

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.04.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.05.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/99109094**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.02.2002**
(Věstník č. 2/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/03683**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/68377**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3989

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/12

C 07 K 14/705

A 61 K 38/17

G 01 N 33/68

(71) Přihlašovatel:
MERCK PATENT GMBH, Darmstadt, DE;

(72) Původce:
Clemetson Kenneth J., Bern, CH;

(74) Zástupce:
Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Rekombinantní destičkový kolagenový receptor
glykoproteinu VI a jeho farmaceutické použití**

(57) Anotace:

Glykoprotein VI (GPVI), jeho izolace čištění a produkce rekombinantního GPVI. Použití GPVI, zvláště rekombinantního GPVI pro ošetřování patologických příhod, souvisejících přímo nebo nepřímo s poruchami srážení krve, jako jsou trombotické a kardiovaskulární choroby. Použití mimobuněčného rekombinantního proteinu pro screeningové testy při hledání možných inhibitorů GPVI vázaní na membrány k zábraně vazby trombocytů a destiček na kolagen. Využití změn GPVI k monitorování věku destiček a kardiovaskulárních chorob.

08.11.01

PV/2001-3989

82693

01-3013-01-Ma

Rekombinantní destičkový kolagenový receptor glykoproteinu VI
a jeho farmaceutické použití

Oblast techniky

Vynález se týká glykoproteinu VI (GPVI), jeho izolování, čištění a způsobů pro rekombinantní produkci. Obzvláště se vynález týká použití GPVI, s výhodou rekombinantního GPVI, k léčení poruch a patologických příhod souvisejících přímo nebo nepřímo s poruchami srážení krve, jako jsou trombotické a kardiovaskulární choroby. Mimobuněčného rekombinantního proteinu je také možno použít k zavedení skriningových testů při hledání potenciálních inhibitorů GPVI vázaných na membrány k zabránění interakcím destiček a kolagenu. GPVI na povrchu destiček se v průběhu života destiček in vivo mění a může se ho proto použít jako markeru věkového profilu destiček.

Dosavadní stav techniky

Glykoprotein VI je 62/65 kDa (neredukovaný, případně redukováný) glykoprotein destičkových membrán, který tvoří komplexy spolu s obecnou subjednotkou Fc γ . Podjednotka GPVI obsahuje vazební místo pro kolagen a podjednotka Fc γ zodpovídá za signalizování. Komplexy se tvoří na hlavních receptorech kolagenu na povrchu destičky, což je rozhodující pro aktivaci destičky v odezvě na kolagen. Rozeznávací sekvence kolagenu sestává ze sekvencí (GlyProHyp) $_n$. Jsou známy pacienti v Japonsku, kteří mají vrozený nedostatek GPVI. Mají mírné problémy s krvácivostí a jejich destičky účinkují jen slabě na kolagen, pravděpodobně vlivem jiných receptorů. Mnoho poznatků se získalo o signalizačních kaskádách vznikajících na GPVI, což se silně podobá signalizačním kaskádám z imunitních receptorů včetně receptorů T-buněk, receptorů B-buněk a receptorů pří-

rodních zabíječů buněk. K těmto kaskádám patří obzvláště rodina tyrosinkináz, jako je Fyn a Lyn, stejně jako p72^{SYK} a mnoho jiných tyrosinkináz a fosfatáz a adaptorů proteinů jako je LAT. Hlavním cílem těchto kaskád je aktivace fosfolipázy Cgama2, která štěpí fosfolipidy na sekundární mediátorový diacylglycerol a IP₃. Má se zato, že GPVI se podílí na aktivaci destičkového integrinu $\alpha 2\beta 1$, který má hlavní roli v ulpívání destiček na stěnách poškozených cév. Myši s vyřazenou ("knocked out") podjednotkou Fcgama mají destičky, které stále vykazují odezvy na kolagen, což znamená, že zbytkový stav $\alpha 2\beta 1$ může být také regulován komplexem GPVI/Fcgama. Destičkový kolagenový receptor GPVI je úzký vztah k přírodním zabíječům aktivátorů receptorů rodiny p58KAR stejně jako Fc α R.

Adheze a aktivace zbytkových kolujících destiček v místě poškození cévy je prvním stupněm v procesu vedoucím k vytváření trombu, který se přemění v hemostatickou zátku. Kolagen je jednou z hlavních součástí cévní stěny zodpovědný za aktivaci destiček. Existuje mnoho typů kolagenu a sedm z nich se nachází v subendotelových vrstvách. Bylo identifikováno několik různých receptorů pro kolagen na destičkách, avšak za hlavní se dnes považuje integrin $\alpha 2\beta 1$ a neintegrinový GPVI. Ačkoli $\alpha 2\beta 1$ je dobře charakterizován, a obě podjednotky byly klonovány a sekvencovány již před několika lety, zůstává struktura GPVI těžko postižitelnou, ačkoli bylo identifikováno několik význaků. Přibližně před dvaceti lety se zjistilo, že GPVI je hlavním destičkovým glykoproteinem s molekulovou hmotností v rozmezí 60 až 65 kDa a s kyselou hodnotou pH. Jeho role jako domnělého receptoru kolagenu byla stanovena po identifikaci pacienta v Japonsku s mírnou poruchou krvácivosti, jehož destičky vykazovaly specifický defekt odezvy na kolagen a postrádaly tento receptor. Tento pacient také vyvinul autoprotitilátky proti deficitnímu receptoru a těch se použilo k dalšímu charakterizování molekuly. Nověji se zjistilo, že GPVI je spojen nekovalentně se známou podjednotkou Fcgama, která působí jako

signalizační část komplexu. Ukázalo se také, že rozeznávací sekvencí kolagenu pro GPVI je opakující se triplet Gly-Pro-Hyp uvnitř spirální struktury kolagenového tripletu, a že syntetických peptidů založených na této struktuře by se mohlo použít jako specifických agonistů zaměřených na GPVI. Ukázalo se, že komplex GPVI/Fcgama signalizuje do vnitřku destiček mechanismem podobným imunitnímu receptoru, zahrnujícím aktivaci p72^{SYK} a vedoucí kaskádou interakcí kináza/fosfatáza/adaptor proteinu k aktivaci PLCgama2 a tedy k uvolňování granulí a agregaci destiček. Dalším stupněm v charakterizaci této molekuly bylo předvedení, že hadí lectin typu C, convulxin z tropického chřestýše *Crotalus durrisus terrificus* je schopen aktivovat destičky shlukováním GPVI multimerní interakcí. Ukázalo se, že convulxin se váže specificky na GPVI, což umožňuje způsob čištění tohoto receptoru ve spojení se zavedenými přístupy.

