(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 527 T2** 2005.06.16

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 637 237 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 527.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/01642**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 907 015.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/018959**
(86) PCT-Anmeldetag: **23.02.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.09.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.02.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **19.05.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.06.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 31/00**
A61K 31/13, A61K 31/135, A61K 31/405, C12N 15/12, C12N 15/11, C12N 5/10, A01K 67/027

(73) Patentinhaber:
Brigham & Women's Hospital, Inc., Boston, Mass., US; NPS Pharmaceuticals, Inc., Salt Lake City, Utah, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
NEMETH, F., Edward, Salt Lake City, US; BROWN, M., Edward, Milton, US; HEBERT, C., Steven, Wellesley, US; VAN WAGENEN, C., Bradford, Salt Lake City, US; BALANDRIN, F., Manuel, Salt Lake City, US; FULLER, H., Forrest, Salt Lake City, US; DEL MAR, G., Eric, Salt Lake City, US

(54) Bezeichnung: **CALCIUMREZEPTORAKTIVE MOLEKÜLE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Sachgebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft den Entwurf, die Entwicklung, Zusammensetzung und Anwendung neuer calcimimetischer Moleküle, die in der Lage sind, auf Zellen in analoger Weise wie extrazelluläre Calciumionen zu wirken; sie betrifft calcilytische Moleküle, die die Wirkung extrazellulärer Calciumionen auf Zellen blockieren, und sie betrifft Verfahren für deren Anwendung und Bestimmung.

[0002] Sie betrifft auch eine neue Überfamilie von Rezeptoren anorganischer Ionen, zu der unter anderem Calciumrezeptoren, Nucleinsäuren, die solche Rezeptoren codieren, Zellen, Gewebe und Tiere, die solche Nucleinsäuren enthalten, Antikörper gegen Rezeptoren, Tests, die Rezeptoren verwenden, und alles vorstehend Gesagte betreffende Verfahren zählen.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Die folgende Beschreibung liefert eine Zusammenfassung von für die vorliegende Erfindung relevanten Informationen. Sie ist kein Eingeständnis dessen, daß irgendeine darin gelieferte Information Stand der Technik der jetzt beanspruchten Erfindung ist, und auch nicht dessen, daß irgendeine der Publikationen, auf die ausdrücklich oder implizit verwiesen wird, Stand der Technik zu dieser Erfindung sind.

[0004] Bestimmte Körperzellen reagieren nicht nur auf chemische Signale, sondern auch auf Ionen wie extrazelluläre Calciumionen (Ca^{2+}). Veränderungen der Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} (nachstehend als „$[Ca^{2+}]$" bezeichnet) verändern die funktionellen Reaktionen dieser Zellen. Eine solche spezialisierte Zelle ist die parathyroidale Zelle, die Parathyrin (PTH) sekretiert. PTH ist der wichtigste, die Ca^{2+}-Homöostase im Blut und in den extrazellulären Flüssigkeiten regulierende endokrine Faktor.

[0005] Indem es auf Knochen- und Nierenzellen wirkt, erhöht PTH den Ca^{2+}-Spiegel des Blutes. Diese Zunahme der $[Ca^{2+}]$ wirkt dann als negatives Rückkopplungssignal, das die PTH-Sekretion hemmt. Die Wechselbeziehung von $[Ca^{2+}]$ und PTH-Sekretion bildet den wesentlichen Mechanismus, der die Ca^{2+}-Homöostase des Körpers aufrechterhält.

[0006] Extrazelluläres Ca^{2+} wirkt direkt auf die parathyroidalen Zellen und reguliert so die PTH-Sekretion. Es wurde die Existenz eines parathyroidalen Zelloberflächenproteins, das Veränderungen der $[Ca^{2+}]$ ermittelt, vorgeschlagen. Dieses Protein wirkt als Rezeptor für extrazelluläres Ca^{2+} („der Ca^{2+}-Rezeptor"), und es wurde vorgeschlagen, daß es Veränderungen der $[Ca^{2+}]$ ermittelt und eine funktionelle Reaktion der Zelle, nämlich die PTH-Sekretion, auslöst. Beispielsweise findet sich ein Überblick über die Rolle von Ca^{2+}-Rezeptoren und extrazellulärem Ca^{2+} bei der Regulation des intrazellulären Ca^{2+} und der Zellfunktion bei Nemeth et al., 11 Cell Calcium 319, 1990; die Rolle der Ca^{2+}-Rezeptoren in den parafollikulären und parathyroidalen Zellen wird bei Nemeth, 11 Cell Calcium 323, 1990 diskutiert; und die Rolle der Ca^{2+}-Rezeptoren auf Knochenosteoklasten wird von Zaidi, 10 Bioscience Reports 493, 1990 diskutiert.

[0007] Andere Körperzellen, und zwar spezifisch die Osteoklasten in den Knochen, die juxtaglomerulären, proximalen Tubuli-Zellen in den Nieren, die Keratinocyten in der Epidermis, die parafollikulären Zellen in der Schilddrüse, die Darmzellen, der Trophoblast in der Placenta haben die Fähigkeit, Veränderungen der $[Ca^{2+}]$ zu erkennen. Es wurde vorgeschlagen, daß Ca^{2+}-Rezeptoren der Zelloberfläche auch auf diesen Zellen vorhanden sein und ihnen die Fähigkeit verleihen könnten, Veränderungen der $[Ca^{2+}]$ festzustellen und eine Reaktion darauf auszulösen oder zu ermöglichen.

[0008] In parathyroidalen Zellen, Osteoklasten, parafollikulären Zellen (C-Zellen), Keratinocyten, juxtaglomerulären Zellen und Trophoblasten ruft eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]$ eine Zunahme der intrazellulären freien Ca^{2+}-Konzentration („$[Ca^{2+}]_i$") hervor. Eine solche Zunahme kann durch Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} oder durch Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Organellen verursacht werden. Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ lassen sich leicht mit fluorometrischen Indikatoren wie Fura-2 oder Indo-1 (Molecular Probes, Eugene, OR) verfolgen und quantifizieren. Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ bietet einen Test für die Fähigkeit von Molekülen, als Agonisten oder Antagonisten am Ca^{2+}-Rezeptor zu wirken.

[0009] In parathyroidalen Zellen ruft eine Zunahme der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration eine schnelle und vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ hervor, auf die eine niedrigere, jedoch anhaltende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ folgt. Die vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ rührt von der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} her, woge-

gen die niedrigere, anhaltende Zunahme aus dem Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} resultiert. Die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} ist von einer erhöhten Bildung von Inosit-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diaglycerin begleitet, zweier biochemischer Indikatoren, die mit der rezeptorabhängigen Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in verschiedenen anderen Zellen verbunden sind.

[0010] Zusätzlich zu Ca^{2+} verursachen auch verschiedene andere zwei- und dreiwertige Kationen wie Mg^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, La^{3+} und Gd^{3+} ebenfalls die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Zellen. Mg^{2+} und La^{3+} steigern auch die Bildung von IP_3; alle diese anorganischen Kationen senken die Sekretion von PTH ab. Der postulierte Ca^{2+}-Rezeptor auf den parathyroidalen Zellen wirkt daher mannigfaltig, denn er weist verschiedene extrazelluläre zwei- und dreiwertige Kationen nach.

[0011] Die Fähigkeit verschiedener Verbindungen, extrazelluläres Ca^{2+} in vitro nachzuahmen, wird von Nemeth et al., (Spermin und Spermidin) in „Calcium-Binding Proteins in Health and Disease", 1987, Academic Press, Inc., S. 33–35; Brown et al., (z.B. Neomycin) 128 Endocrinology 3047, 1991; Chen et al., (Diltiazem und sein Analogon, TA-3090) 5 J. Bone and Mineral Res. 581, 1990; und Zaidi et al., (Verapamil) 167 Biochem Biophys Res Comm 807, 1990 diskutiert.

[0012] Brown et al., 6 J. Bone and Mineral Res. 11, 1991, diskutieren die existierenden Theorien hinsichtlich der Auswirkungen von Ca^{2+}-Ionen auf parathyroidale Zellen und schlagen vor, die Resultate sowohl durch einen rezeptorartigen Mechanismus als auch durch einen rezeptorunabhängigen Mechanismus folgendermaßen zu erklären:
Mehrwertige Kationen (z.B. zweiwertige und dreiwertige Kationen) haben vielerlei Wirkungen auf die parathyroidale Funktion wie die Inhibition der Sekretion von Parathyrin (PTH) und die cAMP-Akkumulation, die Stimulation der Akkumulation von Inositphosphaten und die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration. Man nimmt an, daß diese Wirkungen durch einen „rezeptorartigen" Mechanismus bewirkt werden. Die Inhibition von Agonisten stimulierter cAMP-Akkumulation durch zweiwertige und dreiwertige Kationen zum Beispiel wird nach der Präinkubation mit Pertussistoxin blockiert. Somit kann der mutmaßliche Rezeptor mehrwertiger Kationen an die Inhibition von Adenylatcyclase durch das inhibitorische Guaninnucleotid (G) regulierende Protein (Gi) gekoppelt sein.
Wir haben neuerdings gezeigt, daß das polykationische Antibiotikum Neomycin in mehrfacher Hinsicht der parathyroidalen Funktion die Wirkungen von zwei- und dreiwertigen Kationen nachahmt. Um festzustellen, ob diese Wirkungen für dieses Mittel spezifisch waren oder ob sie eine allgemeinere Wirkung von Polykationen darstellen, testeten wir die Auswirkungen der hochbasischen Peptide Polyarginin und Polylysin sowie der Protamine auf die gleichen Parameter in dispergierten parathyroidalen Rinderzellen. Die Resultate zeigen, daß die parathyroidalen Zellen auf verschiedene Polykationen sowie auf mehrwertige Kationen reagieren, möglicherweise auf ähnlichen biochemischen Wegen. Diese Ergebnisse werden hinsichtlich der jüngst postulierten „rezeptorunabhängigen" Modulation von G-Proteinen durch Polykationen in anderen Systemen diskutiert.
Es wurde angenommen, daß der Ca2+-Rezeptor analog zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (z.B. ein Glycoprotein) ist, doch neuere Studien mit anderen Zelltypen haben die Möglichkeit aufgezeigt, daß Polykationen Zellfunktionen durch alternative oder zusätzliche Mechanismen steuern können. In Mastzellen z.B. erhöhen eine Vielzahl amphipatischer Kationen, darunter Mastoparan, ein Peptid aus Wespengift, 48/80, ein synthetisches Polykation und Polylysin die Sekretion durch einen Pertussistoxin-sensitiven Mechanismus, was die Beteiligung eines G-Proteins nahelegt. Es wurde kein klassischer Zelloberflächenrezeptor festgestellt, der die Wirkungen dieser diversen Agentien vermitteln könnte. Ferner wurde gezeigt, daß die gleichen Verbindungen direkt gereinigte G-Proteine in Lösung oder in künstlichen Phospholipidvesikeln aktivieren. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde vorgeschlagen, daß amphipathische Kationen G-Proteine und dann wieder die Mastzellsekretion durch einen „rezeptorunabhängigen" Mechanismus aktivieren.
Auch von Polykationen wurde gezeigt, daß sie stark mit sauren Phospholipiden interagieren. Polylysine von variierender Kettenlänge (20 bis 1000 Aminosäuren) binden an künstliche Phospholipidvesikel mit Dissoziationskonstanten in der Größenordnung von 0,5 nM bis 1,5 µM. Die Bindungsaffinität hängt direkt mit der Länge der Polylysinkette zusammen, wobei Polymere von 1000 Aminosäuren einen Kd-Wert von 0,5 nM und kürzere Polymere höhere Kd-Werte aufweisen und wobei Lysin nicht in signifikantem Maß interagiert. Diese Beziehung zwischen Stärke und Kettenlänge ähnelt der, die hinsichtlich der Auswirkungen von Polylysin10.200, Polylysin3800 und Lysin auf die parathyroidale Funktion beobachtet wurde.
Es ist möglich, daß die Bindung von Polykationen an Biomembranen einige von deren biologischen Wirkungen hervorruft. Es wurde postuliert, daß die Permeabilisierung der Plasmamembran, die bei manchen Zelltypen von einer Vielzahl von porenbildenden Mitteln, darunter Poykationen induziert wird, durch ihre Wechselwirkung mit einer Phosphatidylserin-artigen Struktur vermittelt wird. Darüberhinaus wird die „rezeptorunabhängige" Aktivierung von gereinigten G-Proteinen durch amphipathische Kationen verstärkt, wenn diese Proteine in Phospholipidvesikel eingebaut werden.

Calciumionen im millimolaren Konzentrationsbereich bewirken ebenfalls deutliche Veränderungen in der Membranstruktur. In manchen Fällen kann Calcium die Wechselwirkung von Polykationen mit Membranlipiden entweder antagonisieren oder verstärken. Diese Überlegungen lassen die Möglichkeit aufscheinen, daß sowohl die Wirkungen von mehrwertigen Kationen als auch die von Polykationen auf parathyroidale Zellen einen rezeptorunabhängigen Mechanismus beinhalten könnten, der nicht das Vorhandensein eines klassischen G-Protein gekoppelten Zelloberflächenrezeptors erfordert. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um die molekulare Basis des Erkennens von Ca2+ durch diese und andere Zelltypen zu klären. [Zitate weggelassen.] Shoback und Chen (6 (Ergänzung 1), J. Bone and Mineral Res. 1991, 5135) und Racke et al., (6 (Ergänzung 1), J. Bone and Mineral Res. 1991, S 118) beschreiben Versuche, die darauf hingedeutet haben sollen, daß in parathyroidalen Zellen ein Ca^{2+}-Rezeptor oder Ca^{2+}-Sensor vorhanden ist. Aus solchen Zellen isolierte Messenger-RNA kann in Oocyten exprimiert werden und brachte bei diesen Oocyten einen Phänotyp hervor, der durch das Vorhandensein eines Ca^{2+}-Rezeptorproteins erklärt werden könnte.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Der Anmelder hat gezeigt, daß Ca^{2+}-Rezeptorproteine bestimmte spezialisierte, am Ca^{2+}-Stoffwechsel des Körpers beteiligte Zellen dazu befähigen, Veränderungen der Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} festzustellen und darauf zu reagieren. Obwohl diese Rezeptoren bestimmte allgemeine Eigenschaften gemeinsam haben, können sie durch verschiedene pharmakologische Mittel selektiv beeinträchtigt werden. Wie nachstehend im Detail dargelegt wird, werden bei parathyroidalen Zellen, Osteoklasten und C-Zellen bestimmte Moleküle mit selektiver Wirkung auf Ca^{2+}-Rezeptoren bestimmt.

[0014] Ca^{2+}-Rezeptoren bilden diskrete molekulare Ziele für eine neue Klasse von Molekülen, die die Wirkung von extrazellulärem Ca^{2+} nachahmen, („Calcimimetika") oder antagonisieren („Calcilytika"). Solche Rezeptoren sind auf Zelloberflächen vorhanden und haben eine niedrige Affinität für extrazelluläres Ca^{2}+ (scheinbare K_d im Allgemeinen größer als 0,5 mM). Solche Rezeptoren können einen freien oder gebundenen Effektormechanismus beinhalten, wie von Cooper, Bloom und Roth, „The Biochemical Basis of Neuropharmacology", Kap. 4, definiert. Solche Rezeptoren sind somit verschieden von intrazellulären Ca^{2+}-Rezeptoren, z.B. Calmodulin und den Troponinen. Calcimimetika wirken z.B. dahingehend selektiv auf Ca^{2+}-Rezeptoren, daß sie direkt oder indirekt die Funktion von parathyroidalen Zellen oder Osteoklasten absenken oder die Funktion von C-Zellen stimulieren. Die Calcimimetika und Calcilytika dieser Erfindung erlauben neue Therapien des Hyperparathyroidismus, der Osteoporose und anderer mit Ca^{2+} in Zusammenhang stehende Krankheiten. Diese Anwendung betrifft in einer Hinsicht die Zielsteuerung von Ca^{2+}-Rezeptoren auf jede dieser drei Zelltypen und andere Zelltypen, die Veränderungen der [Ca^{2+}] feststellen und darauf reagieren.

[0015] Der Anmelder ist der erste, der ein Ca^{2+}-Rezeptorprotein in parathyroidalen Zellen demonstriert, und der solche Ca^{2+}-Rezeptoren in anderen Zellen wie C-Zellen und Osteoklasten pharmakologisch differenziert. Der Anmelder beschreibt auch als erster Verfahren, mit denen Moleküle bestimmt werden können, die an diesen Ca^{2+}-Rezeptoren wirksam sind und die als Leitmoleküle bei der Entdeckung, Entwicklung, dem Entwurf, der Veränderung und/oder Konstruktion von nützlichen Calcimimetika oder Calcilytika, die an Ca^{2+}-Rezeptoren wirken, verwendet werden können. Solche Calcimimetika oder Calcilytika sind zur Behandlung von verschiedenen Krankheitszuständen nützlich, die durch abnormale Spiegel von einem oder mehreren Verbindungen gekennzeichnet sind, zum Beispiel von Polypeptiden wie Hormone, Enzymen oder Wachstumsfaktoren, deren Expression und/oder Sekretion durch Wirkung an einem oder mehreren Ca^{2+}-Rezeptoren reguliert oder beeinflusst wird. Weiterhin erlaubt die Bestimmung verschiedener Ca^{2+}-Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen und die spezifische Reaktion solcher Rezeptoren auf verschiedene Leitmoleküle den Entwurf und die Konstruktion von spezifischen Molekülen, die zur Behandlung spezifischer Krankheiten wirksam sind, die von einer Wirkung an solchen spezifischen Ca^{2+}-Rezeptoren beeinflußt werden können. Zum Beispiel können abnormale Spiegel der Parathyrinsekretion von solchen spezifischen Molekülen beeinflußt werden, ohne daß es zu einer Beeinflussung der Sekretionsspiegel anderer Ca^{2+}-regulierter Hormone und dergleichen kommt.

[0016] Die Bestimmung solcher Leitmoleküle scheiterte bisher am Fehlen eines Absuchsystems hoher Durchsatzleistung, um aktive Moleküle zu entdecken, und am Nichtvorhandensein einer strukturellen Datenbasis, auf deren Grundlage wirksame potentielle Arzneistoffe entworfen werden konnten. Diese Hindernisse sind nun durch die Clonierung des Ca^{2+}-Rezeptors von parathyroidalen Zellen und funktionell verwandter Rezeptoren und durch die systematische Untersuchung der strukturellen Eigenschaften bestimmter Leitmoleküle, die solche clonierten Ca^{2+}-Rezeptoren und funktionell verwandte Rezeptoren aktivieren, beseitigt. Die Clonierung des Ca^{2+}-Rezeptors ermöglicht auch die Entwicklung transfizierter Zellinien, die für ein Hochdurchsatz-Absuchen natürlicher Produkt- oder Molekülbibliotheken und synthetischer Moleküle geeignet sind. Dies liefert, zusammen mit den nachstehend erörterten Struktur-Aktvitäts-Studien, die zur Entwicklung neuer Calci-

mimetika und Calcilytika nötige Technologie.

[0017] Der Anmelder ermöglicht in dieser Anmeldung solche Verfahren. Es wurde eine parathyroidale Rinder-Zellcalciumrezeptor-cDNA cloniert und bei der ATCC unter der Zugangsnummer ATCC 75416 hinterlegt. Durch Verwendung dieses Clons können leicht Rezeptoren für anorganische Ionen in anderen Geweben und Spezieshomologe erhalten werden, z.B. kann die Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA menschlicher parathyroidaler Zellen durch Absuchen von Nucleinsäurebibliotheken oder durch Absuchen auf funktionelle Expression in Xenopus-Oocyten cloniert werden, und die strukturellen Eigenschaften von organischen Molekülen, die für die Wirkung am Ca^{2+}-Rezeptor nötig sind, können durch Testen von ausgewählten natürlichen Produkten oder Molekülbibliotheken und anschließenden Struktur-Aktvitäts-Studien bestimmt werden.

[0018] Somit liefert die Erfindung unter einem ersten Gesichtspunkt ein Nucleinsäuremolekül, das ein Calciumrezeptorpolypeptid codiert, ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus:

(a) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz, wie in SEQ ID NR. 1 dargestellt, umfassen

(b) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleinsäuresequenz des cDNA-Inserts umfassen, das in ATCC 75416 enthalten ist; und

(c) Nucleinsäuremolekülen, die an ein Nucleinsäuremolekül hybridisieren können, das zu einem Molekül nach (a) oder (b) komplementär ist, und die einen funktionellen Calciumrezeptor codieren.

[0019] Solche Nucleinsäuremoleküle und die codierten Rezeptorpolypeptide sind nützlich zur Bestimmung eines Moleküls, das entweder die Wirkung von extrazellulärem Ca^{2+} nachahmt, in dem es eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in einer Zelle hervorruft, oder indem es eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die durch extrazelluläres Ca^{2+} ausgelöst wurde, blockiert. Das Molekül hat einen EC_{50}-Wert von weniger als oder gleich 5 µM und ist nicht Protamin.

[0020] Mit „nachahmen, mimen" ist gemeint, daß das Molekül eine oder mehrere der spezifischen Wirkungen von extrazellulärem Ca^{2+} auf eine auf extrazelluläres Ca^{2+} reagierende Zelle hat. Der Begriff erfordert nicht, daß sämtliche biologische Funktionen von extrazellulärem Ca^{2+} nachgeahmt werden, sondern daß wenigstens eine solche Funktion nachgeahmt wird. Ferner erfordert er nicht, daß die Moleküle an die gleiche Stelle des Ca^{2+}-Rezeptors binden wie extrazelluläres Ca^{2+} (vgl. z.B. die neue Verbindung NPS 467 und ihre Wirkung in Beispiel 20 nachstehend). Mit „blockieren" ist gemeint, daß eine solche Wirkung von Ca^{2+} vom Molekül verringert oder verhindert wird. Der EC_{50}-Wert kann in Tests, wie nachstehend beschrieben, bestimmt werden, bei denen die nachgeahmte Wirkung gemessen wird; jene Molekülkonzentration, bei der halbmaximale Nachahmungswirkung erreicht wird, ist der EC_{50}-Wert. Im Gegensatz dazu ist der IC_{50}-Wert eines Calcilytikums jene Menge, die eine halbmaximale Wirkung blockiert. Vorzugsweise messen solche Tests Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ und werden durch nachstehend beschriebene oder diesen gleichwertige Verfahren als spezifisch für einen Ca^{2+}-Rezeptor bestätigt.

[0021] In bevorzugten Ausführungsformen zeigen die hier beschriebenen Biotests, daß die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in einer Zelle vorübergehend ist und eine Dauer von weniger als einer Minute hat und daß die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ schnell ist und innerhalb von dreißig Sekunden erfolgt und daß das Molekül auch (a) eine anhaltende Zunahme (länger als dreißig Sekunden) der $[Ca^{2+}]_i$ hervorruft, (b) eine Zunahme der Inosit-1,4,5-Triphosphat- und/oder Diaglycerinspiegel hervorruft, z.B. innerhalb von weniger als 60 Sekunden und (c) die Dopamin und Isoproterenol stimulierte Bildung von zyklischem AMP inhibiert. Ferner verschwindet die vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ durch zehnminütige Vorbehandlung der Zelle mit 10 mM Natriumfluorid, oder die vorübergehende Zunahme wird durch kurze Vorbehandlung (nicht mehr als zehn Minuten) der Zelle mit einem Aktivator von Proteinkinase C, z.B. Phorbolmyristatacetat (PMA), Mezerein oder (–)Indolactam V verringert.

[0022] In einer parathyroidalen Zelle sind jene Moleküle besonders nützlich, die in allen vorstehend beschriebenen Tests wirksam sind, da sie hinsichtlich ihrer Wirkungen auf den Ca^{2+}-Rezeptor einer solchen Zelle spezifisch sind. Dies trifft besonders für die vorstehend beschriebene Wirkung der PMA-Vorbehandlung zu.

[0023] In einer stärker vorzuziehenden Ausführungsform ist die Zelle eine parathyroidale Zelle, und das Molekül inhibiert die Sekretion von Parathyrin aus der Zelle. Andere bevorzugte Ausführungsformen beinhalten Moleküle, die eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ auslösen, wie dies beispielsweise als Zunahme des Cl^--Stroms in einer Xenopus-Oocyte festgestellt wurde, der mRNA aus einer parathyroidalen Zelle, einem Knochenosteoklasten, einer juxtaglomerulären Nierenzelle, einer proximalen Tubulus-Nierenzelle, einer distalen Tubulus-Nierenzelle, einer Zelle des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife und/oder des Sammelganges, aus einem Keratinocyten in der Epidermis, einer parafollikulären Zelle in der Schilddrüse (C-Zelle), einer Darmzelle, einem Trophoblasten der Placenta, einem Thrombocyten, einer vaskulären glatten Muskelzelle, einer Herzvorhofzelle, aus Gastrin und Glucagon sekretierenden Zellen, einer Nieren-Mesangialzelle und einer Brustzelle

injiziert worden war.

[0024] In anderen bevorzugten Ausführungsformen ruft das Molekül die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} hervor und verursacht damit eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$; die Zelle ist eine C-Zelle oder ein Osteoklast und das Molekül inhibiert die Knochenresorption in vivo; die Zelle ist ein Osteoklast und das Molekül inhibiert die Knochenresorption in vitro; oder die Zelle ist eine C-Zelle und das Molekül stimuliert die Calcitoninsekretion in vitro oder in vivo; und am meisten vorzuziehen ist das Molekül entweder ein calcimimetisches oder calcilytisches Molekül mit einem EC_{50} oder IC_{50} an einem Ca^{2+}-Rezeptor von weniger als oder gleich 5 µM, und noch mehr vorzuziehen von weniger als oder gleich 1 µM, 100 nmolar, 10 nmolar oder 1 nmolar. Solche niedrigeren EC_{50}- oder IC_{50}-Werte sind vorteilhaft, da sie es erlauben, niedrigere Molekülkonzentrationen in vitro oder in vivo für Therapie und Diagnose zu verwenden. Die Entdeckung von Molekülen mit solchen niedrigen EC_{50}- und IC_{50}-Werten ermöglicht den Entwurf und die Synthese von ähnlich starken und wirkungsvollen Molekülen.

[0025] Unter einem „calcimimetischen" Molekül wird ein Molekül verstanden, das eine oder mehrere Wirkungen von extrazellulärem Ca^{2+} hat und das vorzugsweise die Wirkung von Ca^{2+} an einem Ca^{2+}-Rezeptor nachahmt. Wenn es beispielsweise in bezug auf eine parathyroidale Zelle gebraucht wird, ist es ein Molekül, das, wenn es an parathyroidalen Zellen in vitro getestet wird, wie Messungen mit Verfahren, die den Fachleuten wohlbekannt sind, ergeben haben, eine oder mehrere und vorzugsweise alle der folgenden Eigenschaften hat:

1. Das Molekül verursacht eine rapide (Zeit bis Peak < 5 sec) und vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die gegen eine Inhibition durch 1 µM La^{3+} oder Gd^{3+} resistent ist. Die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ bleibt bei Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} bestehen, wird aber durch eine Vorbehandlung mit Ionomycin (in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+}) aufgehoben;
2. Das Molekül verstärkt Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$, die durch submaximale Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöst werden;
3. Die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die von extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöst wird, wird nicht durch Dihydropyridine inhibiert;
4. Die vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die durch das Molekül verursacht wird, wird durch 10 minütige Vorbehandlung mit 10 mM Natriumfluorid aufgehoben;
5. Die von dem Molekül verursachte vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ wird durch Vorbehandlung mit einem Aktivator aus Proteinkinase C (PKC) wie Phorbolmyristatacetat (PMA), Mezerein oder (–) Indolactam V verringert. Die Gesamtwirkung des Proteinkinase C-Aktivators besteht darin, die Konzentrations-Reaktions-Kurve des Moleküls nach rechts zu verschieben, ohne die maximale Reaktion zu beeinträchtigen.
6. Das Molekül verursacht eine rapide (< 30 sec.) Zunahme der Bildung von Inosit-1,4,5-Triphosphat und/oder Diaglycerin;
7. Das Molekül inhibiert die Dopamin oder Isoproterenol stimulierte Bildung von zyklischem AMP;
8. Das Molekül inhibiert die PTH-Sekretion;
9. Die Vorbehandlung mit Pertussistoxin (100 ng/ml, > 4 Std. lang) blockiert die inhibitorische Wirkung des Moleküls auf die Bildung von zyklischem AMP, führt aber zu keinen Steigerungen der $[Ca^{2+}]_i$, Inosit-1,4,5-Triphosphat oder Diaglycerin und verringert auch die PTH-Sekretion nicht;
10. Das Molekül löst Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ aus, wie beispielsweise als Zunahme des Cl^--Stroms in Xenopus-Oocyten festgestellt, denen $poly(A)^+$ angereicherte mRNA aus parathyroidalen Zellen von Rindern oder Menschen injiziert wurden, ist aber wirkungslos in Xenopus-Oocyten, denen Wasser oder Hirn- oder Leber-mRNA von Ratten injiziert wurde; und
11. In ähnlicher Weise löst das Molekül bei Verwendung eines klonierten Rezeptors aus parathyroidalen Zellen eine Reaktion in Xenopus-Oocyten aus, denen die spezifische cDNA, mRNA oder synthetische Sense-RNA (cRNA), die den Rezeptor codiert, injiziert wurde.

[0026] Mit einem „calcilytischen" Molekül ist jedes Molekül gemeint, das eine oder mehrere der Wirkungen von extracellulärem Ca^{2+} auf eine extrazelluläres Ca^{2+} erkennende Zelle blockiert, vorzugsweise indem es als Antagonist am Ca^{2+}-Rezeptor wirkt. Wenn es beispielsweise in bezug auf eine parathyroidale Zelle gebraucht wird, ist es ein Molekül das, wenn es an parathyroidalen Zellen in vitro getestet wird, wie Messungen mit Verfahren, die den Fachleuten wohlbekannt sind, ergeben haben, eine oder mehrere und vorzugsweise alle der folgenden Eigenschaften hat:

1. Das Molekül blockiert entweder teilweise oder komplett die Fähigkeit erhöhter extrazellulärer Ca^{2+}-Konzentrationen:
   a) die $[Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen,
   b) intrazelluläres Ca^{2+} zu mobilisieren,
   c) die Bildung von Inosit-1,4,5-Triphosphat zu erhöhen,
   d) die Dopamin oder Isoproterenol stimulierte Bildung von zyklischem AMP zu verringern, und
   e) die PTH-Sekretion zu inhibieren;

2. Bei niedriger [Ca^{2+}], d.h. 0,5 mM, ändert das Molekül selbst die [$Ca^{2+}]_i$ nicht;
3. Das Molekül blockiert die von extrazellulärem Ca^{2+} oder calcimimetischen Verbindungen ausgelöste Zunahme des Cl^--Stroms in Xenopus-Oocyten, denen poly(A)$^+$-mRNA aus parathyroidalen Zellen von Rindern oder Menschen injiziert wurde, nicht aber in Xenopus-Oocyten, denen Wasser oder Hirn- oder Leber-mRNA von Ratten injiziert wurde;
4. In ähnlicher Weise blockiert das Molekül bei Verwendung eines klonierten Rezeptors aus parathyroidalen Zellen eine von extrazellulärem Ca^{2+} oder einer calcimimetischen Verbindung ausgelöste Reaktion in Xenopus-Oocyten, denen die spezifische cDNA, mRNA oder cRNA, die den Ca^{2+}-Rezeptor codiert, injiziert wurde.

[0027] Parallele Definitionen nützlicher Calcimimetika und Calcilytika an Ca^{2+}-Rezeptoren auf anderen Zelltypen gehen aus den nachstehenden Beispielen hervor.

[0028] Der Ca^{2+}-Rezeptor ist in der Lage, bestimmte anorganische Polykationen und polykationische organische Moleküle festzustellen und auf diese zu reagieren. Die parathyroidale Zelle zum Beispiel ist nicht dazu in der Lage, eine Zunahme der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration von der Hinzufügung dieser organischen Polykationen zu unterscheiden, vermutlich weil diese organischen Moleküle genau wie extrazelluläres Ca^{2+} am Ca^{2+}-Rezeptor wirken. Die hier beschriebenen calcimimetischen Moleküle sind besonders gute Agonisten des Ca^{2+}-Rezeptors und können als Arzneistoffe verwendet werden, die ausgewählte Zellfunktionen abändern, z.B. die Sekretion von PTH aus parathyroidalen Zellen. Im Gegensatz zu Ca^{2+} wirken diese Moleküle nur bei einem oder mehreren, nicht aber bei allen Ca^{2+}-Rezeptoren und liefern somit eine Möglichkeit, einen Ca^{2+}-Rezeptor spezifisch anzusprechen.

