

(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2004-511806

(P2004-511806A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード (参考) |
|----------------------------|---------------|-------------|
| <b>GO 1 N 33/50</b>        | GO 1 N 33/50  | Z 2GO45     |
| <b>C 1 2 Q 1/02</b>        | C 1 2 Q 1/02  | 4BO63       |
| <b>GO 1 N 33/15</b>        | GO 1 N 33/15  | Z           |
| <b>GO 1 N 33/53</b>        | GO 1 N 33/53  | D           |
| <b>GO 1 N 33/566</b>       | GO 1 N 33/566 |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

|               |                              |          |  |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2002-536552 (P2002-536552) | (71) 出願人 | 391008951<br>アストラゼネカ・アクチエボラーグ  |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年10月16日 (2001.10.16)     |          | スウェーデン国エス-15185セーデル<br>テイエ (番地なし)  |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成15年4月16日 (2003.4.16)       | (74) 代理人 | 100091731<br>弁理士 高木 千嘉   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/SE2001/002264            | (74) 代理人 | 100080355<br>弁理士 西村 公佑   |
| (87) 国際公開番号   | W02002/033416                | (74) 代理人 | 100110593<br>弁理士 杉本 博司   |
| (87) 国際公開日    | 平成14年4月25日 (2002.4.25)       | (72) 発明者 | サルタン・アーマッド<br>カナダ国ケベック H4S 1Z9. サン<br>ローラン. フレデリック・バンティング7<br>171. アストラゼネカ・アール・アンド<br>・ディー・モントリオール |
| (31) 優先権主張番号  | 60/240,889                   |          |  |
| (32) 優先日      | 平成12年10月17日 (2000.10.17)     |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ

## (57) 【要約】

本発明は、ウシ副腎髄質ドコサペプチド (BAM-22P) のアゴニスト、アンタゴニスト、またはインバースアゴニストとして作用する化合物をスクリーニングするのに用いることができるアッセイに関する。このアッセイは、ラットおよびヒトDRR受容体へのBAM-22Pの結合をベースとしたものである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試験化合物の哺乳類 D R R 受容体への結合能をアッセイする方法であって、

a) ウシ副腎髄質ドコサペプチド ( B A M - 2 2 P ) と共に哺乳類 D R R 受容体を発現する細胞と、前記の試験化合物とをインキュベートすること、次いで

b) 前記 B A M - 2 2 P の前記 D R R 受容体への結合が前記の試験化合物によって置換されている程度を測定すること

からなる方法。

## 【請求項 2】

哺乳類の D R R がラットまたはヒトの D R R である請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

D R R を発現している細胞が非相同な D R R 遺伝子で形質転換された組換え細胞である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

アッセイが放射性リガンドアッセイであり、そして B A M - 2 2 P または試験化合物が放射性物質で標識されている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

アッセイが酵素免疫測定法 ( E L I S A ) であり、そして B A M - 2 2 P または試験化合物が酵素に結合するものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 6】

さらに、試験化合物が細胞のホスホリパーゼ C の濃度または細胞内カルシウムの濃度のいずれかを顕著に増加または減少するか否かを測定することを含む請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 7】

試験化合物が B A M - 2 2 P のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストであるかを測定する方法であって、

a) D R R を発現する細胞を前記試験化合物と一緒にインキュベートすること、

b) 工程 a) のインキュベーションの間、前記細胞の細胞内ホスホリパーゼ C またはアデニルシクラーゼ活性または細胞内カルシウム濃度を測定すること、

c) 工程 b) で得られた結果と、インキュベーションが前記試験化合物の不存在下で実施する場合に得られた結果とを比較すること、次いで

30

d) 前記試験化合物の不存在下よりも存在下にて、ホスホリパーゼ C またはアデニルシクラーゼ活性または細胞内カルシウムのレベルが顕著に高い場合は、前記の試験化合物が B A M - 2 2 P のアゴニストであると推断すること、または、ホスホリパーゼ C またはアデニルシクラーゼ活性または細胞内カルシウム濃度が前記試験化合物の不存在下よりも存在下にて顕著に低い場合には、試験化合物が B A M - 2 2 P のアンタゴニストであると推断すること

からなる上記の方法。

## 【請求項 8】

細胞が非相同 D R R 遺伝子 ( ラットおよびヒト ) で形質転換された組換え細胞である、請求項 7 に記載の方法。

40

## 【請求項 9】

D R R を発現している細胞および試験化合物をさらに B A M - 2 2 P を包含する培地中でインキュベーションする請求項 7 または 8 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の分野】

本発明は、試験化合物が、ラットおよびヒトの D R R において B A M - 2 2 P の結合および活性のモジュレータとして活性を有するか否かを測定することに使用されることができるアッセイ方法に関する。有効なモジュレータであるとして同定された化合物は、疼痛、

50

神経障害疾患および炎症疾患における治療薬として、将来使用することができる。

【0002】

【発明の背景】

A. ウシ副腎髄質ドコサペプチド

BAM22ペプチド: YGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYG-OH

プレプロエンケファリンA (PPA) cDNAは、1983年にクローン化された (Nature 297: 431-434, 1982)。PPA遺伝子は、そのコーディング配列内にいくつかの塩基性アミノ酸を含み、タンパク質分解酵素による開裂を受けると、いくつかのペプチドを生じる。このようなペプチド開裂産物には、BAM12P、BAM20P、BAM22P、MEAGL、MEAPおよびペプチドEおよびペプチドF (ウシ副腎髄質) を含む。これらのペプチドには、神経の生存、および痛覚脱失症に関するものもある (Int. J. Devl. Neuroscience 10, No2. pp 171-179, 1992, Eur. J. Pharmacol., 85, 355-356, 1982)。

【0003】

BAM-22Pは、Met-エンケファリンのペプチド前駆体である (Mizuno, Biochem. Biophys. Res. Commun. 97 (4): 1283-90 (1980))。哺乳類において、BAM-22Pは、末梢組織、例えば、副腎髄質、ランゲルハンス島 (Timmers, Diabetes.; 35 (1): 52-7 (1986))、および多くの海馬および視床下部核および視床核、脚間核、黒質、丘、中脳水道周囲灰白質、傍小脳脚核、三叉運動神経および脊髄核、大縫線核および他の縫線核、傍巨細胞網様核 (nucleus reticularis paragigantocellularis)、前庭神経核、いくつかのノルアドレナリン細胞群、孤束核を含む中枢神経系に、並びに、脊髄後角に存在することが (免疫活性によって) 示されている (Khachaturian, J. Comp. Neurol. 220 (3): 310-20 (1983))。