Z dosavadního stavu techniky se jeví GPVI jako velmi zajímavá sloučenina v mnoha terapeutických oborech, týkajících se především aplikací, jež se vztahují přímo nebo nepřímo ke případům koagulace krve závislým na interakci kolagen-destičky. Úkolem vynálezu tedy je připravit GPVI v rekombinantní formě a doložit jeho účinnost jako přímého terapeutického cíle nebo jako nástroje ke skrínování krátkých sloučenin, obzvláště chemicky syntetizovaných nebo syntetizovatelných sloučenin majících schopnost inhibovat interakci přírodní destičky-kolagen. Vynález se týká také částí fragmentů proteinu GPVI, které si zachovaly svou biologickou aktivitu, kterou je vazba na kolagen.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou DNA kodující glykoprotein VI nebo jeho biologicky aktivní fragmenty.

Vynález je úspěšný v čištění přiměřených množství GPVI

pro primární charakterizaci a pro sekvencování peptidu. Sekvencí je použito ke konstrukci primerů pro PCR k identifikaci pozitivní sekvence v knihovně DNA. Této sekvence DNA je pak použito jako sondy k izolování téměř úplné sekvence cDNA z knihovny a vypuštění sekvence 5' se získá použitím způsobu RACE z knihovny destiček cDNA.

Vynález je také užitečný v předvedení použití rekombinantního GPVI jako terapeuticky aplikovatelné sloučeniny, která je schopna při podání pacientovi například s poškozenými krevními cévy, vázat kolagen a tak zabraňovat, aby se destičky, obsahující na membránu vázaný GPVI, vázaly na uvedený kolagen. Rekombinantní rozpustná mimobuněčná doména GPVI obsahuje kolagen vázající místa a může zabraňovat aktivaci destiček kolagenem. Mohla by tudíž být aplikovatelná k léčení chorobných stavů zahrnujících zvýšenou aktivaci destiček kolagenem, jako je aterosklerotické rozrušování krevních destiček u chorob jako je nestabilní angina nebo během chirurgických zásahů jako je perkutánní transluminální koronární angioplastika (PTCA), kdy se arterie otevírají balonkovým katetrem, což způsobuje značné poškození stěny cév a velkou aktivaci destiček a často vede k pozdějšímu opětovnému ucpání cévy. Přednost rekombinantních fragmentů GPVI ve srovnání se současnými léčebnými metodami je v tom, že působí v ranném stavu prevencí nebo redukcí aktivace destiček spíše než potlačením příhod po aktivaci destiček, jako je agregace antagonisty GPIIb-IIIa. Uvolňují se tudíž menší množství obsahu destičkových granulí včetně růstových faktorů a chemokinů, které se podílejí nejenom na opravě ran ale na přestavbě cévních stěn migrací hladkého svalstva a přitažením fagocytových buněk, jako jsou monocyty, o nichž je známo, že přispívají k aterosklerose. Fab fragment humanizovaných myších monoklonálních protilátek proti GPVI by se dalo použít s podobným efektem k blokování GPVI na povrchu destiček s podobnou aplikací jako shora uvedeno.

Rekombinantního GPVI podle vynálezu může být použito při vazební zkoušce na kolagen ke skrínování malých molekul (například v kombinačních knihovnách) schopných inhibovat tuto interakci a kterého může být použito k vyvinutí terapeutických sloučenin které jsou inhibitory interakcí kolagen-destičky. Vhodnou, derivatizací se tyto sloučeniny stávají orálně dostupnými. Hlavním účelem je opět připravit sloučeniny redukcí interakce GPVI-kolagen a tedy aktivace destiček v situacích, kdy přicházejí destičky do styku s kolagenem. Skrínovací technologie, použitá podle vynálezu, je dobře zavedená v dosavadním stavu techniky. Při takových skrínovacích zkouškách umožňuje vynález vyhledat a vyvinout nové cíle, které mohou inhibovat GPVI vázané na přírodní membrány na povrchu destiček jako kolagenový antagonist. Takovými cíli mohou být malé chemické molekuly, jež pak mohou být podkladem pro další výzkumy.

Jinou velkou aplikací GPVI a reakčních činidel, která rozoznávají specifické domény GPVI, je použití jako markerů věku a funkčnosti destiček. Mladé destičky se obecně považují za aktivnější a funkčnější než starší. Mladé destičky se váží a jsou aktivovány hadím jedem lektin konvulxin C-typ, který je specifický pro GPVI a jak stárnou, klesá jejich vázání a stupeň aktivace. Může to být způsobeno buď proteolytickými nebo konformačními změnami v GPVI nebo jejich spojením s Fc gama díky aktivaci destiček nebo poruch v jejich oběhu. To může být užitečným parametrem k měření věku a funkčního profilu destiček u pacientů stejně jako u normálních osob během lékařských kontrol. Věkový profil destiček se mění u mnoha chorob ovlivňujících kostní dřeň nebo imunitní systém a mohl by být významným diagnostickým kritériem, kdyby byly dostupné jiné metody pro jeho stanovení. Například pacienti s chorobami zahrnujícími zvýšený obrát destiček vykazují více mladých destiček, zatímco pacienti po chemoterapii nebo ozařování vykazují stabilně stárnoucí populaci. Takový věkový profil může tedy sloužit k přesnému monitorování léčby. U normální zdravé popu-

