための発現ベクターでもあり、該ベクターは、上記で定義されるペプチドをコードするポリヌクレオチドを、転写及び任意に翻訳のための適切な調節配列の制御下に含む。

【0035】

50

本発明によると、上記のポリヌクレオチドの配列は、該ペプチドをコードするcDNAのものである。これは、特に、AdTx1をコードする配列番号4の配列である。上記の配列は、有利には、それが発現される宿主におけるコドン使用が最適になるように改変され得る。さらに、上記のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの異種配列に連結され得る。

「本発明で定義されるペプチドをコードする核酸配列に関して異種配列」との表現は、該ペプチドをコードする核酸配列に天然で隣接するもの以外の任意の核酸配列を意味する。

#### 【0036】

本発明によると、上記の組換えベクターは、転写及び任意に翻訳のために適する調節配列(プロモーター、エンハンサー、イントロン、開始コドン(ATG)、停止コドン、ポリアデニル化シグナル)の制御下に、上記で定義される少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む発現カセットを含む。

10

#### 【0037】

興味のある核酸分子を、それを真核若しくは原核宿主細胞に導入して維持するために、挿入できる多くのベクターが、それら自体で知られている。適切なベクターの選択は、該ベクターについて構想される使用(例えば、興味のある配列の複製、この配列の発現、染色体外の形でのこの配列の維持、又は宿主の染色体物質への組み込み)、及び宿主細胞の性質にも依存する。例えば、とりわけ、興味のある配列が予め挿入されたウイルスベクター、例えばアデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、AAV、及びバキュロウイルスを用い得る。該配列(単離されているか又はプラスミドベクターに挿入されている)は、それが宿主細胞膜を横切ることができる物質、例えばトランスポーター、例えばナノトランスポーター、又はリポソーム若しくはカチオン性ポリマーの調製物を伴っていてもよいか、又は該宿主細胞に、エレクトロポレーション又はマイクロインジェクションのような物理的方法を用いて導入され得る。さらに、これらの方法は、有利には、例えばリポソームと組み合わせたエレクトロポレーションを用いることにより、組み合わせてよい。

20

#### 【0038】

本発明の主題は、上記で定義される少なくとも1つのペプチド、該ペプチドをコードする1つのポリヌクレオチド、又は1つのベクターと、医薬的に許容されるキャリアを含む医薬組成物でもある。

30

本発明による医薬組成物は、非経口(皮下、筋内、静脈内)、経腸(経口、舌下)又は局部(経鼻、直腸、経膈)の投与に適する剤形である。

医薬的に許容されるキャリアは、通常用いられるものである。

#### 【0039】

本発明の主題は、上記で定義される少なくとも1つのペプチド及び/又は1つのベクターの、尿生殖器若しくは心臓血管の病理、又は癌の治療用の、アルファ1a ( $\alpha_{1a}$ ) アドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性を有する医薬の製造のための使用でもある。

#### 【0040】

尿生殖器の病理は、排尿不全：失禁、女性又は男性における尿路の閉塞、及び勃起障害を含む。

40

好ましくは、上記の尿生殖器の病理は、良性前立腺肥大である。前立腺の体積の増加は、排尿不全の原因である尿道の閉塞をもたらす。アルファ1aアドレナリン作用受容体の遮断は、平滑筋の弛緩及び通常の尿の流れを可能にする。

#### 【0041】

心臓血管の病理は、アルファ1a受容体の遮断が低血圧を導く限りは、主に動脈性高血圧を含む。高血圧のいくつかの形は、クロム親和性細胞腫による。アルファ-遮断薬の使用は、外科的介入の前が推奨される。

#### 【0042】

癌の病理は、アルファ1aアドレナリン受容体がこの器官で主に発現される限りは、主に

50

前立腺癌を含む。アドレナリン作用受容体の阻害は、前立腺癌の上皮細胞の増殖を遅らせるだろう。

【0043】

本発明の主題は、上記で定義されるアルファ1a ( $\alpha_1$ )アドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストの活性を有する配列番号2の配列又は派生変異型のペプチドの、アルファ1aアドレナリン受容体を研究するためのツールとしての使用でもある。

【0044】

上記の使用の有利な実施形態によると、上記のペプチドは、適切な標識と結合される。本発明において定義されるペプチドは、検出可能な及び/又は定量可能なシグナルを得るために、共有又は非共有結合により、放射活性又は非放射活性の化合物で、直接的又は間接的に標識され得る。

