

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

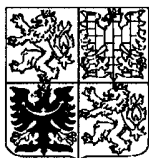
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

734-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29. 08. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.09.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/19637518**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 07. 99**
(Věstník č. 7/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/04709**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/11212**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 07 K	14/47
C 07 K	16/18
G 01 N	33/60
G 01 N	33/68
C 12 Q	1/68
A 61 K	48/00
A 61 K	38/17
A 01 K	67/027

(71) Přihlášovatel:

SIFFERT Winfried, Essen, DE;

(72) Původce:

Siffert Winfried, Essen, DE;

(74) Zástupce:

**Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Podjednotka β3 lidského G proteinu

(57) Anotace:

**Podjednotka beta-3 lidského G-proteinu, kde
tato podjednotka zahrnuje maximálně šest
opakování motivu WD.**

CZ 734-99 A3

Podjednotka $\beta 3$ lidského G-proteinu~~20802~~Oblast techniky

Vynález popisuje nově objevené lidské G-proteiny, zvláště pak podjednotky $\beta 3$ G-proteinů, a způsoby přípravy a použití těchto proteinů v diagnóze a terapii.

Dosavadní stav techniky

Heterotrimerní proteiny vázající nukleotidy guaninu (G-proteiny) jsou velmi důležité při přenosu signálu uvnitř buňky. Zprostředkovávají přenos extracelulárních signálů po stimulaci hormonálních receptorů a dalších receptorů, které po aktivaci procházejí konformační změnou. Ta vede k aktivaci G-proteinů, které mohou následně aktivovat nebo inhibovat intracelulární efekторы (například iontové kanály, enzymy). Heterotrimerní G-proteiny jsou složeny ze tří podjednotek α , β a γ . K dnešnímu dni bylo biochemickými a molekulárně biologickými metodami charakterizováno několik různých podjednotek α , 5 podjednotek β a přibližně 12 podjednotek γ (Birnbaumer L. a Birnbaumer M., Signal transduction by G proteins: vydáno v roce 1994, J. Recept. Res. 15:213 až 252, 1995; Offermanns S. a Schultz G., Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 350:329 až 338, 1994; Nürnberg B., Gudermann T. a Schultz G., Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. 2. část G proteins: structure and function. J. Mol. Med. 73:123 až 132, 1995; Neer E. J., Heterotrimeric G

27.04.99

proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80:249 až 257, 1995; Rens-Domiano S. a Hamm H. E., Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. FASEB J. 9:1059 až 1066, 1995).

Aktivace určitých podjednotek α prostřednictvím receptorů může být inhibována preinkubací s toxinem černého kašle (PTX-pertussis toxin). Mezi tyto podjednotky zahrnujeme především α izoformy α_{i1} , α_{i2} a α_{i3} a různé podjednotky α_o . G-proteiny těchto typů jsou také označovány jako PTX-senzitivní G-proteiny.

Podstata vynálezu

Podjednotky γ a β jsou nositeli základních funkcí při aktivaci G-proteinů a při modulaci intracelulárních reakcí. Všechny podjednotky β G-proteinů, které byly dosud popsány, vykazují vysoký stupeň homologie na úrovni nukleotidové sekvence a rovněž na úrovni aminokyselinové sekvence. Tato homologie existuje nejenom mezi lidskými podjednotkami β (β_1 , β_2 a β_3), ale rovněž při srovnání podjednotek β jiných druhů, například octomilky nebo kvasinek.

Rentgenostrukturní analýzou byly v podjednotkách α , β a γ určeny ty aminokyseliny, které jsou ve vzájemném kontaktu a jsou tudíž nepostradatelné pro uspořádanou tvorbu heterotrimerů.

Všechny podjednotky β G-proteinů, které byly dosud popsány, náleží ke skupině proteinů obsahujících WD motivy. N-konec podjednotky β přednostně interaguje s podjednotkami γ a C-koncová část se účastní interakcí s receptory.

Podjednotky β vytvářejí takzvané „vrtulovité struktury“ (propeller structure). Tyto vrtulovité struktury

v podjednotkách β G-proteinů jsou složeny ze sedmi β -listů, a každý β -list zahrnuje 4 oblasti aminokyselin v antiparalelním uspořádání. Sedmičetná symetrie vrtulovité struktury může být detekována na úrovni aminokyselinové sekvence, kde je zahrnuto sedm opakování motivu WD (tryptofan-kyselina asparágová). Motiv WD je tvořen přibližně 40 aminokyselinami a zahrnuje množství konzervativních aminokyselin včetně sekvence dipeptidu Trp-Asp. Zmíněný motiv WD je často ukončen opakováním WD (obrázek 1).

Nedávno bylo překvapivě zjištěno, že podjednotka β_3 G-proteinů obsahující pouze 6 (namísto původně popsanych 7) motivů WD se vykytuje například u pacientů trpících hypertenzí. Ve srovnání s osobami s normálním tlakem je u pacientů trpících hypertenzí usnadněna buněčná aktivace PTX-senzitivních G-proteinů.

Molekulová analýza odhalila u podjednotky β_3 pacientů trpících hypertenzí novou aminokyselinovou sekvenci, která je ve srovnání se známou sekvencí o 41 aminokyselin kratší. Tato sekvence je znázorněna jako SEK. ID. Č: 2. Formálně je tato sekvence odvozena ze známé lidské podjednotky β_3 delecí aminokyselin 167 až 207.

Odpovídající sekvence DNA kódující protein popsany SEK. ID. Č: 2 je popsána jako SEK. ID. Č: 1.

Příčinou výskytu zkrácené formy podjednotky $G\beta_3$ u pacientů trpících hypertenzí je pravděpodobně alternativní sestřih odpovídajícího genu. Na úrovni DNA se těsně před předpokládaným místem sestřihu nalézá intron. Tento intron začíná za nukleotidem 497 (číslování jako v SEK. ID. Č: 1).