lace je velmi málo známo o rozdělení věkového profilu a jeho úloze jako předvídače změn zdraví. Není známo, zda změny GPVI jsou způsobovány částečným zahrnutím destiček v hemostatických příhodách a zda změny mohou být výraznější u pacientů s rozsáhlou kardiovaskulární chorobou. V současné době se k detekci mladých oběhových destiček obsahujících mRNA používá thiazolové oranže. Tato mRNA se rychle rozkládá, což omezuje metodu na pouze nejmladší destičky. Léčiva, kterých by bylo možno použít v takové zkoušce, by obsahovala specifické GPVI proteiny hadího jedu, jako je konvulxin, nebo monoklonální nebo polyklonální protilátky rozeznávající N-koncovou oblast GPVI nebo monoklonální protilátky rozeznávající nová místa nebo konformace vystavené proteolýzou N-koncových domén nebo specifické konformace přítomné buď v nedotčené molekule a nikoli ve staré a naopak nebo malé chemické jednotky k rozeznání specificky nedotčeného GPVI nebo jeho modifikované formy. Tato reakční činidla by byla značena fluorescenčním markerem nebo spolu s fluorescenčně značenou druhou protilátkou nebo afinitním reakčním činidlem a použita v průtokové cytometrii ke změření vazebního profilu destiček. V dalším stupni by bylo možno přijmout alternativní, méně pracné techniky založené na automatickém měření profilu destiček. S použitím způsobů třídění s průtočnou cytometrií nebo magnetickými kuličkami by mělo být možno oddělovat mladé destičky od starých destiček ke zkoumání faktorů účastnících se odstraňování destiček z oběhu. Reakční činidla rozeznávající specifické formy GPVI by byly klíčem k takovým studiím.

Vynález se tedy týká DNA kodujícího glykoproteinu VI nebo jeho biologicky aktivních fragmentů, obzvláště v sekvenci podle obr. 2.

Vynález se dále týká DNA kodující Glykoprotein VI se sekvencemi aminokyselin podle obr. 1a a 1b.

Vynález se dále týká farmaceutického prostředku obsahujícího rekombinantní GPVI spolu s farmaceuticky přijatelným ředidlem, nosičem nebo excipientem a jeho použití k výrobě léčiv v terapeutickém oboru trombotických a kardiovaskulárních příhod a poruch souvisejících s interakcemi destičky-kolagen.

Dále se vynález týká použití rekombinantního GPVI jako skrínovacího nástroje k detekci specifických inhibitorů interakcí destičky-kolagen.

Vynález se ještě dále týká použití GPVI jako markeru pro věk destiček a účasti na kardiovaskulárních nemocech.

Možnými medikálními indikacemi a aplikacemi jsou například nestabilní angina pectoris, PTCA, použití stentů v této oblasti, operace koronárních cév, obecné operace krevních cév, operace, které mohou poškodit větší krevní cévy jako jsou operace kyčelního kloubu. Kromě toho jsou zahrnuty všechny indikace pocházející z tromboembolických příhod způsobených poruchami interakce mezi cévní stěnou a koagulačním systémem s vysokým rizikem tvoření trombů a ucpání cév.

Jak shora uvedeno, hodí se protein GPVI a jeho fragmenty podle vynálezu jako farmaceuticky účinné sloučeniny ve farmaceutických prostředcích a kombinacích.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou popřípadě obsahovat přídatné aktivní přísady jako jsou anti-koagulanty jako je hirudin nebo heparin nebo trombolytická činidla jako je plasminogenový aktivátor nebo hementin nebo antagonisty jiných receptorů destiček jako jsou antagonisty GPIIb-IIIa jako abciximab nebo eptifibatid nebo antagonisty ADP-receptoru jako je clopidogrel.

Nový protein a jeho biologicky aktivní fragmenty mohou podle vynálezu tvořit farmaceuticky přijatelné soli s kterou-

koli farmaceuticky přijatelnou netoxickou organickou nebo anorganickou kyselinou. Anorganickými kyselinami jsou například kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová nebo fosforečná a kyselé kovové soli jako je natriummonohydrogenortofosfát a kaliumhydrogensíran. Příklady organických kyselin jsou monokarboxylové, dikarboxylové a trikarboxylové kyseliny, jako je kyselina octová, glykolová, mléčná, pyrohroznová, malonová, jantarová, glutarová, fumarová, jablečná, vinná, citronová, askorbová, maleinová, hydroxymaleinová, benzoová, hydroxybenzoová, fenylactová, skořicová, sylicylová a sulfonová, jako je methansulfonová kyselina. Jakožto soli karboxylového koncového aminokyselinového podílu se příkladně uvádějí netoxické soli karboxylové kyseliny tvořené s kteroukoli vhodnou anorganickou nebo organickou zásadou. Jakožto takové soli se příkladně uvádějí soli s alkalickými kovy jako je sodík a draslík, s kovy alkalických zemin jako je vápník a hořčík, s lehkými kovy skupiny IIIA, včetně hliníku a s organickými primárními, sekundárními a terciárními aminy jako jsou trialkylaminy, včetně triethylaminu, prokainu, dibenzylaminu, 1-ethenaminu, N,N'-dibenzylethylendiaminu, dihydroabiethylaminu a N-alkylpiperidinu.

Výrazem "farmaceuticky přijatelný nosič" se vždy míní inertní, netoxické pevné nebo tekuté plnidlo, ředidlo nebo kapslovací materiál, nereagující škodlivě s účinnou složkou nebo s pacientem. Vhodné, s výhodou tekuté nosiče jsou v oboru známy, jako je sterilní voda, solanka, vodná dextróza, cukerné roztoky, ethanol, glykoly a oleje, včetně ropného, živočišného, rostlinného nebo syntetického původu, jako je například arašidový, sojový a minerální olej.

Prostředky podle vynálezu se mohou podávat v jednotkových dávkách obsahujících běžné netoxické farmaceuticky přijatelné nosiče, ředidla, adjuvanty a nosiče, které jsou typické pro parenterální podávání.

Pod označením "parenterální" se míní subkutánní, intravenózní, intra-artikulární a intratracheální injekční a infusní techniky. Vhodné jsou také jiné druhy podání, jako je orální a topické. Parenterální prostředky a kombinace se nejvhodněji podávají intravenózně buď jako bolus nebo jako konstantní fúze o sobě známými způsoby. Tablety a kapsle k orálnímu podání obsahují běžné excipienty jako jsou pojidla, plnidla, ředidla, tabletovací činidla, mazadla, desintegrátory a smáčedla. Tablety se mohou povlékat způsoby známými v oboru.