[0029] Die Calcimimetika und Calcilytika können als Arzneimittel formuliert werden, die dazu nützlich sind, den Spiegel des extracellulären freien Ca^{2+} in einem Patienten zu regulieren und um die Wirkung von extracellulärem Ca^{2+} auf eine Zelle nachzuahmen, die aus der vorstehend beschriebenen Gruppe ausgewählt wird, indem dem Patienten ein solches Arzneimittel verabreicht wird. Vor dieser Erfindung hatte der Anmelder keine Kenntnis von irgendwelchen auf den Ca^{2+}-Rezeptor wirkenden Molekülen, die zur Behandlung von Krankheiten nützlich gewesen wären, welche durch Unregelmäßigkeiten der Funktion oder Regulation eines Ca^{2+}-Rezeptors verursacht werden, oder von Krankheiten bei einem Tier mit normalen Ca^{2+}-Rezeptoren, die aber durch Aktivierung oder Desaktivierung solcher Ca^{2+}-Rezeptoren behandelt werden können.

[0030] Es ist die Wirkungsspezifität solcher Moleküle, die in dieser Erfindung besonders vorteilhaft ist, da sie eine spezifische in vivo- und in vitro-Therapie und -Diagnose und Entdeckung weiterer calcimimetischer oder calcilytischer Moleküle erlaubt.

[0031] Somit liefert die Erfindung einen rekombinanten Ca^{2+}-Rezeptor, eine Zelle, die einen rekombinanten Ca^{2+}-Rezeptor beinhaltet, und gereinigte Nucleinsäure, die einen Ca^{2+}-Rezeptor codiert. Es werden auch die biologische Wirkung und die Anwendung des Moleküls NPS 019, die neuen erfindungsgemäßen Verbindungen oder Zusammensetzungen NPS 459, NPS 467 und NPS 568 (vgl. **Fig. 36**) und ein Verfahren zur Bestimmung eines nützlichen calcimimetischen oder calcilytischen Moleküls durch Bestimmung eines Moleküls beschrieben, das eine oder mehrere Wirkungen von Ca^{2+} an einem ersten Ca^{2+}-Rezeptor, nicht aber an einem zweiten Ca^{2+}-Rezeptor nachahmt oder blockiert, z.B. durch Verwendung eines rekombinanten Ca^{2+}-Rezeptors.

[0032] Unter einem anderen Gesichtspunkt wird eine Zelle, die einen oder mehrere rekombinante(n) Ca^{2+}-Rezeptor (-Rezeptoren) beinhaltet, als Testsystem verwendet, um Antibiotika (z.B. Aminoglycosidantibiotika) auf ihre Wirkung an Calciumrezeptoren, die bei Menschen Nierentoxizität verursachen, abzusuchen.

[0033] Mit „rekombinant" ist gemeint, daß jeder Ca^{2+}-Rezeptor, der durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt wird, eingeschlossen ist, so daß er sich vom natürlich vorkommenden Ca^{2+}-Rezeptor entweder hinsichtlich seiner Lage, Reinheit oder Struktur unterscheidet. Im Allgemeinen wird ein solcher Rezeptor in einer Zelle in einer Menge vorhanden sein, die von jener verschieden ist, die normalerweise in der Natur zu beobachten ist.

[0034] Mit „gereinigt" ist gemeint, daß der Antikörper oder die Nucleinsäure vom natürlich vorkommenden Antikörper oder der natürlich vorkommenden Nucleinsäure verschieden ist, so daß er vom Antikörper oder von der Nucleinsäure, mit der er normalerweise vorkommt, z.B. in einem Vektorsystem, getrennt wird, so daß er dazu verwendet werden kann, rekombinanten Ca^{2+}-Rezeptor zu exprimieren. Vorzugsweise wird der Antikörper oder die Nucleinsäure als homogenes Präparat mittels Standardtechniken bereitgestellt.

[0035] Solche clonierten Rezeptoren können in einer gewünschten Zelle exprimiert und isoliert und kristallisiert werden, um eine Strukturbestimmung zu erlauben. Eine solche Struktur wird den Entwurf von nützlichen Molekülen dieser Erfindung erlauben, die an den Ca^{2+}-Rezeptor binden können. Ferner können gleichwertige solche Rezeptoren cloniert werden, indem ein erster Clon als Sonde für Clone in anderen Zell-, cDNA- oder Genombibliotheken verwendet wird.

[0036] Antikörper gegen den clonierten Rezeptor können isoliert und als Therapeutika in dieser Erfindung oder als Diagnosewerkzeuge zur Bestimmung der Ca^{2+}-Rezeptorenzahl und/oder -Lage und/oder funktionellen Integrität verwendet werden, um mit Ca^{2+} in Zusammenhang stehende Krankheiten oder Zustände zu diagnostizieren. Solche Antikörper können auch in vivo durch intravenöse Verabreichung als Calcimimetika oder Calcilytika verwendet werden.

[0037] Es werden auch calcimimetische oder calcilytische Moleküle beschrieben, die in der Lage sind, entweder als selektive Agonisten beziehungsweise Antagonisten an einem Ca^{2+}-Rezeptor von einer oder mehreren, aber nicht allen Zellen zu wirken, die aus folgender Gruppe ausgewählt werden: parathyroidale Zellen, Knochenosteoklasten, juxtaglomeruläre Nierenzellen, proximale Tubulus-Nierenzellen, distale Tubulus-Nierenzellen, Zellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife und/oder des Sammelganges, Keratinocyten in der Epidermis, parafollikuläre Zellen in der Schilddrüse (C-Zellen), Darmzellen, Trophoblasten in der Placenta, Thrombocyten, vaskuläre glatte Muskelzellen, Herzvorhofzellen, Gastrin und Glucagon sekretierende Zellen, Nieren-Mesangialzellen und Brustzellen. Eine solche Zusammensetzung kann jeden beliebigen, den Fachleuten bekannten pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen, und so ein Arzneimittel bilden.

[0038] Die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle können auch als Therapeutikum für einen Krankheitszustand dazu verwendet werden, die Zahl der Ca^{2+}-Rezeptoren in einem Patienten mittels Standardtechniken z.B. Antisense- und verwandter Technologien (z.B. Ribozyme) zu modulieren.

[0039] Die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle und codierten Polypeptide können in Verfahren zur Bestimmung von Molekülen verwendet werden, die die Aktivität eines Ca^{2+}-Rezeptors beeinflussen, indem Tests, wie nachstehend definiert, verwendet werden, um Calcimimetika und/oder Calcilytika festzustellen. Ferner können Moleküle für therapeutische Anwendungen definiert werden, die sich unter Verwendung der Tests oder Antikörper oder anderer Techniken, wie nachstehend beschrieben, als wirksam bei der Verringerung oder Steigerung der Expression des Ca^{2+}-Rezeptors auf transkriptionaler und translationaler Ebene erwiesen haben.

[0040] Die vorangegangene Zusammenfassung war großteils in Verbindung mit der bevorzugten Ausführungsform, die im Allgemeinen Calciumrezeptoren betrifft. Der offenbarte Rezeptor gehört zu einer neuen Überfamilie von Polypeptid-Rezeptor/Sensor-Molekülen. Der cDNA-Clon, BoPCaR 1, der hier offenbart wird und pflichtgemäß hinterlegt wurde, stellt den ersten solchen beschriebenen Clon dar, der einen Rezeptor/Sensor codiert, welcher ein Mitglied dieser Überfamilie ist. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden Rezeptor/Sensoren, die zu dieser Überfamilie gehören, Rezeptoren anorganischer Ionen genannt.

[0041] Die neue Überfamilie von Rezeptoren anorganischer Ionen beinhaltet eine Vielzahl solcher Moleküle, die miteinander durch die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz, durch Struktur und/oder durch Funktion verwandt sind. Insgesamt unterscheiden diese Attribute auch Mitglieder dieser Überfamilie von Rezeptoren von allen derzeit auf dem Fachgebiet bekannten Rezeptoren/Sensoren. Mitglieder dieser Überfamilie von Rezeptoren zeichnen sich in erster Linie funktionell durch ihre überraschende Fähigkeit aus, Veränderungen des Spiegels von anorganischen Kationen wie Calcium-, Magnesium-, Kalium-, Natrium-, oder Wasserstoffionen und ähnlichen festzustellen und darauf zu reagieren und beim Erkennen solcher Ionen Veränderungen in Zellfunktionen hervorzurufen. Solche Veränderungen können Veränderungen der Second-Messenger-Spiegel einbeziehen, wie sie bei bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren vorkommen, oder Veränderungen im transmembranalen Ionenstrom oder dergleichen. Es gibt auch andere Mitglieder dieser Überfamilie, die anorganische Anionen, wie Phosphat- oder Chloridionen erkennen. Alle derartigen Rezeptoren liegen innerhalb des Schutzbereiches der vorliegenden Erfindung, wie hier beschrieben.

[0042] Rezeptoren, die zur Überfamilie der Rezeptoren anorganischer Ionen gehören, können durch andere Stimuli als Ligandenbindung aktiviert werden. Zum Beispiel werden manche Mitglieder dieser Überfamilie von Rezeptoren durch physikalische Kräfte wie Streckkräfte aktiviert, die auf die Membranen von Zellen wirken, die solche Rezeptoren exprimieren. Alle solche Rezeptoren liegen innerhalb des Schutzbereiches der vorliegenden Erfindung.

[0043] Die Rezeptoren anorganischer Ionen können in der vorstehend beschriebenen An und Weise in Ver-

bindung mit dem bevorzugten Rezeptor verwendet werden. Rekombinante Rezeptoren, die in einer Vielzahl von Gewebetypen einschließlich menschlicher Gewebetypen exprimiert werden, können zum Absuchen (einschließlich Hochdurchsatz-Absuchen) zum Zweck der Entdeckung von Arzneistoffen in Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, verwendet werden. Ionomimetika und Ionolytika können leicht bestimmt werden. Die Vorgehensweise kann an die individuelle Funktion des Rezeptors angepaßt werden. Beispielsweise kann calciumaktivierter Chloridstrom bei einem Rezeptor anorganischer Ionen angewendet werden, der einen Calcium-Kanal bildet oder der intrazelluläxes Calcium neutralisiert. Ligandengesteuerte Ionenkanäle sind auf dem Fachgebiet bekannt. Rezeptoren anorganischer Ionen, die an Second Messenger-Systeme koppeln, erlauben Tests, wie sie vorstehend beschrieben sind, einschließlich der Messung des zyklischen AMP und des Inositphosphats. Zellen, bei denen rekombinante Rezeptoren an leicht nachweisbare Mittel gekoppelt sind, wie G-Protein-Kopplung von Rezeptoren an Pigmentdispersion in Melanophoren, wie in der Literatur beschrieben, können ebenfalls verwendet werden. Somit werden auch Verfahren zum Entdeckten von Mitteln beschrieben, die Mimetika oder Lytika von Rezeptoren anorganischer Ionen sind, sowie solche Mimetika und Lytika selbst, einschließlich jener, die vorzugsweise aus den vorstehend im Detail beschriebenen Mimetika und Lytika ausgewählt werden. Ebenfalls beschrieben werden die Diagnose und Behandlung von Krankheiten oder Zuständen, wie sie vorstehend im Zusammenhang mit der bevorzugten Ausführungsform beschrieben wurden, die mit Rezeptoren anorganischer Ionen im Zusammenhang stehen. Beispielsweise können Krankheiten, die mit einem hohen Spiegel eines Rezeptors anorganischer Ionen einhergehen, aufgrund der Tests auf solche erhöhten Spiegel diagnostiziert werden. Therapeutische Moleküle können durch Absuchen auf Mittel, die die Wirkung der relevanten nativen Ionen nachahmen, oder die die Wirkung oder Stärke des relevanten nativen Ions verändern, bestimmt werden. Die gewebespezifische Expression sowie die Expressionsspiegel können bewertet werden, usw.

[0044] Somit werden unter diesem Gesichtspunkt der Erfindung eine neue Überfamilie von isolierten Rezeptoren anorganischer Ionen und einzigartige Fragmente davon geliefert. Vorzugsweise sind die isolierten Rezeptoren menschliche Rezeptoren, und am stärksten vorzuziehen ist der isolierte Rezeptor ein Calciumrezeptor, der in Geweben oder Zellen exprimiert wird, die aus der Gruppe, bestehend aus: parathyroidalen, Gefäß-, Nieren-, Epidermis-, Schilddrüsen-, Osteoklasten-, Darm-, Brust-, Trophoblasten-, Thrombocyten-, gastrinsekretierende, glucagonsekretierende, Herz-, und Gehirngeweben und -zellen ausgewählt werden, und einzigartige Fragmente davon. Die Erfindung liefert ferner Polypeptidfragmente der vorstehenden Rezeptoren anorganischer Ionen, die eine wünschenswerte Wirkung haben. Das Fragment kann z.B. nur eine Bindungsstelle oder eine Stelle, die an Mimetika, Agonisten oder Antagonisten bindet, haben. Andere nützliche Fragmente beinhalten jene, die nur den externen Abschnitt, die membranspannenden Abschnitte oder intrazellulären Abschnitte des Rezeptors haben. Ferner sind diese Fragmente nützlich zur Bildung chimärer Rezeptoren mit Fragmenten von anderen Rezeptoren, wie nachstehend detaillierter beschrieben. Die Erfindung liefert auch Muteine oder Analoga und andere Abkömmlinge der isolierten Rezeptoren. Somit umfaßt die Erfindung nicht nur natürlich vorkommende Proteine, sondern auch Abkömmlinge davon.

[0045] Die Erfindung liefert auch Nucleotidsequenzen, die die vorstehenden Rezeptoren anorganischer Ionen und Fragmente und Abkömmlinge davon codieren. Solche Nucleotidsequenzen können durch vielerlei Verfahren gewonnen werden, und die Offenbarung der vorliegenden Erfindung erlaubt dem Durchschnittsfachmann, cDNA oder genomische Clone, die solche Rezeptoren codieren, zu gewinnen. Beispielsweise können Hybridisierungssonden auf der Basis der Nucleotidsequenz von BoPCaR 1 hergestellt werden. Werden Genombibliotheken für cDNA-Bibliotheken von einem beliebigen Gewebe bei niedriger Stringenz mit solchen Sonden abgesucht, erhält man hybridisierende Clone, die andere Mitglieder der Überfamilie codieren. Ferner können Antikörper, die an clonierte oder isolierte Rezeptoren anorganischer Ionen binden, leicht hergestellt werden. Solche Antikörper können auch dazu verwendet werden, andere Rezeptoren der Erfindung durch Expressionsclonierungstechniken, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, zu isolieren. Auch gezieltes Gen-Walking kann dazu verwendet werden, Mitglieder der Überfamilie der Rezeptoren anorganischer Ionen zu bestimmen und zu clonieren. Ferner können die Clone durch Expressionsclonierungsverfahren, wie vorstehend beschrieben, gewonnen werden. Diese Verfahren können an die individuelle Funktion des Rezeptors organischer Ionen von Interesse angepaßt werden. Beispielsweise können auch calciumaktivierte Chloridströme für die Clonierung eines Rezeptors anorganischer Ionen verwendet werden, der einen Calciumkanal bildet oder der intrazelluläres Calcium mobilisiert. Liganden gesteuerte Ionenkanäle, wie vorstehend diskutiert, sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispielsweise wurde ein Serotonin gesteuerter Ionenkanal auf diese Art und Weise cloniert. Jedoch sind die Rezeptoren der vorliegenden Erfindung von anderen bekannten Liganden gesteuerten Ionenkanälen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen und hinsichtlich der Tatsache, daß sie anorganische Ionen wie Calcium-, Magnesium-, Wasserstoffionen, Phosphationen usw. erkennen, verschieden.

[0046] Der Fachmann wird auch erkennen, daß jeder auf diese Weise gewonnene clonierte Rezeptor neue

derartige DNA- oder Antikörpersonden liefert, die ihrerseits dazu verwendet werden, noch weitere Clone, die Rezeptoren anorganischer Ionen codieren, zu bestimmen. Weiterhin wird man erkennen, daß, ist einmal die Sequenz von mehr als einem Rezeptor, wie vorstehend umrissen, gewonnen, Information zur lokalisierten Sequenzkonservierung verfügbar sind, die zur Gewinnung noch weiterer Clone, die andere Mitglieder der Überfamilie codieren, nützlich ist. Solche konservierten Sequenzen können auch aus einer Analyse der Gesamtstruktur von BoPCaR 1 abgeleitet werden, da sie typischerweise eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne einschließt.

[0047] Somit werden isolierte Nucleinsäuren, die Rezeptoren anorganischer Ionen und einzigartige Fragmente davon codieren, geliefert. Der bevorzugte Rezeptor ist ein Calciumrezeptor, der in den Geweben oder Zellen, die aus der vorstehend beschriebenen Gruppe ausgewählt werden, exprimiert wird. Am meisten vorzuziehen codiert die Nucleinsäure einen menschlichen Rezeptor anorganischer Ionen oder ein einzigartiges Fragment davon. Die Erfindung liefert weiter die Isolation der endogenen regulatorischen Elemente, die die Expression der vorstehenden Rezeptoren anorganischer Ionen steuern, und Mittel, die in der Lage sind, die Wirkung dieser regulatorischen Elemente zu agonisieren oder antagonisieren, können ebenfalls bestimmt werden.

[0048] Die Erfindung liefert ferner rekombinante Zellen, die die Nucleinsäuren der Erfindung exprimieren. In solchen Zellen kann die Nucleinsäure unter der Kontrolle ihrer genomischen regulatorischen Elemente sein, oder sie kann unter der Kontrolle exogener regulatorischer Elemente, einschließlich eines exogenen Promotors, sein. Mit „exogen" ist ein Promotor gemeint, der in vivo normalerweise nicht transkriptionell an die codierende Sequenz des Rezeptors anorganischer Ionen gekoppelt ist.

[0049] Gereinigte Antikörper gegen die vorstehenden Rezeptoren anorganischer Ionen sowie Antikörper gegen allosterische Stellen von solchen Rezeptoren und Idiotypen von solchen Rezeptoren werden geliefert.

[0050] An ein Toxin gekoppelte Mittel, die Rezeptoren anorganischer Ionen binden, werden ebenfalls geliefert. Solche Mittel können Antikörper sein und sind als solche Immuntoxine. Solche Immuntoxine können zum Beispiel dazu verwendet werden, eine Zelle, die einen Rezeptor anorganischer Ionen exprimiert, in vitro oder in vivo zu töten.

[0051] Darüberhinaus können die offenbarten Nucleinsäuremoleküle dazu verwendet werden, transgene, nichtmenschliche Säuger herzustellen, die ein Transgen enthalten, das einen Rezeptor anorganischer Ionen oder ein einzigartiges Fragment davon enthält. Solche Transgene können nützlich bei der Beeinflussung oder Veränderung der Expression eines Rezeptors anorganischer Ionen oder bei der Inaktivierung der Expression eines Rezeptors anorganischer Ionen, beispielsweise durch homologe Rekombination, sein. Auch andere Transgene können in solchen Säugern geliefert werden, einschließlich jener, die ein Antisensemolekül oder ein Protein codieren, das in der Lage ist, die Expression eines nativen Gens eines Rezeptors anorganischer Ionen zu verändern. Eine solche Veränderung kann eine Hinaufregulierung, eine Herunterregulierung oder eine komplette Inaktivierung sein.

[0052] Somit werden Verfahren geliefert, die zum Zweck der Beeinflussung der Expression des Rezeptors anorganischer Ionen ein Inkontaktbringen einer Zelle mit einem Mittel, das an eine Zellkomponente bindet, beinhalten. Solche Mittel können an Promotoren binden, an andere regulatorische Mittel, die auf Promotoren wirken, an Mittel, die in der Lage sind, an den Rezeptor zu binden, und an Nucleinsäuren, die den Rezeptor oder ein einzigartiges Fragment davon codieren. Der Kontakt kann durch extrazelluläre Verabreichung, durch Bereitstellung eines Transgens, das das Mittel codiert, oder durch jedes beliebige andere geeignete Verfahren geschehen, je nach der Anwendung, auf die sich das betreffende Verfahren richtet.

[0053] Andere Eigenschaften und Vorteile der Erfindung werden aus der nachfolgenden Beschreibung ihrer bevorzugten Ausführuugsformen und aus den Ansprüchen ersichtlich werden.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0054] Zunächst werden die Zeichnungen kurz beschrieben.

Zeichnungen

[0055] Fig. 1 stellt repräsentative Moleküle dar, die in der Erfindung nützlich sind.

[0056] Fig. 2 ist eine graphische Darstellung der durch extrazelluläres Ca^{2+} induzierten $[Ca^{2+}]_i$-Zunahme in

Quin-2 oder Fura-2 beladenen parathyroidalen Rinderzellen. Die anfängliche [Ca^{2+}] betrug 0,5 mM (bei Verwendung von $CaCl_2$), und bei jedem der Pfeile wurde sie in 0,5 mM-Schritten erhöht.

[0057] Fig. 3 ist eine graphische Darstellung der Mobilisierung der [$Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen. Die anfängliche [Ca^{2+}] betrug 0,5 mM und wurde durch Hinzufügen von EGTA, wie angegeben, bis auf < 1µM abgesenkt. (a) Extrazelluläres Mg^{2+} (am Ende 8 mM) löst eine Zunahme der [$Ca^{2+}]_i$ in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} aus. (b) Vorbehandlung mit Ionomycin (1 µM) blockiert die Reaktion auf Mg^{2+}. (c) Vorbehandlung mit 5 µM Molekül 1799 (ein mitochondrialer Entkoppler) ist ohne Auswirkung auf die Reaktion auf Mg^{2+}.

[0058] Fig. 4 ist eine graphische Darstellung, die die bevorzugten inhibitorischen Wirkungen einer niedrigen Konzentraton von Gd^{3+} auf gleichbleibende Zunahmen der [$Ca^{2+}]_i$ zeigt, und die zeigt, daß eine hohe Konzentration von Gd^{3+} eine vorübergehende Zunahme der [$Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen auslöst. Obere Tafel: Kontrolle. Die Anfangskonzentration von extrazellulärem Ca^{2+} war 0,5 mM und wurde an jeder Pfeilspitze um 0,5 mM erhöht. Mittlere Tafel: Gd^{3+} (5 µM) blockiert gleichbleibende, aber nicht vorübergehende Zunahmen der [$Ca^{2+}]_i$, die von extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöst wurde. Untere Tafel: Gd^{3+} (50 µM) löst eine vorübergehende Zunahme der [$Ca^{2+}]_i$ aus und hebt sowohl vorübergehende als auch anhaltende Reaktionen auf extrazelluläres Ca^{2+} auf. In der mittleren und unteren Tafel wurde gerade soviel EGTA hinzugefügt, daß bevorzugt Gd^{3+} cheliert wird; die Blockade des Ca^{2+}-Einstromsist entfernt, und die [$Ca^{2+}]_i$ steigt prompt an.

[0059] Fig. 5 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß die Wirkungen von PMA auf [$Ca^{2+}]_i$, IP_3-Bildung und PTH-Sekretion in parathyroidalen Rinderzellen durch zunehmende Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} aufgehoben werden. Für jede Variable existiert eine Verschiebung nach rechts in der Konzentrations-Reaktions-Kurve für extrazelluläres Ca^{2+}. Beachte auch, daß die Konzentrations-Reaktions-Kurven sigmoidal variieren, während [Ca^{2+}] linear ansteigt.

[0060] Fig. 6 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß die von Spermin ausgelösten Zunahmen der [$Ca^{2+}]_i$ durch Erhöhen der [Ca^{2+}] in parathyroidalen Rinderzellen fortschreitend abgesenkt werden. Das Spermin (200 µM) wurde zu den mit Pfeilspitzen angegebenen Zeitpunkten hinzugefügt. In dieser und in allen folgenden Figuren sind die Zahlen, die die Spuren begleiten, [$Ca^{2+}]_i$ in nM.

[0061] Fig. 7 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß Spermin intrazelluläres Ca^{2+} in parathyroidalen Rinderzellen mobilisiert. Es wurde EGTA hinzugefügt, um die [Ca^{2+}] vor der Sperminzugabe (200 µM), wie angegeben, auf < 1 àM zu reduzieren (linke Spur). Eine Vorbehandlung mit Ionomycin (1 µM) blockiert die Reaktion auf Spermin (rechte Spur).

[0062] Die Fig. 8A und Fig. B sind graphische Darstellungen, die zeigen, daß Spermin die [$Ca^{2+}]_i$ erhöht und die PTH-Sekretion in parathyroidalen Rinderzellen ähnlich wie extrazelluläres Ca^{2+} inhibiert. Die Datenpunkte der Spermindosis-Konzentrations-Reaktions-Kurven sind die Mittelwerte von zwei Versuchen.

[0063] Fig. 9 ist eine graphische Darstellung, die die gegenteiligen Wirkungen von PMA auf Reaktionen auf extrazelluläres Ca^{2+} und auf Reaktionen auf ATPγS in parathyroidalen Rinderzellen zeigt. Linke Tafel: Die Konzentrations-Reaktions-Kurve für die durch extrazelluläres Ca^{2+} induzierte Inhibition der Bildung von zyklischem AMP wird durch PMA (100 nM) nach rechts verschoben. Mittlere Tafel: PMA beeinflußt nicht die Fähigkeit von ATPγS, die [$Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen. Beachte auch, daß die Konzentrations-Reaktions-Kurve von ATPγS ein klassisches sigrnoidales Verhalten als Funktion der log-Konzentration zeigt, im Gegensatz zu den extrazellulären zweiwertigen Kationen.

[0064] Fig. 10 ist eine graphische Darstellung, die die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in menschlichen parathyroidalen Zellen zeigt, die von extrazellulärem Mg^{2+} hervorgerufen wird. Die Zellen wurden aus einem Adenom gewonnen und in Puffer gebadet, der 0,5 mM extrazelluläres Ca^{2+} enthielt. (a) Die vorübergehende und anhaltende Zunahme der [$Ca^{2+}]_i$, ausgelöst von extrazellulärem Mg^{2+} (am Ende 10 mM), zeigt, daß anhaltende Zunahmen nicht von Nimodipin (1 µM) beeinflußt werden, aber von La^{3+} (1 µM) abgesenkt werden und sich prompt wieder umkehren, wenn La^{3+} von niedrigen EGTA-Konzentrationen selektiv cheliert wird. (b) La^{3+} (1 µM) blockiert die anhaltende, aber nicht die vorübergehende Zunahme der [$Ca^{2+}]_i$, die von extrazellulärem Mg^{2+} ausgelöst wird. (c) Vorübergehende von cytosolischem Ca^{2+}, ausgelöst von extrazellulärem Mg^{2+}, bleiben in der Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} bestehen.

[0065] Fig. 11 ist eine graphische Darstellung, die die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Rinderzellen zeigt, die von Neomycin oder Protamin hervorgerufen wird. In allen Spuren betrug die anfängliche [Ca^{2+}] und [Mg^{2+}] 0,5 mM bzw. 1 mM. In den Spuren (a) und (b) wurden die Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Konzentratio-

nen von 0,5 und 1 mM bis auf 2 bzw. 8 mM erhöht. In den anderen Spuren, (c) bis (i), wurde, wie angegeben Neomycin B (30 µM) oder Protamin (1 µg/ml) hinzugefügt. La^{3+} (1 µM), EGTA (1 mM) oder Ionomycin (100 nM) wurde, wie angegeben, hinzugefügt. Jede Spur ist für das Muster aus 5 oder mehr Versuchen mit wenigstens 3 verschiedenen Zellpräparaten repräsentativ. Balken = 1 min.

[0066] Fig. 12 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß Neomycin B vorübergehende, nicht jedoch gleichbleibende Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ blockiert, die von extrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Rinderzellen ausgelöst wurden. Linke Kontrolle: Die $[Ca^{2+}]$ betrug anfangs 0,5 mM und wurde an jeder der offenen Pfeilspitzen in 0,5 mM-Schritten vor der Zugabe von Neomycin B (30 µM) erhöht. Rechts: Neomycin B (30 µM) wurde vor $[Ca^{2+}]$ hinuzugefügt. Balken = 1 min.

[0067] Fig. 13 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß Neomycin B oder Protamin die PTH-Sekretion bei Konzentrationen inhibiert, die eine $[Ca^{2+}]_i$-Zunahme in parathyroidalen Rinderzellen hervorrufen. Die Zellen wurden 30 min lang in Gegenwart von 0,5 mM extrazellulärem Ca^{2+} mit den angegebenen Konzentrationen organischer Polykationen inkubiert. Offene Symbole: Kontrollreaktionen auf PTH-Sekretion in Gegenwart von 0,5 mM (Kreise) oder 2 mM (Rauten) extrazellulärem Ca^{2+}. Die Werte für $[Ca^{2+}]_i$ sind Rautensymbole. In den Versuchen mit Protamin wurden Rinderzellen und in denen mit Neomycin B wurden menschliche parathyroidale (Adenom)-Zellen verwendet. Jeder Punkt ist der Mittelwert ± SEM („standard error of median"; Standardabweichung des Mittelwertes) aus 3 Versuchen.

[0068] Fig. 14 ist eine graphische Darstellung, die die vorzugsweisen inhibitorischen Wirkungen von PMA auf vorübergehende cytosolische Ca^{2+}-Änderungen zeigt, die von Spermin in parathyroidalen Rinderzellen ausgelöst werden. Die anfängliche $[Ca^{2+}]$ betrug 0,5 mM; Spermin (200 µM) oder ATP (50 µM) wurde, wie angegeben, hinzugefügt. Balken = 1 min.

[0069] Fig. 15 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß PMA die Konzentrations-Reaktions-Kurven für durch extrazelluläres Ca^{2+} und Neomycin B induzierte Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen nach rechts verschiebt. Die Zellen wurden 1 min lang mit PMA vorbehandelt, bevor, wie angegeben, die $[Ca^{2+}]$ erhöht oder Neomycin B hinzugefügt wurde. Jeder Punkt ist der Mittelwert ± SEM aus 3 bis 5 Versuchen.

[0070] Fig. 16 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß PMA die Konzentrations-Reaktions-Kurven für durch extrazelluläres Ca^{2+} und Spermin induzierte Inhibition der PTH-Sekretion in parathyroidalen Rinderzellen nach rechts verschiebt. Die Zellen wurden mit der angegebenen $[Ca^{2+}]$ und Sperrain 30 min lang in Gegenwart (ausgefüllte Punkte) und Abwesenheit (offene Kreise) von 100 nM PMA inkubiert. Jeder Punkt ist der Mittelwert ± SEM aus 3 Versuchen.

[0071] Fig. 17 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß Protamin die Bildung von Inositphosphaten in parathyroidalen Rinderzellen erhöht. Parathyroidale Zellen wurden über Nacht in Kulurmedium inkubiert, das 4 µCi/ml ^{3}H-myo-Inosit enthielt, gewaschen und mit der angegebenen Konzentration von Protamin bei 37 °C inkubiert. Nach 30 sec wurde die Reaktion durch Hinzufügen von $CHCl_3$:MeOH:HCl beendet, und IP_1 (Kreise) und IP_3 (Dreiecke) wurden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. Jeder Punkt ist das Mittel aus 2 jeweils in dreifachem Ansatz ausgeführten Versuchen.

[0072] Fig. 18 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß PMA die von extrazellulärem Ca^{2+} oder Sperrain hervorgerufene Bildung von IP_1 in parathyroidalen Rinderzellen absenkt. ^{3}H-myo-Inosit markierte Zellen wurden 30 sec lang dem angegebenen $[Ca^{2+}]$ oder Sperrain ausgesetzt, bevor die Reaktion gestoppt und IP_1 durch Anionenaustauschchromatographie bestimmt wurde. Punktierte Säulen: Die Zellen wurden 5 min mit PMA (100 nm) vorbehandelt, bevor die $[Ca^{2+}]$ erhöht oder Sperrain hinzugefügt wurde. Jeder Wert ist das Mittel aus 2 jeweils in dreifachem Ansatz ausgeführten Versuchen.

[0073] Fig. 19 ist eine graphische Darstellung, die von Neomycin B ausgelöste vorübergehende und anhaltende Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen parathyroidalen (Adenom)-Zellen zeigt. Die $[Ca^{2+}]$ betrug 0,5 mM. (a) Die von Neomycin B (10 µM) ausgelöste anhaltende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ wurde von La^{3}+ abgesenkt. (b) Die von Neomycin B ausgelöste vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ wurde von La^{3+} nicht beeinflußt. (c) Die vorübergehenden Zunahmen der $[Ca^{2+}]$; blieben in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2}+ erhalten.

[0074] Fig. 20 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß Neomycin B eine oszillatorische Zunahme des Cl^--Stroms in Xenopus-Oocyten hervorruft, die den Ca^{2+}-Rezeptor exprimieren. Die obere Spur ist von einer Oocyte drei Tage nach der Injektion von menschlicher (hyperplastischer) poly(A)$^+$-mRNA aus parathyroidalen Zellen. Die untere Spur ist von einer Oocyte, der Wasser injiziert wurde. Neomycin B rief in fünf Zellen, denen

Wasser injiziert wurde, keine Reaktion hervor, und Carbachol rief eine Reaktion in einer Zelle hervor, was gezeigt wird. In beiden Spuren betrug das Haltepotential – 76 mV.