【0004】

哺乳類におけるBAM-22Pの正確な生理学的活性は知られていないが、運動協調および痛覚脱失症に関係するとされている (J. Pharmacol Exp Ther 1986 Sep; 238 (3): 1029-1044, Eur. J. Pharmacol., 85, 355-356, 1982)。

【0005】

BAM-22Pはみなしごペプチド (orphan peptide) であって、その特異的な受容体は、 $\mu$ 、およびオピオイド受容体へ結合するその既知の能力にかかわらず、同定されていない。本発明者等は、BAM-22PがラットおよびヒトのDRR受容体を含む、哺乳類の後根受容体 (dorsal root receptors) (DRR) を活性化することが可能であることを発見した。

【0006】

B. Gタンパク質結合型受容体

Gタンパク質結合型受容体 (GPCR) は、膜貫通ドメインおよび細胞内C-末端ドメインから構成されていると推定される細胞外N-末端に存在する7つの疎水性  $\alpha$ -ヘリックスによって特徴付けられている共通の構造的組織を共有するタンパク質ファミリーを構成する。GPCRは、Gタンパク質の変換の活性化を通して細胞内シグナルを誘発する多種多様なリガンドに結合する (Caron, et al., Rec. Prog. Horm. Res. 48: 277-290 (1993); Freedman, et al., Rec. Prog. Horm. Res. 51: 319-353 (1996))。

【0007】

これまでに300以上のGPCRがクローン化された。そして、通常1,000以上のこのような受容体が存在すると推定されている。概略で、臨床的に関連する全ての薬剤の5

0 ~ 60%が、多様なGPCRの機能を調節することによって作用する (Guderma n n , e t a l . , J . M o l . M e d . 7 3 : 5 1 - 6 3 ( 1 9 9 5 ) ) 。臨 床 的 に 関 連 し た 受 容 体 の 多 く が 中 枢 神 經 系 に 存 在 す る 。

【0008】

同定およびクローン化がなされたGPCRの中には、DRRと言う既知のタンパク質をコードする遺伝子があり、それはmasがん遺伝子ファミリーの受容体に相同である。DRRのラットの対照体は、相同であることが見出され、DRR mRNAを発現する細胞の存在に基づいて、該受容体が痛みの伝達の役目を担うものと提案された。しかし、この受容体のファミリーに対する内在性のリガンドは、これまでは確認されていなかった (C e l l : 4 5 , 7 1 1 - 7 1 9 1 9 8 6 , J B C 2 7 3 , 1 1 8 6 7 - 1 1 8 7 3 1 9 9 8 , W O 9 9 / 3 2 5 1 9 ) 。

10

【0009】

【発明の要約】

本発明は、DRR受容体のアゴニストまたはアンタゴニストである潜在的な治療用化合物を同定することが可能であるアッセイ方法を提供する。ラットまたはヒトのDRRのいずれかを発現している組換え細胞をアゴニストまたはアンタゴニストを同定するためにデザインされたスクリーニングアッセイにおいてBAM-22Pと併せて用いることができる。従って、その最初の実施態様において、本発明は、DRR受容体に結合するその能力について、試験化合物をアッセイする方法に関する。これは、BAM-22Pと共に該受容体遺伝子を発現している細胞と、試験化合物とをインキュベーションすることによって達成される。次いでBAM-22Pの結合が置換される程度が測定される。BAM-22Pまたは試験化合物のいずれかを検出可能に標識する放射性リガンドアッセイ方法または固相酵素免疫検定法を実施することができる。DRRを発現する細胞はいずれも使用することができるが、ラットまたはヒトのいずれか由来の非相同のDRR遺伝子を発現する組換え細胞が好ましい。本明細書において使用された「非相同」という用語は、細胞にトランスフェクトされた任意のDRR遺伝子に関する。即ち、その用語は、任意の非相同DRRに関する。

20

【0010】

また、本発明は、試験化合物が、機能アッセイに基づいて、BAM-22Pに結合するアゴニスト、アンタゴニスト、またはインバースアゴニストであるかどうかを測定する方法を含む。このようなアッセイを実施する一つの方法は、DRRを発現する細胞と試験化合物をインキュベートすること、次いで細胞内ホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼ活性または細胞内カルシウム濃度が調節されるかどうかを測定することである。一般的に、その結果は、同様な方法ではあるが、試験化合物が存在しないでインキュベーションを実施する場合に得られた結果と比較すべきである。一般的に、このタイプの機能アッセイは、上記の種類 of 結合アッセイと一緒に実施される。アッセイの使用に好ましい細胞は、非相同なDRR遺伝子で形質転換された組換え細胞である。アゴニストとして作用する試験化合物は、ホスホリパーゼCを増加させ、アデニルシクラーゼ活性を増加または減少させるか、またはカルシウムの細胞内レベルを増加させる。インバースアゴニストは、特に、アッセイがBAM-22Pの固定した量の存在下で実施される場合には、ホスホリパーゼC活性または細胞内カルシウムレベルを減少させることができる。アンタゴニストは、インバースアゴニストの顕著な特徴である、ホスホリパーゼC活性または細胞内カルシウムについては、反対の応答をせずに、受容体に対するBAM-22Pの結合を遮断する。

30

40

【0011】

【発明の詳述】

本発明は、ラットおよびヒトのDRR受容体へのBAM-22Pの結合を調節する能力について化合物をスクリーニングするのに使用され得るアッセイに関する。報告されているBAM-22Pの任意の形態が使用されうるが、好ましいペプチドは、長さが22アミノ酸であり、次の配列を有する。BAM22ペプチド：YGGFMRRVGRPEWWM  
DYQKRYG-OH (配列番号1)。このペプチドは、市販 (B a c h e m ) されてい

50

るか、または当該分野で周知の標準方法を用いて合成することができる。該ペプチドは、<sup>125</sup>Iのようなラジオアイソトープによって検出可能に標識することができるか、または蛍光標識または化学発光法標識を組み入れることもできる。また、該ペプチドは、西洋ワサビペルオキシダーゼのような簡単に検出可能な酵素に結合することができる。