Kapalné orální prostředky mohou být ve formě vodných nebo olejových suspenzí, roztoků, emulzí, sirupů nebo elixírů nebo se mohou podávat jako sušený produkt pro smísení s vodou nebo s jiným vhodným nosičem před použitím. Takové kapalné prostředky mohou obsahovat běžné aditivy jako jsou suspenzační činidla, emulgátory, nevodné nosiče a konzervační činidla. Typické prostředky mohou být ve formě vodných nebo olejových suspenzí, roztoků, emulzí, želé nebo s výhodou emulzních mastí.

Jednotkové dávky podle vynálezu mohou obsahovat denní požadované množství proteinu podle vynálezu, nebo jejich podíly k vytvoření potřebné dávky. Optimální terapeuticky přijatelná dávka a míra dávkování pro daného pacienta (savce včetně lidí) závisí na mnoha činitelích, jako je aktivita použité specifické účinné látky, věk, hmotnost, celkový zdravotní stav, pohlaví, dieta, čas a cesta podání, rychlost uvolňování, účel léčby, například terapie nebo profylaxe, a povaha léčené trombotické nemoci, protideštičková nebo protisrážlivá aktivita.

Proto je v prostředcích a kombinacích užitečných jako protisrážlivá činidla u léčeného pacienta (in vivo) farmaceuticky účinná denní dávka peptidů podle vynálezu přibližně 0,01 až 100 mg/kg tělesné hmotnosti, s výhodou 0,1 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Podle formy podání může jednotková dávka obsahovat 0,5 až 10 mg inhibitoru kolagenu. K dosažení

05.11.01

protisrážlivého účinku v mimotělní krvi je farmaceuticky účinné množství peptidů podle vynálezu 0,2 až 150 mg/l, s výhodou 1 mg až 20 mg/l mimotělní krve.

Popis obrázků na výkresech

Obr. 1 Proteinová sekvence GPVI (jednopísmenový kód)

1a: vůdčí sekvence

1b: zralý protein

Otevřený čtecí rámec: 339 aminokyselin

Hvězda: glykosilační místo

Dvojitě podtržení: transmembránová doména

Podtržení: sekvencované peptidy

Obr. 2 Sekvence nukleotidu GPVI zahrnující volný čtecí rámec 1017 bp plus 3' a 5' oblasti celkem 1249 bp

Vynález blíže objasňuje následující podrobný popis.

Dvě sekvence 7 aminokyselin, vykazující nejmenší degeneraci v genetickém kódu, se volí pro syntesu DNA primerů k zesílení části GPVIcDNA pomocí PCR. Jelikož umístění obou peptidů v proteinu bylo zcela neznámé, připraví se pro každý z nich dva degenerační primery jeden mající smys, druhý nemající smysl ("antisense"). Těchto primerů je použito k zesílení knihovny kostní dřeně. Kombinace smyslového 5' TYA THC CNG CNA TGA ARMG 3' primeru kodující sekvenci PAMKRSL s antismyslovým 5' TTR TAN ARN GCR AAY TGR TC 3' odpovídajícím DQFALYK zesílí fragment DNA 221 bp. Vedle vybraných peptidů koduje zesílená DNA LysC/AspN peptid DQLELVATGVFAKPSLSAQPGPAVSS, zřetelně spojující sekvenci k cDNA pro GPVI.

Výsledkem skrínování 600 000 pfu z knihovny kostní dřeně s tímto fragmentem 221 bpDNA jsou čtyři pozitivní pfu. Tři mají inzert 1350 bp byť vyříznutý restrikcí enzymem Sal I nebo

EcoR I a patří do superrodiny IgG. Čtvrtý má inzert 4,6 kb digescí Sal I a dává dva fragmenty 2300 bp a 1300 bp při zpracování EcoRI. Jeho DNA koduje sekvenci 10 peptidů odvozených z aminokyseliny sekvencující GPVI avšak končí těsně u aminoza-
končení. Nemohl být nalezen startovací methionin nebo vůdčí sekvence, je však přítomno více než 2000 bp předem sekvencova-
ného nečtecího rámce DNA končící v sekvenci Alu. Pokus 5' kon-
cová RACE se ukončila na destičkové poly ARNA s primery umís-
těnými v části sekvence GPVI, která byla zesílena sekvencí
peptidů. Nalezl se fragment 348 bp včetně 278 bp na sekvenci
čtvrtého klonu a 70 bp nové formy bp 1987 odpovídající 14 ami-
nokyselinám včetně prvního methioninu před spadnutím zpět na
ustavenou sekvenci GPVI. Bylo tedy možno sekvencovat cDNA ob-
sahující celkem 1249 bp, 25 bp 5' sekvenci proti směru starto-
vacího kodonu, otevřeného čtecího rámce 1017 bp kodujícího
protein, včetně vůdčí sekvence, se 339 aminokyselinami a 3' ob-
lastí 207 bp včetně stop kodonu.

cDNA kodující destičky GPVI se klonuje a sekvencuje
z knihovny cDNA lidské kostní dřeně pomocí RACE s destičkou
mRNA k nahrazení chybějící 5' sekvence. Otevřený čtecí rámec
1017 bp koduje 339 aminokyselin a netranslatovanou oblast 3'.
Analýsa hydrofobicity sekvence aminokyselin ukázala přítomnost
dvou domnělých transmembránových domén, domnělé signální sek-
vence 20 aminokyselin a domén 19 aminokyselin mezi zbytky 247
a 265 zralého proteinu. Sekvence a její translace aminokyselin
jsou znázorněny na obr. 2 a 1. Porovnání se sekvencí aminoky-
selin nejvíce podobných molekul nalezených v genové bance
(GenBank) ukazuje zřetelně, že patří do superrodiny imunoglo-
bulinu a extracelulární doména obsahuje dvě IgC2-doménové
smyčky tvořené dvěma disulfidovými můstky. Je to membránou
pronikající proteinová třída jedné molekuly s N-zakončením na
vnějšku a traversuje membránu jednou. Nejtěsněji příbuzné mo-
lekuly patří k třídě receptoru přírodního zabíječe, která ob-
sahuje jak inhibiční, tak aktivační typy. GPVI patří zřejmě do