10

【0045】

標識は、特に、当業者に公知の方法に従って行われる放射活性、磁性又は蛍光標識である。直接検出可能な標識は、特に、放射活性同位体、例えば三重水素( $^3\text{H}$ )及びヨウ素( $^{125}\text{I}$ )、又は発光化合物、例えば放射線発光、化学発光、生物発光、蛍光若しくはリン光物質である。間接的に検出可能な標識は、特にビオチン及びBエピトープを含む。

【0046】

標識は、特に、以下により行われる：

- 蛍光体を、反応性アミン、すなわちリジンが有するアミンにグラフトさせることによる。例えば、34位のリジンのアルギニン又はホモアルギニンへの置換により変異され、Cy3B<sup>TM</sup>反応物(Amersham)がAdTx1の1又は複数の他のリジンにグラフトされたAdTx1を得ることができる。

20

【0047】

- 化学合成により蛍光体を直接組み込むことによる(N-又はC-末端に)。  
- 組換え生産又は合成により反応基(遊離のシステイン、ビオチン)を組み込み、次いで、この基を用いて蛍光体をグラフトすることによる。

このような標識ペプチドは、特に、生理的若しくは病的状態の下で、又は内因性若しくは外因性の刺激に応答して、アルファ1aアドレナリン受容体の組織発現プロファイルを決定するように、該受容体をインビトロ又はインビボで局在化するために用いられる。

【0048】

本発明の主題は、少なくとも以下の：

- 分析される細胞を、上記で定義される標識ペプチドと接触させ、  
- 任意の適切な手段により、標識された細胞を検出する

工程を含む、インビトロ又はインビボでアルファ1aアドレナリン受容体を検出する方法でもある。

30

【0049】

インビボ、哺乳動物の体内で(細胞イメージング)の受容体の特にリアルタイムでの検出は、該ペプチドを該哺乳動物に投与する(非経口注射、経口投与)先行工程を含む。

【0050】

細胞の標識は、特に、当業者に知られる任意の方法(蛍光顕微鏡、フローサイトメトリ、磁気共鳴イメージング)により検出可能な蛍光標識又は磁性標識である。

40

【0051】

あるいは、アルファ1aアドレナリン受容体についての他のアロステリックリガンドを同定するために、標識ペプチドを用いて、分子ライブラリーをスクリーニングする。

本発明の主題は、少なくとも以下の：

- 試験分子のライブラリーの存在下で、アルファ1aアドレナリン受容体と、上記で定義される標識ペプチドを接触させ、  
- 任意の適切な手段により、該ペプチドの該受容体への結合に置き換わることができる分子を同定する

工程を含む、アルファ1aアドレナリン受容体についてのアロステリックリガンドをスクリ

50

ーニングする方法でもある。

【0052】

さらに、本発明で定義されるペプチドとアルファ1aアドレナリン受容体との複合体は、結晶を得るために有利に用いることができる。このような結晶は、X線回折により、アルファ1aアドレナリン受容体の3次元構造を決定することを可能にする。

本発明の主題は、少なくとも以下の：

- a) アルファ1アドレナリン受容体を、上記で定義されるペプチドと、受容体/リガンド複合体を形成するように接触させ、
- b) a)で得られた複合体を、結晶を形成するのに十分な条件下及び時間でインキュベートする

10

工程を含む、アルファ1アドレナリン受容体の結晶を製造する方法でもある。

【0053】

本発明の主題は、任意に適切な標識と結合していてもよい、受容体/リガンド複合体でもあり、ここで、該受容体はアルファ1aアドレナリン受容体であり、ペプチドは上記で定義されるペプチドである。

【0054】

本発明の主題は、配列番号2の配列のペプチド、及び配列番号2の配列の34位のリジンの別のアミノ酸、特にアルギニン又はホモアルギニンでの置換を含む配列番号2の変異型であるペプチドでもある。

上記のペプチドの有利な実施形態によると、これは、適切な標識と結合される。

20

【0055】

本発明の主題は、上記のペプチドから導かれるポリヌクレオチド、発現カセット、組換えベクター及び改変された原核又は真核宿主細胞でもある。

上記のポリヌクレオチドの有利な実施形態によると、これは、AdTx1をコードする配列番号4の配列を有する。

【0056】

本発明は、特に：

- a) 転写及び任意に翻訳のために適切な調節配列(プロモーター、エンハンサー、イントロン、開始コドン(ATG)、停止コドン、ポリアデニル化シグナル)の制御下に、上記で定義される少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む発現カセット、及び
- b) 本発明によるポリヌクレオチドを含む組換えベクターである。有利には、これらのベクターは、上記で定義される少なくとも1つの発現カセットを含む発現ベクターである。