#### 【0012】

DRR受容体は、WO99/32519に記載のような既知の方法を用いて、ラットおよび/またはヒト細胞からクローン化することができる。実施例の部分には、DDRのクローニングに使用され得る方法の詳細な説明を提供する。一旦得ることができれば、DRR配列は、哺乳類細胞において活性なプロモーターを有する発現ベクターに組み込まれる (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press (1989))。使用することができるプロモーターの例には、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター (Hamer, et al., J. Mol. Appl. Gen. 273-288 (1982)); ヘルペスウイルスの前初期遺伝子およびTKプロモーター (Yao, et al., J. Virol. 69: 6249-6258 (1995)); McKnight, Cell 31: 355-365 (1982)); SV40初期プロモーター (Benoit, et al., Nature 290: 304-310 (1981)); および、CMVプロモーター (Boshart, et al., Cell 41: 521-530 (1985)) が含まれる。また、ベクターはエンハンサーおよび他の調節エレメントを含んでもよい。

10

20

#### 【0013】

一旦、発現ベクターが構築されると、例えばリン酸カルシウム沈殿法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、リポソーム導入法、ウイルス導入法またはパーティクル仲介遺伝子導入法 (particle mediated gene transfer) のような方法によって、哺乳類の細胞系に導入され得る。他の哺乳類細胞を使用してもよいが、HEK-293細胞は成功した結果が得られることが分かっており、これらの細胞においてDRRを発現するための方法が実施例の箇所に記載されている。細胞の選択のための標準方法、およびDRRの発現のためのそれらのアッセイのための標準方法 (例えば、ノーザンブロットの解析によるもの) を実施してもよい。

#### 【0014】

一旦、ラットおよびヒトのDRR受容体を発現するBAM-22Pペプチドおよび細胞が得られたならば、試験化合物が結合になんらかの影響を与えるか否かを測定するためのアッセイを実施してもよい。多種多様な異なったタイプのアッセイを、当業者に周知の標準方法を用いて実施することができる。例えば、放射性標識リガンド結合アッセイにおいて、DRRを発現する細胞は、BAM-22Pと一緒に、並びに結合活性の試験をする化合物と一緒に、インキュベートされる。好ましいDDRの供給源は、遺伝子組換え的に形質転換されたHEK-293細胞である。また、BAM-22Pに強く結合する他のタンパク質を発現しないことを条件として、その他の細胞を使用し得る。これは、DRRで形質転換された細胞における結合アッセイを実施し、そしてさらに得られた結果と形質転換されていない対照体を用いて得られた結果とを比較することによって簡単に測定することができる。

30

40

#### 【0015】

アッセイは、そのままの細胞、または細胞から調製された膜を用いて実施することができる (例えば、Wang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 10230-10234 (1993) を参照されたい)。上記で示唆されたように、膜、または細胞は、BAM-22Pと一緒に、さらに試験された化合物の調製物と一緒に、インキュベートされる。結合が完了した後、受容体はリガンドおよび試験化合物を含有する溶液から (例えば濾過によって) 分離され、生じた結合量が測定する。好ましくは、使用されたリガンドは、放射性同位体 (例えば<sup>125</sup>I) を用いて検出可能なように標識される。しかし、所望ならば、他のタイプの標識もまた使用してもよ

50

い。最も共通に用いられる蛍光標識化合物は、フルオロセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン $\alpha$ -フタルアルデヒドおよびフルオレスカミンである。有用な化学発光性化合物には、ルミノール、イソルミノール、セロマトック(theromatic)アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルが含まれる。

#### 【0016】

非特異的結合は、過剰量の非標識リガンドの存在下で結合反応を実施することによって測定され得る。例えば、標識されたBAM-22Pは、千倍過剰の量の非標識BAM-22Pの存在下にて受容体および試験化合物とインキュベートされることができ、非特異的結合は、総結合即ち、非標識リガンドの不存在下における結合から差し引いて、試験された各サンプルに対する特異的な結合に到達する。洗浄、かくはん、振とう、濾過のような他の工程は、必要ならば、本アッセイに含むこともできる。溶液に残存している膜結合型リガンドの分離後、且つ、リガンドが結合した量を(例えば、放射活性同位体をカウントすることによって)定量化する前に、通常、洗浄の工程が含まれる。試験化合物の存在下に得られた特異的結合は、試験化合物が受容体結合を置換した程度を測定するために、標識されたリガンドのみの存在下に得られた結合と比較される。

10

#### 【0017】

結合アッセイを実施する際に、実際に、結合がいくつかの他の機構によって阻害されている場合には、試験化合物が受容体と相互作用していることを明らかにし得るといふ人為的な結果は避けるように注意しなければならない。例えば、試験化合物は、それ自体がBAM-22Pの結合を実質的に阻害しない緩衝液中に存在しなければならない、また、好ましくは、いくつかの異なる濃度で試験されなければならない。また、試験化合物の調製物は、タンパク質分解の活性を測定しなければならない、そして抗タンパク質分解酵素がアッセイ中に含まれることが望ましい。最後に、化合物は、結果についてスクッチャード解析を実施するのに十分な濃度範囲で、BAM-22Pの結合を置換しているものとして同定された化合物を再検討することが大変望ましい。このタイプの解析は当分野で周知であり、受容体に対する試験化合物のアフィニティーを測定するのに使用することができる(例えば、Ausubel, et al., Current Protocols and Molecular Biology, 11.2.1-11.2.19 (1993); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work, et al., Ed. N.Y. (1978)を参照されたい)。コンピュータープログラムを、本結果の解析の助けとして使用してもよい(例えば、Munson, P., Methods Enzymol. 92: 543-577 (1983))。

20

30

#### 【0018】

受容体の活性に対するそれらの効果を基にして、受容体に対するBAM-22Pの結合を阻害する薬剤は、アゴニストまたはアンタゴニストのいずれかであることができる。受容体の活性化は、多数の異なる方法を用いてモニターすることができる。例えば、ホスホリパーゼCアッセイは、マイクロタイタープレートのウェル上の細胞を増殖させ、次いで試験化合物の存在下または不存在下にてウェルをインキュベートすることによって実施することができる。次いで、総イノシトールホスファターゼ(IP)は、樹脂カラム中に抽出し、そしてアッセイバッファー中に再懸濁することができる。このように回収されたIPのアッセイは、IP濃度を測定するための任意の方法を用いて実施することができる。典型的に、ホスホリパーゼCアッセイは結合アッセイとは別に実施されるが、それもまた、単一の細胞調製物でホスホリパーゼCの結合アッセイを実施することが可能である。