aktivační podtřídy nejenom svou funkcí, ale také, jelikož na rozdíl od inhibiční třídy, neobsahuje sekvence ITIM ve své cytoplasmové doméně. Ani neobsahuje žádné tyrosinové zbytky, které by se mohly podílet na fosforylaci. V jeho doméně je několik zbytků threoninu a serinu, ty se však netýkají kritérií pro dohodnoté sekvence kinázy. Podobně jako aktivační třída receptoru NK, obsahuje GPVI zbytek angininu na třetí aminokyselině membránu pronikající domény, která se podílí na tvorbě komplexu s podjednotkou Fc gama. Cytoplasmová doména obsahuje 51 aminokyselin, vykazujících jen malou podobnost (v oblasti těsně pod membránou) s cytoplasmovými doménami této rodiny. To naznačuje, že tato doména GPVI může být sdružena s různými typy cytoplasmové molekuly spíše než ostatní členy rodiny. GPVI obsahuje pouze samostatné domnělé N-glykolyzační místo u Asn69. Doména těsně nad membránou pod beta vrstvami Ig doménového ukončení, je však bohatá na threoninové a serinové zbytky, které by mohly poskytnout O-glykosylační místa, jako se zjistila u GPIb α a GPV. Hlavní funkce této O-glykosylace spočívá pravděpodobně v poskytnutí receptorové struktury dobře rozšířené z povrchu destiček k usnadnění interakcí s jejich objemnými ligandy. Jelikož GPVI byl nověji stanoven jako sialoglykoprotein, rozdíl v molekulové hmotnosti mezi teoretickou hmotností aminokyselin (37 kDa) a hmotností stanovenou gelovou elektroforézou (65 kDa sníženou) musí být způsoben jeho glykosylací.

Struktura přírodních zabíjecích receptorů obou doménových typů se zjistila rentgenovými krystalografickými studiemi a ukázalo se, že obě Ig-domény tvoří ostrý úhel s místem receptoru pro peptid nesoucí antigeny HLA ležícími na vnější straně oblouku. Přímé porovnání struktury vazebního místa peptidu HLA s místem kolagenu bezprostředně naznačuje, proč mají tyto receptory stejný původ, jelikož několikanásobné α šroubovicové struktury vazebního místa HLA a peptidu, který obsahuje, se silně podobají trojnásobné šroubovicové struktuře kola-

genu. Má se zato, že přírodní zabíjecí receptory pracují dimerizačním mechanismem se dvěma receptory rozeznávajícími dvě oddělená místa HLA na buňce kterou buňka přírodního zabíječe zkoumá. Tato dimerizace je možná součástí aktivačního nebo deaktivačního mechanismu, závisejícího na třídě receptoru. V případě GPVI může být také stejně možné, že se dvě molekuly GPVI spojí s jedním Fc gama, jelikož každý monomer dimeru Fc gama má rozlišovací sekvenci. Stechiometrie není však dosud známa a záleží na struktuře kolagenů, kolagenu podobných peptidů, které působí cestou GPVI a konvulxinu, jeví se jako možné, že síla signálu se vztahuje k řadě komplexů GPVI/Fc gama, které jsou spolu propleteny. Jinými receptory destiček patřícími do této Ig-rodiny jsou ICAM-2 (CD102) a PECAM(CD31).

Všechny mikroorganismy, buněčné linie, expresní systémy, hostitelé expresí, plasmidy, promotory, rezistanční markery, replikační původy, restrikční místa nebo jiné fragmenty nebo části vektorů, o kterých je zmínka v popisu ne přímo ve spojení s nárokovaným vynálezem, jsou komerčně nebo jinak obecně dostupné. Za předpokladu, že neexistují jiné překážky, je jich použito pouze jako příkladů a nejsou nezbytné pro podstatu vynálezu a mohou být nahrazeny jinými vhodnými nástroji a biologickými materiály.

Způsoby, které jsou nezbytné podle vynálezu jsou zde podrobně popsány. Jiné způsoby, které nejsou podrobně popsány, jsou známými standardními způsoby pro pracovníky v oboru, nebo jsou popsány podrobněji v uvedených odkazech a v patentové a ve standardní literatuře (například Sambrook a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Colt Spring Harbor, 1989; Harlow Line (1989) Antibodies: Laboratory Manual, Colt Spring Harbor, 1988).

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Materiály

Protein A-Sefaróza, peroxidázou conjugované kozí anti-myší a anti-králičí protilátky, albumin hovězího séra, jed hada *Crotalus durissus terrificus*, aglutinin pšeničných zrn (WGA), N-hydroxysukcinimidylchlorformátem aktivovaná zesíťená 4% kuličková agaróza a Triton X-114 (obchodní produkt společnosti Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), oktanoyl-N-methylglukamid (ONMG) a nonanoyl-N-methylglukamid (NNMG) (obchodní produkt společnosti Oxyl Chemie, Bobbingen, Německo).

Příklad 2

Izolace GPVI z destiček

Membránové glykoproteiny se izolují z destiček shora popsaným způsobem. V podstatě se destičky (ze 40 buffy-koz) promyjí a lysují se ve 2% Tritonu X-114 v přítomnosti inhibitorů proteázy. Triton X-114 a vodné fáze se oddělí a detergentová fáze se vnese na sloupec pšeničného aglutinu spojeného se Sefarózou 4B. Destičkové glykoproteiny se eluují za použití 10 mM Tris HCl, hodnota pH 7,4, 30 mM NaCl, 0,2 % oktanoyl-N-methylglukamidu (ONMG) a 2 % N-acetylglukosaminu. Po dialýze a zkoncentrování se vnese roztok glykoproteinů na sloupec konvulxinu vázaného na N-hydroxylsukcinamidyl-p-nitrofenylchlorformát aktivovaný zesíťenou 4% zrnitou agarózou (1 mg/ml). Sloupec se promyje 4 objemy 10 mM Tris HCl, hodnota pH 7,4, 30 mM NaCl, 0,2 % nonanoyl-N-methylglukamidu (NNMG) a pak 4 objemy 10 mM Tris HCl, hodnota pH 7,4, 30 mM NaCl a 2 % NNMG. GPVI se eluuje 0,08% SDS v 10 mM Tris HCl, hodnota pH 7,4. Roztok se zkoncentruje a vnese se na preparační gel 8,50% polyakrylamidu použitím modelu 491 PrepCell (BioRad, CA). Preparativní elektroforéza se provede za neredukovaných podmínek

05.11.01

podle instrukcí výrobce. GPVI se eluuje v jediném pásu při 65 kDa. Frakce se promyje, zkoncentruje na Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) a resuspendují se v 10 mM Tris HCl, hodnota pH 7,4 a 0,1% ONMG.