[0075] Fig. 21 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß Neomycin B basale oder hervorgerufene Zunahmen von C-Zellen nicht beeinflußt. Kontrollen, linke Spur: Fura-2 beladene rMTC 6-23-Zellen wurden zuest in Puffer mit 1 mM Ca^{2+} gebadet, bevor die $[Ca^{2+}]$ auf 3 mM erhöht wurde. Rechte Spur: Vorbehandlung mit 5 mM Neomycin B.

[0076] Fig. 22 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß extrazelluläres Ca^{2+} eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in Rattenosteoklasten hervorruft. Mikrofluorometrische Aufzeichnung in einem einzelnen Rattenosteoklasten, der mit Indo-1 beladen und über die angegebenen Zeitintervalle (Balken) mit Puffer mit den angegebenen $[Ca^{2+}]$ superfusioniert wurde. Normaler Puffer, der zwischen den Balken superfusioniert wurde, enthielt 1 mM Ca^{2+}.

[0077] Fig. 23 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß Spermin oder Neomycin B keine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in Rattenosteoklasten hervorruft. Ein Indo-1 beladener Osteoklast wurde mit der angegebenen Konzentration von Spermin oder Neomycin B allein (offene Balken) oder zusammen mit 20 mM Ca^{2+} (ausgefüllte Balken) superfusioniert.

[0078] Fig. 24 ist eine graphische Darstellung, die die unterschiedlichen Wirkungen von Argiotoxin 659 (in der Figur als Argiopin gezeigt, Strukturformeln werden auch in Fig. 1 gezeigt) und Argiotoxin 636 auf die $[Ca^{2+}]$; in parathyroidalen Rinderzellen zeigt. Die anfängliche $[Ca^{2+}]$ war 0,5 mM und sie wurde, wo angegeben (rechte Spur), auf 1,5 mM erhöht. Wo angegeben wurde Argiotoxin 659 (300 µM) oder Argiotoxin 636 (400 µM) hinzugefügt.

[0079] Fig. 25 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß extrazelluläres Mg^{2+} oder Gd^{3+} oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stromes in Xenopus-Oocyten hervorruft, denen poly(A)$^+$-mRNA aus parathyroidalen Rinderzellen injiziert worden war. In der Spur (a) war die Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} < 1 µM und in Spur (b) 0,7 mM. Die Spur (c) zeigt, daß extrazelluläres Mg^{2+} keine Reaktion in einer Oocyte auslöst, der nur die mRNA für den Substanz K-Rezeptor injiziert wurde, obwohl eine Superfusion mit Substanz K eine Reaktion auslöst. Das Haltepotential betrug – 70 bis = 80 mV.

[0080] Fig. 26 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß extrazelluläres Ca^{2+} oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stromes in Xenopus-Oocyten hervorrufen, denen poly(A)+-mRNA aus menschlichem (hyperplatischem) Parathyroidalgewebe injiziert worden war. Die Oocyte wurde drei Tage nach der Injektion von 50 ng poly(A)$^+$-mRNA auf ihre Reaktivität gegen extrazelluläres Ca^{2+} getestet. Das Haltepotential betrug – 80 mV.

[0081] Fig. 27 ist eine graphische Darstellung, die die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Rinderzellen zeigt, die von Budmunchiamin ausgelöst wird. Budmunchiamin (300 µM, die Struktur wird ebenfalls gezeigt) wurde hinzugefügt, wo angegeben.

[0082] Fig. 28 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß die Fähigkeit zur Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Rinderzellen stereospezifisch ist. Mit Fura-2 beladene parathyroidale Rinderzellen wurden zuerst in Puffer mit 0,5 mM extrazellulärem Ca^{2+} suspendiert, dann wurde die angegebene Konzentration eines jeden Moleküls hinzugefügt.

[0083] Fig. 29 ist eine graphische Darstellung, die die Wirkung von La^{3+} auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Osteoklasten zeigt. Es wird eine repräsentative Spur von einem einzelnen Rattenosteoklasten gezeigt, der mit Indo-1 beladen ist. Bei niedrigen Konzentrationen blockiert La^{3+} teilweise den $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg, der von extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöst wird.

[0084] Die Fig. 30A und Fig. B sind graphische Darstellungen, die die von extrazellulärem Mn^{2+} ausgelöste Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in Rattenosteoklasten zeigen. Extrazelluläres Mn^{2+} ruft eine konzentrationsabhängige Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 30A) hervor, die in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erhalten bleibt (Fig. 30B).

[0085] Die Fig. 31A und Fig. B sind graphische Darstellungen, die die Mobilisierung der $[Ca^{2+}]_i$ in Rattenosteoklasten zeigen, die von einem als NPS 449 (vgl. Fig. 38) bezeichneten Molekül ausgelöst wird. Isolierte, mit Indo-1 beladene Rattenosteoklasten wurden mit den angegebenen Konzentrationen von NPS 449 in Gegenwart (Fig. 31A) oder Abwesenheit (Fig. 31B) von 1 mM extrazellullärem $CaCl_2$ superfusioniert.

[0086] Fig. 32 ist eine graphische Darstellung, die die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in C-Zellen zeigt, die durch NPS 019 hervorgerufen wurde (vgl. Fig. 1) rMTC 6-23-Zellen wurden mit Fura-2 beladen und in Puffer mit 0,5 mM [Ca^{2+}] gebadet. Wo angegeben, wurde NPS 019 bis zu einer Endkonzentration von 10 µM hinzugefügt. Repräsentative Spuren zeigen, daß die von NPS 019 hervorgerufene vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ gegen eine Inhibition durch La^{3+} resistent ist (mittlere Spur) und in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erhalten bleibt (rechte Spur).

[0087] Fig. 33 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß NPS 456 (Fig. 36) oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stroms in Xenopus-Oocyten hervorruft, denen poly(A)$^+$-mRNA aus parathyroidalen Rinderzellen injiziert wurde.

[0088] Fig. 34 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß extrazelluläres Ca^{2+} oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stroms in Xenopus-Oocyten hervorruft, denen mRNA aus menschlichen Osteoklasten injiziert wurde. Die Oocyte wurde drei Tage nach der Injektion von 50 ng Gesamt-poly(A)$^+$-mRNA auf ihre Reaktivität auf extrazelluläres Ca^2+ getestet.

[0089] Fig. 35 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß der Ca^2+-Rezeptor der parathyroidalen Zelle von mRNA in einer Größenordnung von 2,5–3,5 kb codiert wird. Poly(A)$^+$-mRNA von parathyroidalen Rinderzellen wurde auf Glyceringradienten größenfraktioniert und zu zehn Fraktionen zusammengefaßt. Jede Fraktion wurde separat in Xenopus-Oocyten injiziert (50 ng/Fraktion). Nach drei Tagen wurden die Oocyten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, auf Neomycin B (10 mM) mit oszillatorischen Zunahmen des Cl^--Stromes zu reagieren.

[0090] Fig. 36 zeigt die chemische Struktur von Molekülen, die aus Diphenylpropyl-α-phenethylamin abgeleitet sind; sie stellen eine Molekülfamilie dar, die hergestellt und abgesucht wurde, um die nützlichen Moleküle der Erfindung zu finden.

[0091] Fig. 37 ist eine graphische Darstellung, die zeigt, daß NPS 021 eine calcilytische Verbindung ist, die die Wirkungen von extrazellulärem Ca^{2+} auf die $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen blockiert. Die Zellen wurden zuerst in Puffer mit 0,5 mM $CaCl_2$ gebadet, und die [Ca^{2+}], wo angegeben, bis zu einem Endstand von 2 mM erhöht (linke Spur). Die Hinzufügung von NPS 021 (200 µM) verursachte keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$, inhibierte aber die durch extrazelluläres Ca^{2+} ausgelöste Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ (rechte Spur).

[0092] Fig. 38 ist ein Graph, der die Reaktion von Ca^{2+} auf NPS R,S-467 in vivo zeigt.

[0093] Fig. 39 ist ein Graph, der die Reaktion von PTH auf NPS R,S-467 in vivo zeigt.

[0094] Fig. 40 ist ein Graph, der die Reaktion von Ca^{2+} im Serum auf 25 mg/kg NPS R,S-467 in vivo zeigt.

[0095] Fig. 41 ist ein Graph, der die Reaktion der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen auf verschiedene Enantiomere von NPS 467 in vivo zeigt.

[0096] Fig. 42 ist ein Graph, der die Reaktion von Ca^{2+} im Serum bei Ratten auf verschiedene Enantiomere von NPS 467 in vivo zeigt.

[0097] Fig. 43a stellt ein Reaktionsschema zur Herstellung von Fendilin oder Fendilinanaloga oder -abkömmlingen dar, die in Fig. 36 dargestellt sind. Fig. 43b stellt ein Reaktionsschema zur Synthese von NPS 467 dar.

[0098] Fig. 44 stellt eine Dosis-Reaktions-Kurve dar, die zeigt, daß NPS 467 bei oraler Verabreichung das im Serum ionisierte Calcium bei Ratten verringert.

[0099] Fig. 45 ist eine Restriktionskarte des Plasmids, das BoPCaR 1 enthält und unter der Zugangsnummer ATCC 75416 bei der ATCC hinterlegt wurde.

[0100] Fig. 46 ist eine Restriktionskarte von BoPCaR 1.

[0101] Fig. 47 ist eine Nucleotidsequenz, die (mit etwa 90% Genauigkeit) dem sequenzierten 2,2 kb-Fragment von BoPCaR 1 entspricht.

Calcimimetische und calcilytische Moleküle

[0102] Calcimimetische und calcilytische Moleküle, die in der Erfindung nützlich sind, werden vorstehend allgemein beschrieben. Diese Moleküle können leicht mit Absuchverfahren zur Bestimmung von Molekülen, die die Wirkung von Ca^{2+} an Ca^{2+}-Rezeptoren nachahmen oder antagonisieren, bestimmt werden. Beispiele für solche Verfahren werden nachfolgend gebracht. Diese Beispiele sind für die Erfindung nicht limitierend, sondern veranschaulichen lediglich die Verfahren, die von Fachleuten leicht angewandt oder angepaßt werden können.

[0103] Im Allgemeinen werden calcimimetische und calcilytische Moleküle bestimmt, indem Moleküle, die den nachstehend beschriebenen (Leitmoleküle genannten) nachgeahmt sind, abgesucht werden. Wie nachstehend gesehen werden kann, gibt es mehrere spezifische Calcimimetika und Calcilytika, die an verschiedenen Ca^{2+}-Rezeptoren nützlich sind. Abgeleitete Moleküle werden leicht durch Standardverfahren entworfen und in einem oder mehreren Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, getestet. Viele Moleküle können leicht abgesucht werden, um jene zu bestimmen, die in dieser Erfindung am nützlichsten sind.

[0104] Organische kationische Moleküle, die die Wirkungen von Ca^{2+} in anderen Systemen nachahmen oder antagonisieren, enthalten die erforderliche Struktur für eine Wirkung an einem Ca^{2+}-Rezeptor. Ein rationaler Entwurf anderer nützlicher Moleküle beinhaltet das Studium eines Moleküls, das bekanntermaßen calcimimetisch oder calcilytisch ist, und dann die Modifikation der Struktur des bekannten Moleküls. Beispielsweise sind Polyamine potentiell calcimimetisch, da Sperrain die Wirkung von Ca^{2+} in mehreren in vitro-Systemen nachahmt. Die Ergebnisse zeigen, daß Sperrain in der Tat Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und PTH-Sekretion verursacht, die an jene erinnern, die von zwei- und dreiwertigen Kationen ausgelöst werden (vgl. nachstehend). Im Gegensatz dazu antagonisiert Ga^{3+} die Wirkungen von Gd^{3+} an dem/den parathyroidalen Calciumrezeptor(en). Die nachstehend umrissenen Versuche zielen daher darauf ab, zu demonstrieren, daß diese mit Sperrain erzielten Phänomene die gleichen Mechanismen einbeziehen, wie sie von extrazellulärem Ca^{2+} verwendet werden. Um dies zu erreichen, wurden die Wirkungen von Sperrain auf vielerlei physiologische und biochemische Parameter überprüft, die die Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors kennzeichnen. Diese Moleküle mit ähnlichen Wirkungen sind in dieser Erfindung nützlich und können entdeckt werden, indem Moleküle mit einer dem Sperrain ähnlichen Struktur ausgewählt oder hergestellt werden. Ist einmal ein anderes nützliches Molekül entdeckt, kann dieser Selektionsprozeß leicht wiederholt werden.

[0105] Der Klarheit wegen wird nachstehend eine spezifische Serie von Absuchverfahren zur Bestimmung solcher nützlicher Moleküle, die an einem Ca^{2+}-Rezeptor einer parathyroidalen Zelle aktiv sind, oder die als Agonisten oder Antagonisten der Zellreaktion auf Veränderungen der $[Ca^{2+}]$ wirken, geliefert. Gleichwertige Tests können für Moleküle verwendet werden, die an anderen Ca^{2+}-Rezeptoren oder anderen Rezeptoren anorganischer Ionen wirken oder die Zellfunktionen, die durch die $[Ca^{2+}]$ oder andere Ionen gesteuert werden, auf andere Weise nachahmen oder antagonisieren. Diese Tests stellen Beispiele für die Verfahren dar, die dazu nützlich sind, Moleküle, einschließlich calcimimetischer Moleküle, dieser Erfindung zu finden. Gleichwertige Verfahren können verwendet werden, um lytische Moleküle, einschließlich calcilytischer Moleküle, zu finden, indem nach jenen Molekülen abgesucht wird, die gegen die Wirkung des Ions, einschließlich des extrazellulären Ca^{2+}, am stärksten antagonistisch sind. In vitro-Tests können dazu verwendet werden, die Selektivität, Sättigbarkeit und Reversibilität dieser Mimetika und Lytika mit Standardtechniken zu charakterisieren.

Absuchverfahren

[0106] Im Allgemeinen werden mit Fura-2 beladene parathyroidale Rinderzellen zuerst in Puffer mit 0,5 mM $CaCl_2$ suspendiert. Ein kleines Volumen (5–15 µl) der Testsubstanz wird in die Küvette hinzugefügt, und jede Veränderung des Fluoreszenzsignals wird festgehalten. Die Konzentration der Testsubstanz in der Küvette wird kumulativ erhöht, bis eine vorab bestimmte Konzentration erreicht ist oder Veränderungen der Fluoreszenz bemerkbar werden. Sind keine Veränderungen der Fluoreszenz bemerkbar, so wird das Molekül als inaktiv betrachtet und es werden keine weitere Tests vorgenommen. In anfänglichen Studien, z.B. mit Molekülen des Polyamin-Typs, wurden die Moleküle bei Konzentrationen bis zu 5 oder 10 mM getestet. Da heute stärkere Moleküle bekannt sind (vgl. nachstehend), wird die Maximumkonzentration verringert. Beispielsweise werden neuere Moleküle bei Konzentrationen von bis zu 500 µM oder weniger getestet. Sind bei dieser Konzentration keine Veränderungen der Fluoreszenz bemerkbar, so kann das Molekül als inaktiv betrachtet werden.

[0107] Moleküle, die eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ verursachen, werden weiteren Tests unterworfen. Die beiden wesentlichen Merkmale des Moleküls, die für dessen Betrachtung als calcimimetisches Molekül wichtig sind, sind die Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+} und die Sensitivität gegenüber PKC-Aktivatoren. Moleküle, die

die Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+} in PMA-sensitiver Weise verursachen, haben sich unweigerlich als calcimimetische und die PTH-Sekretion inhibierende Moleküle erwiesen. Wenn nötig können weitere Tests ausgeführt werden, um diese Annahme zu erhärten. Typischerweise werden all die verschiedenen Tests auf calcimimetische oder calcilytische Wirkung (vgl. vorstehend) nicht ausgeführt. Vielmehr wird ein Molekül, das die Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+} in PMA-sensitiver Weise verursacht, zum Absuchen auf menschlichen parathyroidalen Zellen weiterentwickelt. Beispielsweise werden Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ ausgeführt, um den EC_{50}-Wert zu bestimmen und um die Fähigkeit des Moleküls zu messen, die PTH-Sekretion in menschlichen parathyroidalen Zellen zu inhibieren, die von Patienten gewonnen wurden, welche aufgrund von primärem oder sekundärem Hyperparathyroidismus operiert werden. Je niedriger der EC_{50}- oder der IC_{50}-Wert, desto stärker ist das Molekül als Calcimimetikum oder Calcilytikum.

[0108] Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 liefert ein sehr schnelles Mittel zum Absuchen neuer organischer Moleküle auf ihre Wirkung. An einem einzigen Nachmittag können 10–15 Moleküle untersucht und ihre Fähigkeit, intrazelluläres Ca^{2+} zu mobilisieren (oder nicht), festgestellt werden. Die Sensitivität einer jeden beobachteten Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ gegen eine Absenkung durch PMA kann ebenfalls festgestellt werden. Darüberhinaus kann ein einziges Zellpräparat Daten zur $[Ca^{2+}]_i$, zu den Spiegeln von zyklischem AMP, zu IP_3 und zur PTH-Sekretion liefern. Eine typische Vorgehensweise ist es, Zellen mit Fura-2 zu beladen und dann die Zellsuspension in zwei zu teilen; der größte Teil der Zellen wird zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ verwendet, und der Rest wird mit den Molekülen inkubiert, deren Wirkung auf zyklisches AMP und auf die PTH-Sekretion abzuschätzen ist. Wegen der Empfindlichkeit der Radioimmuntests auf zyklisches AMP und PTH können beide Variablen in einem einzigen Inkubationsröhrchen, das 0,3 ml Zellsuspension (etwa 500.000 Zellen) enthält, bestimmt werden. Messungen von Inositphosphaten sind ein zeitraubender Teilbereich des Absuchens. Jedoch liefern mit Chlorid (statt Formiat) eluierte Ionenaustauschsäulen ein sehr schnelles Mittel zum Absuchen auf IP_3-Bildung, da keine Rotationsverdampfung (die ungefähr 30 Stunden dauert) erforderlich ist. Dieses Verfahren erlaubt die Verarbeitung von fast 100 Proben an einem einzigen Nachmittag. Jene Moleküle, die sich aufgrund der Messungen der $[Ca^{2+}]_i$, des zyklischen AMP, IP_3 und PTH als interessant erweisen, werden dann einer genaueren Analyse unterworfen, indem die Bildung von verschiedenen Inositphosphaten geprüft wird und indem ihre Isomerform durch HPLC untersucht wird.

[0109] Mit diesen Verfahren entdeckte interessante Moleküle werden dann auf ihre Spezifität überprüft, z.B. indem ihre Wirkung auf $[Ca^{2+}]_i$ in Calcitonin sekretierenden C-Zellen untersucht wird, z.B. unter Verwendung der Zellinie MTC 6–23 von Ratten.

[0110] Im folgenden werden Verfahren erläutert, die bei diesen Absuchprozeduren nützlich sind. Beispiele typischer Ergebnisse verschiedener calcimimetischer oder calcilytischer Testmoleküle sind in den **Fig. 2**–**Fig. 34** gegeben.

Präparation parathyroidaler Zellen

[0111] Nebenschilddrüsen wurden von frisch geschlachteten Kälbern (12–15 Wochen alt) von einem örtlichen Schlachthof gewonnen und in eiskaltem Parathyroidalzellpuffer (PCB) ins Labor transportiert, der (in mM) enthält: NaCl, 126; KCl, 4; $MgCl_2$, 1; Na-HEPES, 20; pH 7.4; Glucose, 5,6; und veränderliche Mengen von $CaCl_2$, z.B. 1,25 mM. Menschliche Nebenschilddrüsen, die von Patienten gewonnen wurden, welchen aufgrund von primärem oder urämischem Hyperparathyroidismus (HPT) Nebenschilddrüsengewebe operativ entfernt wurde, wurden ähnlich wie das Rindergewebe behandelt. Die Drüsen wurden von überschüssigem Fett und Bindegewebe befreit und dann mit einer kleinen Schere in Würfel von etwa 2–3 mm zerkleinert. Durch Kollagenaseverdauung wurden dissoziierte parathyroidale Zellen hergestellt. Die dissoziierten Zellen wurden dann durch Zentrifugieren in Percollpuffer gereinigt. Das so erhaltene parathyroidale Zellpräparat war im Wesentlichen frei von roten Blutkörperchen, Adipocyten und Kapillargewebe, wie mit Phasenkontrastmikroskopie und Sudanschwarz B-Färbung festgestellt wurde. Dissoziierte und gereinigte parathyroidale Zellen waren in kleinen Aggregaten von 5 bis 20 Zellen vorhanden. Die Lebensfähigkeit der Zellen, wie mit Ausschluß von Trypanblau oder Ethidiumbromid angezeigt, betrug routinemäßig 95%.

[0112] Obwohl die Zellen an diesem Punkt für Versuchszwecke verwendet werden können, sind die physiologischen Reaktionen (Suppressibilität der PTH-Sekretion und verbleibende $[Ca^{2+}]_i$-Spiegel) besser, wenn die Zellen über Nacht gezüchtet werden. Eine Primärkultur hat auch den Vorteil, daß die Zellen bis fast zum Isotopengleichgewicht markiert werden können, wie dies für Studien erforderlich ist, die Messungen des Inositphosphat-Stoffwechsels beinhalten (vgl. nachstehend). Nach Reinigung auf Percollgradienten wurden die Zellen mehrmals in einem 1:1-Gemisch von Ham-F12-Dulbecco's modifizierten Eagle-Medium (GIBCO) gewaschen, das mit 50 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 5 µg/ml Gentamicin und ITS^+ angereichert war. ITS^+

ist eine vorgemischte Lösung, die Insulin, Transferrin, Selen und Rinderserumalbumin (BSA)-Linolensäure (Collaborative Research, Bedford, MA) enthält. Dann wurden die Zellen in Plastikflaschen (75 oder 150 cm^2; Falcon) transferiert und bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre von 5% CO_2 inkubiert. Zu diesen Übernachtkulturen wird kein Serum hinzugefügt, da dessen Anwesenheit den Zellen erlaubt, sich an das Plastik anzulagern, sich zu vermehren und sich zu entdifferenzieren. Die unter den vorstehenden Bedingungen gezüchteten Zellen ließen sich durch Dekantieren leicht aus den Flaschen entfernen, und sie zeigten die gleiche Lebensfähigkeit wie frisch präparierte Zellen.

Messung des cytosolischen Ca^{2+}

[0113] Gereinigte parathyroidale Zellen wurden in 1,25 mM $CaCl_2$-2% BSA-PCB mit 1 µM Fura-2-acetoxymethylester resuspendiert und 20 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann präzipitiert, im gleichen Puffer ohne den Ester resuspendiert und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PCB mit 0,5 mM $CaCl_2$ und 0,5% BSA gewaschen und bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) aufgehoben. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Zellen fünffach mit vorgewärmtem 0,5 mM $CaCl_2$-PCB verdünnt und so eine BSA-Endkonzentration von 0,1 % erhalten. Die Zellkonzentration in der Küvette zur Fluoreszenzmessung betrug $1–2 \times 10^{-6}$/ml.

[0114] Die Fluoreszenz der Indikator-beladenen Zellen wurde bei 37 °C in einem Spektrofluorometer (Biomedical Instrumentation Group, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) gemessen, das mit einem thermostatbestückten Küvettenhalter und Magnetrührer ausgerüstet war und Exzitations- und Emissionswellenlängen von 340 bzw. 510 nm verwendete. Diese Fluoreszenz zeigt den Spiegel des cytosolischen Ca^{2+} an. Die Fluoreszenzsignale wurden mit Digitonin (50 µg/ml Endkonzentration) kalibriert, um die Maximalfluoreszenz (F_{max}) zu erhalten, und mit EGTA (10 mM, pH 8.3, Endwert), um die Minimalfluoreszenz (F_{min}) und eine Dissoziationskonstante von 224 nM zu erhalten. Das Entweichen von Farbstoff ist temperaturabhängig und geschieht meist innerhalb der ersten 2 min nach der Erwärmung der Zellen in der Küvette; danach nimmt das Entweichen von Farbstoff nur sehr langsam zu. Um die Kalibrierung um das Entweichen von Farbstoff zu korrigieren, wurden Zellen in eine Küvette platziert und 2–3 min lang bei 37 °C gerührt. Dann wurde die Zellsuspension entfernt, die Zellen wurden präzipitiert und der Überstand in eine saubere Küvette zurückgegeben. Dann wurde der Überstand wie vorstehend mit Digitonin und EGTA behandelt, so daß man einen Schätzwert von dem Entweichen des Farbstoffs erhielt, die typischerweise 10–15% des gesamten Ca^{2+}-abhängigen Fluoreszenzsignals beträgt. Dieser Schätzwert wurde von der scheinbaren F_{min} subtrahiert.

Messung der PTH-Sekretion

[0115] In den meisten Versuchen wurden für die Studien zur PTH-Sekretion mit Fura-2 beladene Zellen verwendet. Das Beladen parathyroidaler Zellen mit Fura-2 ändert ihre sekretorische Reaktion auf extrazelluläres Ca^{2+} nicht. Die Zellen wurden in PCB mit 0,5 mM $CaCl_2$ und 0,1% BSA suspendiert. Die Inkubationen wurden in Plastikröhrchen (Falcon 2058) ausgeführt, die 0,3 ml der Zellsuspension mit oder ohne kleine Volumina von $CaCl_2$ und/oder organischen Polykationen enthielten. Nach mehrmaliger Inkubation (typischerweise je 30 min) bei 37 °C wurden die Röhrchen auf Eis platziert und die Zellen bei 2 °C präzipitiert. Proben des Überstands wurden mit Essigsäure auf pH 4.5 eingestellt und bei – 70 °C gelagert. Dieses Verfahren wurde sowohl für Rinder- als auch für menschliche parathyroidale Zellen angewandt.

[0116] Für die Rinderzellen wurde die Menge des PTH in den Probenüberständen durch einen homologen Radioimmuntest mit GW-1 oder einem gleichwertigen Antikörper bei einer Endverdünnung von 1/45.000 bestimmt. Als Indikator wurde ^{125}I-PTH (65–84; INCSTAR, Stillwater, MN) verwendet, und die Fraktionen wurden durch Dextran aktivierte Holzkohle getrennt. Die Auszählung der Proben und die Datenreduktion erfolgten auf einem Packard Cobra 5005-Gammazähler.

[0117] Für die menschlichen Zellen wurde ein im Handel erhältlicher Radioimmuntest-Kit (INS-PTH; Nichols Institute, Los Angeles, CA) verwendet, der intaktes und N-terminales menschliches PTH erkennt, da der Antikörper GW-1 menschliches PTH schlecht erkennt.

Messung von zyklischem AMP

[0118] Die Zellen wurden, wie vorstehend für die PTH-Sekretionsstudien beschrieben, inkubiert, und am Ende der Inkubation wurde eine 0,15 ml-Probe genommmen, in 0,85 ml heißes (70 °C) Wasser transferiert und bei dieser Temperatur 5–10 min erwärmt. Anschließend wurden die Röhrchen mehrere Male eingefroren und aufgetaut und die Zelltrümmer durch Zentrifugieren sedimentiert. Portionen des Überstandes wurden acety-

liert, und die Konzentration des zyklischen AMP wurde durch einen Radioimmuntest bestimmt.

Messung der Inositphosphatbildung

[0119] Membranphospholipide wurden durch 20–24 stündige Inkubation parathyroidaler Zellen mit ^{3}H-Myo-Inosit von 4 µCi/ml markiert. Dann wurden die Zellen gewaschen und in PCB mit 0,5 mM $CaCl_2$ und 0,1% BSA resuspendiert. Die Inkubationen wurden in Mikrofugenröhrchen in Abwesenheit oder in Gegenwart verschiedener Konzentrationen organischer Polykationen über verschiedene Zeiträume ausgeführt. Die Reaktionen wurden durch Hinzufügen von 1 ml Chloroform/Methanol/12N HCl (100 : 100 : 1; Vol./Vol./Vol.) gestoppt. Dann wurde Phytinsäurehydrolysatwasser (200 µl; 25 µg Phosphat/Röhrchen) hinzugefügt. Die Röhrchen wurden zentrifugiert, und 600 µl der wässrigen Phase wurden in 10 ml Wasser verdünnt.

[0120] Die Inositphosphate wurden durch Ionenaustauschchromatographie mit AG1-X8 entweder in der Chlorid- oder in der Formiatform getrennt. Wenn nur die IP_3-Spiegel zu bestimmen waren, wurde die Chloridform verwendet, wohingegen die Formiatform dazu verwendet wurde, die Haupt-Inositphosphate (IP_3, IP_2 und IP_1) aufzulösen. Zur Bestimmung von IP_3 allein wurde die verdünnte Probe auf die Säule in der Chloridform aufgebracht und die Säule mit 10 ml 30 mM HCl und anschließend mit 6 ml 90 mM HCl gewaschen und das IP_3 mit 3 ml 500 mM HCl eluiert. Das letzte Eluat wurde verdünnt und ausgezählt. Zur Bestimmung aller Haupt-Inositphosphate wurde die verdünnte Probe auf die Säule in der Formiatform aufgebracht, und IP_1, IP_2 und IP_3 wurden durch Erhöhen der Konzentration des Formiatpuffers aufeinanderfolgend eluiert. Die eluierten Proben aus den Formiatsäulen wurden rotationsverdampft, die Reste in ein Gemisch eingebracht und ausgezählt.

[0121] Die Isomerformen von IP_3 wurden mittels HPLC ausgewertet. Die Reaktionen wurden durch Hinzufügen von 1 ml 0,45 M Perchlorsäure gestoppt, und das Ganze wurde 10 min lang auf Eis gelagert. Nach der Zentrifugierung wurde der Überstand mit $NaHCO_3$ auf pH 7–8 eingestellt. Der Extrakt wurde dann auf eine Partisil SAX-Anionenaustauschsäule aufgebracht und mit einem linearen Ammoniumformiatgradienten eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden dann mit Dowex entsalzt; es folgte Rotationsverdampfung vor der Flüssigszintillationszählung in einem Packard Tri-carb 1500 LSC.

[0122] Für alle Inositphosphat-Trennungsverfahren wurden geeignete Kontrollen nach zuverlässigen Standards verwendet, um festzustellen, ob die Trennung von organischen Polykationen gestört wurde. War das der Fall, so wurden die Proben mit Kationenaustauschharz behandelt, um das störende Molekül vor der Trennung der Inositphosphate zu entfernen.

Messung des cytosolischen Ca^{2+} in C-Zellen

[0123] Neoplastische, aus einem medullären Schilddrüsencarcinom einer Ratte (rMTC 6-23) abgeleitete C-Zellen, die von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 1607) erhalten worden waren, wurden als monomolekulare Schicht in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) plus 15% Pferdeserum in Abwesenheit von Antibiotika gezüchtet. Zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden die Zellen mit 0,02% EDTA/0,05% Trypsin geerntet, zweimal mit PCB mit 1,25 mM $CaCl_2$ und 0,5% BSA gewaschen und, wie vorstehend für parathyroidale Zellen beschrieben, mit Fura-2 beladen. Die Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurden, wie vorstehend beschrieben, mit geeigneter Korrektur um das Entweichen der Farbe ausgeführt.

Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in Rattenosteoklasten

[0124] Die Osteoklasten wurden von 1–2 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten unter aseptischen Bedingungen gewonnen. Die Rattenjungen wurden durch Dekapitieren getötet, die Hintergliedmaßen abgetrennt und die Femora schnell von weichem Gewebe befreit und in vorgewärmtes F-12/DMEM-Medium (DMEM mit 10% fötalem Kälberserum und Antibiotika (Penicillin-Streptomycin-Gentamicin; 100 U/m1-100 µg/ml-100 µg/ml)) gelegt. Die Knochen von zwei Rattenjungen wurden längs zerschnitten und in 1 ml Kulturmedium gelegt. Durch sanftes Zerkleinern der Knochenfragmente mit einer Plastikpipette wurden Knochenzellen gewonnen, und diese wurden mit Kulturmedium verdünnt. Man ließ die Knochenteilchen absetzen, und gleiche Teile (etwa 1 ml) des Mediums wurden in eine Kulturschale mit 6 Vertiefungen transferiert, die 25 mm-Deckgläser enthielt. Man ließ die Zellen 1 Stunde bei 37 °C in einer befeuchteten 5% CO_2-Atmosphäre absetzen. Dann wurden die Deckgläser 3 mal mit frischem Medium gewaschen, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Die $[Ca^{2+}]_i$-Messungen in Osteoklasten wurden innerhalb von 6–8 Stunden nach dem Entfernen der nicht anhaftenden Zellen ausgeführt.

[0125] Die am Deckglas anhaftenden Zellen wurden durch 30-minütige Inkubation mit 5 µM Indo-1-Acetoxymethylester/0,01% Pluronic F28 bei 37 °C in F-12/DMEM ohne Serum, dafür mit 0,5% BSA mit Indo-1 beladen.