Z templátu genomové DNA bylo pomocí PCR rovněž možné detekovat intron začínající přibližně za nukleotidem 620. Zkrácená forma zřejmě vznikla delecí celého exonu. Vynález dále popisuje způsob přípravy zkrácených forem lidských

podjednotek G β 3 (popsaných výše). Tento způsob zahrnuje expresi nukleotidové sekvence kódující takovou zkrácenou formu v hostitelském organismu.

Pro expresi rekombinantního proteinu je nutné vytvořit konstrukt, který kromě kódující nukleotidové sekvence obsahuje rovněž signální a regulační sekvence jako například promotory, terminátory, místa odpovědná za vazbu na ribozom, polyadenylační signál a podobně. Obecné postupy pro expresi rekombinantních genů jsou odborníkům dobře známé.

Vynález se dále týká použití nukleotidových sekvencí podle vynálezu k přípravě účinných látek pro genovou terapii. Zavedením těchto nukleotidových sekvencí, buď samostatně nebo ve formě vhodného vektoru, do buněk pacientů může být dosaženo snadnější aktivovatelnosti G-proteinů v těchto buňkách.

Toto je žádoucí u velkého množství patologických stavů, které jsou spojeny s poruchami regulace funkce G-proteinů.

Jako onemocnění spojená s poruchou regulace funkce G-proteinu jsou označována onemocnění, při kterých se G-protein účastní přenosu signálu, ale vykonává tuto svoji funkci nefyziologických způsobem.

Mezi tyto poruchy patří kardiovaskulární onemocnění, metabolické poruchy a poruchy imunitního systému.

Kardiovaskulárními onemocněními, které mohou být zmíněny, jsou:

Hypertenze, gravidní hypertenze (gestóza, hypertenze v těhotenství), nemoc srdečních věnčitých tepen, lokalizovaná a/nebo nelokalizovaná ateroskleróza, stenóza krevních cév, restenóza po revaskularizačních procedurách (např. PTCA-perkutánní transluminální koronární angioplastika-s nebo bez implantovaného stentu), sklon k mrtvicím nebo trombózám a zvýšená agregace krevních destiček.

Metabolickými poruchami, které mohou být zmíněny, jsou:

Syndrom látkové výměny, inzulinová rezistence a hyperinzulinémie, diabetes II. typu, diabetické komplikace (např. nefropatie, neuropatie, retinopatie atd.), poruchy metabolismu lipidů, poruchy centrální chemorecepce (CO₂ tolerance, acidózní tolerance, syndrom náhlého úmrtí kojenců (SIDS)).

Poruchami imunitního systému, které mohou být zmíněny, jsou:

Snížená síla imunitní odpovědi organismu (tvorba imunoglobulinů, agresivita T-buněk a NK-buněk), obecně snížená schopnost proliferace včetně snížené schopnosti hojit zranění, sklon ke vzniku nádorů a proliferace zahrnující možnost metastázování zhoubně přeměněných buněk, doba trvání latentní fáze po nákaze HIV, než se nemoc stane klinicky pozorovatelnou, Kaposiho sarkom, sklon k cirhóze jater, transplantální tolerance a odmítnutí transplantátu.

Do rozsahu vynálezu dále spadá použití nukleotidových sekvencí podle vynálezu k diagnóze patologických stavů, zvláště pak ke stanovení rizika postižení onemocnění spojeným s poruchou regulace funkce G-proteinů.

Vynález může být rovněž využit, mimo stanovení rizika určitých poruch, k získání obecných fyziologických údajů týkajících se například chemorecepce, CO₂ tolerance, acidózní tolerance, rizika syndromu náhlého úmrtí kojenců (SIDS) nebo způsobilosti k různým druhům sportů.

Do rozsahu vynálezu dále spadá použití nukleotidových sekvencí komplementárních k nukleotidovým sekvencím kódujícím zkrácenou formu podjednotky Gβ3. Sekvence tohoto typu mohou být použity jako antisense konstrukty k léčbě nebo prevenci patologických stavů spojených s poruchami regulace funkce G-proteinů.

27.04.99

Do rozsahu vynálezu dále spadají způsoby použitelné ke stanovení relativního rizika výskytu onemocnění spojeného s poruchou regulace funkce G-proteinů u daného subjektu, kde je toto stanovení provedeno srovnáním sekvence genu kódujícího podjednotku $\beta 3$ lidského G-proteinu daného subjektu s nukleotidovou sekvencí popsanou jako SEK. ID. Č: 1. V případě, že jsou tyto dvě sekvence shodné, je danému subjektu připsáno zvýšené riziko onemocnění.

Použití vynálezu pro stanovení relativního rizika vývinu nemoci předpokládá odebrání vzorku, který obsahuje genetickou informaci, z organismu pacienta. Toho je zpravidla dosaženo odebráním krve, ze které je izolována nukleová kyselina.

Z izolované nukleové kyseliny pacienta je určena struktura genu pro podjednotku $\beta 3$ G-proteinu a jeho sekvence je porovnávána se sekvencí zobrazenou jako SEK. ID. Č.:1.

Struktura genu může být určena metodou sekvenování nukleové kyseliny. To může být provedeno buď přímo z genomové DNA anebo po amplifikaci nukleové kyseliny například technikou polymerázové řetězové reakce (PCR).

Struktura genu může být určena buď na úrovni genomové DNA anebo na úrovni mRNA nebo cDNA.

Ve výhodném provedení je sekvence stanovena po amplifikaci cDNA metodou PCR. Primery vhodné pro metodu PCR mohou být odborníky snadno vyvozeny ze sekvencí zobrazených jako SEK. ID. Č.:1. Ve výhodném provedení je v každém případě vybrán primer vázající se k řetězci a ke komplementárnímu řetězci před a za zvoleným místem delece.

Pro srovnávání genů mohou být použity i další metody, například metoda selektivní hybridizace nebo metoda mapování restrikcními enzymy.

Diagnostické metody popsané v předchozím textu mohou být rovněž prováděny na úrovni proteinu. Proteiny podle vynálezu

mohou být například použity k produkci specifických protilátek rozpoznávajících zkrácenou formu podjednotky G β 3. Protilátky tohoto typu mohou být, tam kde je to vhodné, použity při stanoveních ELISA nebo k diagnostice (prováděné spolu s nebo jako náhrada diagnostiky na úrovni genů) na úrovni proteinů.