30

【0057】

上記で定義されるポリヌクレオチド、組換えベクター及び形質転換細胞は、特に、本発明で定義されるペプチドの産生に用い得る。

【0058】

本発明によるポリヌクレオチドは、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc., Library of Congress, USA)及びMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrookら, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載されるもののような標準的なプロトコルに従うそれら自体で知られる従来の方法により得られる。

40

例えば、これらは、PCR若しくはRT-PCRによる核酸の増幅、相同プローブとのハイブリッド形成によるゲノムDNAライブラリーのスクリーニング、又は完全若しくは部分的な化学合成により得ることができる。組換えベクターは、それら自体で知られる従来組換えDNA及び遺伝子工学の方法により構築されて宿主細胞に導入される。

【0059】

上記で定義されるペプチド及びそれらの誘導體(変異型、改変ペプチド)は、当業者に知られる従来の方法、特に固相若しくは液相合成、又は適切な細胞系(真核若しくは原核)での組換えDNAの発現により調製される。

【0060】

50

より具体的には、

- ペプチド及びそれらの誘導体は、Merrifieldら(J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149~)により元来記載されたFmoc法に従って合成でき、逆相高性能液体クロマトグラフィーにより精製できる；

- ペプチド及び変異型のようなそれらの誘導体は、当業者に知られる任意の手段により得られる対応するcDNAからも作製できる。cDNAを真核又は原核の発現ベクターにクローニングし、組換えベクターで改変された細胞において産生されるタンパク質又はフラグメントを、任意の適切な手段、特にアフィニティクロマトグラフィーにより精製する。

【0061】

上記の態様の他に、本発明は、添付の図面を参照にして本発明の主題の実施例に言及する以下の記載から明らかになる他の態様も含む。図面において：

- 図1は、プラゾシン( )又はAdTx1 ( )の存在下での、アルファ1aアドレナリン受容体への放射標識AdTx1ペプチド( $^{125}\text{I}$ -AdTx1)の結合の置き換えを示す。IC<sub>50</sub>値は、プラゾシン及びAdTx1について、それぞれ $2.2 \times 10^{-10}$  M及び $5 \times 10^{-10}$  Mである。

【0062】

- 図2は、 $^3\text{H}$ -プラゾシン、 $^3\text{H}$ -ラウオルシン及び $^3\text{H}$ -CPG12177の種々のアドレナリン受容体サブタイプへの結合の、プラゾシン又はAdTx1ペプチドによる置き換えを示す。( )  $^3\text{H}$ -プラゾシンのアルファ1a受容体への結合の、プラゾシンによる置き換え(IC<sub>50</sub> =  $0.99 \times 10^{-9}$  M)。( )  $^3\text{H}$ -プラゾシンのアルファ1a受容体への結合の、AdTx1による置き換え(IC<sub>50</sub> =  $1.8 \times 10^{-9}$  M)。( )  $^3\text{H}$ -プラゾシンのアルファ1b受容体への結合の、AdTx1による置き換え(IC<sub>50</sub> =  $2.3 \times 10^{-6}$  M)。( )  $^3\text{H}$ -プラゾシンのアルファ1d受容体への結合の、AdTx1による置き換え(IC<sub>50</sub> =  $9.9 \times 10^{-6}$  M)。( )  $^3\text{H}$ -ラウオルシンのアルファ2a受容体への結合の、AdTx1による置き換え(IC<sub>50</sub> >  $5 \times 10^{-5}$  M)。( )  $^3\text{H}$ -CGP12177のベータ1受容体への結合の、AdTx1による置き換え(IC<sub>50</sub> >  $5 \times 10^{-5}$  M)。

【0063】

- 図3は、アルファ1aアドレナリン受容体を発現する酵母膜上での $^{125}\text{I}$ -AdTx1の熱飽和(hot saturation)を表す。種々の濃度の $^{125}\text{I}$ -AdTx1を、20  $\mu\text{g}$ の酵母膜の存在下で20時間インキュベートする。非特異的結合は、1  $\mu\text{M}$ のAdTx1の存在下で測定する。( ) 非特異的結合。( ) 特異的結合。( ) 合計の結合。特異的結合は飽和可能であり、 $0.8 \pm 0.2$  nMに等しい高親和性の結合である。