Anschließend wurden die Deckgläser gewaschen und weitere 15 nun bei 37 °C in F-12/DMEM ohne Ester inkubiert, bevor sie in eine Superfusionskammer, die auf dem Objekttisch eines für die Mikrofluorometrie ausgerüsteten Nikon Diaphot Umkehrmikroskops montiert war, eingebracht wurden. Die Osteoklasten waren durch ihre bedeutende Größe und durch das Vorhandensein mehrerer Zellkerne leicht auszumachen. Die Zellen wurden mit Puffer (typischerweise PCB mit 0,1 % BSA und 1 mM Ca^{2+}) bei 1 ml/min mit oder ohne Testsubstanz superfusioniert. Die durch Exzitation bei 340 nm emittierte Fluoreszenz wurde durch den Videoport des Mikroskops auf einen dichroitischen 440 nm-Spiegel gelenkt und die Fluoreszenzintensität bei 495 nm und bei 405 nm mit Photomultiplikatorröhren aufgefangen. Der Ausstoß der Photomultiplikatorröhren wurde verstärkt, digitalisiert und in einem 80386-er PC gespeichert. Der Anteil der Fluoreszenzintensität wurde dazu verwendet, die $[Ca^{2+}]_i$ abzuschätzen.

Oocytenexpression

[0126] In zusätzlichen Studien wurden Xenopus-Oocyten, denen mRNA von Rinder- und menschlichen Parathyroidalzellen injiziert worden war, in Absuchverfahren verwendet, und der Cl^--Strom wurde als indirektes Mittel zur Verfolgung der Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen. Im Folgenden ist ein Beispiel zum Testen der Auswirkung von Neomycin dargestellt:

[0127] Oocyten wurde poly(A)$^+$ angereicherte mRNA aus menschlichem parathyroidalem Gewebe (hyperplastische Drüsen aus einem Fall von sekundärer HPT) injiziert. Nach 3 Tagen wurden die Oocyten auf ihre Reaktion auf Neomycin getestet. Neomycin B rief oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stroms hervor, die nach Superfusion mit wirkstoffreier Kochsalzlösung nachließen (vgl. **Fig. 20**). Reaktionen auf Neomycin B wurden bei Konzentrationen zwischen 100 µM und 10 mM beobachtet. Um sicherzustellen, daß die von Neomycin B hervorgerufene Reaktion von der Injektion parathyroidaler mRNA abhängig war, wurde die Wirkung von Neomycin B auf Ströme in Oocyten bestimmt, denen Wasser injiziert worden war. In keiner der fünf untersuchten Oocyten rief Neomycin B (10 mM) irgendeine Veränderung des Stroms hervor. Es ist bekannt, daß etwa 40% der Oocyten auf Carbachol reagieren, eine Wirkung, die von einem endogenen Muscarinrezeptor vermittelt wird. Von den fünf untersuchten Oocyten zeigte eine Einwärtsströme als Reaktion auf Carbachol, und dies wird in der unteren Spur von **Fig. 20** gezeigt. Somit ruft Neomycin B in Zellen, die einen an Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ und des Cl^--Stroms gekoppelten Muscarinrezeptor exprimieren, keine Reaktion hervor. Dies zeigt, daß die Reaktion auf Neomycin B von der Expression eines spezifischen Proteins abhängt, das von der mRNA parathyroidaler Zellen codiert wird. Es legt ziemlich dringend die Vermutung nahe, daß Neomycin B in intakten Zellen direkt auf den Ca^{2+}-Rezeptor wirkt und so die Funktion der parathyroidalen Zellen verändert.

Arzneistoffentwurf aus Leitmolekülen

[0128] Bestimmte organische Moleküle ahmen die Wirkung von extrazellulärem Ca^{2+} nach oder antagonisieren sie, indem sie, wie hier gezeigt, am Ca^{2+}-Rezeptor wirken. Die getesteten Moleküle sind jedenfalls nicht notwendigerweise als Kandidaten für Arzneistoffe geeignet, doch sie dienen dazu, zu demonstrieren, daß die Hypothese, die den Ca^{2+}-Rezeptor basierten Therapien zugrundeliegt, korrekt ist. Diese Moleküle können dazu verwendet werden, die Struktureigenschaften zu bestimmen, die es ihnen ermöglichen, auf den Ca^{2+}-Rezeptor zu wirken, und so Moleküle auszuwählen, die in dieser Erfindung nützlich sind.

[0129] Es folgt ein Beispiel einer solchen analytischen Vorgehensweise: Dieses Beispiel wird in den nachstehenden Beispielen detailliert beschrieben, wird aber hier verwendet, um das Grundprinzip zu demonstrieren, das zum Entwurf nützlicher Moleküle dieser Erfindung aus den hier besprochenen Leitmolekülen verwendet werden kann. Der Fachmann wird die im Beispiel definierten Analyseschritte erkennen, und auch die Tatsache, daß eine analoge Analyse auch bei anderen Leitmolekülen vorgenommen werden kann, bis das gewünschte Calcimimetikum oder Calcilytikum definiert ist.

[0130] Auch andere Beispiele werden nachstehend gegeben. Zusammengenommen demonstrieren die vorgestellten Daten, daß nützliche Leitmoleküle aromatische Gruppen haben, die vorzugsweise an einer oder mehreren Positionen substituiert sind und die je nach Wunsch verzweigte oder lineare, substituierte oder nicht substituierte Alkylgruppen haben können. Weiterhin ist es wichtig, Moleküle korrekter Stereospezifität zu wählen, um eine höhere Affinität für den gewünschten Ca^{2+}-Rezeptor sicherzustellen. Diese Daten weisen den Fachmann somit auf geeignete Leitmoleküle hin, die derivatisiert werden können, um so, sehr ähnlich wie nachstehend beschrieben, die optimalen gewünschten Moleküle dieser Erfindung zu finden.

[0131] Obwohl strukturell unterschiedlich, können die Moleküle, die getestet werden, gemeinsame Eigenschaften haben, die untersucht werden können. In diesem Beispiel wurde die Korrelation zwischen positiver

Nettoladung und der Stärke im Mobilisieren von intrazellulärem Ca^{2+} getestet. Protamin (+ 21; E_{50} = 40 nM) war beim Verursachen der Mobilisierung der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Zellen wirkungsvoller als Neomycin B (+ 6; EC_{50} = 20 µM in menschlichen parathyroidalen Zellen und 40 µM in parathyroidalen Rinderzellen), das seinerseits wirkungsvoller war als Spermin (+ 4; EC_{50} = 150 µM). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die positive Ladung allein die Stärke bestimmt oder ob es andere Struktureigenschaften gibt, die zur Wirkung am Ca^{2+}-Rezeptor beitragen. Es ist wichtig, dies vorab zu bestimmen, da es tiefgreifende Auswirkungen auf die Sichtweise hat, wonach der Ca^{2+}-Rezeptor mit wirksamen und spezifischen therapeutischen Molekülen angegangen werden kann. Somit können viele andere organische Polykationen, die mit Neomycin B und Spermin verwandt sind, untersucht werden, um das Verhältnis zwischen der positiven Nettoladung eines Moleküls und seiner Fähigkeit, intrazelluläres Ca^{2+} zu mobilisieren, zu bestimmen.

[0132] Die erste Serie von Molekülen, die untersucht wurden, waren die Aminoglycoside. Die Moleküle wurden auf parathyroidalen Rinderzellen geprüft und ihre EC_{50}-Werte für die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} bestimmt. Bei den Aminoglycosiden war die Rangfolge der Stärken im Auslösen von vorübergehenden cytosolischen Ca^{2+}-Änderungen: Neomycin B (EC_{50} = 20 oder 40 µM) > Gentamicin (150 µM) > Bekanamycin (200 µM) > Streptomycin (600 µM). Kanamycin und Lincomycin hatten bei einer Testkonzentration von 500 µM keine Wirkung. Die positive Nettoladung dieser Aminoglycoside bei pH 7.3 ist Neomycin B (+ 6) > Gentamicin (+ 5) > Bekanamycin (+ 5) > Kanamycin (durchschnittlich + 4,5) > Streptomycin (+ 3) > Lincomycin (+ 1). Innerhalb der Reihe der Aminoglycoside besteht also eine gewisse, aber nicht absolute Korrelation zur positiven Nettoladung, und Kanamycin, von dem man erwarten würde, daß es stärker als Streptomycin ist, hat keine Wirkung.

[0133] Die Tests verschiedener Polyamine förderten weitere und noch markantere Diskrepanzen zwischen der positiven Nettoladung und der Stärke zu Tage. Es wurden drei Strukturklassen von Polyaminen untersucht: (1) geradkettige, (2) verzweigtkettige und (3) zyklische. Die Strukturen der getesteten Polyamine sind in **Fig. 1** dargestellt. Unter den geradkettigen Polyaminen war Sperrain (+ 4; EC_{50} = 150 µM) stärker als Pentaethylenhexamin (+ 6; EC_{50} = 500 µM) und Tetraethylenpentamin (+ 5; EC_{50} = 2,5 mM), obwohl die letzteren Moleküle eine größere positive Nettoladung haben.

[0134] Wir synthetisierten einige verzweigtkettige Polyamine, die eine unterschiedliche Anzahl sekundärer und primärer Aminogruppen haben und somit hinsichtlich ihrer positiven Nettoladung variieren. Zwei dieser Moleküle, NPS 381 und NPS 382, wurden auf ihre Wirkungen auf die $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen untersucht. NPS 382 (+ 8; EC_{50} = 50 µM) war ungefähr doppelt so stark wie NPS 381 (+ 10; EC_{50} = 100 µM), obwohl es zwei positive Ladungen weniger enthält.

[0135] Eine ähnliche Diskrepanz zwischen der positiven Ladung und der Stärke wurde bei Versuchen mit zyklischen Polyaminen festgestellt. Beispielsweise war Hexacyclen (+ 6; EC_{50} = 20 µM) stärker als NPS 383 (+ 8; EC_{50} = 150 µM). Die mit diesen Polyaminen erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die positive Ladung nicht der einzige Faktor ist, der zur Stärke beiträgt.

[0136] Weitere Studien lieferten Einblicke in die Struktureigenschaften von Molekülen, die Wirkung auf den Ca^{2+}-Rezeptor parathyroidaler Zellen aufweisen. Eine der strukturell wichtigen Eigenschaften ist der intramolekulare Abstand zwischen den Stickstoffatomen (die die positive Ladung tragen). So ist Sperrain beim Hervorrufen von Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen 50 mal stärker als Triethylentetramin (EC_{50} = 8 mM), obwohl beide Moleküle eine positive Nettoladung von + 4 tragen. Der einzige Unterschied in der Struktur dieser beiden Polyamine ist die Anzahl der Methylengruppen, die die Stickstoffatome trennen: Bei Sperrain sind es 3-4-3, wogegen es bei Triethylentetramin 2-2-2 sind. Die scheinbar kleine Veränderung des Abstandes zwischen den Stickstoffatomen hat tiefe Auswirkungen auf die Stärke und legt die Annahme nahe, daß die Konformationsbeziehungen der Stickstoffatome innerhalb des Moleküls entscheidend sind. Die mit Hexacyclen und Pentaethylenhexamin erhaltenen Resultate unterstützen diese Annahme. Das erstere Molekül ist einfach das zyklische Analogon des letzteren und enthält die gleiche Anzahl von Methylengruppen zwischen allen Stickstoffatomen, doch erhöht das Vorliegen einer Ringstruktur die Stärke um das 25-fache. Diese Ergebnisse zeigen, daß die positive Ladung per se nicht der entscheidende Faktor ist, der die Wirkung eines anorganischen Moleküls auf den Ca^{2+}-Rezeptor bestimmt.

[0137] Eine andere Versuchsreihe zeigt die Wichtigkeit von aromatischen Gruppen bei der Bestimmung der Wirkung auf den Ca^{2+}-Rezeptor. Die Resultate wurden mit zwei Arylalkylaminen erhalten, die aus dem Gift der Spinne Argiope lobata erhalten wurden. Diese Moleküle; Argiotoxin 636 und Argiotoxin 659, haben identische Polykationenabschnitte, die an unterschiedliche aromatische Gruppen gebunden sind (**Fig. 24**). Argiotoxin 659 rief eine vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen hervor, wenn es bei Konzentrationen von 100 bis 300 µM getestet wurde. Im Gegensatz dazu war Argiotoxin 636 wirkungslos, wenn es bei

ähnlichen Konzentrationen getestet wurde (Fig. 24). Der einzige Unterschied in der Struktur dieser Arylalkylamine ist der aromatische Abschnitt der Moleküle: Argiotoxin 659 enthält eine 4-Hydroxyindol-Einheit, wogegen Argiotoxin 636 eine 2,4-Dihydroxyphenylgruppe enthält. Die positive Nettoladung auf diesen beiden Arylalkylaminen ist die gleiche (+ 4), also müssen ihre unterschiedlichen Stärken von den verschiedenen aromatischen Gruppen herrühren. Dies zeigt, daß die positive Nettoladung allein die Stärke nicht bestimmt. Die wirkliche Bedeutung dieser Befunde liegt jedoch in der Entdeckung, daß aromatische Gruppen signifikant zu der Fähigkeit von Molekülen beitragen, den Ca^{2+}-Rezeptor zu aktivieren.

[0138] Agatoxin 489 (NPS 017) und Agatoxin 505 (NPS 015) verursachen beide die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2}+ in parathyroidalen Zellen mit EC_{50}-Werten von 6 bzw. 22 µM. Der einzige Unterschied in der Struktur dieser Moleküle ist eine Hydroxylgruppe auf der Indoleinheit (Fig. 19). Dies zeigt, daß Substitutionen in der aromatischen Region des Moleküls die Stärke beeinflussen können. Dies zeigt, daß unter den noch zu untersuchenden Leitmolekülen jene Moleküle sind, die substituierte aromatische Einheiten haben.

[0139] Zu den Struktureigenschaften der hier beschriebenen Leitmoleküle, die systematisch zu variieren sind, gehören (1) die positive Nettoladung, (2) die Zahl der Methylengruppen, die Stickstoffatome trennen und (3) zyklische Versionen von z.B. Polyaminen mit und ohne Veränderungen des Methylengruppenabstands und der positiven Nettoladung. Zusätzlich können systematische Variationen der Struktur und der Lage von aromatischen Gruppen untersucht werden, z.B. in einer Vielzahl von Arylalkylaminen, die aus den Giften von Wespen und Spinnen isoliert wurden; und es können durch die Koppelung von im Handel erhältlichen aromatischen Einheiten an die Polyamineinheit von Argiotoxin synthetische Moleküle hergestellt werden. Die Polyamineinheit von Argiotoxin kann leicht an jede beliebige aromatische Einheit, die eine Carboxylsäure enthält, gekoppelt werden. Somit ist es einfach, systematisch Hydroxy- und Methoxyderivate der Phenylessigsäure und Benzoesäure sowie die Serie der Hydroxyindolessigsäuren abzusuchen. Auch Analoga, die heteroaromatische Funktionalitäten enthalten, können hergestellt und auf ihre Wirkung geprüft werden.

[0140] Vergleiche von Stärke und Wirksamkeit unter solchen Molekülen werden die optimale Struktur und Lage der aromatischen Gruppe bei konstanter positiver Ladung ergeben.

[0141] Eine der strukturellen Variationen des Polyaminmotivs, die die Stärke zu erhöhen scheinen, ist das Vorhandensein der zyklischen Version des geradkettigen Elternmoleküls. Budmunchiamin A, das aus der Pflanze Albizia amara isoliert wurde, ist ein zyklisches Derivat von Spermin (Fig. 1). Das Hinzufügen von Budmunchiamin A zu parathyroidalen Rinderzellen verursachte eine rapide und vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die in Abwesenheit des extrazellulären Ca^{2+} erhalten blieb und die durch Vorbehandlung mit PMA abgeschwächt wurde. Daher ruft es die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Zellen hervor, wahrscheinlich indem es auf den Ca^{2+}-Rezeptor wirkt. Es ist ungefähr gleich stark wie Spermin (EC_{50} ungefähr 200 µM), hat aber eine positive Ladung weniger als dieses.

[0142] Die mit Budmunchiamin A erhaltenen Ergebnisse demonstrieren die Voraussagekraft der Struktur-Wirkungs-Studien und die neue Strukturinformation, die durch Testen natürlicher Produkte zu gewinnen ist. Damit läßt sich das Absuchen natürlicher Produkte, die rational aufgrund der Strukturinformation ausgewählt wurden, leicht ausführen; z.B. können die Moleküle aufgrund genau begründeter chemotaxonomischer Prinzipien unter Benützung geeigneter Datenbanken wie Napralert ausgewählt werden. Beispielsweise können aus mit Albizia verwandten Schmetterlingsblütlern wie Pithecolobium abgeleitete makrozyklische Polyaminalkaloide oder andere aus Pflanzen abgeleitete Moleküle abgesucht werden.

[0143] Fig. 36 liefert ein zweites Beispiel einer Reihe von Molekülen, die abgesucht wurden, um nützliche Moleküle dieser Erfindung zu bestimmen. Im Allgemeinen wurden diese Moleküle aus Fendilin abgeleitet und getestet, um ihre jeweiligen EC_{50}-Werte zu bestimmen. Darüberhinaus läßt das Testen verwandter Moleküle wie NPS 447 und NPS 448 stereospezifische Wirkungen der Molekülstruktur erkennen. Die aktivsten bisher getesteten Verbindungen sind die neuen, als NPS 467 und NPS 568 bezeichneten Verbindungen, die EC_{50}-Werte von weniger als 5 µM haben. Der Fachmann kann durch Überprüfen dieser Molekülreihe andere geeignete Derivate bestimmen, die in der Erfindung getestet werden können.

[0144] Diese Beispiele demonstrieren den allgemeinen Entwurfs- und Absuchprozeß, wie er in dieser Erfindung nützlich ist; und sie zeigen, daß der Fachmann nach Belieben weitere Bibliotheken von Verbindungen und natürlichen Produkten absuchen kann, um andere nützliche Leitmoleküle oder neue Moleküle dieser Erfindung zu bestimmen.

[0145] Wie vorstehend diskutiert, beinhalten die Beispiele für Moleküle, welche als Calcimimetika nützlich

sind, verzweigte oder zyklische Polyamine, positv geladene Polyaminosäuren und Arylalkylamine. Darüberhinaus sind andere positiv geladene organische Moleküle einschließlich natürlich vorkommender Moleküle und deren Analoga nützliche Calcimimetika. Diese natürlich vorkommenden Moleküle und ihre Analoga habe vorzugsweise Ladungs-Masse-Verhältnisse, die mit jenen der hier als Beispiele behandelten Moleküle korreliert sind. (Die Beispiele beinhalten aus marinen Arten isoliertes Material, Arthropodengifte, terrestrische Pflanzen und aus Bakterien und Pilzen abgeleitete Fermentationsflüssigkeiten). Es wird angenommen, daß eine Gruppe bevorzugter natürlich vorkommender Moleküle und Analoga, die als Calcimimetika nützlich sind, ein Verhältnis von positiven Ladungen : Molekulargewicht in Dalton von ungefähr 1 : 40 bis 1 : 200, vorzugsweise von 1 : 40 bis 1 : 100 haben wird. Spezifischere Beispiele solcher Moleküle werden nachstehend gegeben.

Polyamine

[0146] Die in dieser Erfindung als Calcimimetika nützlichen Polyamine können entweder verzweigt oder zyklisch sein. Verzweigte oder zyklische Polyamine haben potentiell eine höhere calcimimetische Wirkung als ihre geradkettigen Analoga. Das heißt, daß verzweigte oder zyklische Polyamine dazu tendieren, einen niedrigeren EC_{50}-Wert zu haben als ihre entsprechenden linearen Polyamine mit der gleichen effektiven Ladung bei physiologischem pH-Wert (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1

Molekül	(+) Nettoladung	EC_{50} (µM)
Neomycin	+ 6	20 oder 40
Hexacyclen	+ 6	20
NPS 382	+ 8	50
NPS 381	+ 10	100
NPS 383	+ 8	150
Gentamicin	+ 5	150
Spermin	+ 4	150
Bekanamycin	+ 5	200
Argiotoxin-659	+ 4	300
Pentaethylenhexamin (PEHA)	+ 6	500
Streptomycin	+ 3	600
Spermidin	+ 3	2000
Tetraethylenpentamin (TEPA)	+ 5	2500
1,12-Diamindodecan (DADD)	+ 2	3000
Triethylentramin (TETA)	+ 4	8000

[0147] „Verzweigte Polyamine" bezeichnet in diesem Zusammenhang ein Kettenmolekül, das aus kurzen Alkylbrücken oder Alkylgruppen besteht, die durch Aminobindungen miteinander verbunden sind, und auch Punkte enthält, an denen sich die Kette verzweigt. Diese „Verzweigungspunkte" können entweder an einem Kohlenstoffatom oder an einem Stickstoffatom, vorzugsweise an einem Stickstoffatom gelegen sein. Ein Verzweigungspunkt an einem Stickstoffatom ist typischerweise ein tertiäres Amin, kann aber auch ein quarternäres sein. Ein verzweigtes Polyamin kann 1 bis 20 Verzweigungspunkte, vorzugsweise 1 bis 10 Verzweigungspunkte haben.

[0148] Im Allgemeinen sind die Alkylbrücken und Alkylverzweigungen in einem verzweigten Polyamin 1 bis 50, vorzugsweise 2 bis 6 Kohlenstoffatome lang. Die Alkylverzweigungen können auch durch ein oder mehrere Heteroatome (Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel) unterbrochen sein oder mit funktionellen Gruppen substi-

tuiert sein, wie Halogenatome, darunter Fluor-, Chlor-, Brom-, Jodatome; Hydroxy-; Nitro-; Acyloxy (R' COO-)-; Acylamido (R' CONH-)- oder Alkoxy (-OR')-reste wobei R' 1 bis 4 Kohlenstoffatome enthalten kann.

[0149] Die Alkylverzweigungen können auch mit Gruppen substituiert werden, die bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind, wie Amino- oder Guanidogruppen. Diese funktionellen Substituenten können physikalische Eigenschaften hinzufügen oder solche wie die Löslichkeit verändern, und so die Wirkung, die Zuführung oder die Bioverfügbarkeit der Moleküle erhöhen.

[0150] Die verzweigten Polyamine können drei oder mehrere Ketten- und Verzweigungsendpunkte haben. Die Endpunkte können Methylengruppen oder Aminogruppen, vorzugsweise Aminogruppen sein.

[0151] Eine bevorzugte Molekülgruppe ist die Gruppe verzweigter Polyamine mit der Formel:

$H_2N\text{-}(CH_2)_j\text{-}(NR_i\text{-}(CH_2)_j)_k\text{-}NH_2$

wobei k eine ganze Zahl zwischen 1 und 10 ist, jedes j gleich oder verschieden und eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist und jedes R_i gleich oder verschieden ist und aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff und $\text{-}(CH_2)_j\text{-}NH_2$ ausgewählt ist, wobei j wie vorstehend definiert wird und wenigstens ein R_i nicht Wasserstoff ist.

[0152] Besonders bevorzugte verzweigte Polyamine dieser Erfindung sind die Moleküle N^1,N^1,N^5,N^{10},N^{14},N^{14}-Hexakis-(3-Aminopropyl)-Spermin und N^1,N^1,N^5,N^{14},N^{14}-Tetrakis-(3-Aminopropyl)-Spermin, die in Fig. 1 als NPS 381 bzw. NPS 382 bezeichnet werden.

[0153] „Zyklische Polyamine" bezieht sich in diesem Zusammenhang auf Heterozyklen, die zwei oder mehrere Heteroatome (Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel) enthalten, von denen wenigstens zwei Stickstoffatome sind. Die Heterozyklen haben im Allgemeinen einen Umfang von ungefähr 6 bis ungefähr 20, vorzugsweise von ungefähr 10 bis ungefähr 18 Atomen. Die Stickstoff-Heteroatome werden von 2 bis 10 Kohlenstoffatomen getrennt. Die Heterozyklen können auch an den Stickstoffstellen mit Aminoalkyl- oder Aminoarylgruppen (NH_2R-, wobei R ein Aminoaryl- oder niederer Alkylrest von 2 bis 6 Kohlenstoffatomen ist) substituiert sein.

[0154] Besonders bevorzugte zyklische Polyamine dieser Erfindung werden in Fig. 1 als Hexacyclen-(1,4,7,10,13,16-Hexaaza-Cyclooctadecan) und NPS 383 gezeigt.

Polyaminosäuren

[0155] Die in dieser Erfindung nützlichen Polyaminosäuren können zwei oder mehrere bei physiologischem pH-Wert positiv geladene Aminosäurereste enthalten. Zu diesen positiv geladenen Aminosäuren zählen Histidin, Lysin und Arginin. Die Länge dieser Polypeptide variiert von 2 bis 800 Aminosäuren, stärker bevorzugt von 20 bis 300 Aminosäuren. Diese Polypeptide können aus einem einzelnen, sich wiederholenden Aminosäurerest bestehen oder die Vielfalt eines natürlich vorkommenden Proteins oder Enzyms haben.

[0156] Die Aminosäurereste, die die Polyaminosäuren umfasssen, können solche der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren oder andere alternative Reste sein. Zu den alternativen Resten zählen beispielsweise die; Positionen dieser Erfindung können auch Bestandteile enthalten, die durch ein als Marker fungierendes Molekül oder Ion derivatisiert sind. Es kann eine große Vielfalt von Markierungseinheiten verwendet werden, darunter Radioisotope, Chromophore und Fluoreszenzmarker. Insbesondere die Radioisotopenmarkierung kann in vivo leicht festgestellt werden. Radioisotope können durch Koordinationsbindung als Kationen im Porphyrinsystem gekoppelt werden. Zu den nützlichen Kationen zählen Technetium und Indium. In den Zusammensetzungen können die positiv geladenen Moleküle an einen Marker gebunden oder mit einem solchen assoziiert sein.

Syntheseverfahren

[0157] Strategien zur Synthese und Modifikation der Polyamine beinhalten die Verwendung einer Vielzahl von Amin schützenden Gruppen (Phthalimido-, BOC-, CBZ-, Benzyl- und Nitrilgruppen), die selektiv entfernt werden können und damit zur Konstruktion funktionalisierter Moleküle (ihren. Die in Frage kommenden synthetischen Verfahren sind jenen nachgebildet, die zur Konstruktion der Argiopine 636 und 659 und anderer aus Spinnengiften abgeleiteter Arylalkylamine verwendet wurden.

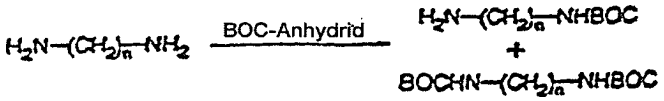
[0158] Kettenverlängerungen von 2–4 Methylengruppen wurden typischerweise durch Alkylierung mit dem

entsprechenden N-(Bromalkyl)phthalimid erreicht. Ein 1 : 1,2-Gemisch von Amin und Bromalkylphthalimid wurde in Gegenwart von 50% KF auf Celit in Acetonitril unter Rückfluß erhitzt. Die Kettenverlängerungen wurden ebenfalls durch Alkylierung eines gegebenen Amins mit Acrylnitril oder Ethylacrylat erreicht. Der Reaktionsfortschritt wurde durch DC verfolgt, und die Zwischenprodukte auf Silikagel mit Kombinationen von Dichlormethan, Methanol und Isopropylamin gereinigt. Die Endprodukte wurden durch Kationenaustausch (HEMA-SAB) und RP-HPLC (Vydac C-18) gereinigt. Die Reinheits- und Strukturüberprüfung erfolgten durch ^{1}H- und ^{13}C-NMR und Hochauflösungs-Massenspektrometrie (EI, CI und/oder FAB).

[0159] Schützende BOC-Gruppen wurden durch Behandlung eines Amins (1° oder 2°) mit Ditert-butyl-dicarbonat in Dichlormethan in Gegenwart einer katalytischen Menge von Dimethylaminopyridin hinzugefügt. Schützende Benzyl-Gruppen wurden auf einem der folgenden zwei Wege hinzugefügt: (1) Kondensation eines 1°-Amins mit Benzaldehyd, mit nachfolgender Natrium-Borhydrid-Reduktion oder (2) Alkylierung eines 2°-Amins mit Benzylbromid in Gegenwart von KF. Amidverbindungen und Ringschluß geschahen typischerweise durch die Reaktion eines Amins (1° oder 2°) mit dem N-Hydroxysuccinimidester einer gegebenen Säure. Dies wurde (im Fall der Ringschlüsse) direkt durch Behandlung der „Aminosäure" mit Dicyclohexylcarbodiimid unter verdünnten Bedingungen erreicht.

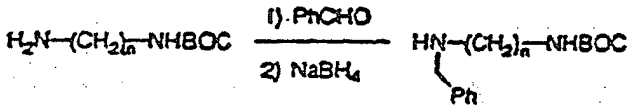
[0160] Die Entfernung der Phthalimid-Schutzfunktionalität wurde durch Reduktion mit Hydrazin in unter Rückfluß erhitztem Methanol erreicht. Die Entfernung der BOC-Schutzfunktionalität wurde in wasserfreier TFA erreicht. Die Entfernung der Benzyl-, Nitril- und CBZ-Schutzfunktionalitäten wurde durch Reduktion in eiskalter Essigsäure unter 55 psi Wasserstoff in Gegenwart einer katalytischen Menge von Palladiumhydroxid auf Kohle erreicht. Die Nitrilfunktionalitäten (in Gegenwart von Benzyl-, und CBZ-Gruppen) wurden unter Wasserstoff in der Gegenwart von Raney-Nickelschwamm selektiv reduziert.

[0161] Genau gesagt werden verzweigte Polyamide typischerweise aus einfachen Diaminoalkanen der Formel NH_2-$(CH_2)_n$-NH_2 oder einfachen Polyaminen wie Spermidin oder Sperrain hergestellt. Eines der beiden primären (terminalen) Amine wird mit einer schützenden Gruppe wie BOC (t-Butyloxycarbonylgruppe), Phthalimid-, Benzyl-, 2-Ethylnitril- (das Michael-Kondensationsprodukt eines Amins und eines Acrylnitrils) oder Amidgruppe- geschützt oder „maskiert". Eine typische Reaktion ist die Addition einer schützenden BOC-Gruppe durch Behandlung mit Di-t-Butyldicarbonat (BOC-Anhydrid):

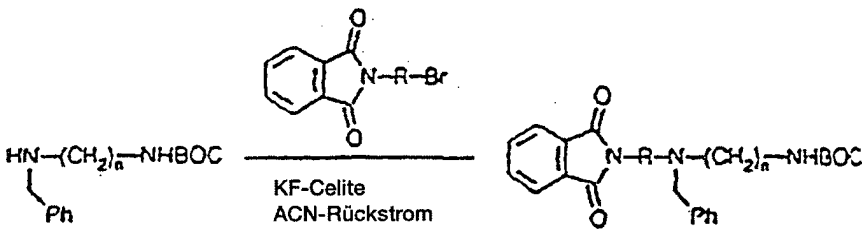


[0162] Das einfach geschützte Produkt wird vom nicht geschützten und dem zweifachgeschützten Produkt durch einfache Chromatographie- oder Destillationsverfahren getrennt.

[0163] Das im einfach geschützten Produkt verbleibende freie Amin wird mit einem Alkylierungsmittel (oder Acylierungsmittel) selektiv alkyliert (oder acyliert). Um eine Monoalkylierung sicherzustellen, wird das freie Amin teilweise durch Kondensation mit Benzaldehyd und nachfolgende Natrium-Borhydrid-Reduktion geschützt, wodurch das N-Benzyl-Derivat gebildet wird:



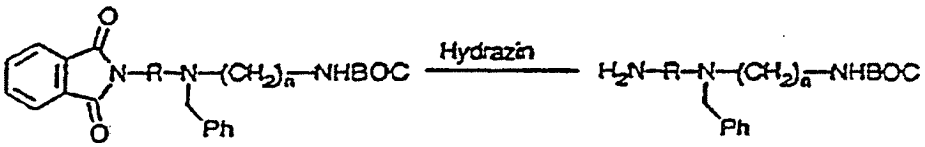
[0164] Das N-Benzyl-Derivat wird dann mit dem Alkylierungsmittel umgesetzt. Ein typisches Alkylierungsmittel ist ein N-(Bromalkyl)phthalimid, das folgendermaßen reagiert:



[0165] Beispielsweise wird N-(Brombutyl)phthalimid zur Verlängerung oder Verzweigung der Kette mit vier Methyleneinheiten verwendet. Alternativ verlängert eine Reaktion mit Acrylnitril gefolgt von einer Reduktion der

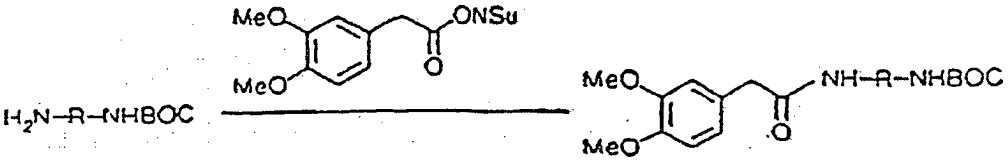
Cyangruppe die Kette um drei Methylen- und eine Aminogruppe.