Vynález se dále týká přípravy transgenních zvířat nesoucích výše popsanou genetickou mutaci (zkrácenou podjednotku G β 3). Transgenní zvířata tohoto typu jsou velmi důležitá, zvláště jako živočišný model pro výzkum a léčbu poruch popsaných výše. Odborníkům jsou dobře známy způsoby přípravy transgenních zvířat.

Popis obrázků na výkresech

Obrázek 1 znázorňuje strukturu podjednotky β G-proteinu a její interakci s podjednotkou γ .

Obrázek 2 znázorňuje závislost aktivace G-proteinů indukované působením mastoparanu 7 (MAS 7) na koncentraci mastoparanu, a to u buněk získaných z organismu osob s normálním tlakem (NT-buňky, prázdné kroužky) a u buněk získaných z organismu pacientů trpících hypertenzí (HT-buňky, plná kolečka). Hodnoty EC₅₀ jsou 5 μ M pro HT-buňky a 47 μ M pro NT-buňky.

Obrázek 3 znázorňuje časovou závislost vazby [³⁵S]GTP γ S (stimulované působením mastoparanu 7) na buněčné linie NT (NT, prázdné kroužky) a na HT-buňky (HT, plná kolečka).

Obrázek 4 znázorňuje závislost vazby [³⁵S]GTP γ S (stimulované působením mastoparanu 7) na buněčné membrány izolované z NT-buněk (NT, prázdné kroužky) a z HT-buněk (HT, plná kolečka) na koncentraci GDP.

27.04.99

Obrázek 5 znázorňuje závislost vazby [35 S]GTP γ S (stimulované působením mastoparanu 7) na buněčné membrány izolované z NT-buněk (NT, prázdné kroužky) a z HT-buněk (HT, plná kolečka) na koncentraci Mg^{+2} .

Obrázek 6 znázorňuje rekonstituci aktivace G-proteinů působením extraktů (získaných pomocí cholátu) z buněčných membrán z NT-buněk (NT, prázdné kroužky) a z HT-buněk (HT, plná kolečka).

Obrázek 7 znázorňuje strukturu nové varianty lidského proteinu G 3 a její interakci s podjednotkou γ .

Příklady provedení vynálezu

Vynález je dále ilustrován na následujících příkladech.

Příklad 1

Funkční výsledky aktivace G-proteinů při esenciální hypertenzi

Aktivace G-proteinů byla detailně charakterizována na NT-buňkách a na HT-buňkách. Za tímto účelem byla sledována (a kvantifikována) stimulovaná inkorporace radioaktivně značeného [35 S]GTP γ S postupem popsáním v publikaci Wieland a další (Wieland T., Liedel K., Kaldenberg-Stasch S., Meyer zu Heringdorf D., Schmidt M. a Jakobs K. H., Analysis of receptor-G-protein interactions in permeabilized cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 351: 329 až 336, 1995). G-proteiny byly na počátku aktivovány stimulací buněk (permeabilizovaných pomocí digitoninu) působením peptidu mastoparan 7. Tento peptid simuluje konfiguraci „aktivovaný G-protein spojený s receptorem“, a tudíž může být použit k indukci

aktivace G-proteinů, která není závislá na přítomnosti receptorů (Ross E. M. a Hagashijima T., Regulation of G protein activation by mastoparan and other cationic peptides, Methods Enzymol. 237:27 až 39, 1994). Vazba GTPγS indukovaná pomocí MAS-7 je plně PTX-senzitivní a může být tudíž využita ke kvantifikaci aktivace heterotrimerních G-proteinů typu Gi. Obrázek 2 znázorňuje závislost aktivace G-proteinů indukované působením mastoparanu 7 (MAS 7) na koncentraci mastoparanu, a to u buněk získaných z organismu osob s normálním tlakem (NT) a buněk získaných z organismu pacientů trpících hypertenzí (HT). MAS-7 indukuje vytvoření pevné vazby [³⁵S]GTPγS na HT-buňky, a to s hodnotou EC₅₀ přibližně 5 μM (Obr. 2). Maximální vazby je dosaženo při koncentraci MAS-7 přibližně 25 až 50 μM. Naproti tomu, koncentrace potřebná k indukci stejně intenzivní vazby [³⁵S]GTPγS na NT-buňky je desetinásobně vyšší (obrázek 2). Tato data ukazují, že k aktivaci PTX-senzitivních G-proteinů v HT-buňkách (ve srovnání s NT-buňkami) postačuje podstatně méně aktivovaných receptorů.

Vazba [³⁵S]GTPγS na HT-buňky je podstatně zrychlena (rychlostní konstanta 0,005 s⁻¹ u NT-buněk ve srovnání s konstantou 0,01 s⁻¹ u HT-buněk).

Obrázek 4 znázorňuje závislost vazby [³⁵S]GTPγS (stimulované působením mastoparanu 7) na buněčné membrány izolované z NT-buněk a HT-buněk na koncentraci GDP. Je zřejmé, že maximální stimulace vazby [³⁵S]GTPγS k membránám z HT-buněk je dosaženo při nižších koncentracích GDP (přibližně 0,2 μmol/l) než je tomu u NT-buněk, kde je k dosažení stejného účinku nutné použít GDP v koncentraci 1 μmol/l.

Podobně, maximální intenzity vazby (stimulované působením mastoparanu 7) [³⁵S]GTPγS k membránám izolovaným z HT-buněk je dosaženo při nižších koncentracích volných iontů

Mg^{+2} (přibližně 0,01 mmol/l) než je tomu u NT-buněk, kde je k dosažení vazby [^{35}S]GTP γ S o maximální intenzitě nutné použít volné ionty Mg^{+2} v koncentracích 0,1 mmol/l (obrázek 5).