40

#### 【0019】

受容体の活性化は、細胞内カルシウムの濃度の測定値に基づいて測定され得る。例えば、形質転換されたHEK-293細胞は、コンフルエントになるまでガラス製のカバースライド上で増殖され得る。リンスした後、Fluo-3、Fluo-4およびFURA-2AM(Molecular Probe F-1221)のような薬剤の存在下でインキュ

50

ベートされ得る。リンスして、さらにインキュベーションした後、カルシウム置換は、光度計を用いて測定されることが出来る。細胞内カルシウム濃度を測定するための他のタイプのアッセイは、当業者に周知であって、それもまた使用してもよい。

#### 【0020】

受容体の固有の活性を測定するアッセイ、例えばイノシトールリン酸測定に基づいたアッセイは、インバースアゴニストの活性を測定する目的で使用されることが出来る。アゴニストの活性を遮断するが、それ自身の活性は有さないアンタゴニストとは異なって、インバースアゴニストは、アゴニストによって産生される応答に対して全く反対の生物学的応答を生じる。例えば、あるアゴニストが細胞内カルシウムの増加を促進する場合には、インバースアゴニストが細胞内カルシウムレベルを減少させるのである。

10

#### 【0021】

前文で議論された、放射性リガンドおよび細胞活性化アッセイは、単に特定の試験化合物がヒト/ラットDRR受容体に対するBAM-22Pの結合を変更するか否か、そしてアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するか否か、を測定するのに使用し得るアッセイのタイプの例を提供するに過ぎない。本発明と両立し得るこれらのアッセイにおいては多くのバリエーションがある。このようなアッセイには、受容体に結合したBAM-22Pを検出するための手段として標識された抗体の使用を包含するか、または本明細書の実施例に記載された蛍光イメージングプレートリーダーのアッセイの形態を取り得る。

#### 【0022】

##### 【実施例】

20

##### I. 方法

クローンラットおよびヒトDRRの調製：

特許WO 99/32519の明細書を参照されたい。

##### 発現

HEK-293細胞は、スーパーフェクト(Superscript)試薬(Qiagen)を用いたラットおよびヒトDRR(pcDNA3.0ベクター、Invitrogen)をコード化する哺乳類発現構築物でトランスフェクトされた。DRRの安定な受容体のプールは、選択マーカー(G418、0.9mg/ml)を適用することによって開発され、該細胞はこの選択培地にて維持された。DRRクローンに特異的なmRNAの存在は、ノーザンブロット分析によって、さらに逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって、評価された。

30

#### 【0023】

##### リガンド

クローンラットおよびヒトのDRRのリガンドを同定するために、ペプチドおよび非ペプチドのリガンドのコレクションは、市販品(Sigma, CalBiochem, American Peptide Company, Bachem, RBI, Phoenix)から得られた。化合物を3μMにて水/DMSOに溶解し、96ウェルマイクロプレートに置いた。総計して1000化合物(ペプチドおよび非ペプチド)が調製され、試験された。

#### 【0024】

##### アッセイ

機能アッセイは、96ウェルプラットホームにて、蛍光カルシウム指示薬Fluo-3(Molecular Probes)を用いてFLIPR(Fluorescent Imaging Plate Reader, Molecular Devices)を用いて実施された。HEK-293細胞は、受容体を発現しているか、または野生型の細胞のいずれかであり、次のようにしてFluo-3をローディングした。ラットおよびヒトDRRを発現する安定なHEK-293クローンまたは親細胞を、96ウェルプレートにて10,000細胞/ウェルの濃度でプレートに播種した。実験を実施した日に、DRR細胞に(4μM Fluo-3および20%プルロニック・アシド(pluronic acid)を含有する10%ウシ胎児血清を用いたダルベッコ改変培地と一緒に)蛍光溶液を口

40

50

ーディングした。細胞は、加湿されたチャンバーにて1時間37℃でインキュベートした。インキュベーション工程の後に、細胞を20mM HEPESおよび0.1% BSA (pH 7.4) 含有 Hanks 液にて5回洗浄した。細胞をFLIPRシステムを用いて解析し、異なる化合物に反応した細胞内カルシウムの流動を測定した。

#### 【0025】

##### II. 結果

HEK-293細胞は、アッセイの内部標準として用いられ得るいくつかのGPCR (例えば、ブラジキニンおよびPACAP受容体) を内生的に発現する。バックグラウンドのシグナルは、FLIPRアッセイを用い、親のHEK-293細胞(トランスフェクトしていない)にて化合物の全てで確立した。クローンDRRを発現するHEK-293細胞を全ての化合物で刺激し、カルシウム応答を親のHEK-293細胞におけるそれらと比較した。10  
唯一の化合物ヒト副腎髄質ドコサペプチド(BAM-22P)のみが、野生型の細胞ではなくて、形質転換された細胞におけるシグナルを一貫して引き出すことができる。これは、BAM-22Pが遺伝子組換えによって発現された受容体と相互作用している  
ということを示している。この結論の確認は、形質転換されていない細胞または他のオー  
ファン受容体をトランスフェクトされた細胞ではなくて、DRRを用いてトランスフェク  
トされた細胞において、BAM-22Pによって用量反応関係が観察されたことによっ  
て得られた。このようにして、クローンラットおよびヒトDRRはBAM-22Pに対する  
特異的な受容体であるということが確立された。ラットおよびヒトのDRR受容体は、  
BAM-22Pの作用を模倣する化合物(アゴニスト)か、またはBAM-22Pの作用に  
拮抗する化合物(アンタゴニスト)かのいずれかをスクリーニングするのに使用すること  
ができる。20

#### 【0026】

スクリーニングアッセイは、上記のFLIPRアッセイを用いて実施されることが  
できる。また、BAM-22Pはヨウ素化して、全細胞または膜にて、放射性リガンド結合ア  
ッセイにおけるトレーサーとして、使用されることができ、使用され得る他のアッセイと  
しては、GTPアゼアッセイ、アデニルシクラーゼアッセイ、イノシトールリン酸を測  
定するアッセイ、およびレポーター遺伝子アッセイ(例えば、ルシフェラーゼ、アクエオ  
リン、アルカリホスファターゼなど)を利用するアッセイ)が含まれる。

#### 【0027】

本明細書の全ての引例は、全て参照によって組み込まれる。本発明は本明細書に完全に記  
載してきたので本発明は、発明または任意のその実施態様の精神または範囲に影響す  
ることなく、条件、パラメータなどの広範で均等な範囲内で、実施し得ることが当業者に理  
解される。30