【0064】

- 図4は、COS細胞で一過的に発現されたh-アルファ1a (A)及びh-アルファ1b (B)アドレナリン受容体の、AdTx1-Cy3B<sup>TM</sup>蛍光誘導体での標識を示す。

【実施例】

【0065】

実施例1：AdTx1ポリペプチドの調製

1) 化学合成

AdTx1ペプチドを、Fmoc (フルオレニルメチルオキシカルボニル)法により、ジシクロヘキシルカルボジイミド/1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAT)をカップリング剤として、及びN-メチルピロリドンを用いて、固相合成した(Mourierら, Molecular Pharmacology, 2003, 63, 26~35)。簡単に、合成は、ペプチドのC-末端の端からN-末端の端に、0.05 mmolの樹脂を用いて行う。合成の最後に、樹脂/ペプチドを、9 mlのトリフルオロ酢酸、0.5 mlのトリイソプロピルシラン及び0.5 mlの蒸留水の混合物で処理する。次いで、ペプチドを、2時間のインキュベーションの後に樹脂から切断する。混合物を、冷エチルエーテルの上からろ過し、2回遠心分離する。このようにして得られる沈殿物を、10%酢酸溶液に溶解し、凍結乾燥する。還元された合成毒素を、Discovery (登録商標) Bio Wide Pore C5、25 cm x 10 mm、10  $\mu\text{m}$ 半調製カラム(SUPELCO)での、150分間で40%~70%の溶媒Bの勾配を用いる(A: 0.1% TFA、B: 50%アセトニトリル及び0.1% TFA)、4.5 ml/分の流速での逆相クロマトグラフィー(HPLC)により精製する。続いて、検出を220 nmで行う。

10

20

30

40

50

## 【0066】

合成毒素は、次いで、100 mM Trisバッファー、pH 8.0中で、1/1のGSSG/GSHのモル比及び1 mMの濃度での還元グルタチオン(GSSG)及び酸化グルタチオン(GSH)の存在下で折り畳まれる。4、暗所及びアルゴンの下で3日後、折り畳まれた合成毒素を、上記と同じ条件の逆相クロマトグラフィー(HPLC)により精製する。合成毒素の濃度は、5  $\mu$ Mである。

## 【0067】

## 2) 組換えポリペプチドの作製

AdTx1をコードするヌクレオチド配列のクローニングを、ある技術(Gateway (登録商標), Invitrogen)に従う相同組換えにより行う。5'から3'に連続的に: attB1組換え配列、TEV切断部位(ENLYFQG)、AdTx1をコードする配列(配列番号3)、偽停止(pseudo stop)、Stagペプチドをコードする配列、停止コドン及びattB2組換え配列を含むポリヌクレオチドフラグメント(配列番号4)を、PCRにより増幅した。PCR産物を、ドナープラスミドpDONR221(Invitrogen)に、相同組換えによりクローニングした。このようにして得られたクローンを用いて、適切な細胞系でのAdTx1の発現に適する組換え発現ベクターを作製する。

10

## 【0068】

## 実施例2: アルファ1アドレナリン受容体へのAdTx1の結合の解析

## 1) 材料及び方法

## a) AdTx1毒素のヨウ素化

AdTx1のヨウ素化は、ラクトペルオキシダーゼにより触媒されるハロゲン化反応により行う。50  $\mu$ lの0.1Mリン酸バッファー、pH 7.3、10  $\mu$ lの100  $\mu$ M毒素、10  $\mu$ lの1/50,000 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、1 mCi [<sup>125</sup>I]及び0.7単位のラクトペルオキシダーゼ(Sigma)を含有する反応混合物を、25 にて1分間インキュベートする。ヨウ素化された毒素を、次いで、以前に記載されたようにして(Krimm I.ら, J. Mol. Biol., 1999, 285, 1749~63)、逆相HPLCにより精製する。