Další experimenty sledovaly zvýšenou aktivovatelnost G-proteinů odvozených z HT-buněk. Za tímto účelem byly z očí hovězího dobytka purifikovány fotoreceptor rhodopsin a transductin-podjednotka α G-proteinu (αt); Phillips W. J., Wong S. C. a Cerione R. A. Rhodopsin/transductin interactions.

II. Influence of the transductin- $\beta\gamma$ subunit complex on the coupling of the transductin- α subunit to rhodopsin. J. Biol. Chem. 267:17040 až 17046, 1992. G-proteiny byly navíc pomocí cholátu extrahovány z membrán HT- a NT-buněk (Mitchell J., Northup J. K. a Schimmer B. P. Defective guanyl nucleotide binding protein $\beta\gamma$ subunits in a forskolin-resistant mutant of the Y1 adrenocortical cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(19):8933 až 8937, 1992). Byla sledována specifická vazba (indukovaná rhodopsinem = receptorem) [^{35}S]GTP γ S k α -transductinu (αt) a byl zkoumán vliv extraktů (získaných pomocí cholátu) z membrán HT- a NT-buněk na tuto vazbu. Koncentrace proteinů ve zmíněných extraktech byla ve všech experimentech stejná.

Obrázek 6 znázorňuje vliv extraktů (získaných pomocí cholátu) z HT- a NT-buněk na vazbu [^{35}S]GTP γ S k α -transductinu, kde je tato vazba stimulována rhodopsinem.

V tomto případě je zřejmé, že extrakty (získané pomocí cholátu) z HT-buněk stimulují vazbu (katalyzovanou rhodopsinem) [^{35}S]GTP γ S k αt podstatně účinněji než extrakty (získané pomocí cholátu) z NT-buněk.

Provedené experimenty umožňují vyvození následujících závěrů:

- V HT-buňkách je zvýšena aktivovatelnost G-proteinů. Tato aktivovatelnost je, ve srovnání s aktivovatelností G-

27.04.99

proteinů z NT-buněk, daleko účinnější a vyžaduje podstatně méně aktivovaných receptorů a navíc je kinetika aktivace těchto G-proteinů zřetelně rychlejší (obrázky 2 a 3).

- Ve srovnání s NT-buňkami je u HT-buněk maximální aktivace G-proteinů dosaženo při nižších koncentracích GDP a volných iontů Mg^{+2} . Toto pozorování vede k závěru, že proteinové interakce podjednotek α , β a γ probíhají v HT-buňkách podstatně účinněji než je tomu v NT-buňkách (obrázky 4 a 5).
- Vazba [^{35}S]GTP γ S k αt , kde je tato vazba indukována rhodopsinem, je působením extraktů (získaných pomocí cholátu) z HT-buněk stimulována podstatně účinněji než při použití extraktů (získaných pomocí cholátu) z NT-buněk. Tato skutečnost dokazuje, že zvýšená aktivovatelnost G-proteinů z HT-buněk může být rekonstituována v systému in vitro (obrázek 6). Z těchto zjištění je navíc možné jednoznačně říci, že příčiny zásadních změn v HT-buňkách jsou situovány v podjednotkách $\beta\gamma$ heterotrimerních G-proteinů. V experimentech sledujících možnost rekonstituce G-proteinů (o vyšší aktivovatelnosti) z HT-buněk není, v přítomnosti αt , pozorována žádná aktivace podjednotek α přítomných v extraktech buněk (získaných pomocí cholátu). Fotoreceptor rhodopsin navíc specificky aktivuje pouze αt a neaktivuje podjednotky α přítomné ve zmíněných extraktech.

Nově popsaný protein se skládá z 299 aminokyselin. Ve srovnání s lidskou podjednotkou $G\beta 3$ popsanou dříve, se v této nově popsané podjednotce nachází delece v oblasti čtvrtého opakování WD. Vzhledem k pravidelnosti výskytu určitých aminokyselin v sekvenci je nicméně možné předpoklá-

27.04.99

dat, že nový, zkrácený protein G β 3 bude rovněž vytvářet vrtulovitou strukturu, v níž ale bude namísto sedmi listů vrtule (obrázek 1) pouze šest listů (obrázek 9).

Jelikož jsou jak N-konec, tak C-konec nové, zkrácené podjednotky G β 3 stejné jako u dříve popsané podjednotky G β 3, je možné u této zkrácené podjednotky předpokládat stejnou intenzitu interakcí s α a γ podjednotkami heterotrimerních G-proteinů a spřažení s receptory. Ve spojení s výsledky funkčních studií popsaných výše je zřejmé, že nová, zkrácená podjednotka G β 3 je příčinou zvýšené aktivovatelnosti heterotrimerních G-proteinů, pozorované u pacientů trpících hypertenzí.

Předpokládá se, že důvodem výskytu zkrácené podjednotky G β 3 u pacientů trpících hypertenzí je alternativní sestřih genu kódujícího lidskou G β 3. Na úrovni DNA se přímo před předpokládaným místech sestřihu nalézá intron.

Tento intron začíná za bazí 497 v otevřeném čtecím rámci (kde je A ve startovním kodonu ATG je definován jako +1).

Místa sestřihu tohoto intronu a místo větvení jsou znázorněny podtrženou kurzívou.

GGA CAC CAC GTG gtgaggctgaacattgctggtgctggggccttgggagtgggcccg
cctttctctaagagtcctccattttggcag TGC CTT GTG GGA

Jelikož pomocí PCR je možné rovněž detekovat intron začínající v otevřeném čtecím rámci za bazí 620, je zřejmé, že zkrácená forma lidského G β 3 popsaná v této přihlášce je důsledkem alternativního sestřihu původní podjednotky G β 3, kde tento alternativní sestřih vede k deleci celého exonu.