[0166] Die schützenden Gruppen des so erhaltenen kettenverlängerten Moleküls können dann selektiv abgetrennt werden und ergeben so ein neues freies Amin. Beispielsweise wird Trifluoressigsäure verwendet, um eine BOC-Gruppe zu entfernen; katalytische Hydrogenierung wird zur Verringerung einer Nitrilfunktionalität und Entfernung einer Benzylgruppe verwendet; und Hydrazin wird zur Entfernung von Phthalimidgruppen wie folgt verwendet:



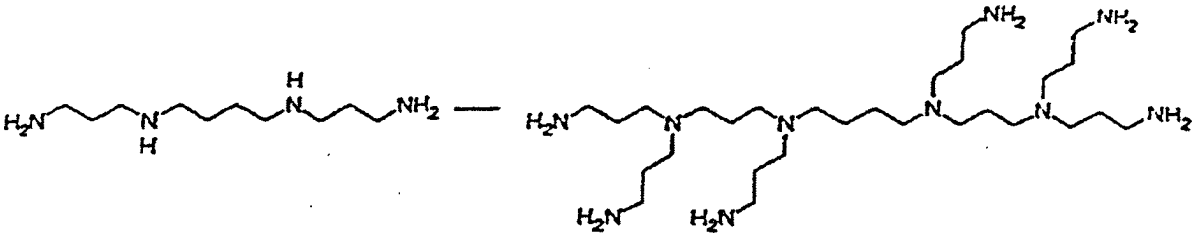
[0167] Die neuen freien Amine können, wie vorstehend beschrieben, weiter alkyliert (oder acyliert) werden, um die Länge des Polyamins zu erhöhen. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis die gewünschte Kettenlänge und Verzweigungszahl erreicht ist. Im letzten Schritt führt die Entfernung des Schutzes des Produktes zum gewünschten Polyamin. Jedoch können am geschützten Ende vor dem Entfernen des Schutzes weitere Modifikationen in der folgenden An und Weise durchgeführt werden:

[0168] Beispielsweise wird das Polyamin vor dem Entfernen des BOC-Schutzes mit dem N-Hydroxysuccinimid-Ester von 3,4-Dimethoxyphenylessigsäure acyliert, so daß es ein zweifach geschütztes Polyamin ergibt:



[0169] Dies wird schließlich ein Arylalkyl-Polyamin ergeben. Die BOC-Gruppe kann dann selektiv mit Trifluoressigsäure entfernt werden, damit das andere Aminoende freigelegt wird, das dann wie vorstehend verlängert werden kann.

[0170] Bestimmte verzweigte Polyamine können durch gleichzeitige Alkylierung oder Acylierung der freien primären und sekundären Amine in einem, wie vorstehend beschrieben, gebildetem Polyamin gebildet werden. Beispielsweise ergibt die Behandlung von Sperrain mit einem Überschuß von Acrylnitril gefolgt von einer katalytischen Reduktion folgendes:



[0171] Zyklische Polyamine können, wie vorstehend beschrieben, hergestellt werden, indem man mit Ausgangsmaterialien wie Hexacylen (Aldrich Chem.) beginnt.

[0172] Die Polyaminosäuren innerhalb des Schutzbereiches dieser Erfindung können durch auf dem Fachgebiet bekannte rekombinante Techniken hergestellt werden, oder sie können mit den auf dem Fachgebiet bekannten standardmäßigen Festphasentechniken synthetisiert werden. Die Festphasensynthese wird am carboxyterminalen Ende des Peptids unter Verwendung einer µ-aminogeschützten Aminosäure begonnen. Für alle Aminogruppen können schützende BOC-Gruppen verwendet werden, obwohl auch andere schützende Gruppen geeignet sind. Beispielsweise kann BOC-lys-OH mit chlormethylierten Polystyrolharz-Unterlagen verestert werden. Die Polystyrolharz-Unterlage ist vorzugsweise ein Copolymer von Styrol mit etwa 0,5 bis 2% Divinylbenzol als Querverbindungsmittel, das das Polystyrolpolymer in bestimmten organischen Lösungsmitteln komplett unlöslich macht. Vgl. Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis (1969), W. H. Freeman Co., San Francisco; und Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (1963) 85:2149–2154. Dieses und andere Verfahren der Peptidsynthese werden auch in den U.S.-Patenten Nr. 3,862,925; 3,842,067; 3,972,859 und 4,105,602 durch Beispiele erläutert.

[0173] Die Polypeptidsynthese kann manuelle Techniken anwenden oder automatische, zum Beispiel unter Verwendung des Applied Biosystems 403A-Peptidsynthesegerätes (Foster City, Kalifornien) oder des automatischen Peptidsynthesegerätes Biosearch SAM II (Biosearch Inc., San Rafael, Kalifornien) nach den Anleitungen des vom Hersteller gelieferten Handbuches.

[0174] Die Arylalkylamine der Erfindung sind natürliche Produkte, die durch bekannte Verfahren isoliert werden oder wie bei Jasys et al., Tetrahedron Lett. (1988) 29:6223–6226, und Nason et al., Tetrahedron Lett. (1989) 30:2337–2340 beschrieben.

[0175] Ein allgemeines Verfahren zur Herstellung von Fendilin (oder von den in Fig. 36 gezeigten Fendilinanaloga) ist folgendes: In einem 10 ml-Rundbodenkolben, der mit einem Magnetrührstab und einer Gummischeidewand ausgerüstet ist, wurde 1,0 mMol 3,3'-Bisphenylpropylamin (oder primäres Alkylamin) in 2 ml Ethanol mit 1,1 mMol Phenol und 1,0 mMol Acetophenon (oder substituiertem Acetophenon) behandelt. Dazu wurden 2,0 mMol $MgSO_4$ und 1,0 mMol $NaCNBH_3$ hinzugefügt. Dies wurde unter einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) 24 Std lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 50 ml Ether gegossen und 3 mal mit 1 N NaOH und einmal mit Salzwasser gewaschen. Die Etherschicht wurde mit wasserfreiem K_2CO_3 getrocknet und in vacuo reduziert. Dann wurde das Produkt durch Säulenchromatographie oder HPLC auf einer stationären Phase aus Siliziumdioxid mit Kombinationen von CH_2Cl_2 – Methanol – Isopropylamin (typischerweise 3% Methanol und 0,1% Isopropylamin in Methylenchlorid) gereinigt.

[0176] Eine bevorzugte Vorgehensweise zur Herstellung von Fendilin oder Fendilin-Analoga (wie die in Fig. 36 dargestellten) verwendet Titan(IV)-Isopropoxid und wurde nach den in J. Org. Chem. 55:2552 (1990) beschriebenen Verfahren modifiziert. Für die Synthese von NPS 544 wurde anstelle von Titan(IV)-Isopropoxid Titantetrachlorid verwendet (Verfahren beschrieben in Tetrahedron Letters 31:5547 (1990)). Das Reaktionsschema ist in Fig. 43a dargestellt. In Fig. 43a stellen R, R' und R" Hydrocarbylgruppen dar. Gemäß einer Ausführungsform werden in einem 4 ml-Gefäß 1 mMol Amin (1) (typischerweise ein primäres Amin) und 1 mMol Keton oder Aldehyd (2) (im Allgemeinen Acetophenon) vermischt, dann mit 1,25 mMol Titan(IV)-Isopropoxid (3) vermischt und unter gelegentlichem Rühren etwa 30 min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alternativ kann ein sekundäres Amin an Stelle von (1) verwendet werden. Beachte: Manche Reaktionen ergeben starke Niederschläge oder Feststoffe, die (bis zu ihrem Schmelzpunkt) erwärmt/erhitzt werden, um ein mehrmaliges Umrühren/Vermischen im Lauf der Reaktion zu erlauben. Das Reaktionsgemisch wird mit 1 ml Ethanol mit 1 mMol Natriumcyanoborid (4) behandelt, und das erhaltene Gemisch wird dann unter gelegentlichem Rühren etwa 16 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeitspanne wird die Reaktion durch Hinzufügen von etwa 500 µl Wasser unterbrochen. Das Reaktionsgemisch wird mit Ethylether auf etwa 4 ml Gesamtvolumen verdünnt und dann zentrifugiert. Die obere organische Phase wird entfernt und auf einem Rotavapor reduziert. Das so erhaltene Produkt (6) wird durch Chromatographie durch eine kurze Siliziumdioxid-Säule (oder alternativ durch präparative DC auf Siliziumdioxid) mit einer Kombination von Dichlormethan : Methanol : Isopropylamin (typischerweise 95:5:0,1) teilweise gereinigt, anschließend erfolgt die Reinigung durch HPLC (Normalphasen-HPLC mit Siliziumdioxid mit Dichlormethan : Methanol : Isopropylamin oder Umkehrphasen-HPLC, C-18 mit 0,1 % TFA mit Acetonitril oder Methanol).

[0177] Wenn angemessen oder gewünscht, kann durch die Verwendung von Verfahren, wie die in Beispiel 21 beschriebenen, eine chirale Auflösung erreicht werden.

Zubereitung und Verabreichung

[0178] Wie hier demonstriert, können die Moleküle der Erfindung dazu verwendet werden, (a) eine oder mehrere Wirkungen eines extrazellulären Ions, einschließlich extrazellulären Ca^{2+}, nachzuahmen oder zu antagonisieren; (b) den extrazellulären Spiegel des freien Ca^{2+} in einem Individuum zu beeinflussen; und (c) Krankheiten wie Hyperparathyroidismus, Osteoporose und Bluthochdruck zu behandeln. Im Allgemeinen können nun Krankheiten oder Zustände, an denen Rezeptoren anorganischer Ionen beteiligt sind, untersucht, diagnostiziert und/oder vorteilhaft behandelt werden. Während im Allgemeinen gezeigt wurde, daß die Moleküle einen Einfluß auf parathyroidale Zellen haben, können sie auch die Ca^{2+}-Rezeptoren auf anderen Zellen, einschließlich der Knochenosteoklasten, juxtaglomerulären Nierenzellen, proximalen Tubulus-Nierenzellen, distalen Tubulus-Nierenzellen, Zellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife und/oder des Sammelganges, Keratinocyten in der Epidermis, parafollikuläre Zellen in der Schilddrüse (C-Zellen), Darmzellen, Trophoblasten in der Placenta, Thrombocyten, vaskulärer glatter Muskelzellen, Herzvorhofzellen, Gastrin und Glucagon sekretierender Zellen, Nieren-Mesangialzellen und Brustzellen modulieren.

[0179] Obwohl diese Moleküle typischerweise in Therapien für menschliche Patienten Anwendung finden

werden, können sie auch zur Behandlung ähnlicher oder gleicher Krankheiten bei anderen warmblütigen Tierarten wie anderen Primaten, Nutztieren wie Schweinen, Rindern und Geflügel; Sport- und Haustieren wie Pferden, Hunden und Katzen verwendet werden.

[0180] In Therapie- und/oder Diagnoseanwendungen können die Moleküle der Erfindung für eine Vielzahl von Verabreichungsmodi zubereitet werden, darunter systemische und topische oder örtliche Verabreichung. Techniken und Zubereitungen sind im Allgemeinen in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA zu finden.

[0181] Für systemische Verabreichung ist die orale Verabreichung zu bevorzugen. Alternativ kann Injektion angewandt werden, z.B. intramuskulär, intravenös, intraperitoneal und subcutan. Zur Injektion werden die Moleküle der Erfindung in flüssigen Lösungen zubereitet, vorzugsweise in physiologisch verträglichen Puffern wie Hank-Lösung oder Ringer-Lösung. Ferner können die Moleküle in fester Form zubereitet und unmittelbar vor der Anwendung wieder aufgelöst oder suspendiert werden. Lyophilisierte Formen sind ebenfalls eingeschlossen.

[0182] Die systemische Verabreichung kann auch durch transmucosale oder transdermale Mittel erfolgen, oder die Moleküle können oral verabreicht werden. Für transmucosale oder transdermale Verabreichung werden bei der Zubereitung Penetrationsmittel verwendet, die der zu permierenden Barriere angemessen sind. Solche Penetrationsmittel sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt und beinhalten zum Beispiel für transmucosale Verabreichungen Gallensalze und Fusidinsäurederivate. Ferner können Detergentien zur Erleichterung der Permeation eingesetzt werden. Die transmucosale Verabreichung kann z.B. durch Nasensprays oder mittels Suppositorien geschehen. Für die orale Verabreichung werden die Moleküle in konventionellen oralen Verabreichungsformen wie Kapseln, Tabletten und Tonika zubereitet.

[0183] Für die topische Administration werden die Moleküle der Erfindung in Einreibungen, Salben, Gelen oder Cremes zubereitet, wie sie auf dem Fachgebiet allgemein bekannt sind.

[0184] Wie in den nachstehenden Beispielen gezeigt, können die Mengen der verschiedenen Verbindungen dieser Erfindung, die verabreicht werden müssen, mit Standardverfahren bestimmt werden. Im Allgemeinen ist es eine Menge zwischen etwa 1 und 50 mg/kg des zu behandelnden Tieres.

Rekombinante Rezeptoren

[0185] Das Absuchen natürlicher Produkte hat traditionell die Leitstrukturen für die Entwicklung verschiedener therapeutischer Moleküle geliefert. Jedoch war früher das Hochdurchsatz-Absuchen natürlicher Produktbibliotheken oder anderer Molekülbibliotheken auf ihre Wirkung auf den Ca^{2+}-Rezeptor nicht möglich. Um die Fähigkeit dazu zu erreichen, ist es am besten, die Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA zu clonieren und dann transfizierte Zelllinien zu schaffen, die für ein Absuchen mit hohem Durchsatz geeignet sind. Die Struktur des Rezeptors kann darüber hinaus dazu verwendet werden, Einblick in die molekulare Geometrie der Ligandenbindungsstelle(n) zu gewinnen; und eine solche Information kann dazu verwendet werden, ein rationales Entwurfsprogramm für Arzneistoffe, wie vorstehend diskutiert, zu erweitern. Begrenzte Struktur-Aktivitäts-Studien und Tests der ausgewählten natürlichen Produktmoleküle werden die anfängliche Strukturdatenbank liefern, die als Leitfaden für ein rationales Absuchen natürlicher Produkte und für den Entwurf von Arzneistoffen nötig ist.

[0186] Die Entdeckung einer Überfamilie von Genen liefert die gleichen Vorteile für alle Rezeptoren anorganischer Ionen. Obwohl sich die folgende Diskussion oft auf die Methodik zum Clonieren eines Calciumrezeptors beziehen wird, wird der Durchschnittsfachmann verstehen, daß diese Methodik allgemein auf die Clonierung aller Rezeptoren anorganischer Ionen anwendbar ist.

[0187] Diese rekombinanten Rezeptoren erlauben zum ersten Mal ein Absuchen von Mimetika und Lytika, einschließlich Calcimimetika und Calcilytika, beispielsweise durch Bindungstests mit den Rezeptoren. Dies ist besonders nützlich beim Absuchen mit den menschlichen Rezeptoren, um therapeutisch nützliche Verbindungen zu finden.

[0188] Die Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA der parathyroidalen Rinder- und Menschenzellen kann durch funktionale Expression in Xenopus-Oocyten cloniert werden. Es ist möglich, eine Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} in Xenopus-Oocyten indirekt durch Messung des Stroms durch den von endogenem Ca^{2+} aktivierten Cl^--Kanal zu verfolgen. Die von diesem Signalübertragungsweg gelieferte Verstärkung der Reaktion ermöglicht die Feststellung von Rezeptorproteinen, die bei sehr niedrigen Spiegeln von mRNA codiert werden. Dies erlaubt die Fest-

stellung von rezeptorspezifischen cDNA-Clonen ohne die Notwendigkeit von Hochaffinitätsliganden, spezifischen Antiseren oder Protein- oder Nucleinsäure-Sequenzinformation. Ein Beispiel einer solchen Vorgehensweise folgt.

[0189] Adulte weibliche Xenopus laevis wurden von Xenopus I (Ann Arbor, MI) bezogen und nach Standardverfahren gehalten. Von kälteanästhesierten Kröten wurden Ovarienlappen herausgeschnitten. Die Oocytenaggregate wurden in modifizierte Barth-Kochsalzlösung (MBS) transferiert. Einzelne Oocyten wurden durch 2-stündige Inkubation bei 21 °C in MBS mit 2 mg/ml Kollagenase (Sigma, Typ 1A) gewonnen, und Oocyten im Stadium V–VI wurden für die Injektion ausgewählt.

[0190] Glaskapillarröhrchen (1 mm Durchmesser) wurden zu einer dünnen Spitze ausgezogen und von Hand abgebrochen, um einen Spitzendurchmesser von etwa 15 µm zu erhalten. Ein Tröpfchen mRNA (1 ng/nl in Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser) wurde auf Parafilm planiert und durch Einsaugen in das Kapillarröhrchen gezogen. Das Kapillarröhrchen wurde dann an einen Picospritzer (WPI Instruments) angeschlossen, und das Volumen der luftimpulsgetriebenen Tröpfchen auf 50 ng mRNA (typischerweise 50 nl) eingestellt. Eine 35 mm-Kulturschale mit einem auf dem Boden fixierten Stück Nylonstrumpf wurde dazu verwendet, die Oocyten während der Injektion von mRNA in den vegetativen Pol zu sichern. Die injizierten Oocyten wurden in eine 35 mm-Kulturschale mit MBS, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin planiert und 3 Tage lang bei 18 °C inkubiert.

[0191] Nach der Inkubation wurde eine Oocyte in eine 100 µl-Plastikkammer planiert und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit MBS bei einer Durchflußrate von 0,5 ml/min superfusioniert. Die Testmoleküle oder anorganischen Polykationen wurden hinzugefügt, indem das Rohrstück schnell in andere Puffer gesteckt wurde. Die Aufzeichnungs- und Stromleitungselektroden wurden aus bis zu einem Widerstand von 1–3 mOhm gezogenen dünnwandigen Kapillarröhrchen, die mit 3M KCl gefüllt waren, konstruiert. Die Oocyten wurden unter mikroskopischer Beobachtung mit beiden Elektroden angestochen (am animalischen Pol) und an einen Axon Instruments Axoclamp 2A-Klemmenspannungsverstärker angeschlossen, der dazu verwendet wurde, das Haltepotential (- 70 bis – 80 mV) festzusetzen und die Ströme zu messen, die durchgeschickt wurden, um das Haltepotential aufrechtzuerhalten. Die Ströme wurden direkt auf einem Streifenschreiber aufgenommen.

[0192] Für die mRNA-Präparation wurde Gewebe von Kälbern oder von Patienten mit sekundärer HPT, die sich einer chirurgischen Entfernung der Nebenschilddrüsen unterzogen hatten, gewonnen. Gereinigte Zellen müssen nicht präpariert werden; ganze Drüsenstücke wurden dazu verwendet, mRNA zu präparieren, die die Expression des Ca^{2+}-Rezeptors in Xenopus-Oocyten steuern. Die gesamte zelluläre RNA wurde durch saure Guanidiniumthiocyanat/Phenol-Extraktion aus homogenisierten Drüsen präpariert. Zur Selektion auf poly(A)$^+$-mRNA nach Standardverfahren wurde Oligo-dT-Cellulosechromatographie benützt. Zur Größenfraktionierung der mRNA wurde die Zentrifugierung durch Glyceringradienten benützt. Die mRNA wurde mit 20 mM Methylquecksilberhydroxid denaturiert und auf einen linearen 15–30% Glyceringradienten in Beckman TLS55-Röhrchen aufgetragen (50–100 µg bei einer Konzentration von 1 mg/ml). Nach 16 Stunden langer Zentrifugierung bei 34.000 U/min wurden 0,3 ml Gradientenfraktionen gesammelt und im gleichen Volumen Wasser mit 5 mM beta-Mercaptoethanol verdünnt. Die mRNA wurde dann durch zwei Zyklen Ethanolfällung gewonnen. Wenn gewünscht, kann die mRNA (50–100 µg poly(A)$^+$) auf einem präparativen 1,2% Agarose/6,0 M Harnstoff-Gel zusammen mit einer Reihe von RNA-Größenmarkern aufgetrennt werden. Nach der Sichtbarmachung der mRNA durch Ethidiumbromidfärbung werden Gelscheiben, die RNA in ungefähr 1 kb- bis 2 kb-Größenschritten enthalten, herausgeschnitten. Die mRNA wird durch Verwendung von RNAid-Bindungsmatrix (nach dem Standardverfahren des Herstellers; Stratagene, Inc.) aus den Agarosegelscheiben gewonnen, und die gewonnenen mRNA-Fraktionen werden in DEPC behandeltes Wasser eluiert.

[0193] Die Mengen der gewonnenen mRNA wurden durch Messung der UV-Absorption quantifiziert. Der Größenbereich der mRNA, die in jeder Fraktion des Glyceringradienten enthalten war, wurde durch Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophorese bestimmt, indem eine kleine Menge (0,5 µg) einer jeden Probe verwendet wurde. Die Integrität der mRNA wurde durch in vitro-Translation einer jeden Probe beurteilt. Reticulocytenlysate (im Handel erhältliche Kits; BRL) wurden zur Translation von 0,05–0,5 µg von jeder mRNA-Fraktion verwendet. Die so erhaltenen ^{35}S-markierten Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die intakte mRNA war in der Lage, die Synthese von Proteinen des vollständigen Größenbereiches zu steuern, der ungefähr den Größen der einzelnen mRNA-Fraktionen entsprach.

[0194] Im Vektor λZAPII wurde eine cDNA-Bibliothek konstruiert, wozu eine Modifikation der Technik von Gubler und Hoffman befolgt wurde. RNA aus der Fraktion/den Fraktionen mit der besten Reaktion im Oocytentest wurde als Startmaterial verwendet. Die Synthese des ersten cDNA-Stranges wurde durch einen oli-

go-dT/NotI-Primer-Linker gestartet. Die Synthese des zweiten Stranges geschah durch das RNase H/DNA-Polymerase I-Selbstprimingverfahren. Bei der doppelsträngigen cDNA wurden mit T4-DNA-Polymerase glatte Enden hergestellt, und EcoRI-Adapter wurden mit T4-Ligase über glatte Enden an die cDNA ligiert. Nach NotI-Verdauung zur Spaltung des Linkers wurde cDNA voller Länge auf Sephacryl 500 HA durch Ausschlußchromatographie größenselektiert. Die Erststrang-cDNA wurde mit α-^{32}P-dATP radioaktiv markiert, und alle Synthese- und Gewinnungsschritte durch Verfolgung des Einbaus der Radioaktivität überwacht. Die aus der Größenausschlußsäule gewonnene cDNA voller Länge wurde an EcoRI/NotI verdaute λZAPII-Arme ligiert. Das Ligierungsgemisch wurde mit im Handel erhältlichem hochwirksamem Verpackungsextrakt (Stratagene, Inc.) im Test verpackt und auf den geeigneten Wirtsstamm (XL1-blue) ausplattiert. Der Prozentsatz rekombinanter Phagen wurde durch das Verhältnis weißer zu blauer Plaques bestimmt, wenn die Bibliothek auf IPTG und X-Gal ausplattiert wurde.

[0195] Die durchschnittliche Insertgröße wurde aus zehn zufällig ausgewählten Clonen bestimmt, Phagen-DNA-„mini-preps" wurden mit EcoRI und NotI verdaut, um das Insert freizusetzen, und die Größe wurde durch Agarosegelelektrophorese bestimmt. Die Bibliothek bestand aus >90% rekombinanter Phagen, und die Insertgröße reichte von 1,5 bis 4,2 kb. Der rekombinante Ligierungsansatz wurde in großer Menge verpackt und ergab so 800.000 primäre Clone. Das Verpackungsgemisch wurde titriert und bei 50.000 Plaques pro 15 cm-Platte ausplattiert. Jeder Pool von 50.000 Clones wurde in SM-Puffer eluiert und individuell gelagert.

[0196] Von jedem der Clon-Pools wurden Plattenlysat-Stammlösungen zur Phagen-DNA-Präparation in kleiner Menge benützt. Phagenpartikel werden durch Polyethylenglycolfällung präzipitiert, und die Phagen-DNA durch Proteinase K-Verdauung und nachfolgende Phenol : Chloroform-Extraktion gereinigt. 20 Mikrogramm DNA werden mit NotI verdaut und als Matrize für die in vitro-Transkription von Sense-Strang-RNA benützt. Die in vitro-Transkription erfolgt gemäß Standardverfahren unter Verwendung von T7-RNA-Polymerase und des 5'-Kappenanalogons m^{7}GpppG in 50 µl Gesamtreaktionsvolumen. Nach dem Dnase I/Proteinase K-Verdau und der Phenol/Chloroform-Extraktion wird die RNA durch Ethanolfällung konzentriert und für die Oocyteninjektion verwendet.

[0197] Den Oocyten wurde synthetische mRNA (cRNA) von jedem der 16 Bibliotheks-Subpools, die jeweils 50.000 unabhängigen Clonen entsprechen, injiziert. Nach einer Inkubation von 3 bis 4 Tagen wurde geprüft, ob 10 mM Neomycin bei den Oocyten einen Ca^{2+}-abhängigen Cl-Strom auslösen konnten. Ein als „Pool 6" bezeichneter Pool gab ein positives Signal und enthielt somit einen cDNA-Clon, der einen funktionierenden Calciumrezeptor enthielt. Um die Komplexität des Pools 6 zu verringern und somit die Reinigung des darin enthaltenen Calciumrezeptorclons voranzutreiben, wurden die Phagen des Pools 6 bei µ20.000 Plaques pro Platte wiederausplattiert und 12 Platten geerntet. Die DNA von jedem dieser Subpools wurde präpariert und die cRNA synthetisiert. Wieder wurde Oocyten cRNA injiziert und diese 3–4 Tage später auf die Fähigkeit von 10 mM Neomycin geprüft, einen Ca^{2+}-abhängigen Cl^--Strom auslösen konnten. Der Subpool 6–3 war positiv, und dieser Pool wurde einer weiteren Ausplattierungsrunde unterworfen, was die Komplexität des Pools auf um die 5.000 Clone pro Pool verringern. Die Pools wurden nochmals durch Präparation der cRNA und Injektion in Oocyten getestet. Der Unterpool 6–3.4 war positiv. Um die weitere Reinigung des positiven Clons in Pool 6–3.4 zu beschleunigen, wurde Phagen-DNA aus diesem Pool durch Superinfektion mit dem Helferphagen ExAssist (Stratagene) als Plasmid-DNA entnommen. Die Transfektion der entnommenen Plasmide in den Bakterienstamm DH5alphaF' ergab transformierte Bakterienkolonien auf Ampicillinplatten. Diese wurden in Pools von je 900 Clonen geerntet. Dann wurde die Plasmid-DNA aus jedem Subpool präpariert und die cRNA in der üblichen Weise synthetisiert und getestet. Der Subpool 6–3.4.4 war positiv. Anschließend wurden Bakterien, die das Plasmid Subpool 6–3.4.4 enthielten, in Subpools von je µ50 Clonen ausplattiert. Es ist zu erwarten, daß die Fortsetzung dieses Vorgangs zu einem einzelnen Clon führt, der einen funktionierenden Calciumrezeptor codiert.

[0198] Alternative Tests sind für die Feststellung der Expression eines Calciumrezeptors in Oocyten verfügbar. Beispielsweise können Oocyten mit $^{45}Ca^{2+}$ beladen und dann mit einem Calcimimetikum behandelt werden. Die Mobilisierung von $^{45}Ca^{2+}$ aus intrazellulären Vorräten ergibt eine Nettozunahme des $^{45}Ca^{2+}$-Ausstroms, die sich leicht bestimmen läßt. Auch fluoreszierende Ca^{2+}-Indikatoren können in Oocyten injiziert werden. In diesem Fall werden die Oocyten, die einen Calciumrezeptor exprimieren, nach Aktivierung mit einem Calcimimetikum eine erhöhte Fluoreszenz aufweisen. Diese Tests können anstelle des im vorstehenden Beispiel beschriebenen elektrophysiologischen Tests auf Calcium induzierten Cl^--Strom zum Clonieren von Calciumrezeptoren verwendet werden. Ferner muß der im Clonierungsvorgang verwendete calcimimetische Ligand nicht, wie vorstehend angegeben, Neomycin sein, sondern könnte an Stelle dessen zum Beispiel Gd^{+++}, Ca^{++}, Mg^{++} oder eine andere calcimimetische Verbindung sein.

[0199] Anfängliche Versuche verwendeten Xenopus-Oocyten, denen Wasser oder poly(A)+ angereicherte mRNA (50 ng) aus parathyroidalen Rinderzellen injiziert worden war. Nach drei Tagen wurden die Oocyten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das intrazelluläre Ca^{2+} als Reaktion auf Anstiege der Konzentration extrazellulärer zwei- und dreiwertiger Kationen zu erhöhen. In die Oocyten wurden Aufzeichnungs- und Stromleitungselektroden gesteckt, und die $[Ca^{2+}]_i$ wurde indirekt durch Messung der Ströme durch den vom endogenen Ca^{2+} aktivierten Cl^--Kanal überprüft. In Oocyten, denen $poly(A)^+$ angereicherte mRNA aus parathyroidalen Rinderzellen (oder aus menschlichen parathyroidalen Zellen, Fig. 26) injiziert worden war, verursachte eine Erhöhung der Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} von 0,7 auf 3, 5 oder 10 mM eine schnelle und vorübergehende Zunahme des Cl^--Stromes, der dann um einen höheren Basisstrom schwankte. Eine Erhöhung der Konzentration von extrazellulärem Mg^{2+} von 1 auf 10 mM verursachte ebenfalls oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stromes. Die Reaktion des Cl^--Stromes auf extrazelluläres Mg^{2+} blieb bestehen, wenn die Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} auf < 1 µM verringert wurde (Fig. 25).

[0200] Das impermeable dreiwertige Kation Gd^{3+} (600 µM) verursachte ebenfalls oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stromes (Fig. 25). Solche Zunahmen des Cl^--Stromes, die schwanken und in nominaler Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erhalten bleiben, bemerkt man, wenn die Oocyten andere Ca^{2+} mobilisierende Rezeptoren exprimieren konnten, und wenn sie mit dem geeigneten Liganden (z.B. Substanz K, Fig. 25) stimuliert wurden. In diesen Fällen die Zunahme des Cl^--Stromes die Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+} widerspiegelt. Diese Anfangsstudien zeigen ebenfalls, daß extrazelluläre Polykationen intrazelluläres Ca^{2+} in Oocyten, denen mRNA aus parathyroidalen Zellen injiziert wurde, mobilisieren.

[0201] Oocyten, denen Wasser injiziert worden war, zeigten keine Veränderung des Cl^--Stromes, wenn sie extrazellulärem Ca^{2+} (10 mM) oder Mg^{2+} (20 oder 30 µM) ausgesetzt wurden. In einer Versuchsreihe wurde Oocyten die mRNA injiziert, die den Substanz K-Rezeptor codiert. In diesen Oocyten rief extrazelluläres Mg^{2+} (20 mM) keinen Strom hervor, aber die Zellen reagierten heftig auf die Zugabe von Substanz K (Fig. 25). Diese Versuche weisen darauf hin, daß es keine endogene Sensitivität der Oocyte gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} oder Mg^{2+} gibt.

[0202] Ähnliche Versuche wurden mit Oocyten ausgeführt, denen aus menschlichen Nebenschilddrüsen (hyperplastisches Gewebe aus einem Fall von sekundärer HPT) präparierte $poly(A)^+$ angereicherte mRNA injiziert worden war. Bei diesen Oocyten führte eine Erhöhung der Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} zu einer reversiblen Zunahme des Cl^--Stromes, der schwankte (Fig. 26). Die Zugabe von 300 µM La^{3+} verursachte ebenfalls oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stromes. Eine Erhöhung der Konzentration von extrazellulärem Mg^{2+} von 1 auf 10 mM rief Zunahmen des Cl^--Stromes hervor, die in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erhalten blieben. Zusätzliche Versuche legen die Annahme nahe, daß die Reaktion auf extrazelluläres Ca^{2+} konzentrationsabhängig ist. So wuchs der Cl^--Strom in drei mRNA-injizierten Oocyten bis auf ein Maximum von 111 ± 22 nA bei 3 mM und 233 ± 101 nA bei 10 mM extrazellulärem Ca^{2+} an.

[0203] Die mit Xenopus-Oocyten erhaltenen Ergebnisse demonstrieren das Vorhandensein von mRNA(s) in parathyroidalen Zellen, die (ein) Proteine) codiert, das/die normalerweise nicht-reagierenden Zellen Sensitivität gegen extrazelluläres Ca^{2+} verleiht/verleihen. Ferner zeigt die Fähigkeit von extrazellulärem Mg^{2+}, oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stromes in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} hervorzurufen, daß der Cl^--Strom von der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} und nicht vom Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} abhängt. Die mit La^{3+} erhaltenen Ergebnisse zeigen ebenfalls, daß das/die exprimierte(n) Proteine) mit der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} verbunden ist/sind. Zusammen zeigen diese Daten, daß das/die exprimierte(n) Proteine) als ein Zelloberflächenrezeptor und nicht als ein Kanal wirkt/wirken. Diese Studien liefern zwingende Beweise für die Existenz eines Ca^{2+}-Rezeptorproteins auf der Oberfläche von parathyroidalen Zellen und demonstrieren die Brauchbarkeit des Xenopus-Oocyten-Systems für die molekulare Clonierung der Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA.