20

## 【0069】

## b) アドレナリン受容体を含む膜の調製

各受容体サブタイプ、<sub>1a</sub>、<sub>1b</sub>、<sub>1d</sub>、<sub>2a</sub>及び<sub>1</sub>は、上記の受容体に対応するcDNAを含む発現プラスミドで形質転換された酵母Pichia pastorisで発現される。各クローンを、同じ様式で培養する。Pichia pastorisクローンを、10 mlの培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、100 mMリン酸カリウム、pH 6、1.3%窒素含有酵母ベース、1%グリセロール)に30 にて一晩接種し、培養物を、次いで、100 mlの新鮮な培地で希釈し、30 にて4時間、再びインキュベートする。培養物を、続いて、遠心分離し(3000 g, 5分)、2.5% DMSOを補った500 mlの誘導培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、100 mMリン酸カリウム、pH 6、1.3%窒素含有酵母ベース、0.5%メタノール)に再懸濁し、振とうしながら(200 rpm)、20 にて18時間インキュベートする。培養物を採集し(3000 g, 15分、4)、3 mlのバッファー(50 mMリン酸カリウム、pH 7.4、100 mM NaCl、5%グリセロール、2 mM EDTA及び1 mM PMSF)に再懸濁し、氷で冷却する。冷たいガラスビーズ(2 ml; 400~600  $\mu$ m酸洗浄ガラスビーズ, Sigma)を懸濁物に加え、次いで、混合物を30秒間のボルテックスに8回付し、その後、氷上で放置する。ガラスビーズ及び溶解されていない細胞を、次いで、溶解物から遠心分離(3000 gにて5分、4)により分離し、ペレットを、同じ条件下で洗浄する。上清を回収し、20,000 gにて1時間遠心分離する。各調製物のペレットは、ホモジナイザーを用いてバッファー(50 mM Tris pH 8、120 mM NaCl、10%グリセロール、1 mM PMSF)に再懸濁し、定量に分け、使用時まで-80 に維持する。

30

40

## 【0070】

## c) 結合アッセイ

5  $\mu$ gの膜を、最終容量200  $\mu$ lで、10 mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったTris-HClバッファー、pH 7.2中の、最終濃度1 nMの<sup>3</sup>H-プラゾシン([7-メトキシ-3H], Perkin Elmer Life Sciences)、又は<sup>3</sup>H-ラウオルシン[メチル-3H] (Perkin Elmer Life Sciences)、又は<sup>3</sup>H-CPG12177 (Perkin Elmer Life Sciences)と混合し、次いで、混合物を周囲温度にて、漸増用量のAdTx1 (0.01 nM~100  $\mu$ M)の存在下で5時間インキュベートする。非特異的結合は、<sup>3</sup>H-プラゾシン

50

との結合について1  $\mu$ Mのプラゾシン(Sigma)の存在下で、 $^3$ H-ラウオルシンとの結合について1  $\mu$ Mのヨヒンビン(Sigma)の存在下で、又は $^3$ H-CPG12177との結合について1  $\mu$ Mのプロプラノロール(Sigma)の存在下で測定する。反応は、反応媒体を2 mlの洗浄バッファー(Tris-HCl, pH 7.2, 10 mM)で希釈した後に、4 にてろ過することにより停止する。ろ過は、0.3% PEIバッファー(ポリエチレンジアミン、Sigma)で前処理したガラスフィルタ(GFC, Whatman)で行う。2回連続で迅速な洗浄を行う。ろ紙を80 にて1時間乾燥させ、10 mlのLipoluma Plus (Lumac LMC)を加える。放射を、Rockbeta 1211カウンタ(LKB Wallac)で検出し、これは、各アッセイの値をcpm (カウント毎分)で与える。結果の解析は、Kaleidographソフトウェア(Tools for discovery, Synergy Software, PA, USA)を用いて行う。

【0071】

10

アルファ1aアドレナリン受容体への結合の、ヨウ素化AdTx1ペプチド(0.1 nM)による置き換えの解析は、トリチウム化リガンドについて用いたものと同じプロトコルに従って行い、放射活性をMultigamma 1261カウンタ(LKB Wallac)で測定する。

【0072】

アルファ1aアドレナリン受容体のAdTx1での飽和の解析は、漸増濃度のヨウ素化ペプチドを、20  $\mu$ gのアルファ1aアドレナリン受容体含有膜の存在下で20時間インキュベートし、次いで、上記のようにして放射活性を測定することにより行う。非特異的結合は、1  $\mu$ MのAdTx1の存在下で測定する。

【0073】

## 2) 結果

20

種々のアドレナリン受容体サブタイプ、アルファ1a、1b、1d、2a及びベータ1へのAdTx1ペプチドの結合の解析を、図1、2及び3に示す。

AdTx1ペプチドは、アルファ1aアドレナリン受容体リガンドである(図1)。種々のアドレナリン受容体サブタイプに特異的なオルトステリックリガンドを用いる競合結合アッセイは(図2)、AdTx1ペプチドがアルファ1aアドレナリン受容体サブタイプに選択的に結合することを示す。IC<sub>50</sub>値により評価されるアルファ1a、1b、1d、2a及びベータ1サブタイプに対するその親和性は、それぞれ、 $1.8 \times 10^{-9}$  M、 $2.3 \times 10^{-6}$  M、 $9.9 \times 10^{-6}$  M、 $> 5 \times 10^{-5}$  M、及び $> 5 \times 10^{-5}$  Mである。