27.04.99

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

1. PŘIHLAŠOVATEL:

- (A) Jméno: BASF Aktiengesellschaft
- (B) Ulice: Carl-Bosh-Strasse 38
- (C) Město: Ludwigshaften
- (D) Stát: Spolková republika Německo
- (E) PSČ: D-67056
- (F) Telefon: 0621/6048526
- (G) Telefax: 0621/6043123
- (H) Telex: 1762175170

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Podjednotka $\beta 3$ lidského G-proteinu

(iii) POČET SEKVENCÍ: 2

(iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:

- (A) ADRESÁT: ČERMÁK-HOŘEJŠ-VRBA, Advokátní a patentová kancelář
- (B) ULICE: Národní 32
- (C) MĚSTO: Praha 1
- (D) STÁT: Česká Republika
- (E) PSČ: 116 66

(v) STROJNĚ ČITELNÁ FORMA:

- (A) TYP MÉDIA: Floppy disk
- (B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní
- (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release č. 1.0, Verze č.

1.25

(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

- (A) DÉLKA: 1394 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ: dva
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA k mRNA

(iii) HYPOTETICKÝ: NE

(iv) ANTISENSE: NE

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo Sapiens

(ix) CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY:

- (A) NÁZEV/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..900

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEK. ID. Č.:1:

ATG GGG GAG ATG GAG CAA CTG CGT CAG GAA GCG GAG CAG CTC AAG AAG	48
Met Gly Glu Met Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Lys	
1 5 10 15	
CAG ATT GCA GAT GCC AGG AAA GCC TGT GCT GAC GTT ACT CTG GCA GAG	96
Gln Ile Ala Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Val Thr Leu Ala Glu	
20 25 30	
CTG GTG TCT GGC CTA GAG GTG GTG GGA CGA GTC CAG ATG CGG ACG CGG	144
Leu Val Ser Gly Leu Glu Val Val Gly Arg Val Gln Met Arg Thr Arg	
35 40 45	
CGG ACG TTA AGG GGA CAC CTG GCC AAG ATT TAC GCC ATG CAC TGG GCC	192
Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Ala	
50 55 60	

ACT GAT TCT AAG CTG CTG GTA AGT GCC TCG CAA GAT GGG AAG CTG ATC	240
Thr Asp Ser Lys Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile	
65 70 75 80	
GTG TGG GAC AGC TAC ACC ACC AAC AAG GTG CAC GCC ATC CCA CTG CGC	288
Val Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg	
85 90 95	
TCC TCC TGG GTC ATG ACC TGT GCC TAT GCC CCA TCA GGG AAC TTT GTG	336
Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Phe Val	
100 105 110	
GCA TGT GGG GGG CTG GAC AAC ATG TGT TCC ATC TAC AAC CTC AAA TCC	384
Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Met Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Ser	
115 120 125	
CGT GAG GGC AAT GTC AAG GTC AGC CGG GAG CTT TCT GCT CAC ACA GGT	432
Arg Glu Gly Asn Val Lys Val Ser Arg Glu Leu Ser Ala His Thr Gly	
130 135 140	
TAT CTC TCC TGC TGC CGC TTC CTG GAT GAC AAC AAT ATT GTG ACC AGC	480
Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Asn Asn Ile Val Thr Ser	
145 150 155 160	
TCG GGG GAC ACC ACG TGT GCC AAG CTC TGG GAT GTG CGA GAG GGG ACC	528
Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Thr	
165 170 175	
TGC CGT CAG ACT TTC ACT GGC CAC GAG TCG GAC ATC AAC GCC ATC TGT	576
Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys	
180 185 190	
TTC TTC CCC AAT GGA GAG GCC ATC TGC ACG GGC TCG GAT GAC GCT TCC	624
Phe Phe Pro Asn Gly Glu Ala Ile Cys Thr Gly Ser Asp Asp Ala Ser	
195 200 205	
TGC CGC TTG TTT GAC CTG CGG GCA GAC CAG GAG CTG ATC TGC TTC TCC	672
Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg Ala Asp Gln Glu Leu Ile Cys Phe Ser	
210 215 220	
CAC GAG AGC ATC ATC TGC GGC ATC ACG TCT GTG GCC TTC TCC CTC AGT	720
His Glu Ser Ile Ile Cys Gly Ile Thr Ser Val Ala Phe Ser Leu Ser	
225 230 235 240	
GGC CGC CTA CTA TTC GCT GGC TAC GAC GAC TTC AAC TGC AAT GTC TGG	768
Gly Arg Leu Leu Phe Ala Gly Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp	
245 250 255	
GAC TCC ATG AAG TCT GAG CGT GTG GGC ATC CTC TCT GGC CAC GAT AAC	816
Asp Ser Met Lys Ser Glu Arg Val Gly Ile Leu Ser Gly His Asp Asn	
260 265 270	
AGG GTG AGC TGC CTG GGA GTC ACA GCT GAC GGG ATG GCT GTG GCC ACA	864
Arg Val Ser Cys Leu Gly Val Thr Ala Asp Gly Met Ala Val Ala Thr	
275 280 285	
GGT TCC TGG GAC AGC TTC CTC AAA ATC TGG AAC TGAGGAGGCT GGAGAAAGGG	917
Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu Lys Ile Trp Asn	
290 295 300	
AAGTGAAGG CAGTGAACAC ACTCAGCAGC CCCCTGCCCCG ACCCCATCTC ATTCAGGTGT	977
TCTCTTCTAT ATTCCGGGTG CCATTCCCAC TAAGCTTTCT CCTTTGAGGG CAGTGGGGAG	1037

07.04.99

CATGGGACTG TGCCTTTGGG AGGCAGCATC AGGGACACAG GGGCAAAGAA CTGCCCCATC	1097
TCCTCCCATG GCCTTCCCTC CCCACAGTCC TCACAGCCTC TCCCTTAATG AGCAAGGACA	1157
ACCTGCCCCCT CCCCAGCCCT TTGCAGGCC AGCAGACTTG AGTCTGAGGC CCCAGGCCCT	1217
AGGATTCTC CCCCAGAGCC ACTACCTTTG TCCAGGCCTG GGTGGTATAG GCGTTTGGC	1277
CCTGTGACTA TGGCTCTGGC ACCACTAGG TCCTGGCCCT CTTCTTATTC ATGCTTTCTC	1337
CTTTTCTAC CTTTTTTTCT CTCCTAAGAC ACCTGCAATA AAGTGTAGCA CCCTGGT	1394