[0204] In einer anderen Versuchsreihe wurde mRNA aus parathyroidalen Zellen durch Zentrifugieren durch einen Glyceringradienten größenfraktioniert. Es wurden zehn Fraktionen gewonnen. Jede Gruppe wurde in Xenopus-Oocyten injiziert, und nach dreitägiger Inkubationsperiode wurden die Oocyten auf die Expression des Ca^{2+}-Rezeptors getestet. Die Oocyten, denen die Fraktionen 4–6 injiziert worden waren, zeigten die größte und einheitlichste Zunahme des Cl^--Stromes als Reaktion auf extrazelluläres Ca^{2+} (Fig. 35). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Ca^{2+}-Rezeptor von mRNA eines Größenbereichs von 2,5–3,5 kb codiert wird. Dies deutet darauf hin, daß eine Strategie, die eine direkte Expression von RNA, synthetisiert aus der cDNA-Bibliothek eines Transkriptionsvektors, verwendet, durchführt ist. Es wurden Größenfraktionierungsversuche dieser An ausgeführt und in jedem der drei verschiedenen Fraktionierungsversuche ähnliche Resultate erhalten.

[0205] Die in den vorangegangenen Versuchen erhaltenen und charakterisierten mRNA-Fraktionen können durch Injektion in Oocyten getestet werden. Für jede mRNA-Fraktion werden 10-20 Oocyten 50 ng RNA bei einer Konzentration von 1 ng/nl Wasser injiziert. Die injizierten Oocyten werden 48–72 Stunden lang bei 18 °C gehalten und dann durch Messung des Cl^--Stromes auf die Expression des Ca^{2+}-Rezeptors geprüft. Für jede Gruppe injizierter Oocyten wird die für die Expression des Rezeptors positive Anzahl sowie die Größe des gemessenen Ca^{2+}-abhängigen Cl^--Stromes bestimmt. Als negative Kontrollen werden Oocyten Rattenleber-poly(A)$^+$ angereicherte mRNA, Hefe-RNA oder Wasser injiziert.

[0206] Es wird erwartet, daß eine mRNA im Bereich von 2,5–3,5 kb den Rezeptor codieren wird. Größere mRNA kann zum Clonieren eine Vorgehensweise erfordern, die auf der Hybridabreicherung („hybrid depletion") der parathyroidalen mRNA vor der Injektion der Oocyte beruht. Diese Strategie ist für einen Erfolg nicht von der Erzeugung von cDNA-Clonen von voller Länge abhängig. Wenn die Rezeptorexpression nicht mit einer einzigen Größenfraktion der mRNA erreicht wird, werden den Oocyten Fraktionen gemischter Größe injiziert, um eine Kombination zu ergeben, die tatsächlich einen funktionierenden Rezeptor ergibt. Wenn sich herausstellt, daß zur Bildung eines funktionierenden Rezeptors mehrere Untereinheiten nötig sind, wird die Expressions-Clonierungsstrategie der Hybridabreicherung angewandt. Bei dieser Vorgehensweise werden die Clone nach ihrer Fähigkeit ausgewählt, eine spezifische mRNA-Spezies aus der gesamten mRNA-Population abzureichern. Ein eine einzelne Untereinheit codierender Clon wird durch seine Fähigkeit bestimmt, die Bildung eines aktiven Multi-Untereinheiten-Komplexes zu verhindern. Durch erschöpfendes Absuchen ist es möglich, Clone zu bestimmen, die alle benötigten Untereinheiten codieren.

[0207] Diese Vorgehensweise erlaubt die Isolation von Clonen, die die einzelnen Untereinheiten codieren, die für einen funktionierenden Rezeptorkomplex erforderlich sind. Synthetische RNA aus Pools von Clonen werden mit den gleichen Techniken, die für die Analyse der ursprünglichen mRNA-Fraktionen verwendet wurden, auf ihre Fähigkeit geprüft, die Expression des Ca^{2+}-Rezeptors in Xenopus-Oocyten zu induzieren. Ursprünglich werden 10 Pools, die 100.000 primäre Clone darstellen, geprüft. Pools von Clonen, die eine positive Reaktion zeigen, werden bei einer niedrigeren Komplexität (typischerweise 4- bis 10-fach niedriger) abgesucht, und wieder werden positive Pools weiter unterteilt und abgesucht. Dieser Prozeß der Genbank-Subfraktionierung wird weiter verfolgt, bis einzelne positive Clone bestimmt sind. Als eine negative Kontrolle für den Oocyten-Expressionstest werden aus jenen DNA-Matrizen, die eine positive Reaktion hervorrufen, Antisense-Transkripte erzeugt. Antisense-Transkripte sind nicht imstande, einen authentischen Rezeptor zu erzeugen, und dies wird jegliches nichtspezifische positive Signal steuern, das von der Injektion synthetischer RNA hervorgerufen werden könnte. Eine weitere Sorge gilt der Tatsache, daß synthetische RNA gelegentlich die Translation in injizierten Oocyten durch einen undefinierten Mechanismus „vergiften" kann. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wird synthetischen RNAs, die eine negative Reaktion ergeben, mRNA der parathyroidalen Zellen in verschiedenen Verdünnungen co-injiziert, um festzustellen, ob sie die Expression des Ca^{2+}-Rezeptors nicht-spezifisch stören.

[0208] Wenn ein einzelner Clon, der den Ca^{2+} Rezeptor codiert, bestimmt ist, wird das cDNA-Insert aus dem Vektor herausgeschnitten und für die Produktion von synthetischer RNA in großem Maßstab benützt. Die Injektion dieser einzelnen RNA-Art in Oocyten erlaubt ein genaues Abschätzen der Charakteristika des exprimierten Rezeptors.

[0209] Wenn die Größe der mRNA, die den Ca^{2+}-Rezeptor codiert, für eine Clonierung durch direkte Transkription und Expression zu groß ist oder wenn mehrere Untereinheiten beteiligt sind, wird eine Hybridabreicherungstechnik zum Absuchen von Clon-Pools angewendet. Die cDNA-Insert-DNA wird aus Clon-Pools von der größenselektierten cDNA-Bibliothek der parathyroidalen Zellen hergestellt. Diese DNA wird mit der mRNA parathyroidaler Zellen unter Bedingungen hybridisiert, die die Bildung von DNA/RNA-Duplexmolekülen erlauben. Die nicht angelagerte, Hybride abgereicherte RNA wird gewonnen und für die Injektion der Oocyten verwendet. Alternativ können andere Verfahren der Hybridabreicherung oder der Hybridsperrung verwendet werden; diese sind dem Fachmann wohlbekannt. DNA aus Clon-Pools, die Ca^{2+}-Rezeptor-mRNA darstellende Sequenzen enthalten, wird von dieser mRNA aus der Gesamt-mRNA-Population der parathyroidalen Zellen abgereichert, und die Expression des Rezeptors bei der Injektion der Oocyte ist verringert oder fehlt ganz. Es wird ein Prozeß der Subfraktionierung mit Clon-Pools abnehmender Komplexität verfolgt, wobei bei jedem Schritt auf clonierte DNA getestet wird, die die Ca^{2+}-Rezeptor-codierende mRNA aus der Gesamt-mRNA-Population von parathyroidalen Zellen abreichert. Die Verwendung einer internen Kontrolle während der Hybridabreicherungstests stellt sicher, daß die Hybrid abgereicherte RNA intakt ist und in der Oocyte translatiert werden kann.

[0210] Menschliche parathyroidale Zellen exprimieren einen an Adenylatcyclase gekoppelten beta-adrenergen Rezeptor. Dieser Rezeptor kann in Oocyten exprimiert werden, wo er zur Agonisten induzierten Aktivie-

rung der endogenen Adenylatcyclase in der Lage ist. Während des Absuchens auf Ca^{2+}-Rezeptorclone unter Verwendung der Hybridabreicherung werden die mit Hybrid abgereicherter mRNA injizierten Oocyten auf Isoproterenol induzierte Adenylatcyclaseaktivierung getestet. Eine positive Reaktion in diesem Test dient dazu, anzuzeigen, daß jede beobachtete Inhibition der Ca^{2+}-Rezeptorreaktion spezifisch ist und daß sie nicht auf eine allgemeine Inhibition der Gesamt-mRNA-Population zurückzuführen ist.

[0211] Die Strategie des Absuchens unter Verwendung der Hybridabreicherung kann zur Isolation von Clonen führen, die keine komplette Protein codierende Region enthalten. Positive Clone, die mit dieser Absuchstrategie isoliert werden, werden sequenziert, um ihre Protein codierende Fähigkeit zu bestimmen. Die Northern Blot-Analyse der menschlichen Nebenschilddrüsen-RNA erlaubt die Bestimmung der Größe der kompletten mRNA, die spezifischen Clonen entspricht. Wenn die positiven Clone nicht von voller Länge zu sein scheinen, verwendet man die clonierte cDNA als Hybridisierungssonde zum Absuchen einer Nebenschilddrüsen-cDNA-Bibliothek auf komplette cDNAs.

[0212] Eine Vielzahl von Zellinien sind dazu in der Lage, exogen exprimierte Rezeptoren an endogene Funktionsreaktionen zu koppeln. Eine Anzahl dieser Zellinien (z.B. NIH-3T3, HeLa, NG115, CHO, HEK 293 und COS7) können zur Bestätigung dafür, daß sie keinen endogenen Ca^{2+}-Rezeptor aufweisen, getestet werden. Jene Linien, die keine Reaktion auf extrazelluläres Ca^{2+} zeigen, können dazu verwendet werden, stabil transfizierte Zellinien, die den clonierten Ca^{2+}-Rezeptor exprimieren, zu etablieren.

[0213] Die Herstellung dieser stabilen Transfektanten geschieht durch Transfektion einer geeigneten Zellinie mit einem eukaryontischen Expressionsvektor wie etwa pMSG, in dem die codierende Sequenz der Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA in die Mehrfachclonierungsstelle cloniert wurde. Diese Expressionsvektoren enthalten eine Promotorregion wie den Mäuse-Brusttumorvirus-Promotor (MMTV), die die Transkription von cDNAs in vielen Säugerzellen auf hohem Niveau antreiben. Ferner enthalten diese Vektoren Gene zur Selektion von Zellen, die die cDNA von Interesse stabil exprimieren. Der selektierbare Marker im Vektor pMSG codiert ein Enzym, Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (XGPRT), das Resistenz gegen einen Soffwechselinhibitor verleiht, der zur Kultur hinzugefügt wird, um die nichttransfizierten Zellen abzutöten. Gewöhnlich werden eine Vielzahl von Expressionsvektoren und Selektionsschemata überprüft, um die optimalen Bedingungen für die Produktion von Ca^{2+}-Rezeptor exprimierenden Zelllinien zur Verwendung in Hochdurchsatz-Absuchtests zu bestimmen.

[0214] Das wirksamste Verfahren zur Transfektion von Eukaryontenzellinien mit Plasmid-DNA variiert je nach dem gegebenen Zelltyp. Das Ca^{2+}-Rezeptor-Expressionskonstrukt wird durch die geeignete Technik in gezüchtete Zellen eingeschleust, sei es durch Ca^{2+}-Phosphatfällung, DEAE-Dextran-Transfektion, Lipofektion oder Elektroporation.

[0215] Die Zellen, bei denen die transfizierte DNA stabil eingebaut ist, werden durch ihre Resistenz gegen Selektionsmedien, wie vorstehend beschrieben, bestimmt, und clonale Zelllinien werden durch Expansion der resistenten Kolonien erzeugt. Die Expression der Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA durch diese Zellinien wird durch Lösungshybridisierung und Northern-Blot-Analyse untersucht. Die funktionelle Expression des Rezeptorproteins wird durch Messung der Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+} als Reaktion auf extern zugegebene Ca^{2+}-Rezeptor-Agonisten bestimmt.

[0216] Das Clonieren des Ca^{2+}-Rezeptors ermöglicht sowohl Struktur- als auch Funktionsstudien dieses neuen Rezeptors. Rekombinant hergestellter Rezeptor kann für Strukturuntersuchungen kristallisiert werden. Stabil transfizierte Zellinien, die den Rezeptor exprimieren, können zum Hochdurchsatz-Absuchen natürlicher Produkt- oder anderer Verbindungsbibliotheken verwendet werden. Moleküle der erforderlichen Stärke und Spezifität können markiert werden (radioaktiv oder fluoreszent). Die Fähigkeit der Testmoleküle/-extrakte, solche markierten Moleküle zu verdrängen, bildet die Basis eines Hochdurchsatz-Tests zum Absuchen.

[0217] Eine andere Strategie zum Clonieren eines Rezeptors anorganischer Ionen in Oocyten ist folgende:

[0218] Die allgemeine Vorgehensweise zur Isolation, Defollikulation und Injektion von Frosch-Oocyten wird nachstehend beschrieben. Kurz gesagt, werden Xenopus laevis-Frösche durch Eintauchen in 0,17% Tricain betäubt, und ein Lappen des Ovars wird entfernt und in kleine Stücke geschnitten. Mit einem L-förmigen Kapillarrohr werden nach der 90-minütigen Inkubation des Ovariengewebes in einem calciumfreien Puffer bei Raumtemperatur einzelne Oocyten im Stadium V–VI isoliert. Die abgetrennten Oocyten [gewöhnlich 200–300 pro Versuch] werden dann weitere 90 min in Kollagenaselösung [Sigma, Typ Π; 2 mg/ml] inkubiert, wonach die Follikularschicht mit feinen Pinzetten entfernt werden kann. Die defollikulierten Oocyten werden über Nacht bei

17 °C in Frosch-Ringer [ND96] inkubiert, und degenerierende Oocyten werden entfernt [gewöhnlich < 2–3% der Gesamtheit]. Den überlebenden Oocyten werden dann 50 ml H_2O [Kontrolle] oder poly(A)$^+$-mRNA [15–50 ng/Oocyte; in 50 nl H_2O] injiziert, und diese dann 2–4 Tage bei 17 °C inkubiert. [Frosch-Ringer, ND96, enthält (mM): NaCl (96), KCl (2), $CaCl_2$ (0,5), $MgCl_2$ (0,5), HEPES (5), Pyruvat (2,5)].

[0219] Die Gesamt-RNA wird mit Guanidiniumthiocyanat aus dem Gewebe [Nieren, Osteoklasten usw.] extrahiert und auf einem CsCl-Kissen separiert. Dann wird die poly(A)$^+$-RNA durch Oligo(dT)-Cellulosechromatographie isoliert [zwei Säulendurchgänge]. Die Integrität der poly(A)$^+$-RNA wird durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Fähigkeit von 25-50 ng poly(A)$^+$-RNA, nach Kontakt mit extrazellulärem Gd^{3+} eine Ca^{2+}-abhängige Cl^--Kanal-Aktivität hervorzurufen, wird überprüft [d.h. als Beleg für die Ca^{2+}-Rezeptoraktivität]. Der nächste Schritt besteht darin, die mRNA, die Ca^{2+}-Rezeptoraktivität exprimiert, bis zu einem kleinen Größenbereich (~ 1 kb) zu lokalisieren. Zu diesem Zweck werden ~ 100 µg poly(A)$^+$-RNA durch einen Saccharosegradienten aufgetrennt und 40 Größenfraktionen werden von dem Gradienten gewonnen. Alternativ können ~ 200–300 ng poly(A)$^+$-RNA durch präparative Dauerfluß-Agarosegelelektrophorese fraktioniert [Hediger, M.A.: Anal. Biochem. 159:280-86, (1986)] und 70–90 Fraktionen gewonnen werden. Den Xenopus laevis-Oocyten werden Pools von poly(A)$^+$-RNA-Fraktionen [3–5 Fraktionen/Pool; 0,2–0,5 ng /Oocyte] injiziert, und die Fähigkeit der Pools, Ca^{2+}-Rezeptoraktivität hervorzurufen, wird geprüft. Einzelne Fraktionen von dem/n Pool(s), der/die die höchste Ca^{2+}-Rezeptoraktivität ergibt/ergeben, werden in Oocyten injiziert, und definieren so die Fraktionen) innerhalb dieses Pools von poly(A)$^+$-RNA, die die höchste Expression des Ca^{2+}-Rezeptors in Oocyten ergeben.

[0220] Aus diesem poly(A)$^+$-RNA-Pool wird unter Verwendung des Superscript-Plasmidsystems [pSPORT1; BRL] eine gerichtete cDNA-Bibliothek konstruiert. Die cDNA wird unter Verwendung von SuperScript, MuMLV-RT, reversen Trankripten [von denen viele von voller Länge hinsichtlich der codierenden Region sein werden], erzeugt. Die cDNA wird durch Gelelektrophorese nach Größe getrennt, und die geeignete cDNA-Größenregion [auf Basis des poly(A)$^+$-RNA-Größenbereichs] wird mittels GENECLEAN II [Bio 101] extrahiert. Diese größenselektierte cDNA wird dann gerichtet in den pSPORT1-Plasmidvektor ligiert, wofür ein Not I-Primer am 3'-Ende und ein Adapter für Sal I am 5'-Ende verwendet werden. Die so erhaltenen Plasmide werden durch Elektroporation in ELECTROMAX DH10B-Zellen [BRL] eingeschleust. Die transformierten Bakterien werden auf Nitrocellulosefilter gezüchtet [500-800 Kolonien/Filter] und die Masterfilter bei 4 °C [kurzzeitig] oder – 70 °C [über lange Zeit] gelagert. Die Bakterien der Replikafilter werden gezüchtet, und die Plasmid-DNA wird aus den Filtern isoliert, durch Restriktionsspaltung linearisiert und dann als Matrize für die Synthese von Sense-cRNA durch in vitro-Transkription [T7-Promotor in Gegenwart von Kappen-Analogon] verwendet. Die cRNA-Pools werden einzeln in Oocyten injiziert und diese auf die Expression von Gd^3+ induzierte [1–100 µM] Aktivierung von Cl^--Strömen getestet. Eine parallele standardmäßige Selektionsprozedur wird zur Bestimmung eines Clons verwendet, der Ca^{2+}-Rezeptoraktivität in Oocyten exprimiert.

[0221] Es wird eine Restriktionskarte der Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA erstellt und geeignete Restriktionsfragmente werden in pSPORT1 subcloniert. Subclonierte cDNAs werden mit Standardverfahren [Sequenase Polymerase 2® 2, USB] in beiden Richtungen sequenziert. Wo zur Sequenzierung von Regionen innerhalb oder zwischen Subclonen oder wo zur Lösung von Kompressionsproblemen oder nicht eindeutigen Sequenzregionen erforderlich, werden Sequenzierungsprimer (18-mer) angewandt. Die codierende Region des Ca^{2+}-Rezeptorproteins wird vom längsten offenen Leserahmen her bestimmt, der eine Startstelle hat, die vorzugsweise homolog zu den Kozak-Konsenssequenzen ist. Es werden Hydropathie und andere Proteinalgorithmen verwendet, um eine Topologie für das Ca^{2+}-Rezeptorprotein zu erstellen. Die Nucleotidsequenz der cDNA, die Aminosäuresequenz des Ca^{2+}-Rezeptorproteins und die Proteintopologie werden mit jenen der anderen Ca^{2+}-Rezeptoren und anderer bekannter cDNAs und Proteine in den Datenbanken verglichen. Homologe Regionen könnten Domänen darstellen, die an der Kationenbindung oder -regulation beteiligt sind.

[0222] Das derzeit bevorzugte Verfahren für die Isolierung von Nucleinsäure von Rezeptoren anorganischer Ionen basiert auf dem Hybridisierungsabsuchen.

[0223] Regionsspezifische Primer oder von BoPCaR1 abgeleitete Sonden können dazu verwendet werden, nach bekannten Verfahren (Innis et al., PCR Protocols, Academic Press, San Diego, CA (1990)) die DNA-Synthese und PCR-Amplifikation zu primen sowie Kolonien zu bestimmen, die clonierte DNA enthalten, die ein Mitglied der Familie der Rezeptoren anorganischer Ionen codieren.

[0224] Werden Primer verwendet, die aus Nucleinsäuren abgeleitet sind, die einen Rezeptor anorganischer Ionen codieren, wird der Fachmann erkennen, daß durch Anwendung von Hochstringenzbedingungen, Anlagerung bei 50–60 °C, Sequenzen amplifiziert werden, die mehr als etwa 76% Homologie zum Primer aufwei-

sen. Durch Anwendung von Bedingungen niedrigerer Stringenz, Anlagerung bei 35–37 °C, werden Sequenzen amplifiziert, die über etwa 40–50% Homologie zum Primer aufweisen.

[0225] Werden DNA-Sonden, die aus Rezeptoren anorganischer Ionen abgeleitet sind, für Kolonie/Plaque-Hybridisierung verwendet, wird der Fachmann erkennen, daß durch Anwendung von Hochstringenzbedingungen, Hybridisierung bei 50–65 °C, 5 × SSPC, 50% Formamid, Waschen bei 50–65°C, 0,5 × SSPC, Sequenzen erhalten werden können, die über etwa 90% Homologie zur Sonde aufweisen, und durch Anwendung von Bedingungen niedrigerer Stringenz, Hybridisierung bei 35–37 °C, 5 × SSPC, 40–45% Formamid, Waschen bei 42 °C, SSPC, Sequenzen erhalten werden, die über 35–45% Homologie zur Sonde aufweisen.

[0226] Als Quelle für die genomische DNA, die Mitglieder der Rezeptorenfamilie anorganischer Ionen codiert, kann jedes beliebige Gewebe verwendet werden. Jedoch ist hinsichtlich der RNA die am stärksten bevorzugte Quelle jenes Gewebe, das gehobene Spiegel des gewünschten Mitglieds der Rezeptorfamilie anorganischer Ionen exprimiert. In der vorliegenden Erfindung wurden Oocyteninjektion und die Verwendung von 2-Elektroden-Spannungsklemmen an die gesamte Oocyte zur Feststellung der Expression von einer solchen Gewebequelle benützt. Jedoch ist es nun möglich, unter Verwendung der hier offenbarten Sequenzen solche Zellen zu bestimmen, wobei die Rezeptorsequenz anorganischer Ionen in Northern-Blot- oder in in situ-Hybridisierungsverfahren als Sonde benützt wird, so daß Vorgehensweisen nicht notwendig sind, die zur Clonierung des ersten Familienmitglieds verwendet werden, und der Erhalt von RNA aus einem Gewebe, das hohe Spiegel von Rezeptoren anorganischer Ionen exprimiert, nicht notwendig ist.

[0227] Die vorliegende Erfindung liefert ferner Verfahren zur Bestimmung von Zellen oder Geweben, die ein Mitglied der Rezeptorfamilie anorganischer Ionen exprimieren. Eine Sonde, die beispielsweise die DNA-Sequenz von BoPCaR1, ein Fragment davon oder eine DNA-Sequenz, die einen anderes Mitglied der Familie der Rezeptorproteine anorganischer Ionen umfaßt, kann als Sonde oder Amplifikationsprimer verwendet werden, um Zellen festzustellen, die eine Botschaft exprimieren, die der Sonde oder dem Primer homolog ist. Der Fachmann kann leicht derzeit verfügbare Techniken der Nucleinsäureamplifikation oder -feststellung so anpassen, daß Sonden oder Primer verwendet werden, die auf jenen Sequenzen basieren, die ein Mitglied der Rezeptorfamilie anorganischer Ionen codieren.

[0228] Die geeigneten, andere Rezeptoren exprimierenden Zellen oder Gewebe vorausgesetzt, können diese Rezeptoren in analoger Art und Weise cloniert werden, wie vorstehend für den Calciumrezeptor parathyroidaler Zellen beschrieben. Beispielsweise codiert mRNA von menschlichem Osteoklastomgewebe den Osteoklasten-Calciumrezeptor (**Fig. 34**). Man muß somit, um einen Clon des menschlichen Osteoklastenrezeptors zu isolieren, lediglich mRNA von Osteoklastomgewebe isolieren, eine cDNA-Bibliothek herstellen und Subpools, wie vorstehend beschrieben, testen/fraktionieren. Ferner sind die bevorzugten Rezeptoren zum Absuchen von Wirkstoffen menschlichen Ursprungs. Ein Clon, der einen Rezeptor von einer Spezies codiert, kann dazu verwendet werden, durch Kreuzhybridisierung den entsprechenden menschlichen cDNA-Clon zu erhalten, wie dies dem Fachmann wohlbekannt ist. Weiterhin erlaubt der Clon der parathyroidalen Zellen oder anderer Zellrezeptoren die Isolation von Genen; die ähnliche anorganische Ionen erkennende Proteine in anderen Zellen codieren, und die Expression dieser Proteine. Dies läßt sich über viele Vorgehensweisen erreichen. Die Southern-Blot-Analyse von menschlicher genomischer DNA, die die Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA als Hybridisierungssonde verwendet, gibt einen Hinweis auf die Anzahl der verwandten Sequenzen, die im Genom codiert sind; die Hybridisierung bei unterschiedlichen Stringenzgraden gibt einen Hinweis auf den Grad der Divergenz zwischen verwandten Sequenzen. Dies liefert Informationen zur potentiellen Anzahl von Genen, die verwandte Rezeptorproteine codieren. Die Northern Blot-Analyse mit Ca^{2+}-Rezeptor-cDNA als Sonde stellt fest, ob in verschiedenen Geweben die gleichen oder verwandte Transkripte vorliegen. Wenn verwandte Transkripte festgestellt werden, die zum Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen homolog sind, ist es eine relativ einfache Sache, Clone dieser mRNAs zu erhalten, entweder durch Absuchen der geeigneten cDNA-Bibliotheken oder durch Polymerase-Kettenreaktionstechniken (PCR).

[0229] Zielgerichtetes Gen-Walking (TGW) ist eine Modifikation der Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die die Amplifikation von unbekannten DNA-Sequenzen erlaubt, die an kurze Segmente bekannter Sequenzen angrenzen. Parker et al., Nucl. Acids Res., 19:3055, (1991). Im Gegensatz zu konventionellen PCR-Techniken, die DNA-Sequenzen zwischen zwei bekannten Primerstellen amplifizieren, kann TGW DNA amplifizieren, die an eine solche Stelle grenzt. Somit kann TGW als Ersatz für konventionelle Clonierungs- und Bibliotheksabsuchverfahren zum Isolieren von Sequenzen stromaufwärts oder stromabwärts bekannter Sequenzen dienen. Die Vorgehensweise kann dazu verwendet werden, Gene von jeder beliebigen Start-DNA-Matrize, für die nur eine begrenzte Menge Sequenzinformation bekannt ist, zu isolieren.

[0230] Zuerst werden parallel einige Standard-PCR-Reaktionen gefahren, für die ein „zielgerichteter Primer" und verschiedene „Walking-Primer" benützt werden. Der zielgerichtete Primer ist ein sequenzspezifischer Primer, der zu einer bekannten Sequenz auf dem DNA-Molekül von Interesse genau komplementär ist und der auf unbekannte angrenzende Sequenzen gerichtet ist. Die Walking-Primer sind nichtspezifische Sequenzen, die zu DNA in der Nähe des zielgerichteten Primers nicht komplementär sind. Die Walking-Primer können beliebige, der Sequenz des zielgerichteten Primers nicht verwandte Oligonucleotide sein. In den ersten PCR-Anläufen werden nur dann Produkte gebildet, wenn sich ein Walking-Primer an einen DNA-Strang anlagert, der an den Strang angrenzt und damit komplementär ist, mit dem der zielgerichtete Primer hybridisiert hat. Die PCR-Produkte von Interesse liegen vorzugsweise innerhalb des 5 Kilobasen-Größenbereichs. Amplifikationsprodukte werden noch mit 60% fehlgepaarten Nucleotiden innerhalb des Walking-Primers in bezug auf die DNA-Matrize gebildet. Eine perfekte Basenpaarung ist nur für die ersten beiden 3'-Nucleotide des Walking-Primers erforderlich, doch ansonsten wird partielle Homologie toleriert. Die Anlagerungstemperatur ist eine Schlüsselvariable beim Bestimmen der Zahl der PCR-Produkte, wie sie mit Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden.

[0231] Als nächstes wird ein Oligomer-Extensionstest mit einem „internen Detektionsprimer" ausgeführt. Dieser Primer stellt bekannte Sequenzen zwischen den beiden vorherigen Primern dar, die an den zielgertchteten Primer grenzen. Der interne Detektionsprimer wird mit und dann in einem einzigen PCR-Zyklus mit DNA aus der ersten PCR als Matrize angewendet. Diese Extension bestimmt Produkte aus der ersten PCR, die an den zielgertchteten Primer grenzen. Diese neuen Produkte werden durch Agarose-Gelelektrophorese und Autoradiographie bestimmt. Alle Produkte, die nicht mit dem internen Detektionsprimer hybridisieren, stellen nichtangrenzende Amplifikationsprodukte dar, die von irgendeiner Untergruppe der Primer gebildet wurden.

[0232] Zuletzt werden Banden, die im Oligomer-Extensionstest bestimmt wurden, aus dem Gel herausgeschnitten und durch Standard-PCR reamplifiziert, wobei der zielgerichtete Primer und Walking-Primer benützt werden, die die Bande anfangs gebildet haben. Diese neue PCR-Bande wird dann direkt sequenziert, um bisher unbekannte Sequenzinformation zu liefern.

[0233] Um die Information in die entgegengesetzte Richtung auszudehnen, werden Komplemente des zielgertchteten Primers und des internen Detektionsprimers hergestellt, und ihre Anordnung wird im Verfahren umgekehrt.

[0234] Bei der Ausführung des Absuchens durch Hybridisierung und der Clonierung sollte folgendes beachtet werden: Da es eine Degeneration im genetischen Code gibt, existiert für fast alle Aminosäuren (außer Tryptophan und Methionin) mehr als ein Codon. Darüberhinaus ist auch die Häufigkeit des Vorkommens eines bestimmten Codons bei Menschen und nicht-menschlichen Lebewesen verschieden. Die Oligonucleotide werden unter Berücksichtigung der Codondegeneration und der beim Menschen bevorzugten Codons synthetisiert. Darüberhinaus werden auch Oligonucleotide mit verschiedenen Permutationen von möglichen Codons synthetisiert. Um eine übermäßige Zahl zu vermeiden, müssen nicht alle möglichen Sequenzen synthetisiert werden, die sich aus der Degeneration des Codes ergeben. Vielmehr wird eine Untergruppe jener Codons gewählt, die mit größter Häufigkeit vorkommen.

[0235] Neue Rezeptorclone, die auf diese Weise erhalten werden, können durch Expression entweder in Oocyten oder in transfizierten Zelllinien auf ihre Funktion getestet werden. Transfizierte Zelllinien, die einen zellspezifischen Rezeptor anorganischer Ionen exprimieren, können dann ein Mittel des Hochdurchsatz-Absuchens für Moleküle darstellen, die spezifisch auf den Ionen-Erkennungsmechanismus von beispielsweise Osteoklasten oder juxtaglomerulären Zellen wirken.

[0236] In einem alternativen Verfahren kann der Calciumrezeptor durch Expression in Eukaryontenzellen cloniert werden. Beispielsweise kann eine cDNA-Bibliothek aus parathyroidaler mRNA hergestellt werden und in einen eukaryontischen Expressionsvektor wie pCDNA1 cloniert werden. Subpools aus dieser Bibliothek können in Eukaryontenzellen wie COS7 oder HEK293 transfiziert werden, was zu einer vorübergehenden Expression von codierten cDNA-Sequenzen auf relativ hohem Niveau führt. Die Zellen, die mit einem funktionierenden Calciumrezeptorclon transfiziert werden, werden den Calciumrezeptor exprimieren, der dann durch Calcium, Neomycin oder andere calcimimetische Verbindungen aktiviert werden kann. Wenn die Zellen zuerst mit einem fluorometrischen $[Ca^{2+}]_i$-Indikator beladen werden, führt die Aktivierung des Calciumrezeptors zu erhöhter Fluoreszenz. Somit werden Bibliotheks-Subpools, die den Calciumrezeptor enthalten, durch ihre Fähigkeit bestimmt, bei einer Transfektion in Eukaryontenzellen eine Calcium- oder Calcimimetikum-spezifische Zunahme der Fluoreszenz zu erzeugen. Diese Fluoreszenz kann entweder mit Hilfe eines Fluorometers oder eines Fluoreszenz aktivierten Zellsortierers (FACS) nachgewiesen werden.

[0237] Wir haben auch einen „Calciumfangtest" zum Nachweis von COS 7-Zellen entwickelt, die G-Protein gekoppelte Rezeptoren exprimieren. In diesem Test werden einzellige COS 7-Zellschichten mit cDNA-Clonen von einer parathyroidalen Rinder-cDNA-Bibliothek (z.B. Unterfraktionen oder Pools von einer in pCDNA1 hergestellten Bibliothek) transfiziert und auf ihre Fähigkeit getestet, als Reaktion auf eine Behandlung mit einem Agonisten des Ca^{2+}-Rezeptors radioaktives $^{45}Ca^{2+}$ einzufangen. Die Einzell-Schichten werden der Emulsions-Autoradiographie unterworfen, und die Zellen, die $^{45}Ca^{2+}$ eingefangen haben, werden durch das Vorhandensein von Ansammlungen photographischen Korns unter dem Dunkelfeldmikroskop identifiziert. Bibliothekspools, die ein positives Signal erzeugen, werden dann sequentiell unterteilt, bis eine einzelne cDNA identifiziert ist, die das Signal erzeugt.