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/33416 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/566, C07K 14/705, 14/70, 14/665 (74) Agent: GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY; AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje (SE).
- (21) International Application Number: PCT/SE01/02264 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 16 October 2001 (16.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/240,889 17 October 2000 (17.10.2000) US (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): ASTRAZENECA AB [SE/SE]; S-151 85 Södertälje (SE).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): AHMAD, Sultan [IN/CA]; AstraZeneca R & D Montreal, 7171 Fredrick-Banting, St Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA). GRAZZINI, Eric [FR/CA]; AstraZeneca R & D Montreal, 7171 Fredrick-Banting, St Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA). GROBLEWSKI, Thierry [FR/CA]; AstraZeneca R & D Montreal, 7171 Fredrick-Banting, St Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA). LEMBO, Paolo [CA/CA]; AstraZeneca R & D Montreal, 7171 Fredrick-Banting, St Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA). SCHMIDT, Ralf [DE/CA]; AstraZeneca R & D Montreal, 7171 Fredrick-Banting, St Laurent, Quebec H4S 1Z9 (CA).
- Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/33416 A1

(54) Title: ASSAYS

(57) Abstract: The present invention is directed to assays that can be used to screen for compounds that act as agonists or antagonists or inverse agonists of bovine adrenal medulla docosapeptide (BAM-22P). The assays are based upon the binding of BAM-22P to the rat and human DRR receptors.

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

### ASSAYS

#### Field of the Invention

The present invention is directed to assay methods that can be used to determine whether a test compound has activity as a modulator of the binding and activity of BAM-22P at the rat and human DRRs. Compounds identified as being effective modulators have potential use as therapeutic agents in treating pain, neuropathic and inflammatory disorders.

#### Background of the Invention

##### 10 A. Bovine Adrenal Medulla docosapeptide

##### BAM22 peptide: YGGFMRRVGRPEWWM DYQKRYG-OH.

The preproenkephalin A (PPA) cDNA was cloned in 1983 (Nature 297:431-434, 1982). The PPA gene contains several basic amino acids within its coding sequence which can give rise to several peptides upon protease cleavage. Such peptide cleavage products include BAM12P, BAM20P, BAM22P, MEAGL, MEAP and Peptide E and F (Bovine adrenal medulla). Some of these peptides have been implicated in neuronal survival, and analgesia (Int. J. Devl. Neuroscience 10, No2, pp171-179, 1992, Eur. J. Pharmacol., 85,355-356, 1982).

BAM-22P is a peptide precursor of Met-enkephalins (Mizuno, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97 (4): 1283-90 (1980). In mammals, BAM-22P has been shown to be present (by immunoreactivity) in peripheral tissue such as the adrenal medulla, islets of Langerhans (Timmers, *Diabetes.* 35 (1):52-7 (1986)) and in the central nervous system including many hypothalamic and thalamic nuclei, interpeduncular nucleus, substantia nigra, the colliculi, periaqueductal gray, parabrachial nuclei, trigeminal motor and spinal nuclei, nucleus raphe magnus and other raphe nuclei, nucleus reticularis paragigantocellularis, vestibular nuclei, several noradrenergic cell groups, nucleus tractus solitarius, as well as in the dorsal horn of the spinal cord (Khachaturian, *J. Comp. Neurol.* 220 (3):310-20 (1983).

Although the precise physiological activity of BAM-22P in mammals is not known, it has been implicated in motor coordination and analgesia (*J. Pharmacol Exp Ther* 1986 Sep; 238 (3):1029-1044, Eur. J. Pharmacol., 85,355-356, 1982).

BAM-22P is an orphan peptide and its specific receptor has not been identified despite its known ability to bind to the mu, delta and kappa opioid receptors. The present inventors

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-2-

have discovered that BAM-22P is able to activate mammalian dorsal root receptors (DRR), including the rat and human DRR receptors.

#### B. G Protein-Coupled Receptors

G protein coupled receptors (GPCRs) constitute a family of proteins sharing a common structural organization characterized by an extracellular N-terminal end, seven hydrophobic alpha helices putatively constituting transmembrane domains and an intracellular C-terminal domain. GPCRs bind a wide variety of ligands that trigger intracellular signals through the activation of transducing G proteins (Caron, *et al.*, *Rec. Prog. Horm. Res.* 48:277-290 (1993); Freedman, *et al.*, *Rec. Prog. Horm. Res.* 51:319-353 (1996)).

More than 300 GPCRs have been cloned thus far and it is generally assumed that there exist well over 1,000 such receptors. Roughly 50-60% of all clinically relevant drugs act by modulating the functions of various GPCRs (Gudermann, *et al.*, *J. Mol. Med.* 73:51-63 (1995)). Many of the clinically relevant receptors are located in the central nervous system.

Among the GPCRs that have been identified and cloned is a gene that encodes a protein known as DRR which is homologous to the receptors of the mas oncogene family. A rat counterpart of DRR was found to be homologous and based upon the location of cells expressing DRR mRNA, it has been proposed that the receptor plays a role in transmission of pain. However, the endogenous ligand for this family of receptors has not previously been identified (Cell: 45, 711-719 1986, JBC 273,11867-11873 1998, WO 99/32519).

#### 20 Summary of the Invention

The present invention provides assays capable of identifying potential therapeutic compounds which are agonists or antagonists of the DRR receptor. Recombinant cells expressing either rat or human DRR can be used in conjunction with BAM-22P in screening assays designed to identify agonists and antagonists. Thus, in its first aspect, the invention is directed to a method of assaying a test compound for its ability to bind to the DRR receptor. This is accomplished by incubating cells expressing the receptor gene with BAM-22P and test compound. The extent to which the binding of BAM-22P is displaced is then determined. Radioligand assays or enzyme-linked immunosorbent assays may be performed in which either BAM-22P or the test compound is detectably labeled. Although any cell expressing DRR may be used, a recombinant cell expressing a heterologous DRR gene from either the rat or human is preferred. The term "heterologous" as used herein refers to any DRR gene transfected into a cell, *i.e.*, the term refers to any non-endogenous DRR.