Příklad 3

Aminokyselinová analýza GPVI

GPVI se digeruje s endoproteinázami LysC a AspN (Boehringer Mannheim Německo). Deset vytvořených peptidů se oddělí re-verní fázovou chromatografií HPLC a sekvencuje se na pulzním kapalinovém proteinovém sekvenceru Applied Biosystem model 477A s on-line analyzátozem aminokyseliny fenylthiohydantoin model 120A.

Příklad 4

Zesílení fragmentu 221 bp kodujícího část GPVI z knihovny lam-bdagt11cDNA

Vzorek (10^{10} pfu) (destičky vytvářejících jednotek) z knihovny lidské kostní dřeně (Clonetech, Palo Alto, CA) se zesílí pomocí dvou kombinací 4-degeneračních primerů. Koncentrace konečného primeru je 2 μ M, koncentrace dNTP je 200 μ M a použije se 2U/100 μ l reakce AmpliTaqCold (Perkin Elmer, Rotkreuz, Švýcarsko). Podmínky PCR jsou 5 cyklů při teplotě 37 °C následované 30 cykly při teplotě 44 °C. Smyslový 19 mer 5' TYATHCCN-GCNATGAARMG3' a antismyslový 20 mer 5' TTRTANARNGCRAAYTGRTC3' zesílí fragment 221 bp, který byl subklonován v Bluescript KS⁺ (Stratagene, La Jolla, CA) a sekvencuje se použitím soupravy T7 Sequenase kit (Amersham, Švýcarsko).

Příklad 5

Skrínování knihovny lam-bdagt11 cDNA sondou 221 bp GPVI

Fragment 221 bp se odřízne z plasmidu, vyčistí se a ozna-

či se $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (20MBq/50 μl , Hartmann Analytik, Braunschweig, Německo) pomocí soupravy High Prime Labelling kit (Boehringer Mannheim, Švýcarsko). Skrínuje se knihovna lidské kostní dřeně podle výrobcovy instrukce. Pozitivní fágy se nechají růst, jejich DNA se izoluje a subklonuje se v BlueScriptu pomocí míst ether EcoRI nebo Sall a sekvencuje se. Sekvencování se provede pomocí systému ABS RACE. Destičkový poly ARNA se připraví shora popsaným způsobem (Power a kol. Cytokine 7, str. 479 až 482, 1995). Reversní transkripce (30 μl se provede pomocí 5 μg polyARNA primerem 5' TGAATGAGAGCGGTCAGTTCAGC3' (20 μM) dNTP (1 mM), RNasin (40 U), pufru 1X AMV a 20 U AMV reversní transkriptázy po 20 minut při teplotě 45 °C, pak 20 minut při teplotě 52 °C. Reakční směs se zpracuje 2 μl 6N NaOH 30 minut při teplotě 65 °C, neutralizuje se 2 μl 6N octovou kyselinou a zkoncentruje se v zařízení Centricon 30 (Amicon). Kotva se váže na první standardní DNA podle protokolu Aptes a Siebert (BioTechniques 15, str. 890 až 893, 1993). Provede se zahrnutí PCR pomocí primeru komplementárního ke kotvě a primeru 5' TTGTACAGAGCAAATTGGTC3' (35 cyklů, 55 °C a následovaný primerem 5' GACCAGAGGCTTCCGTTCTG3' (30 cyklů při teplotě 53 °C). Nejvyšší pruh (350 bp) se oddělí agarozovou elektroforézou od nižších, subklonuje se na BlueScriptu a sekvencuje se.

Příklad 6

Příprava anti-GPVIFab a F(ab')_2

Polyklonální antiséra proti lidské GPVI se generují v králících. Podle popisu se čistí IgG z králíčího anti-GPVI antiséra. Provede se digesce IgG imobilizovaným papainem (Pierce) k vytvoření fragmentů Fab podle standardního výrobcova protokolu. Fragmenty Fab se oddělí od nedigerovaného IgG a fragmentů Fc pomocí imobilizovaného sloupce Proteinu A (Sigma). Průtok se zavede do dialyzační zkušavky, zkoncentruje se použitím pevného polyethylenglykolu 20 000, opatrně se dialyzuje proti 20 mM Hepes, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, hodnota pH 7,4 a uloží se

při teplotě 4 °C až do použití. Fragmenty $F(ab')_2$ se připraví pepsinovou digescí IgG, hmotnostní poměr enzymu k substrátu 1:50, v 0,5M acetátového pufru, hodnota pH 4,0, 18 hodin při teplotě 37 °C. Hodnota pH se opraví na 7,4 zředěným roztokem hydroxidu sodného a vzorek se dialyzuje proti 20 mM fosfátu, hodnota pH 7,4. Fragmenty $F(ab')_2$ se oddělí od nedigerovaného IgG a fragmentů Fc použitím chromatografie Proteinu A. Protekly produkt se zavede do dialyzační zkumavky, zkoncentruje se použitím pevného polyethylenglykolu 20 000, intenzivně se dialyzuje proti 20 mM Hepes, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, hodnota pH 7,4 a uloží se v podílech při teplotě -20 °C. Promyté destičky se lysují v Tritonu X-114 a oddělení fází se provede na rozpustném materiálu před izolováním membrány glykoproteinů spojených s fází Triton X-114 afinitní chromatografií na aglutinin Sefaróze 4B pšeničných klíčků, jak shora popsáno. Jelikož GPVI představuje jen velmi malý zlomek shromážděného glykoproteinu destičkových membrán, použije se specifčnosti hadího lektinového konvulxinu typu C k izolaci tohoto receptoru. Afinitní chromatografií na konvulxinu spojeného se Sefarózou 4B se získá protein 65 kDa jako hlavní produkt. Avšak necharakterizovaný materiál jak s vyšším, tak s nižším M_r koelugoval s GPVI a nemohl být odstraněn extensivním promýváním sloupce. Jako konečný stupeň čištění se zařadila preparativní gelová elektroforéza na 8,5% polyakrylamidu. Frakce obsahující GPVI se shromáždí a dají samostatný pruh při reanalyse. Vyčištěný GPVI se testuje na schopnost blokovat shlukování destiček kolagenem. Pozoruje se mírný inhibiční účinek po přidání podílů roztoku GPVI do suspenze destiček. Předběžnou inkubací GPVI s kolagenem před přidáním směsi do suspenze destiček se však může agregaci zabránit způsobem závislým na dávce. Tyto destičky se dále agregovaly po přidání čerstvého kolagen. Za neredukčních podmínek má izolovaný protein M_r 62 kDa s posunem směrem k mírně vyšší M_r (65 kDa) při redukčních podmínkách. Jelikož se zjistilo, že zakončení GPVI je blokováno, digeroval se protein s enzymy LysC a LysC/AspN, což vytvořilo 4 a 6 peptidů,