[0238] Der Calciumrezeptor scheint funktionell mit einer Rezeptorklasse verwandt zu sein, die sogenannte „G"-Proteine benützt, um die Ligandenbindung an intrazelluläre Signale zu koppeln. Solche „G-gekoppelten" Rezeptoren können aufgrund der Stimulation von Adenylylcyclase durch ein rezeptoraktiviertes „G_s"-Protein eine Zunahme des intrazellulären zyklischen AMP oder aufgrund der Inhibition von Adenylylcyclase durch ein rezeptoraktiviertes „G_i"-Protein eine Abnahme des zyklischen AMP auslösen. Andere rezeptoraktivierte G-Proteine lösen Veränderungen des Inosittriphophatspiegels aus, die zu einer Ca^{2+}-Abgabe aus intrazellulären Vorräten führen. Dieser letztere Mechanismus gilt besonders für Calciumrezeptoren. Alle bekannten G-gekoppelten Rezeptoren sind strukturell verwandt und haben sieben konservierte Transmembrandomänen. Eine Anzahl solcher Rezeptoren wurde auf der Basis der Sequenzhomologie mit schon früher clonierten Rezeptoren cloniert. Eine besonders nützliche Vorgehensweise ist es, degenerierte Primerhomologe zu den konservierten Transmembrandomäne codierenden Regionen einzusetzen und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA-Regionen zu amplifizieren, die diese Sequenzen codieren. So werden solche Oligonucleotidprimer mit genomischer DNA oder cDNA zu RNA gemischt, die aus dem Gewebe der Wahl isoliert wurde, und die PCR wird ausgeführt. Es können einige Versuche erforderlich sein, um neue, G-gekoppelte Rezeptorsequenzen aus dem Gewebe der Wahl spezifisch zu amplifizieren, da diese nicht notwendigerweise mit schon bekannten G-gekoppelten Rezeptoren identisch sind, doch ist dies dem Fachmann wohlbekannt [vgl. zum Beispiel Buck, L. und Axel, R. (1991) Cell, 65:175–187].

[0239] Die Calciumrezeptoren können auch durch eine solche Vorgehensweise über PCR cloniert werden. Nachstehend werden zwei Beispiele degenerierter Oligonucleotidprimerpaare gegeben, die zur PCR-Amplifikation von Calciumrezeptoren codierenden Sequenzen benützt werden können. Das erste Paar basiert auf der Kreuzhomologie, die die Mehrzahl der G-gekoppelten Rezeptoren in den Sequenzen, die die Transmembrandomänen II bzw. VII codieren, aufweisen. Das zweite Primerpaar basiert auf der Kreuzhomologie, die eine divergentere Untergruppe von G-gekoppelten Rezeptoren, darunter Calcitonin, Secretin, PTH- und GLP-Rezeptoren, aufweist. Dieses Paar entspricht konservierten Sequenzen, die die Transmembrandomänen III und VII codieren. Werden eines oder beide dieser zwei Primerpaare mit cDNA aus beispielsweise parathyroidalem oder Osteoklastengewebe vermischt, so führt die PCR-Amplifikation zur Erzeugung von amplifizierten DNAs von ungefähr 500 bis 800 Basenpaaren. Diese DNAs können isoliert und auf das Vorhandensein von Calciumrezeptorsequenzen analysiert werden. Beispielsweise kann jede amplifizierte Sequenz als Sonde zum Isolieren eines cDNA-Clons voller Länge verwendet werden, der dann in einem oder mehreren der vorstehend angegebenen Tests darauf hin untersucht werden kann, ob er einen Rezeptor anorganischer Ionen codiert.

PRIMERPAAR 1

```
5'  GACTACTTCCTGGTGAACCTGGC  3'
    A   T    T  T C C   C
-------------------------------------------------
5'  TCAAIGAGCCIGTAGATGATGGGGTT  3'
     T C   AGG A  A AC CA  A
                   GC
```

PRIMERPAAR 2

```
5' AACTACTICTGGITGCTGGTGGAGGGCCTCTA  3'
                C        A  GG G
                T
-------------------------------------
5' GAAGCAGTAIATAATGGCAACAAAAAAGCCCTGGAA 3'
     A        G CA     G    GA
                       C     T
```

[0240] In einem alternativen Verfahren kann der Rezeptor anorganischer Ionen durch Verwendung eines mo-

noclonalen Antikörpers, der gegen den Rezeptor erzeugt wird, cloniert werden. Monoclonale Antikörper stellen mächtige Werkzeuge zur Immunaffinitätsreinigung spezifischer Proteine dar. Ist es einmal gereinigt, können vom Protein von Interesse begrenzte Aminosäwesequenzdaten gewonnen und dazu verwendet werden, Oligonucleotidsequenzsonden zu entwerfen, um damit nach Clones der vollständigen cDNA-Sequenz zu suchen.

[0241] Es wird ein Beispiel beschrieben, das einen Calciumrezeptor einbezieht. Für die Herstellung von Hybridomen werden ganze Nebenschilddrüsenzellen von Rindern als Immunogen verwendet. Man erhält gereinigte, dispergierte Zellen und lebende oder fixierte Zellpräparate werden einem geeigneten Mäusestamm gemäß den etablierten Verfahren intraperitoneal injiziert. Die Immunisierungspläne und die Erzeugung der Hybridome folgen Standardverfahren. Zur Bestimmung von Hybridomen, die monoclonale Antikörper absondern, welche den Ca^{2+}-Rezeptor erkennen, wird ein Absuchverfahren in zwei Schritten verwendet. Der erste Absuchschritt bestimmt diejenigen monoclonalen Antikörper, die Oberflächenantigene parathyroidaler Zellen erkennen. Sodann werden immunhistochemische Techniken zum Absuchen der Hybridomüberstände auf das Vorhandensein von Mäuseantikörpern benützt, die an die Oberfläche parathyroidaler Zellen binden. Dieser Absuchschritt kann an fixierten Schnitten von Nebenschilddrüsengewebe oder an dispergierten Zellen in Primärkulturen ausgeführt werden. Die Techniken für diesen Test sind in der Literatur wohl etabliert.

[0242] Dieses Absuchen bestimmt Hybridome, die monoclonale Antikörper gegen vielerlei Zelloberflächendeterminanten erzeugen, und man würde erwarten, daß die für den Ca^{2+}-Rezeptor spezifischen monoclonalen Antikörper nur eine kleine Untergruppe davon bilden. Um die monoclonalen Antikörper zu bestimmen, die an den Ca^{2+}-Rezeptor binden, werden Hybridomüberstände, die im ersten Absuchdurchgang als positiv getestet wurden, auf ihre Fähigkeit überprüft, die Reaktion gezüchteter parathyroidaler Zellen auf Ca^{2+}-Rezeptor-Agonisten zu blockieren. Es ist zu erwarten, daß einige Antikörper, die an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden, die Ligandenbindung inhibieren oder aktivieren, oder auf andere Weise die Rezeptoraktivierung beeinträchtigen oder diese beeinflussen.

[0243] Monoclonale Antikörper, die in beiden Absuchdurchgängen als positiv getestet wurden, werden durch Western-Blot-Test, Immunfällung und Immunhistochemie charakterisiert. Dies erlaubt die Bestimmung der Größe des erkannten Antigens und dessen Gewebeverteilung. Dann wird der geeignete monoclonale Antikörper für die Reinigung des Ca^{2+}-Rezeptorproteins durch Immunaffinitätschromatographie nach Standardtechniken benützt. Es werden ausreichende Proteinmengen gewonnen, um eine begrenzte Aminosäuresequenzbestimmung zu erlauben. Dann werden auf der Basis der Peptidsequenzinformation degenerierte Oligonucleotidsonden entworfen. Diese Sonden werden dann zum Absuchen von cDNA-Bibliotheken aus Nebenschilddrüsen nach Ca^{2+}-Rezeptorclonen von voller Länge benützt. Die erhaltenen Clone werden durch DNA-Sequenzierung und durch funktionelle Expression im Oocytensystem und in gezüchteten Säugerzellinien charakterisiert.

[0244] Alternativ können die Antikörper dazu verwendet werden, Expressionsbibliotheken abzusuchen, z.B. cDNA-Bibliotheken in λgt11 oder dessen Äquivalent, um jene Clone zu bestimmen, die ein antigenreaktives Protein exprimieren. Solche Clone können dann sequenziert werden, um zu bestimmen, ob sie ein Protein codieren, das ein Ca^{2+}-Rezeptor sein könnte.

[0245] Der Fachmann wird auch erkennen, daß zum Clonieren und Analysieren von Calciumrezeptoren anstelle von monoclonalen Antikörpern Phagendisplaybibliotheken verwendet werden können. In diesen Bibliotheken werden antikörpervariable Regionen oder Zufallspeptide nach dem Schrotschußprinzip in Phagenexpressionsvektoren cloniert, so daß die Antikörperregionen oder Peptide auf der Oberfläche des Phagenpartikels dargeboten werden, Der/die Phage(n), der/die Antikörperregionen oder Peptide darbietet/darbieten, die zu hochspezifischer Bindung an Calciumrezeptoren in der Lage sind, wird/werden an Zellen binden, die diese Rezeptoren darbieten (z.B. parathyroidale Zellen, C-Zellen, Osteoklasten usw.). Hunderte von Millionen solcher Phagen können einem Panning-Verfahren gegen diese Zelltypen unterzogen werden, und es können vorzugsweise jene Phagen selektiert werden, die an diese Zellen binden können (was die Bindung solcher Phagen an Calciumrezeptoren einschließt). Auf diese An und Weise kann die Komplexität der Bibliothek stark reduziert werden. Die mehrmalige Wiederholung dieses Vorgangs ergibt einen Pool von Phagen, die an den verwendeten Zelltyp binden. Anschließend können die vorstehend für monoclonale Antikörper beschriebenen Absuchvorgänge dazu verwendet werden, Phagen zu isolieren, die Calciumrezeptor bindende Antikörper- oder Peptidregionen aufweisen, und diese Phagen können dazu verwendet werden, den Calciumrezeptor für Strukturbestimmungs- und Clonierungszwecke zu isolieren. Kits zur Herstellung solcher Phagendisplaybibliotheken sind im Handel erhältlich (z.B. Stratacyte oder Cambridge Antibody Technology Limited). Rekombinante Phagen, die mit solchen Calciumrezeptor bindenden Eigenschaften ausgestattet sind, können auch anstelle von monoclonalen Antikörpern in den verschiedenen Analysen von Calciumrezeptoren verwendet werden. Solche

Phagen können auch in Bindungskompetitions-Absuchverfahren mit hohem Durchsatz angewandt werden, um organische Verbindungen zu bestimmen, die in der Lage sind, funktionell an Calciumrezeptoren zu binden, die als Strukturhinweise für die Entwicklung von Therapeutika für den Menschen, die am Calciumrezeptor wirken, dienen können.

[0246] Als eine andere Alternative kann die Affinitäts-Querverbindung von Radioliganden mit ihren Rezeptoren dazu verwendet werden, das Rezeptorprotein, wie von Pilch & Czech, 1 Receptor Biochem. Methodol. 161, 1984 beschrieben, zu isolieren. Die kovalente Anbindung der Radioliganden erlaubt gründliches Waschen zum Entfernen der nichtspezifischen Bindung. Beispielsweise wird ein hochaffines Molekül, z.B. ein Zufallscopolymer von Arginin und Tyrosin (MG = 22K; Argtyr-Verhältnis = 4 : 1), das intrazelluläres Ca^{2+} mit einem EC_{50}-Wert von ungefähr 100 nM oder weniger mobilisiert, mit ^{125}I jodiert und querverbunden. Protamine können wegen ihrer viel geringeren Größe in Querverbindungsstudien zu bevorzugen sein und sie können, wie von Dottavio-Martin & Ravel, 87 Analyt. Biochem. 562, 1978 beschrieben, reduktiv alkyliert werden.

[0247] Die nichtspezifische Markierung wird durch Querverbindung in Gegenwart nichtmarkierter Polykationen und zwei- oder dreiwertiger Kationen auf ein Minimum beschränkt. Bei hohen Konzentrationen dieser Moleküle könnten die nichtspezifischen Wechselwirkungen des Markers mit der Zelloberfläche verringert sein.

[0248] Die Erfindung liefert isolierte Nucleinsäuresequenzen, die Rezeptoren anorganischer Ionen codieren, und die isolierten Rezeptoren selbst. Sie liefert auch einzigartige Fragmente der Vorstehenden. Der Begriff „isoliert" betrifft eine Nucleinsäuresequenz, die: (i) in vitro durch beispielsweise Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert; (ii) durch beispielsweise chemische Synthese synthetisiert; (iii) durch Clonieren rekombinant erzeugt; oder (iv) etwa durch Spaltung und Gelauftrennung gereinigt wird. Wenn er in Beschreibungen von Polypeptiden oder Aminosäuresequenzen benützt wird, betrifft der Begriff „isoliert" Polypeptide, die aus einem Expressionssystem stammen, das die isolierten Nucleinsäuresequenzen der Erfindung sowie Polypeptide benützt, die beispielsweise durch chemische Syntheseverfahren synthetisiert werden, und Polypeptide, die von nativen biologischen Materialien abgetrennt und dann mit konventionellen Proteinanalyseverfahren erheblich gereinigt wurden.

[0249] Ebenfalls innerhalb des Schutzbereiches dieser Erfindung sind einzigartige Fragmente von Rezeptoren anorganischer Ionen. Der Begriff einzigartige Fragmente betrifft Abschnitte des Rezeptors, für die zum Datum dieser Erfindung kein Gegenstück unter bekannten Sequenzen gefunden wurde. Diese Polypeptidfragmente können leicht als einzigartig identifiziert werden, indem zum Zeitpunkt dieser Erfindung bekannte Protein-Datenbanken nach identischen Peptiden abgesucht werden. Zusätzlich zur Erzeugung von Rezeptorfragmenten aus der Expression von klonierten partiellen Sequenzen von Rezeptor-DNA können Fragmente auch direkt aus dem intakten Protein erzeugt werden. Proteine werden spezifisch durch proteolytische Enzyme, darunter Trypsin, Chymotrypsin oder Pepsin, aber nicht nur diese gespaltet. Jedes dieser Enzyme ist für den Typ von Peptidbindung, den es angreift, spezifisch. Trypsin katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen, deren Carbonylgruppe von einer basischen Aminosäure, gewöhnlich Arginin oder Lysin stammt. Pepsin und Chymotrypsin katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen von aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Durch Verhinderung der Spaltung an einer Stelle, die für ein proteolytisches Enzym zugänglich ist, werden abwechselnde Sätze gespalteter Polypeptidfragmente erzeugt. Beispielsweise ergibt die Reaktion der ε-Aminogruppen von Lysin mit Ethyltrifluorthioacetat in schwach basischer Lösung einen blockierten Aminosäurerest, dessen angrenzende Peptidbindung nicht mehr für die Hydrolyse durch Trypsin zugänglich ist. Goldberger et al., Biochem., 1:401 (1962). Die Behandlung eines solchen Polypeptids mit Trypsin spaltet somit nur an den Arginylresten. Die Polypeptide können auch modifiziert und so Peptidverkettungen geschaffen werden, die für die durch proteolytische Enzyme katalysierte Hydrolyse zugänglich sind. Beispielsweise ergibt die Alkylierung von Cysteinresten mit β-Haloethylamin Peptidverkettungen, die durch Trypsin hydrolysiert werden. Lindley, Nature, 178: 647 (1956). Ferner können chemische Reagenzien benützt werden, die Polypeptidketten an spezifischen Resten spalten. Witcop, Adv. Protein Chem. 16: 221 (1961). Zum Beispiel spaltet Bromcyan Polypeptide an Methioninresten. Gross & Witkip, J. Am Chem Soc., 83: 1510 (1961). Somit werden durch Behandlung eines Rezeptors anorganischer Ionen wie zum Beispiel eines menschlichen Calciumrezeptors oder Fragmenten davon mit verschiedenen Kombinationen von modifizierenden Molekülen, proteolytischen Enzymen und/oder chemischen Reagenzien zahlreiche getrennte überlappende Peptide von unterschiedlichen Größen erzeugt. Diese Peptidfragmente können aus solchen Aufspaltungen durch chromatographische Verfahren isoliert und gereinigt werden.

[0250] Alternativ können Fragmente mit Hilfe eines geeigneten Festzustand-Syntheseverfahrens synthetisiert werden. Steward und Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Freemantle, San Francisco, CA (1968).

[0251] Die Fragmente können für Tests, als Ionenbindungsmittel, zur Herstellung von Antikörpern und dergleichen verwendet werden. Die Fragmente können auch auf erwünschte biologische Wirkungen ausgewählt werden. Beispielsweise kann das Fragment nur die Bindungsstelle beinhalten, oder eine Stelle, die an Agonisten oder Antagonisten (z.B. von Calcium) bindet, wie hier beschrieben. Solche Fragmente lassen sich leicht vom Durchschnittsfachmann mittels Routineverfahren zur Feststellung spezifischer Bindung an das Fragment bestimmen. Im Fall eines Calciumrezeptors zum Beispiel kann ein zu testendes Fragment mit Hilfe rekombinanter DNA-Methodik von einem Fragment des den rekombinanten Rezeptor codierenden Gens exprimiert werden. Dieses Fragment wird dann unter geeigneten Assoziationsbedingungen mit Calcium oder einer anderen Chemikalie in Kontakt gebracht, um zu bestimmen, ob das Calcium an das Fragment bindet. Diese Fragmente sind nützlich bei Absuchtests auf Agonisten und Antagonisten von Calcium und auf eine therapeutische Wirkung, bei der es nützlich ist, Calcium aus dem Serum oder anderen Körpergeweben zu entfernen.

[0252] Andere nützliche Fragmente beinhalten jene, die nur den äußeren Abschnitt, den membranspannenden Abschnitt oder den inneren Abschnitt des Rezeptors haben. Diese Abschnitte sind leicht durch Vergleich der Aminosäuresequenz des Rezeptors mit jenen bekannter Rezeptoren oder durch andere Standardverfahren bestimmbar. Diese Fragmente sind nützlich zur Bildung chimärer Rezeptoren mit Fragmenten anderer Rezeptoren, so daß eine Zelle, der ein Rezeptor fehlt, mit einem intrazellulären Abschnitt gebildet werden kann, der eine gewünschte Funktion innerhalb dieser Zelle ausführt, und mit einem extrazellulären Abschnitt, der diese Zelle auf die Gegenwart von Ionen oder die hier beschriebenen Agonisten oder Antagonisten reagieren läßt. Solche chimären Rezeptorgene stellen bei geeigneter Formulierung nützliche Gentherapien für eine Vielzahl von Krankheiten dar, die eine Dysfunktion von Rezeptoren beinhalten, oder bei denen die Modulation der Rezeptorfunktion eine wünschenswerte Wirkung auf den Patienten hat. Ferner können chimäre Rezeptoren so konstruiert werden, daß die intrazelluläre Domäne an einen gewünschten enzymatischen Vorgang gekoppelt wird, der leicht durch kolorimetrische, radiometrische, luminometrische, spektrophotometrische oder fluorometrische Tests festgestellt werden kann und durch die Wechselwirkung des extrazellulären Abschnitts mit seinem nativen Liganden (z.B. Calcium) oder Agonisten und/oder Antagonisten der Erfindung aktiviert werden kann. Zellen, die solche chimären Rezeptoren exprimieren, sind die Basis für erleichterte Absuchvorgänge zur Entdeckung neuer Agonisten und/oder Antagonisten der Erfindung.

[0253] Die Erfindung liefert auch Muteine oder Analoga und andere Abkömmlinge von isolierten Rezeptoren, wie hier beschrieben. Somit umfaßt die Erfindung nicht nur natürlich vorkommende Proteine, sondern auch solche Abkömmlinge. Solche Abkömmlinge haben die gewünschte, hier beschriebene Rezeptoraktivität und werden im Allgemeinen durch die hier beschriebenen Verfahren bestimmt. Wenngleich Beispiele solcher Proteine und der sie codierenden Gene gebracht werden, schränken diese Beispiele die Erfindung nicht ein, sondern demonstrieren lediglich die Variation, die mit solchen Genen und Proteinen verbunden sein kann. Im Allgemeinen wird das Gen die Amiosäuresequenz des nativen Rezeptors haben, doch kann es an einer oder mehreren Aminosäurepositionen, die die Rezeptoraktivität des hergestellten Rezeptorproteins nicht signifikant beeinträchtigen, geändert werden. So können in nichtkonservierten Regionen des Calciumrezeptorproteins (d.h. jenen Regionen, die für eine Rezeptoraktivität nicht nötig sind) Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder substituiert werden. In stärker konservierten Regionen, die für eine Rezeptoraktivität erforderlich sind, können die Aminosäuren konservativer substituiert sein. Beispielsweise können ein oder mehrere Aminosäurereste innerhalb der Sequenz durch eine andere Aminosäure ähnlicher Polarität, die als Funktionsäquivalent wirkt, substituiert sein. Substitute für eine Aminosäure innerhalb der Sequenz können aus anderen Angehörigen der Klasse, zu der die Aminosäure gehört, ausgewählt werden. Zu den nichtpolaren (hydrophoben) Aminosäuren zählen Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin. Zu den polaren neutralen Aminosäuren zählen Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin und Glutamin. Zu den positiv geladenen (basischen) Aminosäuren zählen Arginin, Lysin und Histidin. Zu den negativ geladenen (sauren) Aminosäuren zählen Asparaginsäure und Glutaminsäure.

[0254] Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, daß zur Bestimmung der konservierten und nichtkonservierten Proteinregionen Standardverfahren, die in vitro-Mutagenesetechniken oder Deletionsanalysen nützen, angewandt werden können und daß alle solche Ableitungen den nachstehend beschriebenen gleichwertig sind.

[0255] Ebenfalls innerhalb des Schutzbereiches der Erfindung sind Rezeptorproteine oder einzigartige Fragmente oder Derivate davon, die während oder nach der Translation unterschiedlich modifiziert werden, z.B. durch Phosphorylierung, Glycosylierung, Querverbindung, Acylierung, proteolytische Spaltung, Bindung an ein Antikörpermolekül, Membranmolekül oder einen anderen Liganden (Ferguson et al., 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:285–320).

[0256] Ferner können rekombinante Nucleinsäuresequenzen der Erfindung so verändert werden, daß die Prozessierung oder Expression von Rezeptorsequenzen modifiziert wird. Zum Beispiel und nicht in der Absicht einer Einschränkung des Schutzbereichs der Erfindung, kann die codierende Sequenz unter Anwendung gut charakterisierter Verfahren mit einer Promotorsequenz und/oder einer Ribosomenbindungsstelle verbunden und dadurch die Expression und Bioverfügbarkeit verbessert werden.

[0257] Ferner kann eine gegebene rekombinante codierende Sequenz in vitro oder in vivo mutiert werden und so können Variationen in den codierenden Regionen geschaffen und/oder neue Restriktionsendonucleasenstellen gebildet oder bestehende zerstört werden, um eine weitere in vitro-Modifizierung zu erleichtern. Es kann jede auf dem Fachgebiet bekannte Mutagenesetechnik verwendet werden, einschließlich ortsgerichteter in vitro-Mutagenese (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), Anwendung von TAB®-Linkern (Pharmacia), PCR-gerichteter Mutagenese und dergleichen, jedoch nicht nur diese.

[0258] Ferner können Codons so modifiziert werden, daß sie zwar eine identische Aminosäure codieren, im gewählten Expressionssystem aber ein bevorzugtes Codon sind.

[0259] Die Erfindung liefert auch einzigartige Fragmente von Nucleinsäuren, die einen Rezeptor anorganischer Ionen codieren. Der Begriff „einzigartige Fragmente" betrifft Abschnitte der Nucleinsäure, für die sich zum Datum dieser Erfindung kein identisches Gegenstück in bekannten Sequenzen findet. Diese Fragmente können leicht durch eine Analyse der zum Datum der Erfindung existierenden Nucleinsäure-Datenbanken bestimmt werden, um Gegenstücke festzustellen. Einzigartige Fragmente sind unter anderem in Clonierungsverfahren und Tests nützlich.

[0260] Die Erfindung liefert ferner Rezeptoren bindende Mittel einschließlich Antikörper und/oder Fragmente davon, die an eine Toxineinheit konjugiert oder zusammen mit einer Toxineinheit als rekombinantes Fusionsprotein exprimiert werden können. Die Toxineinheit bindet an eine Zielzelle und dringt in diese ein, indem sie die Wechselwirkung des Bindemittels und des entsprechenden Zielzellen-Oberflächenrezeptors ausnützt. Die toxische Einheit, an die das Mittel, der Antikörper und/oder das Fragment konjugiert wird, kann ein Protein wie zum Beispiel antivirales Kermesbeerenprotein, Ricin, Gelonin, Abrin, Diphterie-Exotoxin oder Pseudomonas-Exotoxin sein. Die Toxineinheit kann auch ein Hochenergieemittierendes Radionuklid wie Kobalt-60 sein. Die chemische Struktur der Toxineinheit soll den Schutzbereich der Erfindung in keiner Weise einschränken. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, daß eine große Vielfalt möglicher Einheiten an die Bindemittel gebunden werden kann. Vgl. beispielsweise „Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Cruse und R.E. Lewis Jr. (Hrsg.), Carger Press, New York, (1989). Es ist ferner auf dem Fachgebiet allgemein anerkannt, daß viele Toxineinheiten, einschließlich der vorstehend ausdrücklich aufgeführten, als pharmazeutisch verträglich angesehen werden.

[0261] Die Konjugation des Bindungsmittels an eine andere Einheit (z.B. ein bakterielles Toxin) kann durch jede chemische Reaktion erreicht werden, die die beiden Moleküle bindet, so lange beide Moleküle dabei ihre jeweilige Wirkung beibehalten. Diese Verbindung kann viele chemische Mechanismen beinhalten, zum Beispiel kovalente Bindung, Affinitätsbindung, Interkalation, koordinative Bindung und Koplexierung. Die bevorzugte Bindung ist jedoch die kovalente Bindung. Die kovalente Bindung kann entweder durch direkte Kondensation vorhandener Seitenketten oder durch den Einbau externer Brückenmoleküle erreicht werden. Viele zweiwertige oder mehrwertige Verbindungsmittel sind zum Koppeln von Proteinmolekülen wie eines Antikörpers an andere Moleküle nützlich. Beispielsweise können stellvertretend für Kuppelungsmittel organische Verbindungen wie Thioester, Carbodiimide, Succinimidester, Diisocyanate, Glutaraldehyde, Diazobenzole und Hexamethyldiamine genannt werden. Diese Auflistung soll nicht erschöpfend für die verschiedenen Klassen von Kuppelungsmitteln sein, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, sondern vielmehr beispielhaft für die üblicheren Kuppelungsmittel sein (vgl. Killen und Lindstom 1984, „Specific killing of lymhocytes that cause experimental Autoimmune Myasthenia Gravis by toxin-acetylcholine receptor conjugates" Jour. Immun. 133:1335–2549; Jansen, F.K., H.E. Blythman, D. Carriere, P. Casella, O. Gros, P. Gros, J.C. Laurent, F. Paolucci, B. Pau, P. Poncelet, G. Richer, H. Vidal., und G.A. Voisin. 1982. „Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity". Immunological Reviews 62:185–216; und Vitetta et al., vorst.).

[0262] Durch Verwendung rekombinanter DNA-Techniken liefert die vorliegende Erfindung Zielzellen, einschließlich Säuger-Zielzellen, die so verändert sind, daß sie Rezeptoren anorganischer Ionen exprimieren. Zum Beispiel können die nach den vorstehend dargelegten Verfahren clonierten Gene für solche Rezeptoren in Zellen inseriert werden, die die Rezeptoren natürlicherweise exprimieren, so daß das rekombinante Gen auf wesentlich höherem Spiegel exprimiert wird.

[0263] Die vorliegende Erfindung erlaubt es auch, ein experimentelles Modellsystem zum Studium der physiologischen Rolle der Rezeptoren zu liefern. In diesen Modellsystemen können die Rezeptoren anorganischer Ionen, Fragmente oder Abkömmlinge davon entweder dem System zugeführt oder innerhalb des Systems hergestellt werden. Solche Modellsysteme könnten dazu verwendet werden, die Wirkungen oder die Zellfunktion von Rezeptorüberschuß oder -entzug zu studieren. Die experimentellen Modellsysteme können dazu verwendet werden, die Wirkungen in Zellen oder Gewebekulturen, in ganzen Tieren oder in bestimmten Zellen oder Geweben innerhalb von ganzen Tieren oder von Gewebekultursystemen oder über spezifizierte Zeitintervalle (einschließlich der Embryogenese) zu studieren. Eine bevorzugte Ausführungsform sind Tests, die den clonierten Rezeptor oder Teile davon beinhalten, einschließlich besonders jener, die in Hochdurchsatz-Absuchtests auf Arzneistoffe nützlich sind.

[0264] Ein rekombinantes Gen der Erfindung kann dazu verwendet werden, das endogene Gen durch homologe Rekombination zu inaktivieren und damit eine Zelle, ein Gewebe oder ein Tier zu erzeugen, der bzw. dem ein Rezeptor anorganischer Ionen fehlt. Zum Beispiel, und nicht in der Absicht einer Einschränkung des Schutzbereichs der Erfindung, kann ein rekombinantes Gen so verändert werden, daß es eine Insertionsmutation (z.B. das neo-Gen) enthält, die bei Insertion in das Genom einer Empfängerzelle, eines Empfängergewebes oder eines Empfängertieres die Transkription des Rezeptors inaktiviert. Ein solches Konstrukt kann durch eine Technik wie Transfektion, Transduktion, Injektion usw. in eine Zelle wie eine embryonale Stammelle eingeschleust werden. Stammzellen, denen eine intakte Rezeptorsequenz fehlt, können transgene Tiere hervorbringen, denen der Rezeptor fehlt.

[0265] Ein „transgenes Tier" ist ein Tier, das Zellen hat, die DNA enthalten, die künstlich in eine Zelle inseriert wurde, wobei die DNA zu einem Teil des Genoms des Tieres wird, das sich aus jener Zelle entwickelt. Bevorzugte transgene Tiere sind Primaten, Mäuse, Ratten, Kühe, Schweine, Pferde, Ziegen, Schafe, Hunde und Katzen. Die transgene DNA kann menschliche Rezeptoren anorganischer Ionen codieren. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die native Expression in einem Tier verringert werden, indem eine Menge Anti-Sense-RNA oder DNA geliefert wird, die eine Verringerung der Expression des Rezeptors bewirkt.

[0266] Zur Erzeugung der mit dieser Erfindung verbundenen transgenen Tiere sind vielerlei Verfahren verfügbar. DNA kann vor der Fusion der männlichen und der weiblichen Pronuclei in den Pronucleus einer befruchteten Eizelle injiziert werden oder nach dem Beginn der Zellteilung in den Zellkern einer embryonalen Zelle (z.B. in den Zellkern eines Zweizellen-Embryos) injiziert werden (Brinster et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82: 4438–4442 (1985)). Embryonen können mit Viren, insbesondere Retroviren infiziert werden, die so modifiziert wurden, daß sie Nucleotidsequenzen von Rezeptoren anorganischer Ionen der Erfindung tragen.

[0267] Pluripotente Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse des Embryos stammen und in Kultur stabilisiert sind, können in Kultur manipuliert werden, so daß sie die Nucleotidsequenzen der Erfindung einbauen. Aus solchen Zellen kann durch Implantation in eine Blastocyste, die einer Leihmutter eingesetzt und von dieser ausgetragen wird, ein transgenes Tier erzeugt werden.

[0268] Für transgene Versuche geeignete Tiere können von üblichen Handelsquellen bezogen werden, wie Charles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY), Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN) usw.

[0269] Die Vorgehensweisen zur Manipulation der Nagerembryonen und zur Mikroinjektion von DNA in den Pronucleus der Zygote sind dem Durchschnittsfachmann wohlbekannt (Hogan et al., vorst.). Mikroinjektionsverfahren für Fische, Amphibieneier und Vögel sind bei Houdebine und Chourrout, Experientia, 47: 897–905 (1991) detailliert beschrieben. Andere Vorgehensweisen zum Einschleusen von DNA in Gewebe von Tieren sind in U.S.-Patent Nr. 4,945,050 (Sandford et al., 30. Juli 1990) beschrieben.

[0270] Um lediglich ein Beispiel zu geben: Zur Herstellung einer transgenen Maus wird bei weiblichen Mäusen Superovulation ausgelöst. Weibchen und Männchen werden zusammengebracht, die begatteten Weibchen durch CO_2-Ersticken oder Halsverrenken getötet, und die Embryonen aus den freipräparierten Eileitern gewonnen. Umgebende Cumuluszellen werden entfernt. Die pronucleären Embryonen werden dann gewaschen und bis zum Zeitpunkt der Injektion gelagert. Adulte weibliche Mäuse in einem zufälligen Zyklus werden mit vasektomierten Männchen gepaart. Empfängerweibchen und Spenderweibchen werden zum gleichen Zeitpunkt gepaart. Die Embryonen werden dann chirurgisch transferiert.