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-3-

The invention also encompasses methods of determining if a test compound is an agonist, antagonist, or inverse agonist of BAM-22P binding based upon a functional assay. One way to carry out such assays is to incubate a cell expressing DRR with the test compound and to then determine whether intracellular phospholipase C, adenylyl cyclase activity or intracellular calcium concentrations are modulated. Results should typically be compared with those obtained when incubations are performed in a similar manner but in the absence of test compound. In general, functional assays of this type will be performed in conjunction with binding assays of the sort described above. The preferred cell for use in the assays is a recombinant cell that has been transformed with a heterologous DRR gene. Test compounds that act as agonists should produce an increase in phospholipase C, decrease or increase in adenylyl cyclase activity or increase in intracellular levels of calcium. Inverse agonists may reduce phospholipase C activity or intracellular calcium levels, particularly if assays are performed in the presence of a fixed amount of BAM-22P. Antagonists, should block the binding of BAM-22P to the receptor but not produce the opposite response in terms of phospholipase C activity or intracellular calcium that is the hallmark of an inverse agonist.

#### Detailed Description of the Invention

The present invention is directed to assays that can be used to screen compounds for their ability to modulate the binding of BAM-22P to the rat and human DRR receptors. Any form of BAM-22P that has been reported may be used, but the preferred peptide is 22 amino acids in length and has the sequence: BAM22 peptide: YGGFMRRVGRPEWWM DYOKRYG-OH . (SEQ ID NO:1). This peptide may be obtained commercially (Bachem) or can be synthesized using standard methodology well known in the art. The peptide may be detectably labeled with radioisotopes such as <sup>125</sup>I or, alternatively, fluorescent or chemiluminescent labels can be incorporated. Also, the peptide can be joined to enzymes that are readily detectable such as horseradish peroxidase.

The DRR receptor may be cloned from rat and/or human cells using known processes such as that described in WO 99/32519. The Examples section provides a detailed description of a procedure that may be used in cloning DRR. Once obtained, the DRR sequence should be incorporated into an expression vector with a promoter active in mammalian cells (Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press (1989)). Examples of promoters that may be used include that of the mouse metallothionein I gene (Hamer, *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273-288 (1982)); the immediate-early and TK promoter of

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-4-

herpes virus (Yao, *et al.*, *J. Virol.* 69:6249-6258 (1995); McKnight, *Cell* 31:355-365 (1982)); the SV 40 early promoter (Benoist, *et al.*, *Nature* 290:304-310 (1981)); and, the CMV promoter (Boshart, *et al.*, *Cell* 41:521-530 (1985)). Vectors may also include enhancers and other regulatory elements.

5 Once expression vectors have been constructed, they can be introduced into a mammalian cell line by methods such as calcium phosphate precipitation, microinjection, electroporation, liposomal transfer, viral transfer or particle mediated gene transfer. Although other mammalian cells may be used, HEK-293 cells have been found to give successful results and a procedure for expressing DRR in these cells is described in the Examples section. Standard procedures for selecting cells and for assaying them for the expression of DRR (*e.g.*, by Northern analysis) may be performed.

10 Once the BAM-22P peptide and cells expressing the rat and human DRR receptors have been obtained, assays may be performed to determine whether test compounds have any effect on binding. A wide variety of different types of assays can be performed using standard methods well known in the art. For example, in radioligand binding assays, cells expressing DRRs are incubated with BAM-22P and with a compound being tested for binding activity. The preferred source of DRR is recombinantly transformed HEK-293 cells. Other cells may also be used provided they do not express other proteins that strongly bind BAM-22P. This can easily be determined by performing binding assays on cells transformed with DRR and comparing the results obtained with those obtained using their non-transformed counterparts.

15 Assays may be performed using either intact cells or with membranes prepared from the cells (*see e.g.*, Wang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10230-10234 (1993)). As suggested above, the membranes, or cells, are incubated with BAM-22P and with a preparation of the compound being tested. After binding is complete, receptor is separated from the solution containing ligand and test compound, *e.g.*, by filtration, and the amount of binding that has occurred is determined. Preferably, the ligand used is detectably labeled with a radioisotope such as <sup>125</sup>I. However, if desired, other types of labels can also be used. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein, isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin *o*-phthaldehyde and fluorescamine.

20 Useful chemiluminescent compounds include luminol, isoluminol, therromatic of acridinium ester, imidazole, acridinium salt, and oxalate ester.

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-5-

Nonspecific binding may be determined by carrying out the binding reaction in the presence of a large excess of unlabeled ligand. For example, labeled BAM-22P may be incubated with receptor and test compound in the presence of a thousandfold excess of unlabeled BAM-22P. Nonspecific binding should be subtracted from total binding, *i.e.*,  
5 binding in the absence of unlabeled ligand, to arrive at the specific binding for each sample tested. Other steps such as washing, stirring, shaking, filtering and the like may be included in the assays as necessary. Typically, wash steps are included after the separation of membrane-bound ligand from ligand remaining in solution and prior to quantitation of the amount of ligand bound, *e.g.*, by counting radioactive isotope. The specific binding obtained in the  
10 presence of test compound is compared with that obtained in the presence of labeled ligand alone to determine the extent to which the test compound has displaced receptor binding.

In performing binding assays, care must be taken to avoid artifacts which may make it appear that a test compound is interacting with receptor when, in fact, binding is being inhibited by some other mechanism. For example, the compound being tested should be in a  
15 buffer which does not itself substantially inhibit the binding of BAM-22P and should, preferably, be tested at several different concentrations. Preparations of test compound should also be examined for proteolytic activity and it is desirable that antiproteases be included in assays. Finally, it is highly desirable that compounds identified as displacing the binding of BAM-22P be reexamined in a concentration range sufficient to perform a Scatchard analysis  
20 on the results. This type of analysis is well known in the art and can be used for determining the affinity of a test compound for receptor (*see e.g.*, Ausubel, *et al.*, Current Protocols and Molecular Biology, 11.2.1-11.2.19 (1993); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work, *et al.*, Ed. N.Y. (1978)). Computer programs may be used to help in the analysis of results (*e.g.*, Munson, P., *Methods Enzymol.* 92:543-577 (1983)).

Depending upon their effect on the activity of the receptor, agents that inhibit the binding of BAM-22P to receptor may be either agonists or antagonists. Activation of receptor may be monitored using a number of different methods. For example, phospholipase C assays may be performed by growing cells in wells of a microtiter plate and then incubating the wells in the presence or absence of test compound total inositol phosphates (IP) may then be  
25 extracted in resin columns, and resuspended in assay buffer. Assay of IP thus recovered can be carried out using any method for determining IP concentration. Typically, phospholipase C

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-6-

assays will be performed separately from binding assays, but it may also be possible to perform binding phospholipase C assays on a single preparation of cells.