05.11.01

ze kterých byla sekvence získána. Peptidy se oddělí reverzní fázovou chromatografií HPLC na sloupci C4 a sekvencují se Edmanovým způsobem. Sekvence aminokyselin těchto peptidů jsou v translatované sekvenci cDNA potvrzeny (obr. 1).

Průmyslová využitelnost

Glykoprotein VI (GPVI) zvláště rekombinantní GPVI pro výrobu farmaceutických prostředků k léčení poruch a patologických příhod souvisejících přímo nebo nepřímo s poruchami srážení krve a dále pro screeningové testy při hledání možných inhibitorů GPVI vázaných na membrány k zabránění interakcím destiček a kolagenu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. DNA kodující glykoprotein VI nebo jeho biologicky aktivní fragmenty.
2. DNA podle nároku 1 obsahující částečně nebo plně sekvenci podle obr. 2.
3. DNA podle nároku 1 obsahující sekvenci podle obr. 2.
4. DNA podle nároku 1 až 3 kodující glykoprotein VI obsahující sekvenci aminokyselin podle obr. 1a a 1b.
5. Rekombinantní lidský glykoprotein VI jako léčivo, obsahující sekvenci aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1b.
6. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protein podle nároku 5 a farmaceuticky přijatelné ředidlo, nosič nebo excipient.
7. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje přídatně farmakologicky účinnou látku.
8. Použití rekombinantního GPVI jako skrínovacího činidla k detekci specifických inhibitorů interakcí destička-kolagen.
9. Použití rekombinantního GPVI pro výrobu léčiv v terapeutickém oboru trombotických a kardiovaskulárních příhod a poruch souvisejících s interakcemi destička-kolagen.
10. Použití změn GPVI jako markeru pro věk destiček a pro posouzení vystavení destiček trombotickým a kardiovaskulárním stavům nebo příhodám.

Seznam sekvencí

- <110> Merck Patent GmbH
- 5 <120> Rekombinantní destičkový kolagenový receptor glykoproteinu VI a jeho farmaceutické použití
- <130> GlycoproteinVI-Merck
- 10 <140>
<141>

<160> 1
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1249
<212> DNA
- 20 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (26)..(85)
- 25 <223> vedoucí sekvence

<220>
<221> CDS
<222> (86)..(1042)
- 30 <223> zralý GPVI protein

<400> 1
gagctcagga cagggctgag gaacc atg tct cca tcc ccg acc gcc ctc ttc 52
Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe
1 5
- 35
tgt ctt ggg ctg tgt ctg ggg cgt gtg cca gcg cag agt gga ccg ctc 100
Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly Pro Leu
10 15 20 25
- 40
ccc aag ccc tcc ctc cag gct ctg ccc agc tcc ctg gtg ccc ctg gag 148
Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Glu
30 35 40
- 45
aag cca gtg acc ctc cgg tgc cag gga cct ccg ggc gtg gac ctg tac 196
Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr
45 50 55
- 50
cgc ctg gag aag ctg agt tcc agc agg tac cag gat cag gca gtc ctc 244
Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala Val Leu
60 65 70
- 55
ttc atc ccg gcc atg aag aga agt ctg gct gga cgc tac cgc tgc tcc 292
Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser
75 80 85
- 60
tac cag aac gga agc ctc tgg tcc ctg ccc agc gac cag ctg gag ctc 340
Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu
90 95 100 105

	ggt gcc acg gga gtt ttt gcc aaa ccc tcg ctc tca gcc cag ccc ggc	388
	Val Ala Thr Gly Val Phe Ala Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly	
	110 115 120	
5	cag gcg gtg tcg tca gga ggg gac gta acc cta cag tgt cag act cgg	436
	Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln Thr Arg	
	125 130 135	
10	tat ggc ttt gac caa ttt gct ctg tac aag gaa ggg gac cct gcg ccc	484
	Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro Ala Pro	
	140 145 150	
15	tac aag aat ccc gag aga tgg tac cgg gct agt ttc ccc atc atc acg	532
	Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile Ile Thr	
	155 160 165	
20	gtg acc gcc gcc cac agc gga acc tac cga tgc tac agc ttc tcc agc	580
	Val Thr Ala Ala His Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser	
	170 175 180 185	
25	agg gac cca tac ctg tgg tcg gcc ccc agc gac ccc ctg gag ctt gtg	628
	Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val	
	190 195 200	
30	gtc aca gga acc tct gtg acc ccc agc cgg tta cca aca gaa cca cct	676
	Val Thr Gly Thr Ser Val Thr Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro	
	205 210 215	
35	tcc tcg gta gca gaa ttc tca gaa gcc acc gct gaa ctg acc gtc tca	724
	Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser	
	220 225 230	
40	ttc aca aac aaa gtc ttc aca act gag act tct agg agt atc acc acc	772
	Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr	
	235 240 245	
45	agt cca aag gag tca gac tct cca gct ggt cct gcc cgc cag tac tac	820
	Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr	
	250 255 260 265	
50	acc aag ggc aac ctg gtc cgg ata tgc ctc ggg gct gtg atc cta ata	868
	Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile	
	270 275 280	
55	atc ctg gcg ggg ttt ctg gca gag gac tgg cac agc cgg agg aag cgc	916
	Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg	
	285 290 295	
60	ctg cgg cac agg ggc agg gct gtg cag agg ccg ctt ccg ccc ctg ccg	964
	Leu Arg His Arg Gly Arg Ala Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro	
	300 305 310	
65	ccc ctc ccg cag acc cgg aaa tca cac ggg ggt cag gat gga ggc cga	1012
	Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg	
	315 320 325	
70	cag gat gtt cac agc cgc ggg tta tgt tca tgaccgctga accccaggca	1062
	Gln Asp Val His Ser Arg Gly Leu Cys Ser	
	330 335	

cggtcgtatc caagggaggg atcatggcat gggaggcgac tcaaagactg gcgtgtgtgg 1122
 agcgtggaag caggagggca gaggctacag ctgtggaaac gaggccatgc tgcctcctcc 1182
 5 tgggtgttcca tcagggagcc gttcggccag tgtctgtctg tctgtctgcc tctctgtctg 1242
 agggcac 1249