【0074】

アルファ1aアドレナリン受容体へのプラゾシン結合の、AdTx1ペプチドの存在下での置き換えについての曲線(図1及び2)は、置き換えが不完全であることを示し、これは、アロステリック調節を反映する。

30

【0075】

図1及び2に示す結果は、AdTx1ペプチドがアルファ1aアドレナリン受容体に特異的に結合し、それが、その結合により、オルトステリックリガンドについての親和性をアロステリックに減少させることを示す。よって、これは、アルファ1aアドレナリン受容体に選択的なアロステリックアンタゴニストである。

【0076】

アルファ1aアドレナリン受容体飽和曲線(図3)は、AdTx1の特異的結合が飽和可能であり、かつ $0.8 \pm 0.2$  nMに等しい高親和性結合であることを示す。

40

【0077】

実施例3： アルファ1aアドレナリン受容体の、AdTx1Cy3B<sup>TM</sup>蛍光誘導体での標識

### 1) 材料及び方法

AdTx1 K34R変異型を、AdTx1について実施例1に記載するようにして合成した。AdTx1 K34R変異型を、次いで、Cy3B-モノ-NHS-エステル蛍光体(AMERSHAM)に、製造者により推奨されるプロトコルに従って結合させた。ヒトアルファ1aアドレナリン受容体の発現ベクター又はヒトアルファ1bアドレナリン受容体の発現ベクターのいずれかでトランスフェクションされ、このアルファ1a又はアルファ1b受容体を一過的に発現するCOS細胞(ATCC)を、2  $\mu$ MのAdTx1-Cy3bの存在下で16時間インキュベートし、次いで、543 nmでのレーザー励起後に放射される蛍光を、蛍光顕微鏡(Leica TCS SP2, LEICA MICROSYSTEMS)を用いて $\times 40$ の倍

50

率で分析した。

【 0 0 7 8 】

2) 結果

図4は、AdTx1蛍光誘導体でのアルファ1aアドレナリン受容体の特異的標識を示す。図4Aは、AdTx1蛍光誘導体によるh-アルファ1aアドレナリン受容体の強い標識を示す。これに対して、図4Bは、AdTx1蛍光体によるh-アルファ1bアドレナリン受容体の標識がないことを示す(図4B)。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 9 】

【 図 1 】 プラゾシン ( ) 又はAdTx1 ( ) の存在下での、アルファ1aアドレナリン受容体への放射標識AdTx1ペプチド (<sup>125</sup>I-AdTx1) の結合の置き換えを示す。

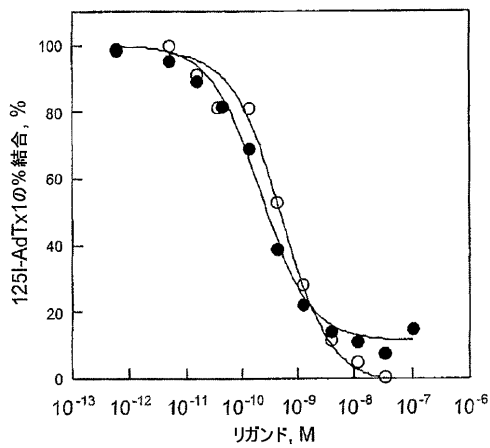
【 図 2 】 <sup>3</sup>H-プラゾシン、<sup>3</sup>H-ラウオルシン及び<sup>3</sup>H-CPG12177の種々のアドレナリン受容体サブタイプへの結合の、プラゾシン又はAdTx1ペプチドによる置き換えを示す。

【 図 3 】 アルファ1aアドレナリン受容体を発現する酵母膜上での<sup>125</sup>I-AdTx1の熱飽和を表す。

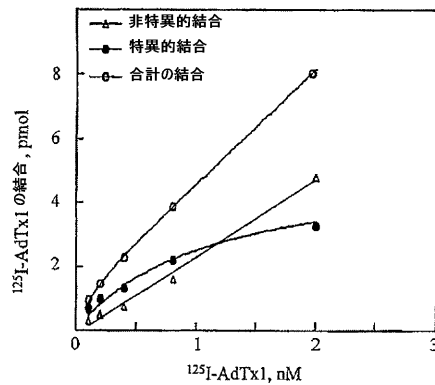
【 図 4 】 COS細胞で一過的に発現されたh-アルファ1a (A)及びh-アルファ1b (B)アドレナリン受容体の、AdTx1-Cy3B<sup>TM</sup>蛍光誘導体での標識を示す。