5 Activation of receptor may also be determined based upon a measurement of intracellular calcium concentration. For example, transformed HEK-293 cells may be grown on glass cover slides to confluence. After rinsing, they may be incubated in the presence of an agent such as Fluo-3, Fluo-4 and FURA-2 AM (Molecular Probe F-1221). After rinsing and further incubation, calcium displacement may be measured using a photometer. Other types of assays for determining intracellular calcium concentrations are well known in the art and may also be employed.

10 Assays that measure the intrinsic activity of the receptor, such as those based upon inositol phosphate measurement, may be used in order to determine the activity of inverse agonists. Unlike antagonists which block the activity of agonists but produce no activity on their own, inverse agonists produce a biological response diametrically opposed to the response produced by an agonist. For example, if an agonist promoted an increase in intracellular calcium, an inverse agonist would decrease intracellular calcium levels.

The radioligand and cell activation assays discussed above merely provide examples of the types of assays that can be used for determining whether a particular test compound alters the binding of BAM-22P to the human/rat DRR receptors and acts as an agonist or antagonist. There are many variations on these assays that are compatible with the present invention. 20 Such assays may involve the use of labeled antibodies as a means for detecting BAM-22P that has bound to receptor or may take the form of the fluorescent imaging plate reader assays described in the Examples section herein.

#### Examples

##### I. Methods

25 *Preparation of Clone Rat and Human DRRs:*

*See description in Patent WO 99/32519*

##### *Expression*

HEK-293 cells were transfected with a mammalian expression construct coding for the rat and human DRRs (pcDNA 3.0 vector, Invitrogen) using the Superfect reagent (Qiagen). A 30 stable receptor pool of DRR was developed by applying a selection marker (G418, 0.9 mg/ml) and the cells were maintained in this selection medium. The presence of mRNA specific for

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-7-

clone DRR was assessed by Northern blot analysis and by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

#### *Ligands*

In order to identify the ligand of clone rat and human DRRs, a collection of peptide and non-peptide ligands was obtained from commercial sources (Sigma, CalBiochem, American Peptide Company, Bachem, RBI, Phoenix). The compounds were dissolved in water/DMSO at 3  $\mu$ M and placed in 96 well microplates. A total of 1000 compounds (peptides and non-peptides) were prepared and tested.

#### *Assay*

A functional assay was performed with FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader, Molecular Devices) using the fluorescent calcium indicator Fluo-3 (Molecular Probes) on a 96 well platform. HEK-293 cells, either expressing the receptor or wild type cells, were loaded with Fluo-3 as follows. Stable HEK-293 clones expressing rat and human DRR or parental cells were plated at a density of 10,000 cells/well in a 96 well plate. On the day of the experiment, the DRR cells were loaded with fluorescent solution (Dulbecco's modified medium with 10% fetal bovine serum containing 4  $\mu$ M Fluo-3 and 20% pluronic acid). The cells were incubated at 37 C for one hour in a humidified chamber. Following the incubation step, cells were washed five times in Hanks' with 20 mM Hepes and 0.1% BSA (pH 7.4). The cells were analyzed using the FLIPR system to measure the mobilization of intracellular calcium in response to different compounds.

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-8-

## II. Results

HEK-293 cells endogenously express some GPCRs such as bradykinin and PACAP receptors which can be used as internal controls for assays. The background signal was established with all of the compounds in the parental HEK-293 cells (non-transfected) using the FLIPR assay. HEK-293 cells expressing the clone DRR were stimulated with all compounds and calcium responses were compared with those in parental HEK-293 cells. Only one compound, bovine adrenal medulla docosapeptide (BAM-22P), consistently elicited signals in the transformed cells but not the wild type cells. This indicates that BAM-22P is interacting with the recombinantly expressed receptors. Confirmation of this conclusion was obtained by the observation of a dose-response relationship with BAM-22P in the cells transfected with DRR, but not in the non-transfected cells or in cells transfected with other orphan receptors. Thus, it has been established that clone rat and human DRR is a specific receptor for BAM-22P. The rat and human DRR receptors can be used to screen compounds which either mimic the action of BAM-22P (agonists) or antagonize the action of BAM-22P (antagonists).

Screening assays can be performed using the FLIPR assay described above. Alternatively, BAM-22P can be iodinated and used as a tracer in radioligand binding assays on whole cells or membranes. Other assays that can be used include the GTP $\gamma$ S assay, adenylyl cyclase assays, assays measuring inositol phosphates, and reporter gene assays (*e.g.*, those utilizing luciferase, aequorin, alkaline phosphatase, etc.).

All references cited herein are fully incorporated by reference. Having now fully described the invention, it will be understood by those of skill in the art that the invention may be performed within a wide and equivalent range of conditions, parameters and the like, without affecting the spirit or scope of the invention or any embodiment thereof.

25

30

35

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-9-

CLAIMS

1. A method of assaying a test compound for its ability to bind to a mammalian DRR receptor, comprising:
  - 5 a) incubating a cell expressing a mammalian DRR receptor with bovine adrenal medulla docosapeptide (BAM-22P), and said test compound; and
  - b) determining the extent to which the binding of said BAM-22P to said DRR receptor is displaced by said test compound.
- 10 2. The method according to claim 1, wherein the mammalian DRR is a rat or human DRR.
3. The method of claim 1 or claim 2, wherein said cell expressing DRR is a recombinant cell that has been transformed with a heterologous DRR gene.
4. The method of claim 1 or claim 2, wherein said assay is a radioligand assay and said BAM-22P or said test compound is radioactively labeled.
- 15 5. The method of claim 1 or claim 2, wherein said assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and either said BAM-22P or said test compound is joined to an enzyme.
6. The method of any one of claims 1 to 5, further comprising determining whether said test compound significantly increases or decreases either the phospholipase C or intracellular calcium concentration of said cell.
- 20 7. A method of determining if a test compound is an agonist, antagonist or inverse agonist of BAM-22P, comprising:
  - a) incubating a cell expressing DRR with said test compound;
  - 25 b) determining the intracellular phospholipase C or adenylyl cyclase activity or intracellular concentration of calcium of said cell during the incubation of step a);
  - c) comparing the results obtained in step b) with the results obtained when incubations are performed in the absence of said test compound; and
  - 30 d) concluding that said test compound is an agonist of BAM-22P if the level of phospholipase C or adenylyl cyclase activity or intracellular calcium is significantly higher in the presence of said test

WO 02/33416

PCT/SE01/02264

-10-

compound than in its absence, or concluding that said test compound is an antagonist of BAM-22P if the level of phospholipase C or adenylyl cyclase activity or intracellular calcium concentration is significantly lower in the presence of said test compound than in its absence.