10 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 2
 Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15

Arg Val Pro Ala
 20 20

<210> 3
 <211> 319
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala Leu Pro Ser Ser
 30 1 5 10 15

Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys Gln Gly Pro Pro
 20 25 30

35 Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser Ser Arg Tyr Gln
 35 40 45

Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg Ser Leu Ala Gly
 50 55 60

40 Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp Ser Leu Pro Ser
 65 70 75 80

Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala Lys Pro Ser Leu
 45 85 90 95

Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly Asp Val Thr Leu
 100 105 110

50 Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala Leu Tyr Lys Glu
 115 120 125

Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp Tyr Arg Ala Ser
 130 135 140

55 Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly Thr Tyr Arg Cys
 145 150 155 160

60 Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser Ala Pro Ser Asp
 165 170 175

Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr Pro Ser Arg Leu
 180 185 190
 5 Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser Glu Ala Thr Ala
 195 200 205
 Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr Thr Glu Thr Ser
 210 215 220
 10 Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser Pro Ala Gly Pro
 225 230 235 240
 Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg Ile Cys Leu Gly
 245 250 255
 15 Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala Glu Asp Trp His
 260 265 270
 Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala Val Gln Arg Pro
 275 280 285
 20 Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys Ser His Gly Gly
 290 295 300
 25 Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly Leu Cys Ser
 305 310 315

<160> 3

30

06.11.01

PV 2001-3989

84695

OBR-1.(1a)

1

20

MSPSP TALFC LGLCLGRVPA

(1b)

1

QSGPLPKPSL QALPSSLVPL EKPVTLCQG PPGVDLYRLE KLSSSRYQDQ (50)AVLFIPAMKR SLAGRYCSY QN*GSLWSLPS DQLELVATGV FAKPSLSAQP (100)GPAVSSGGDV TLQCQTRYGF DQFALYKEGD POPYKNPERW YRASFPITV (150)TAAHSGTYRC YSFSSRDPYL WSAPSDPLEL VVTGTSVTPS RLPTEPPSSV (200)AEFSEATAEL TVSFTNKVFT TETSRSTITTS PKESDSPAGP ARQYYTKGNL (250)VRICLGAVIL IILAGFLAED WHSRRKRLRH RGRAVQRPLP PLPPLPQTRK (300)SHGGQDGGRO DVHSRGLCS (319)

GAGCTCAGGA CAGGGCTGAG GAACCATGTC TCCATCCCCG ACCGCCCTCT (50)
TCTGTCTTGG GCTGTGTCTG GGGCGTGTGC CAGCGCAGAG TGGACCGCTC (100)
CCCAAGCCCT CCCTCCAGGC TCTGCCCAGC TCCCTGGTGC CCCTGGAGAA
GCCAGTGACC CTCCGGTGCC AGGGACCTCC GGGCGTGGAC CTGTACCGCC (200)
TGGAGAAGCT GAGTTCCAGC AGGTACCAGG ATCAGGCAGT CCTCTTCATC
CCGGCCATGA AGAGAAGTCT GGCTGGACGC TACCGCTGCT CCTACCAGAA (300)
CGGAAGCCTC TGGTCCCTGC CCAGCGACCA GCTGGAGCTC GTTGCCACGG
GAGTTTTTGC CAAACCCTCG CTCTCAGCCC AGCCCGGCCC GGCGGTGTGC (400)
TCAGGAGGGG ACGTAACCCT ACAGTGTGAG ACTCGGTATG GCTTTGACCA
ATTTGCTCTG TACAAGGAAG GGGACCCTGC GCCCTACAAG AATCCCGAGA (500)
GATGGTACCG GGCTAGTTTC CCCATCATCA CGGTGACCGC CGCCACAGC
GGAACCTACC GATGCTACAG CTTCTCCAGC AGGGACCCAT ACCTGTGGTC (600)
GGCCCCCAGC GACCCCTGG AGCTTGTGGT CACAGGAACC TCTGTGACCC
CCAGCCGGTT ACCAACAGAA CCACCTTCCT CGGTAGCAGA ATTCTCAGAA (700)
GCCACCGCTG AACTGACCGT CTCATTACA AACAAAGTCT TCACAACCTGA
GACTTCTAGG AGTATCACCA CCAGTCCAAA GGAGTCAGAC TCTCCAGCTG (800)
GTCCTGCCCC CCAGTACTAC ACCAAGGGCA ACCTGGTCCG GATATGCCTC
GGGGCTGTGA TCCTAATAAT CCTGGCGGGG TTTCTGGCAG AGGACTGGCA (900)
CAGCCGGAGG AAGCGCCTGC GGCACAGGGG CAGGGCTGTG CAGAGGCCGC
TTCCGCCCTT GCCGCCCTC CCGCAGACCC GGAAATCACA CGGGGGTCAG (1000)
GATGGAGGCC GACAGGATGT TCACAGCCGC GGGTTATGTT CATGACCGCT
GAACCCCAGG CACGGTCGTA TCCAAGGGAG GGATCATGGC ATGGGAGGCG (1100)
ACTCAAAGAC TGGCGTGTGT GGAGCGTGGA AGCAGGAGGG CAGAGGCTAC
AGCTGTGGAA ACGAGGCCAT GCTGCCTCCT CCTGGTGTTT CATCAGGGAG (1200)
CCGTTCGGCC AGTGTCTGTC TGTCTGTCTG CCTCTCTGTC TGAGGGCAC (1249)