(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

(A) DÉLKA: 299 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEK. ID. Č.:2:

Met	Gly	Glu	Met	Glu	Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Lys	1	5	10	15
Gln	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Lys	Ala	Cys	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Ala	Glu	20	25	30	
Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Arg	Val	Gln	Met	Arg	Thr	Arg	35	40	45	
Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Ala	50	55	60	
Thr	Asp	Ser	Lys	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	65	70	75	80
Val	Trp	Asp	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn	Lys	Val	His	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	85	90	95	
Ser	Ser	Trp	Val	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	100	105	110	
Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Met	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser	115	120	125	
Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Ala	His	Thr	Gly	130	135	140	
Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Asn	Ile	Val	Thr	Ser	145	150	155	160
Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Arg	Glu	Gly	Thr	165	170	175	
Cys	Arg	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly	His	Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ile	Cys	180	185	190	

27.04.99

Phe	Phe	Pro	Asn	Gly	Glu	Ala	Ile	Cys	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Ser
		195					200					205			
Cys	Arg	Leu	Phe	Asp	Leu	Arg	Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Ile	Cys	Phe	Ser
		210					215					220			
His	Glu	Ser	Ile	Ile	Cys	Gly	Ile	Thr	Ser	Val	Ala	Phe	Ser	Leu	Ser
					230						235				240
Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Tyr	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Asn	Val	Trp
				245					250					255	
Asp	Ser	Met	Lys	Ser	Glu	Arg	Val	Gly	Ile	Leu	Ser	Gly	His	Asp	Asn
			260					265					270		
Arg	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Asp	Gly	Met	Ala	Val	Ala	Thr
			275				280						285		
Gly	Ser	Trp	Asp	Ser	Phe	Leu	Lys	Ile	Trp	Asn					
			290				295								

27.04.99

P A T E N T O V É N Á R O K Y

PV 434-99

20802

1. Podjednotka beta-3 lidského G-proteinu, kde tato podjednotka zahrnuje maximálně šest opakování motivu WD.
2. Protein podle nároku 1, kde tento protein má aminokyselinovou sekvenci popsanou jako SEK. ID. Č: 2.
3. Nukleotidová sekvence kódující protein podle nároku 1 nebo 2.
4. Nukleotidová sekvence podle nároku 3, kde tato sekvence je popsána jako SEK. ID. Č: 1.
5. Způsob přípravy proteinu podle jakéhokoliv z předchozích nároků v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento způsob zahrnuje použití nukleotidové sekvence podle jakéhokoliv z předchozích nároků spolu s vhodnými regulačními sekvencemi a expresi provedenou v hostitelském organismu.
6. Způsob podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná exprese je provedena v buňkách imunitního systému pacientů trpících selháním imunity.
7. Způsob podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný pacient je HIV pozitivní.
8. Způsob podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná exprese je provedena v lidských somatických buňkách.
9. Použití nukleotidové sekvence podle jakéhokoliv z předchozích nároků k přípravě léčivých látek použitel-

27.04.99

ných k léčbě onemocnění spojených s poruchou funkce G-proteinů.

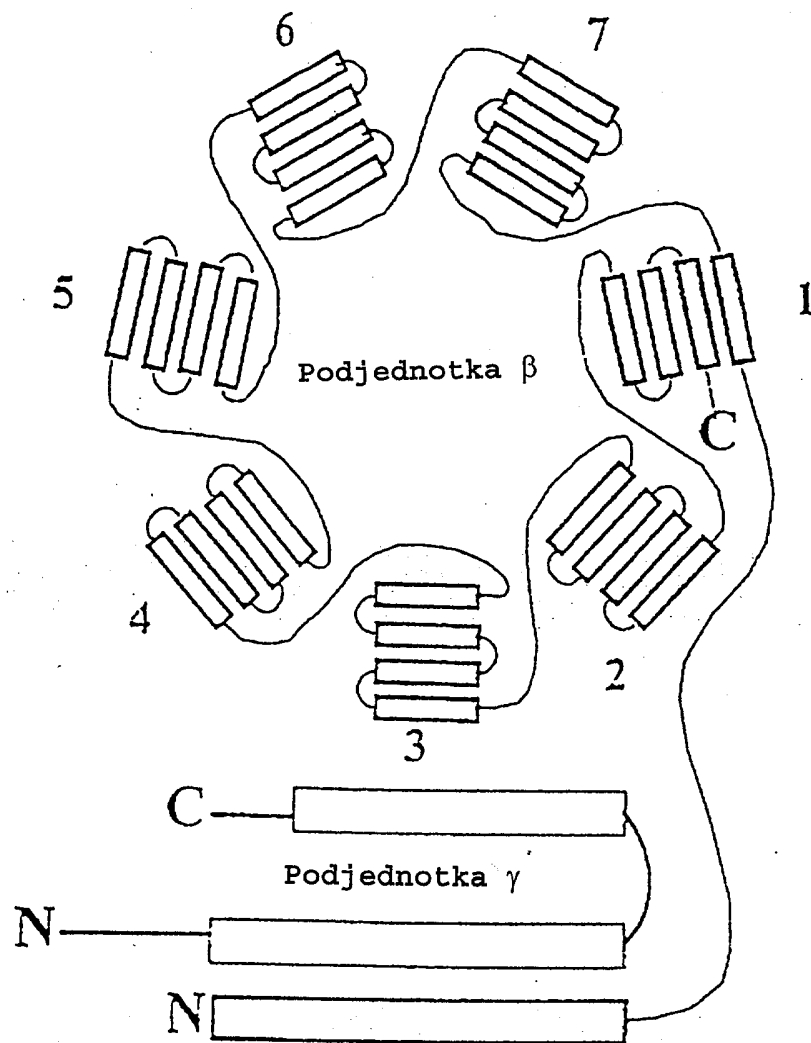
10. Použití genetické modifikace v genu pro podjednotku $\beta 3$ lidského G-proteinu k diagnóze onemocnění.
11. Použití genetické modifikace v genu pro podjednotku $\beta 3$ lidského G-proteinu ke stanovení rizika postižení onemocněním spojeným s poruchou regulace funkce G-proteinů.
12. Použití podle nároku 10 nebo 11, kde zmíněná genetická modifikace zahrnuje nukleotidovou sekvenci popsanou jako SEK. ID. Č: 1.
13. Použití podle nároků 10 až 12, kde zmíněným onemocněním je kardiovaskulární porucha, metabolická porucha nebo porucha imunitního systému.
14. Použití podle nároků 10 až 12, kde zmíněným onemocněním je hypertenze.
15. Použití nukleotidové sekvence podle jakéhokoliv z předchozích nároků k přípravě transgenních živočichů.
16. Použití nukleotidové sekvence komplementární k nukleotidové sekvenci podle nároku 3 nebo 4 k přípravě antisense léčiva k léčbě nebo prevenci onemocnění.
17. Použití podle nároku 16, kde zmíněným onemocněním je hypertenze, gravidní hypertenze, onemocnění srdečních věnčitých tepen, restenóza po revaskularizačních procedurách nebo mrtvice.