10

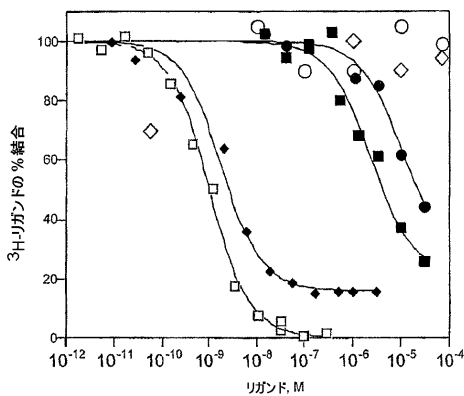
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】

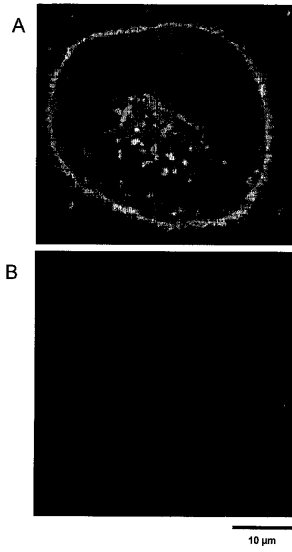


FIGURE 4

【 配 列 表 】

2009528821000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/FR2007/000325
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/46 A61K35/58 C12N15/63		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOLKKONEN MIKAEL ET AL: "Muscarinic toxins from the black mamba <i>Dendroaspis polylepsis</i> " EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 234, no. 2, 1995, pages 579-585, XP002407402 ISSN: 0014-2956 the whole document	1-16, 18-21, 23,24
Y	WO 99/24055 A (UNIV SINGAPORE [SG]; GOPALADRISHNAKONE PONNAMPALAM [SG]; PU XIAO CHUN) 20 May 1999 (1999-05-20) the whole document	1-16, 18-21, 23,24
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 October 2007		Date of mailing of the international search report 07/11/2007
Name and mailing address of the ISA* European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer SCHWACHTGEN, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2007/000325

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PAROLA ANTHONY L ET AL: "Site-specific fluorescence labeling of the beta2 adrenergic receptor amino terminus" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 254, no. 1, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 88-95, XP002168694 ISSN: 0003-2697 the whole document	9,10, 18-21, 23,24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2007/000325

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9924055	A	AU	31-05-1999
		US	02-09-2003

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000325

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. C07K14/46 A61K35/58 C12N15/63		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	JOLKKONEN MIKAEL ET AL: "Muscarinic toxins from the black mamba <i>Dendroaspis polylepis</i> " EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 234, no. 2, 1995, pages 579-585, XP002407402 ISSN: 0014-2956 le document en entier	1-16, 18-21, 23,24
Y	WD 99/24055 A (UNIV SINGAPORE [SG]; GOPALADRISHNAKONE PONNAMPALAM [SG]; PU XIAO CHUN) 20 mai 1999 (1999-05-20) le document en entier	1-16, 18-21, 23,24
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	
<input checked="" type="checkbox"/>	Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
* Catégories spéciales de documents cités:		
<p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
23 octobre 2007		07/11/2007
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  SCHWACHTGEN, J

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n° PCT/FR2007/000325
--

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	PAROLA ANTHONY L ET AL: "Site-specific fluorescence labeling of the beta2 adrenergic receptor amino terminus" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 254, no. 1, 1 décembre 1997 (1997-12-01), pages 88-95, XPO02168694 ISSN: 0003-2697 le document en entier	9,10, 18-21, 23,24

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000325

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9924055	A	20-05-1999	AU	1184399 A	31-05-1999
			US	6613745 B1	02-09-2003

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/46 (2006.01)	C 0 7 K 14/46	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 9/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 15/10 (2006.01)	A 6 1 P 15/10	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ジル, ニコラ