5

8. The method of claim 7, wherein said cell is a recombinant cell that has been transformed with a heterologous DRR gene (rat and human).
9. The method of either claim 7 or claim 8, wherein said cell expressing DRR and test compound are incubated in a medium further comprising BAM-22P.

10

WO 02/33416

11

PCT/SE01/02264

SEQUENCE LISTING

5 <110> AstraZeneca AB  
<120> ASSAYS  
<130> 100201

10 <150> US 60/240,889  
<151> 2000-10-17  
<160> 1

15 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
<210> 1  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 1  
Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp  
1 5 10 15

25 Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly  
20

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |   | International application No.<br>PCT/SE 01/02264   |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER   |   |  |
| IPC7: G01N 33/566, C07K 14/705, C07K 14/70, C07K 14/665<br>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)   |   |  |
| IPC7: C07K, G01N, C12N, C12Q  |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |  |
| SE,DK,FI,NO classes as above  |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  |   |  |
| EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, DIALOG   |   |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                              | Relevant to claim No.  |
| A   | WO 9932519 A1 (ASTRA PHARMA INC.), 1 July 1999<br>(01.07.99), see specially claim 42<br>--                      | 1-9  |
| A   | WO 0183555 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY),<br>8 November 2001 (08.11.01), see the whole document<br>-- | 1-9  |
| A   | EP 1118621 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.),<br>25 July 2001 (25.07.01), see the whole document<br>--      | 1-9  |
| A   | US 4388236 A (STEIN), 14 June 1983 (14.06.83),<br>see specially the claims<br>--                                | 1-9  |
| <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  |   | "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  |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date   |   | "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   |
| "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) |   | "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 |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |   | "Z" document member of the same patent family  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |   |  |
| Date of the actual completion of the international search   | Date of mailing of the international search report  |  |
| 2 February 2002   | 12-02-2002  |  |
| Name and mailing address of the ISA:<br>Swedish Patent Office<br>Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM<br>Facsimile No. +46 8 666 02 86  | Authorized officer<br>Patrick Andersson/BS<br>Telephone No. +46 8 782 25 00                                     |  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 01/02264

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|---|---|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A   | US 5367053 A (DOOLEY ET AL), 22 November 1994<br>(22.11.94), see the whole document<br><br>--   | 1-9                   |
| A   | The Journal of Biological Chemistry, Volume 273,<br>No. 19, 1998, Thomas Walther et al: "Sustained<br>Long Term Potentiation and Anxiety in Mice<br>Lacking the Mas Protooncogene",<br>pages 11867-11873, see specially page 11867<br><br>--<br>----- | 1-9                   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

2/02 PCT/SE 01/02264

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9932519 A1                          | 01/07/99         | AU 1990499 A            | 12/07/99         |
|  |                  | BR 9814335 A            | 10/10/00         |
|  |                  | CN 1284966 T            | 21/02/01         |
|  |                  | EP 1051434 A            | 15/11/00         |
|  |                  | NO 20003221 A           | 10/08/00         |
|  |                  | PL 341524 A             | 23/04/01         |
|  |                  | SE 9704836 D            | 00/00/00         |
|  |                  | SK 8752000 A            | 18/01/01         |
|  |                  | TR 200001861 T          | 00/00/00         |
|  |                  | WO 0183555 A2           | 08/11/01         |
| EP 1118621 A1                          | 25/07/01         | AU 5999399 A            | 26/04/00         |
|  |                  | AU 5999499 A            | 26/04/00         |
|  |                  | JP 2000189174 A         | 11/07/00         |
|  |                  | WO 0020456 A            | 13/04/00         |
| US 4388236 A                           | 14/06/83         | US 4264492 A            | 28/04/81         |
| US 5367053 A                           | 22/11/94         | AT 206137 T             | 15/10/01         |
|  |                  | CA 2163020 A            | 24/11/94         |
|  |                  | DE 69428441 D           | 00/00/00         |
|  |                  | EP 0702558 A,B          | 27/03/96         |
|  |                  | JP 9508350 T            | 26/08/97         |
|  |                  | WO 9426296 A            | 24/11/94         |

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 エリック・グラッツィーニ  
カナダ国ケベック H 4 S 1 Z 9 . サンローラン . フレデリック - バンティング 7 1 7 1 . アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・モントリオール

(72)発明者 ティエリー・グロブレウスキ  
カナダ国ケベック H 4 S 1 Z 9 . サンローラン . フレデリック - バンティング 7 1 7 1 . アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・モントリオール

(72)発明者 パオラ・レムボー  
カナダ国ケベック H 4 S 1 Z 9 . サンローラン . フレデリック - バンティング 7 1 7 1 . アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・モントリオール

(72)発明者 ラルフ・シュミット  
カナダ国ケベック H 4 S 1 Z 9 . サンローラン . フレデリック - バンティング 7 1 7 1 . アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・モントリオール

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA36 DB07 FB01 FB03 FB08  
4B063 QA01 QA06 QQ08 QQ79 QQ89 QR48 QR50 QR77 QS33 QX02  
QX07

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 化验   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2004511806A</a>  | 公开(公告)日 | 2004-04-15 |
| 申请号            | JP2002536552   | 申请日     | 2001-10-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 阿斯利康(瑞典)有限公司   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 阿斯利康Akuchieboragu  |         |            |
| [标]发明人         | サルタンアーマッド<br>エリックグラッツィーニ<br>ティエリーグロブレウスキ<br>パオラレムポー<br>ラルフシュミット  |         |            |
| 发明人            | サルタン・アーマッド<br>エリック・グラッツィーニ<br>ティエリー・グロブレウスキ<br>パオラ・レムポー<br>ラルフ・シュミット   |         |            |
| IPC分类号         | C07K14/47 C07K14/705 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/502 C07K14/47 C07K14/705 G01N33/5008 G01N33/566 G01N2333/705 G01N2500/10  |         |            |
| FI分类号          | G01N33/50.Z C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/566  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DB07 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB08 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02 4B063/QX07 |         |            |
| 代理人(译)         | 西村 公佑<br>杉本博司  |         |            |
| 优先权            | 60/240889 2000-10-17 US  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及可用于筛选作为牛肾上腺髓质docosapopeptide ( BAM-22P ) 的激动剂, 拮抗剂或反向激动剂的化合物的试验。该测定基于BAM-22P与大鼠和人DRR受体的结合。