27.04.99

18. Použití podle nároku 16, kde zmíněným onemocněním je onemocnění, které je důsledkem diabetu, jako například nefropatie, polyneuropatie nebo retinopatie.
19. Použití podle nároku 16, kde zmíněným onemocněním je metastázující nádor.
20. Způsob použitelný ke stanovení relativního rizika postižení pacienta onemocněním spojeným s poruchou regulace funkce G-proteinů v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento způsob zahrnuje srovnání sekvence genu pro podjednotku $\beta 3$ lidského G-proteinu s nukleotidovou sekvencí popsanou jako SEK. ID. Č: 1 a v případě, že zmíněná sekvence genu pro podjednotku $\beta 3$ lidského G-proteinu odpovídá SEK. ID. Č: 1, přiznání zvýšeného rizika onemocnění danému subjektu.
21. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že srovnání genů je provedeno sekvenováním, restriční analýzou nebo selektivní hybridizací.
22. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 k přípravě protilátek specificky namířených proti tomuto proteinu.

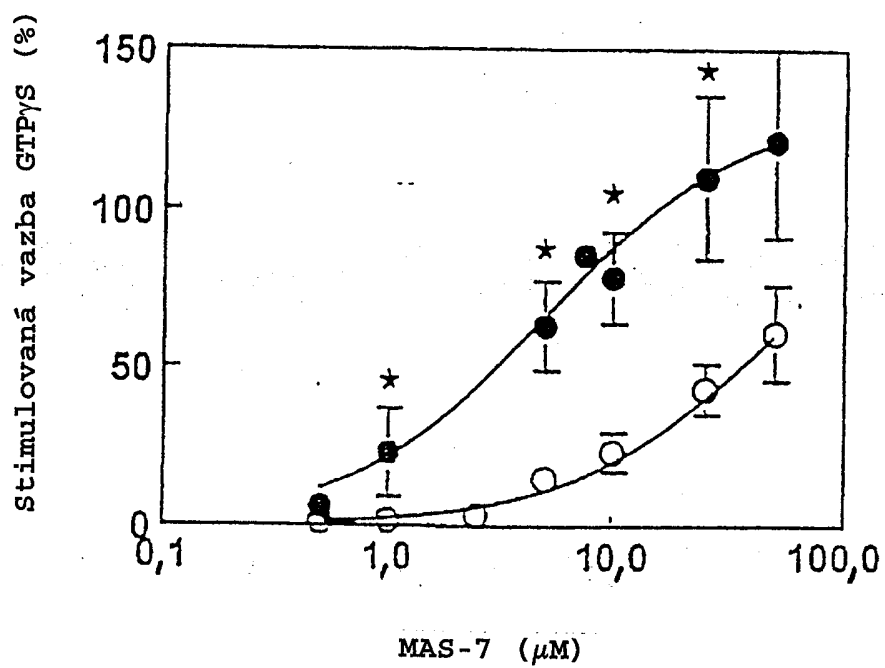
27.04.99

Obrázek 1



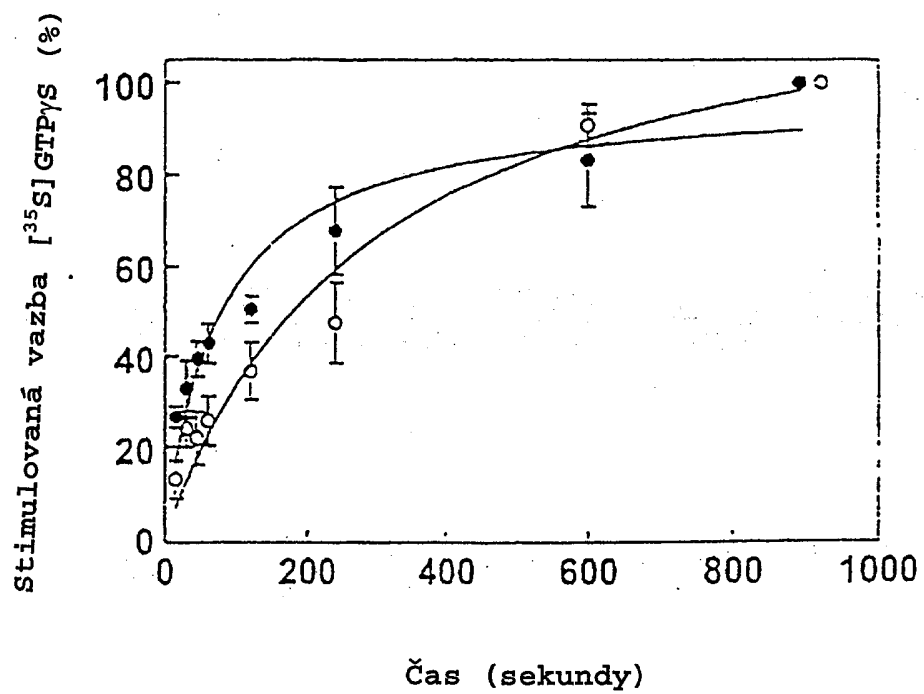
27.04.99

Obrázek 2



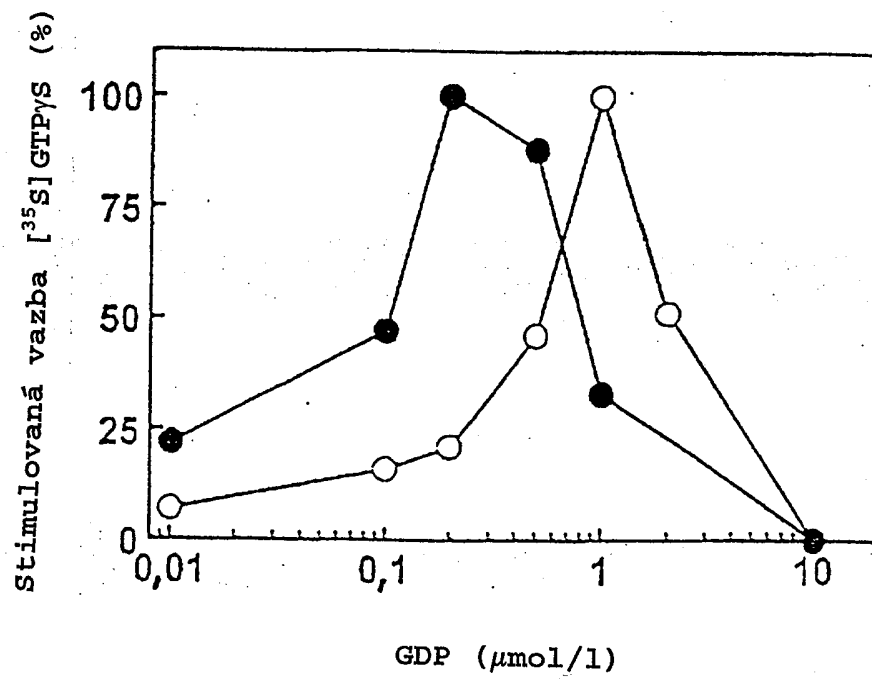
27.04.99

Obrázek 3



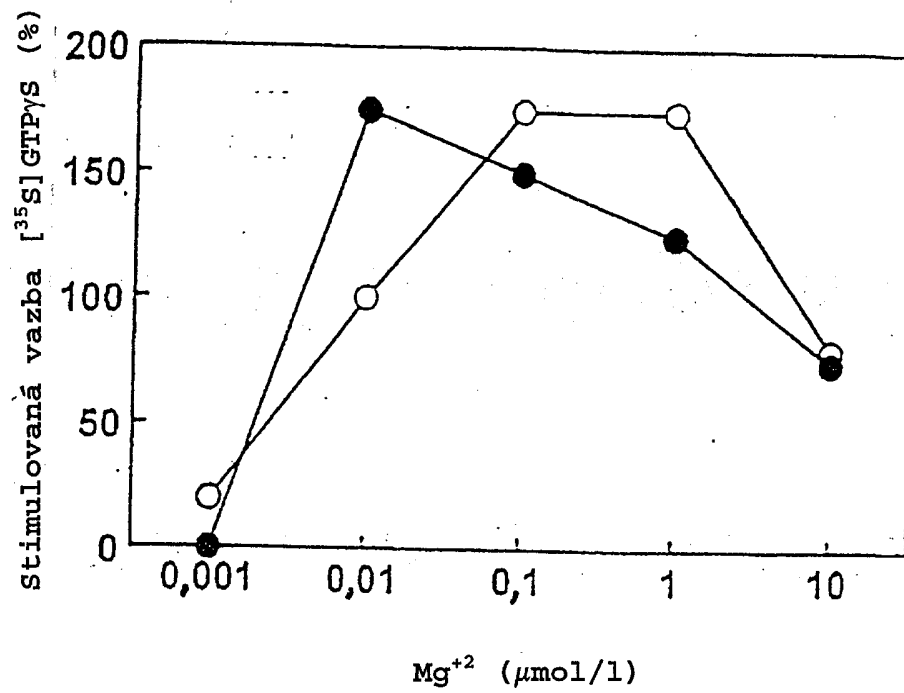
27.04.99

Obrázek 4



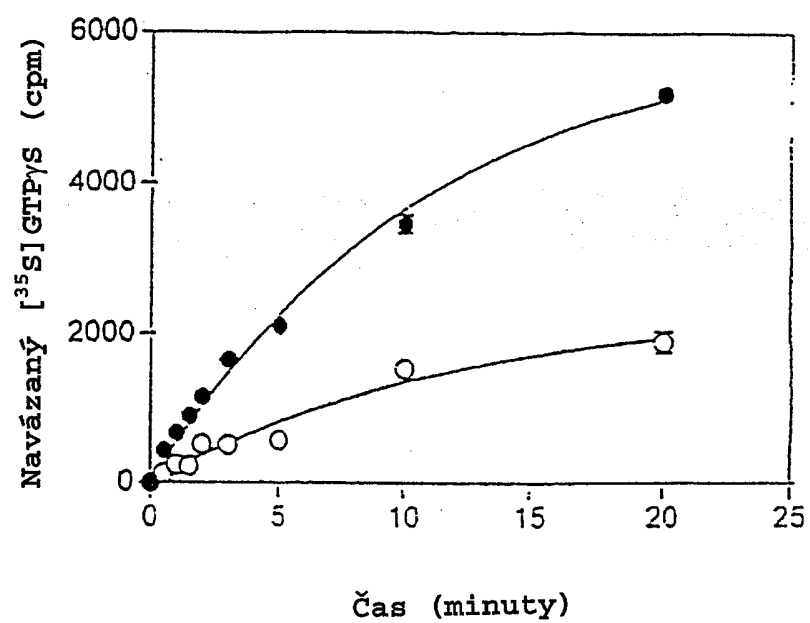
27.04.99

Obrázek 5



27.04.99

Obrázek 6



27.04.99

Obrázek 7