フランス、エフ - 7 7 2 9 0 ミトリー モリー、アベニュー ドゥ ドーフィネ 1 0 2

(72)発明者 メネズ, アンドレ

フランス、エフ - 7 8 4 7 0 マグニー レ アミュール、リュ クロード ニコラ レドール 1 0 2

Fターム(参考) 2G045 DA36

4B024 AA01 BA38 BA63 CA01 DA11 EA04 GA11 HA03 HA08  
 4B063 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS03 QS28 QS32 QS36 QS38  
 QX02  
 4B064 AG01 AG20 AG30 CC30 CE20 DA01  
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44  
 4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA20 BA23 CA43 NA14 ZA361  
 ZA421 ZA811 ZA841 ZB261 ZC421  
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 CA53 DA83 EA21 FA33 FA74 GA25

专利名称(译)	具有对α1a肾上腺素能受体具有选择性的变构拮抗剂性质的肽及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009528821A</a>	公开(公告)日	2009-08-13
申请号	JP2008555840	申请日	2007-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	提交SARRIA阵列内尔双原子原子能委员会		
申请(专利权)人(译)	Komissaria一个Reneruji原子		
[标]发明人	ジルニコラ メネズアンドレ		
发明人	ジル,ニコラ メネズ,アンドレ		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 C07K1/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/46 C07K14/705 C12Q1/02 A61K38/00 A61K48/00 A61P9/02 A61P35/00 A61P43/00 A61P13/02 A61P15/00 A61P13/08 A61P15/10 A61P9/12 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61P13/00 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P15/10 C07K14/4703 C07K14/70571		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/02.Z C07K1/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K14/46 C07K14/705 C12Q1/02 A61K37/02 A61K48/00 A61P9/02 A61P35/00 A61P43/00.111 A61P13/02 A61P15/00 A61P13/08 A61P15/10 A61P9/12 G01N33/53.Y G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/BA38 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA08 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS28 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG20 4B064/AG30 4B064/CC30 4B064/CE20 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA23 4C084/CA43 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZA811 4C084/ZA841 4C084/ZB261 4C084/ZC421 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA53 4H045/DA83 4H045/EA21 4H045/FA33 4H045/FA74 4H045/GA25		
优先权	2006001584 2006-02-23 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

具有以下特征的肽 (1) 用作药物：它具有SEQ ID NO：2 (说明书中给出的65个氨基酸的定义序列) 或与SEQ ID NO：2具有至少70%的同源性或80%的相似性；它具有三指结构，包括在第一和第三半胱氨酸，第二和第四半胱氨酸，第五和第六半胱氨酸以及第七和第八半胱氨酸之间具有二硫键的八个半胱氨酸残基；它具有选择性的变构肾上腺素α1a受体拮抗剂活性。还包括以下方面的独立权利要求：(1) 如上的具有SEQ ID NO：3的肽 (本说明书中给出的65个氨基酸的定义序列)；(2) 表达载体在编码条件下的用途，该表达载体包含编码(1)的多核苷酸控制转录和任选翻译为药物的调控序列；(3) 通过使肾上腺素α1a受体与测试化合物库接触来筛选变构肾上腺素α1a受体配体，以及(1)标记形式并鉴定能够置换的分子(1)从受体；(4) 通过使测试细胞与(1)以标记形式接触并检测标记细胞来检测肾上腺素α1a受体；(5) 通过使受体与(1)接触而产生肾上腺素α1受体晶体形成受体/配体复合物

ペプチド	アミノ酸の数	SwissProt アクセシ ョンNo.	同一性	類似性
MT-ベータ	65	P80495	96% (63/65)	96% (63/65)
相乗作用様毒液タンパク質 CM-3	65	P25518	95% (61/65)	96% (62/65)
MT3	65	P81031	81% (53/65)	89% (58/65)
ムスカリン様毒素様タンパク質 2 (MTLP-2)	65	P82463	76% (49/65)	79% (51/65)
MT4	66	Q9PSN1	74% (49/66)	86% (57/66)
MT2	65	P18328	70% (46/75)	80% (52/65)
MT1	66	P81030	72% (48/66)	84% (56/66)
MT7	65	Q8QGR0	67% (44/65)	78% (51/65)
MT-アルファ	66	P80494	71% (47/66)	83% (55/66)

并孵育该复合物；(6) 具有SEQ ID NO : 2的分离的肽；(7) 包含肾上腺素 $\alpha$ 1a受体和(1)的分离的受体/配体复合物；(8) 编码(1)的多核苷酸；(9) 包含上述多核苷酸的重组载体；(10) 用上述多核苷酸或载体修饰的细胞。 活动：细胞抑制；尿毒症; 变压性 低血压。 作用机理：肾上腺素 $\alpha$ 1a受体拮抗剂。 基因治疗。