[0271] Die Vorgehensweise zur Erzeugung transgener Ratten ähnelt der zur Erzeugung von Mäusen. Vgl. Hammer et al., Cell, 63:1099–1112 (1990).

[0272] Verfahren zur Züchtung von embryonalen Stammzellen (ES) und die nachfolgende Herstellung transgener Tiere durch die Einschleusung von DNA in ES-Zellen mittels Verfahren wie Elektroporation, Calciumphosphat/DNA-Fällung und direkte Injektion in die Zelle sind Durchschnittsfachleuten ebenfalls wohlbekannt. Vgl. z.B. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach, Hrsg. E.J. Robertson, IRL Press (1987).

[0273] In Fällen, die eine zufällige Genintegration beinhalten, wird ein Clon, der die Sequenzen) der Erfindung enthält, mit einem resistenzcodierenden Gen co-transfiziert. Alternativ wird das Neomycinresistenz codierende Gen physisch an die Sequenzen) der Erfindung gebunden. Die Transfektion und Isolation der gewünschten Clone werden mit jedem beliebigen von mehreren Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann wohlbekannt sind, ausgeführt (E.J. Robertson, vorst.).

[0274] In ES-Zellen eingeschleuste DNA-Moleküle können auch durch den Vorgang der homologen Rekombinaton in das Chromosom integriert werden. Capecchi, Science, 244: 1288-1292 (1989). Verfahren zur positiven Selektion des Rekombinationsereignisses (z.B. neo-Resistenz) und duale positive-negative Selektion (d.h. neo-Resistenz und Gancyclovir-Resistenz) und die anschließende Bestimmung des gewünschten Clons mittels PCR sind von Capecchi, vorst. und Joyner et al., Nature, 338: 153–156 (1989) beschrieben worden, deren Lehren hier durch Bezugnahme eingeschlossen sind. Die Schlußphase der Vorgehensweise besteht darin, ES-Zellen in Blastocysten zu injizieren und die Blastocysten in scheinträchtige Weibchen zu transferieren. Die so erhaltenen chimären Tiere werden aufgezogen und ihre Nachkommenschaft mit dem Southern-Blot-Verfahren untersucht, um die Individuen zu bestimmen, die das Transgen enthalten.

[0275] Vorgehensweisen zur Herstellung von Säugern, die keine Nager sind und anderen Tieren wurden von anderen diskutiert. Vgl. Houdebine und Chourrout, vorst.; Pursel et al., Science 244: 1281–1288 (1989); und Simms et al. Bio/Technology, 6: 179–183 (1988).

Anwendungen

[0276] Primärer Hyperparathyroidismus (HPT) ist durch Hypercalcämie und hohe Spiegel an zirkulierendem PTH gekennzeichnet. Einer der Hauptdefekte bei HPT scheint eine verringerte Sensitivität der parathyroidalen Zellen für die negative Rückkoppelungs-Regulierung durch extrazelluläres Ca^{2+} zu sein. So ist im Gewebe von Patienten mit primärem HPT der „Sollwert" für extrazelluläres Ca^{2+} nach rechts verschoben, so daß höhere als die normalen Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} erforderlich sind, um die PTH-Sekretion abzusenken. Darüberhinaus senken bei primärem HPT selbst hohe Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} die PTH-Sekretion oft nur teilweise ab. Bei sekundärem (urämischem) HPT beobachtet man einen ähnlichen Anstieg des Sollwertes für extrazelluläres Ca^{2+}, obwohl der Grad, bis zu dem Ca^{2+} die PTH-Sekretion absenkt, normal ist. Die Veränderungen der PTH-Sekretion gehen mit Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ einher: der Sollwert der von extrazellulärem Ca^{2+} induzierten Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ wird nach rechts verschoben, und das Ausmaß dieser Zunahme verringert. Ferner wird die Färbung von Gewebe mit einem monoclonalen Antikörper, der den Ca^{2+}-Rezeptor zu erkennen scheint, in adenomatösen und hyperplastischen parathyroidalen Zellen verringert.

[0277] Der Ca^{2+}-Rezeptor stellt eine diskrete molekulare Einheit für pharmakologische Eingriffe dar. Moleküle, die die Wirkung des extrazellulären Ca^{2+} nachahmen oder antagonisieren, sind für die Langzeitbehandlung von sowohl primärem als auch sekundärem HPT vorteilhaft. Solche Moleküle liefern den zusätzlichen Antrieb, der erforderlich ist, um die PTH-Sekretion abzusenken, was der hypercalcämische Zustand allein nicht leisten kann. Solche Moleküle mit größerer Wirksamkeit als extrazelluläres Ca^{2+} können die scheinbar nicht unterdrückbare Komponente der PTH-Sekretion, die besonders bei adenomatösem Gewebe problematisch ist, überwinden. Alternativ oder zusätzlich können solche Moleküle die Synthese von PTH absenken, da gezeigt wurde, daß langandauernde Hypercalcämie den Spiegel von präproPTHmRNA in adenomatösem parathyroidalem Gewebe von Rindern und Menschen absenkt. Langandauernde Hypercalcämie senkt auch die Vermehrung der parathyroidalen Zellen in vitro ab, so daß Calcimimetika auch zur Begrenzung der für sekundären HPT charakteristischen Hyperplasie der parathyroidalen Zellen wirksam sein kann.

[0278] Andere Zellen des Körpers können direkt auf die physiologischen Veränderungen der Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} reagieren. Die Calcitoninsekretion aus den parafollikulären Zellen der Schilddrüse (C-Zellen) wird durch Veränderungen der Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} reguliert. Die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen der Nieren wird wie die PTH-Sekretion durch erhöhte Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} abgesenkt. Extrazelluläres Ca^{2+} verursacht die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in diesen Zellen. Andere Nierenzellen reagieren folgendermaßen auf Ca^{2+}: Erhöhtes Ca^{2+} hemmt die Bildung von $1,25(OH)_2$-Vitamin D durch proximale tubuläre Zellen, stimuliert die Produktion von calciumbindendem Protein

in distalen tubulären Zellen und inhibiert die tubuläre Reabsorption von Ca^{2+} und Mg^{2+} und die Wirkungen von Vasopressin auf den medullären, dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (MTAL), verringert die Vasopressinwirkung in Zellen des corticalen Sammelganges und beeinflußt die vaskulären glatten Muskelzellen in den Blutgefäßen des Nieren-Glomerulus. Calcium fördert die Differenzierung der Becherzellen des Darms, der Brustzellen und der Hautzellen. Es inhibiert auch die Sekretion der natriuretischen Vorhofpeptide aus den Herzvorhöfen, verringert die cAMP-Akkumulation in Thrombocyten, verändert die Gastrin- und Glucagon-Sekretion und wirkt bei vaskulären glatten Muskelzellen in Richtung auf eine Veränderung der Zellsekretion vasoaktiver Faktoren. Einzelne Osteoklasten reagieren auf eine Erhöhung der Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} mit entsprechenden Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$, die teilweise von der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} herrühren. Die Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in Osteoklasten gehen mit einer Inhibition der funktionellen Reaktionen (Knochenresorption) analog der PTH-Sekretion in parathyroidalen Zellen einher. Die Freisetzung von alkalischer Phosphatase aus knochenbildenden Osteoklasten wird durch Calcium direkt stimuliert. Somit gibt es genügend Hinweise, die die Annahme nahelegen, daß Ca^{2+} zusätzlich zu seiner allgegenwärtigen Rolle als intrazelluläres Signal auch als extrazelluläres Signal fungiert und so die Reaktionen bestimmter spezialisierter Zellen reguliert. Moleküle dieser Erfindung können zur Behandlung von Krankheiten, die mit unterbrochenen Ca^{2+}-Reaktionen in diesen Zellen verbunden sind, benützt werden.

[0279] Das Clonieren des Ca^{2+}-Rezeptors auf parathyroidalen und auf anderen Zellen wird es erlauben, das Vorliegen homologer Proteine in anderen Zellen direkt festzustellen. Somit kann eine Familie strukturell homologer Ca^{2+}-Rezeptorproteine erhalten werden. Solche Rezeptoren werden es erlauben, zu verstehen, wie diese Zellen extrazelluläres Ca^{2+} feststellen, und sie werden ein Verständnis des Wirkungsmechanismus/der Wirkungsmechanismen der hier beschriebenen Therapeutika zur Behandlung von HPT, Osteoporose und Bluthochdruck und neue Therapien für andere, die Knochen und Mineralien betreffende Krankheiten erlauben.

[0280] Andere Anwendungen sind vorstehend besprochen. Beispielswiese können rekombinante Ca^{2+}-Rezeptorproteine bei der Therapie angewandt und durch Standardverfahren, z.B. Transfektion der das betreffende Protein codierenden Nucleinsäure eingeschleust werden. Zusätzlich ist ein solches Protein in Tests auf calcimimetische Moleküle dieser Erfindung nützlich.

[0281] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, schränken ihren Schutzbereich aber nicht ein.

[0282] Verfahren zur Züchtung von embryonalen Stammzellen (ES) und die nachfolgende Herstellung transgener Tiere durch die Einschleusung von DNA in ES-Zellen mittels Verfahren wie Elektroporation, Calciumphosphat/DNA-Fällung und direkte Injektion in die Zelle sind Durchschnittsfachleuten ebenfalls wohlbekannt. Vgl. z.B. Teratocarcinomas and Embryonic Stein Cells, A Practical Approach, Hrsg. E.J. Robertson, IRL Press (1987).

[0283] In Fällen, die eine zufällige Genintegration beinhalten, wird ein Clon, der die Sequenzen) der Erfindung enthält, mit einem resistenzcodierenden Gen co-transfiziert. Alternativ wird das Neomycinresistenz codierende Gen physisch an die Sequenzen) der Erfindung gebunden. Die Transfektion und Isolation der gewünschten Clone werden mit jedem beliebigen von mehreren Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann wohlbekannt sind, ausgeführt (E.J. Robertson, vorst.).

[0284] In ES-Zellen eingeschleuste DNA-Moleküle können auch durch den Vorgang der homologen Rekombinaton in das Chromosom integriert werden. Capecchi, Science, 244: 1288-1292 (1989). Verfahren zur positiven Selektion des Rekombinationsereignisses (z.B. neo-Resistenz) und duale positive-negative Selektion (d.h. neo-Resistenz und Gancyclovir-Resistenz) und die anschließende Bestimmung des gewünschten Clons mittels PCR sind von Capecchi, vorst. und Joyner et al., Nature, 338: 153–156 (1989) beschrieben worden, deren Lehren hier durch Bezugnahme eingeschlossen sind. Die Schlußphase der Vorgehensweise besteht darin, ES-Zellen in Blastocysten zu injizieren und die Blastocysten in scheinträchtige Weibchen zu transferieren. Die so erhaltenen chimären Tiere werden aufgezogen und ihre Nachkommenschaft mit dem Southern-Blot-Verfahren untersucht, um die Individuen zu bestimmen, die das Transgen enthalten.

[0285] Vorgehensweisen zur Herstellung von Säugern, die keine Nager sind, und anderen Tieren wurden von anderen diskutiert. Vgl. Houdebine und Chourrout, vorst.; Pursel et al., Science 244: 1281–1288 (1989); und Simms et al. Bio/Technology, 6: 179–183 (1988).

Anwendungen

[0286] Primärer Hyperparathyroidismus (HPT) ist durch Hypercalcämie und hohe Spiegel an zirkulierendem PTH gekennzeichnet. Einer der Hauptdefekte bei HPT scheint eine verringerte Sensitivität der parathyroidalen Zellen für die negative Rückkoppelungs-Regulierung durch extrazelluläres Ca^{2+} zu sein. So ist im Gewebe von Patienten mit primärem HPT der „Sollwert" für extrazelluläres Ca^{2+} nach rechts verschoben, so daß höhere als die normalen Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} erforderlich sind, um die PTH-Sekretion abzusenken. Darüberhinaus senken bei primärem HPT selbst hohe Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} die PTH-Sekretion oft nur teilweise ab. Bei sekundärem (urämischem) HPT beobachtet man einen ähnlichen Anstieg des Sollwertes für extrazelluläres Ca^{2+}, obwohl der Grad, bis zu dem Ca^{2+} die PTH-Sekretion absenkt, normal ist. Die Veränderungen der PTH-Sekretion gehen mit Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ einher: der Sollwert der von extrazellulärem Ca^{2+} induzierten Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ wird nach rechts verschoben, und das Ausmaß dieser Zunahme verringert. Ferner wird die Färbung von Gewebe mit einem monoclonalen Antikörper, der den Ca^{2+}-Rezeptor zu erkennen scheint, in adenomatösen und hyperplastischen parathyroidalen Zellen verringert.

[0287] Der Ca^{2+}-Rezeptor stellt eine diskrete molekulare Einheit für pharmakologische Eingriffe dar. Moleküle, die die Wirkung des extrazellulären Ca^{2+} nachahmen oder antagonisieren, sind für die Langzeitbehandlung von sowohl primärem als auch sekundärem HPT vorteilhaft. Solche Moleküle liefern den zusätzlichen Antrieb, der erforderlich ist, um die PTH-Sekretion abzusenken, was der hypercalcämische Zustand allein nicht leisten kann. Solche Moleküle mit größerer Wirksamkeit als extrazelluläres Ca^{2+} können die scheinbar nicht unterdrückbare Komponente der PTH-Sekretion, die besonders bei adenomatösem Gewebe problematisch ist, überwinden. Alternativ oder zusätzlich können solche Moleküle die Synthese von PTH absenken, da gezeigt wurde, daß langandauernde Hypercalcämie den Spiegel von präproPTHmRNA in adenomatösem parathyroidalem Gewebe von Rindern und Menschen absenkt. Langandauernde Hypercalcämie senkt auch die Vermehrung der parathyroidalen Zellen in vitro ab, so daß Calcimimetika auch zur Begrenzung der für sekundären HPT charakteristischen Hyperplasie der parathyroidalen Zellen wirksam sein kann.

[0288] Andere Zellen des Körpers können direkt auf die physiologischen Veränderungen der Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} reagieren. Die Calcitoninsekretion aus den parafollikulären Zellen der Schilddrüse (C-Zellen) wird durch Veränderungen der Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} reguliert. Die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen der Nieren wird wie die PTH-Sekretion durch erhöhte Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} abgesenkt. Extrazelluläres Ca^{2+} verursacht die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in diesen Zellen. Andere Nierenzellen reagieren folgendermaßen auf Ca^{2+}: Erhöhtes Ca^{2+} hemmt die Bildung von $1,25(OH)_2$-Vitamin D durch proximale tubuläre Zellen, stimuliert die Produktion von calciumbindendem Protein in distalen tubulären Zellen und inhibiert die tubuläre Reabsorption von Ca^{2+} und Mg^{2+} und die Wirkungen von Vasopressin auf den medullären, dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (MTAL), verringert die Vasopressinwirkung in Zellen des corticalen Sammelganges und beeinflußt die vaskulären glatten Muskelzellen in den Blutgefäßen des Nieren-Glomerulus. Calcium fördert die Differenzierung der Becherzellen des Darms, der Brustzellen und der Hautzellen. Es inhibiert auch die Sekretion der natriuretischen Vorhofpeptide aus den Herzvorhöfen, verringert die cAMP-Akkumulation in Thrombocyten, verändert die Gastrin- und Glucagon-Sekretion und wirkt bei vaskulären glatten Muskelzellen in Richtung auf eine Veränderung der Zellsekretion vasoaktiver Faktoren. Einzelne Osteoklasten reagieren auf eine Erhöhung der Konzentration des extrazellulären Ca^{2+} mit entsprechenden Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$, die teilweise von der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} herrühren. Die Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in Osteoklasten gehen mit einer Inhibition der funktionellen Reaktionen (Knochenresorption) analog der PTH-Sekretion in parathyroidalen Zellen einher. Die Freisetzung von alkalischer Phosphatase aus knochenbildenden Osteoklasten wird durch Calcium direkt stimuliert. Somit gibt es genügend Hinweise, die die Annahme nahelegen, daß Ca^{2+} zusätzlich zu seiner allgegenwärtigen Rolle als intrazelluläres Signal auch als extrazelluläres Signal fungiert und so die Reaktionen bestimmter spezialisierter Zellen reguliert. Moleküle dieser Erfindung können zur Behandlung von Krankheiten, die mit unterbrochenen Ca^{2+}-Reaktionen in diesen Zellen verbunden sind, benützt werden.

[0289] Das Clonieren des Ca^{2+}-Rezeptors auf parathyroidalen und auf anderen Zellen wird es erlauben, das Vorliegen homologer Proteine in anderen Zellen direkt festzustellen. Somit kann eine Familie strukturell homologer Ca^{2+}-Rezeptorproteine erhalten werden. Solche Rezeptoren werden es erlauben, zu verstehen, wie diese Zellen extrazelluläres Ca^{2+} feststellen, und sie werden ein Verständnis des Wirkungsmechanismus/der Wirkungsmechanismen der hier beschriebenen Therapeutika zur Behandlung von HPT, Osteoporose und Bluthochdruck und neue Therapien für andere, die Knochen und Mineralien betreffende Krankheiten erlauben.

[0290] Andere Anwendungen sind vorstehend besprochen. Beispielswiese können rekombinante Ca^{2+}-Rezeptorproteine bei der Therapie angewandt und durch Standardverfahren, z.B. Transfektion der das betreffen-

de Protein codierenden Nucleinsäure eingeschleust werden. Zusätzlich ist ein solches Protein in Tests auf calcimimetische Moleküle dieser Erfindung nützlich.

[0291] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, schränken ihren Schutzbereich aber nicht ein.

Beispiele

[0292] Bei den hier beschriebenen Studien stellte es sich heraus, daß viele organische Moleküle intrazelluläres Ca^{2+} mobilisieren und die PTH-Sekretion in parathyroidalen Zellen absenken. Diese Moleküle sind strukturell verschieden, doch die meisten haben eine positive Nettoladung bei physiologischem pH-Wert. Die Kationennatur der organischen Moleküle spielt eine wichtige Rolle, ist jedoch nicht der einzige Faktor, der die Wirkung bestimmt.

Beispiel 1: Absuchen calcimimetischer Moleküle auf parathyroidalen Rinderzellen

[0293] Dissoziierte parathyroidale Rinderzellen wurden auf Percollgradienten gereinigt und über Nacht in serumfreiem Medium gezüchtet. Die Zellen wurden anschließend mit Fura-2 beladen und die Konzentration von freiem intrazellulärem Ca^{2+} wurde fluorometrisch gemessen. Die Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurden zum Absuchen nach Molekülen benützt, die am Ca^{2+}-Rezeptor wirken. Um als Calcimimetikum betrachtet zu werden, mußte ein Molekül die normalen, von zunehmendem extrazellulärem Ca^{2+} verursachten und durch die Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors ausgelösten Wirkungen zeigen. Das heißt,

1) Das Molekül muß eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ bewirken; die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ kann in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erhalten bleiben und/oder das Molekül kann von extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöste Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ verstärken.

2) Das Molekül muß eine Abnahme der Isoproterenol stimulierten Bildung von zyklischem AMP verursachen, die von Pertussistoxin blockiert wird;

3) Das Molekül muß die PTH-Sekretion über den gleichen Konzentrationsbereich inhibieren, der die $[Ca^{2+}]_i$-Zunahme verursacht; und

4) Die Konzentrations-Reaktions-Kurve für die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ und die PTH-Sekretion durch das Molekül muß durch einen PKC-Aktivator wie Phorbolmyristatacetat (PMA) nach rechts verschoben werden.

[0294] Es wurden mehrere strukturell verschiedene Molekülklassen getestet: Polyamine, Aminoglycosid-Antibiotika, Protamine und Polymere von Lysin oder Arginin. Die Strukturen dieser Moleküle sind in **Fig. 1** dargestellt. In **Fig. 1** einbezogen sind die positiven Nettoladungen der Moleküle und ihre EC_{50}-Werte beim Hervorrufen der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Rinderzellen.

[0295] Je größer die positive Nettoladung des Moleküls, desto größer ist im Allgemeinen seine mobilisierende Stärke für intrazelluläres Ca^{2+}. Jedoch wurden zu dieser offensichtlichen Regel einige verblüffende Ausnahmen gefunden, die nachstehend besprochen werden.

[0296] Wie aus den Figuren ersichtlich, riefen Spermin, Neomycin B und Protamin rapide und vorübergehende Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in Fura-2-beladenen parathyroidalen Rinderzellen hervor (**Fig. 6**, **Fig. 7**, **Fig. 11**). Sie verursachten jedoch keine anhaltenden gleichbleibenden Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Rinderzellen (**Fig. 6**, **Fig. 11**), wohl aber in menschlichen parathyroidalen Zellen (**Fig. 19**). In dieser Hinsicht ähnelten sie der von extrazellulärem Mg^{2+} ausgelösten cytosolischen Ca^{2+}-Reaktion, die die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} ohne die Begleiterscheinung des Einströmens von extrazellulärem Ca^{2+} in Rinderzellen (**Fig. 11b**) auslöst. Vorübergehende, von Spermin, Neomycin B und Protamin ausgelöste Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ wurden durch niedrige Konzentrationen (1 µM) von La^{3+} oder Gd^{3+} (**Fig. 11f**, **Fig. g**) nicht blockiert. Vorübergehende Transienten cytosolischen Ca^{2+}, die von den molekularen Polykationen ausgelöst worden waren, blieben in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erhalten, wurden aber blockiert, wenn die zellulären Ca^{2+}-Speicher durch Vorbehandlung mit Ionomycin entleert wurden (**Fig. 7**; **Fig. 11h**, **Fig. i**). Daher verursachten alle diese Moleküle die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in parathyroidalen Zellen.

[0297] Es wurde ferner gezeigt, daß die molekularen Polykationen den gleichen Pool von intrazellulärem Ca^{2+} mobilisierten, der auch vom extrazellulären Ca^{2+} verwendet wurde. Folglich inhibierte das Erhöhen der Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} fortschreitend die von Spermin hervorgerufenen vorübergehenden Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ (**Fig. 6**). Umgekehrt blockierte eine maximal effektive Spermin- oder Neomycin B-Konzentration (**Fig. 12**) die vorübergehenden, nicht jedoch die von extrazellulärem Ca^{2}+ hervorgerufenen gleichbleibenden $[Ca^{2+}]_i$-Zunahmen.

[0298] Signifikanterweise inhibierten Sperrain, Neomycin B und Protamin die PTH-Sekretion im gleichen Ausmaß wie extrazelluläres Ca^{2+}. Diese inhibitorische Wirkung auf die Sekretion erhielt man bei Konzentrationen, die die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} verursachten (Fig. 8, Fig. 13). Diese Befunde sind für das Verständnis der Mechanismen wichtig, die zur Regulierung der PTH-Sekretion durch extrazelluläres Ca^{2+} beitragen. Da eine Vielzahl anorganischer Polykationen die Sekretion inhibiert, jedoch nur extrazelluläres Ca^{2+} eine anhaltende gleichbleibende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht, kann eine solche Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ an der Regulierung der Sekretion nicht maßgeblich beteiligt sein. Die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+}, nicht der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+}, ist der essentielle, mit der Inhibition der PTH-Sekretion verbundene Mechanismus. Dies ist wichtig, da es denjenigen Mechanismus definiert, den zu beeinflussen es genügt, wenn ein Molekül die PTH-Sekretion beeinflussen soll; Moleküle, die selektiv das Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} stimulieren, werden im Unterdrücken der PTH-Sekretion relativ unwirksam sein. Im Gegensatz dazu müßten Moleküle, die einzig die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} verursachen, ebenso wirkungsvoll bei der Unterdrückung der PTH-Sekretion sein wie extrazelluläres Ca^{2+}.

[0299] Wie die durch extrazelluläres Ca^{2+} ausgelöste Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+}, so wurde auch die durch molekulare Polykationen ausgelöste Mobilisierung durch PMA abgesenkt. Ein repräsentativer Versuch, der die bevorzugte inhibitorische Wirkung von PMA auf durch Sperrain ausgelöste vorübergehende Veränderungen beim cytosolischen Ca^{2+} zeigt, wird in Fig. 14 dargestellt. Die von ATP hervorgerufenen vorübergehenden Veränderungen beim cytosolischen Ca^{2+} blieben unbeeinflußt, selbst wenn eine submaximale ATP-Konzentration verwendet wurde. Die Wirkung von PMA auf von den molekularen Polykationen ausgelöste vorübergehende Veränderungen beim cytosolischen Ca^{2+} entsprach dessen Wirkung auf Reaktionen auf extrazelluläres Ca^{2+}; in beiden Fällen kam es zu einer Verschiebung der Konzentrations-Reaktions-Kurve nach rechts (Fig. 15). Die absenkende Wirkung von PMA auf $[Ca^{2+}]_i$ wurde von einer verstärkenden Wirkung auf die Sekretion begleitet, die bei höheren Konzentrationen der organischen Polykationen überwunden wurden (Fig. 16).

[0300] Die durch molekulare Polykationen ausgelöste Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} ging mit einer Zunahme der Bildung von Inositphosphaten einher. Beispielsweise verursachte Protamin eine rapide (innerhalb 30 sec) Zunahme der Bildung von IP_3, begleitet von einer Zunahme des IP_1-Spiegels. Diese Wirkungen waren beide von der Konzentration von extrazellulärem Protamin abhängig (Fig. 17). Ferner stoppte eine Vorbehandlung mit PMA die von molekularen Polykationen hervorgerufene Bildung von Inositphosphaten. Repräsentative Ergebnisse, die mit Spermin erhalten wurden, sind in Fig. 18 dargestellt.

[0301] Spermin, Neomycin B und Protamin senkten die Isoproterenol induzierten Zunahmen des zyklischen AMP ab. Wie die inhibitorische Wirkung von extrazellulärem Ca^{2+} auf die Bildung von zyklischem AMP wurde auch die durch molekulare Polykationen verursachten Wirkungen durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin blockiert (Tabelle 2).

Tabelle 2

	zyklisches AMP	(% der Kontrolle)
	Kontrolle	+ PTx
0,5 mM Ca^{2+}	100	106 ± 8
2,0 mM Ca^{2+}	19 ± 4	94 ± 2
0,5 mM Ca^{2+}, 200 µM Spermin	23 ± 5	93 ± 6
0,5 mM Ca^{2+}, 30 µM Neomycin B	28 ± 8	87 ± 6
0,5 mM Ca^{2+}, 2 µg/ml Protamin	20 ± 4	89 ± 9

[0302] Pertussistoxin (PTx) blockiert die Inhibitionswirkung von extrazellulärem Ca^{2+} und von molekularen Polykationen auf die Bildung von zyklischem AMP. Parathyroidale Rinderzellen wurden 16 h lang mit oder ohne 100 ng/ml Pertussistoxin gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und 15 min lang mit 10 µM Isoproterenol mit oder ohne den angegebenen Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} oder molekularen Polykationen inkubiert. Das gesamte zyklische AMP (Zellen + Überstand) wurde durch RIA bestimmt, und die Ergebnisse sind als Prozentsatz der in 0,5 mM Ca^{2+} erhaltenen Menge (112 ± 17 pMol/10^6 Zellen) ausgedrückt. Jeder Wert ist der Mittelwert ± SEM aus drei Versuchen.

[0303] In menschlichen parathyroidalen Zellen rief extrazelluläres Mg^{2+} eine anhaltende gleichbleibende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ zusätzlich zu einer rapiden vorübergehenden Zunahme hervor (Fig. 10). Wie in parathyroidalen Rinderzellen, die auf extrazelluläres Ca^{2+} reagieren, rührt die von Mg^{2+} hervorgerufene gleichbleibende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen parathyroidalen Zellen vom Ca^{2+}-Einstrom durch spannungsunempfindliche Kanäle her (Fig. 10a). Diese Wirkung von Mg^{2+} auf die gleichbleibende $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen parathyroidalen Zellen zeigt sich sowohl in adenomatösem als auch in hyperplastischem Gewebe.

[0304] Neomycin B und Spermin wurden auf ihre Wirkung auf $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen parathyroidalen Zellen, die aus adenomatösem Gewebe präpariert wurden, getestet. Repräsentative Resultate mit Neomycin B werden in Fig. 19 gezeigt. Neomycin B verursachte nicht nur eine vorübergehende, sondern zusätzlich noch eine gleichbleibende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen parathyroidalen Zellen (Fig. 19a). Somit ist in menschlichen Zellen das Muster der Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$, die von extrazellulärem Ca^{2+}, Mg^{2+} oder Neomycin B hervorgerufen wird, sehr ähnlich.

[0305] Von Neomycin B ausgelöste vorübergehende Veränderungen beim cytosolischen Ca^{2+} blieben in Gegenwart von La^{+} (1 µM) und in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erhalten. Daher verursachte Neomycin B die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in menschlichen parathyroidalen Zellen. Neomycin B inhibierte die PTH-Sekretion aus menschlichen parathyroidalen Zellen bei Konzentrationen, die die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} verursachten (Fig. 13). Es gab jedoch einige Unterschiede zwischen den Reaktionen der parathyroidalen Zellen vom Menschen und vom Rind auf Neomycin B. Der EC_{50}-Wert von Neomycin B für die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} betrug 40 µM in parathyroidalen Rinderzellen und 20 µM in menschlichen parathyroidalen Zellen (vgl. Fig. 13 und Fig. 15), wogegen die Stärke von Sperrain in parathyroidalen Zellen vom Rind und vom Menschen ähnlich war (EC_{50} = 150 µM). Daher können Rinderzellen zwar für anfängliche Absuchtests auf Aktivität von Testmolekülen verwendet werden, doch ist es wichtig, die Folgestudien mit menschlichen parathyroidalen Zellen vorzunehmen.

[0306] Um die Wirkungen molekularer Polykationen auf C-Zellen zu untersuchen, wurde eine von einem medullären Schilddrüsencarcinom von Ratten abgeleitete neoplastische Zellinie (rMTC 6-23-Zellen) verwendet. Sowohl Sperrain (10 mM) als auch Neomycin B (5 mM) hatten keine Auswirkung auf die Basis-$[Ca^{2+}]_i$ in diesen Zellen. Auch hatte keines der Moleküle eine Auswirkung auf die Reaktion auf die anschließende Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+}. Repräsentative Ergebnisse, die das Ausbleiben einer Wirkung von Neomycin B dokumentieren, werden in Fig. 21 gezeigt. Neomycin B (1 mM) oder Sperrain (1 oder 5 mM) riefen keinerlei Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in Osteoklasten hervor (Fig. 23). In der gezeigten Spur schien es eine gewisse Verstärkung der Reaktion auf eine anschließende Zunahme der Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} zu geben, obwohl dies kein durchgehender Befund war. In zwei anderen Zellen war Sperrain (5 mM) abermals ohne Wirkung auf die Basis-$[Ca^{2+}]_i$ und verursachte eine geringe Inhibition (etwa 15%) der von extrazellulärem Ca^{2+} induzierten $[Ca^{2+}]_i$-Zunahme. In einer dritten Zelle war Neomycin B (5 mM) ohne Wirkung auf die Basis-$[Ca^{2+}]_i$ und beeinflußte nicht die von extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöste Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Das Gesamtbild, das sich aus diesen Studien ergibt, ist, daß Sperrain und Neomycin B ohne Wirkung auf die Basisspiegel oder stimulierten Spiegel von cytosolischem Ca^{2+} in Osteoklasten sind.

[0307] Die Tatsache, daß die molekularen Polykationen die Ca^{2+} erkennenden Mechanismen von C-Zellen oder Osteoklasten nicht beeinflussen, demonstriert die Möglichkeit, neue Leitmoleküle zu entdecken oder zu entwerfen, die spezifisch auf den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen wirken oder auf andere Weise eine oder mehrere Funktionen der normalen Reaktion der parathyroidalen Zellen auf $[Ca^{2+}]$ modulieren.

Beispiel 2: Absuchen von Molekülen auf menschlichen parathyroidalen Zellen

[0308] Es wurden die Auswirkungen von Sperrain und Neomycin auf die $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen parathyroidalen Zellen getestet, die aus, wie in Beispiel 1 beschrieben, resezierten und präparierten Drüsen gewonnen worden waren. Es zeigte sich, daß Sperrain in menschlichen parathyroidalen Zellen nur eine geringe Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ bewirkte, wenn es bei Konzentrationen von 300 µM getestet wurde.

[0309] Neomycin dagegen rief eine große Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen parathyroidalen Zellen hervor, wenn es bei Konzentrationen von 20 µM getestet wurde. Das Ausmaß der von Neomycin hervorgerufenen Reaktion war derjenigen gleich, die von einer maximal effektiven Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} hervorgerufen wurde.

Beispiel 3: Absuchen von Molekülen auf Xenopus-Oocyten

[0310] Oocyten, denen mRNA aus menschlichen parathyroidalen Zellen injiziert wurde, exprimieren den Ca^{2+}-Rezeptor und mobilisieren intrazelluläres Ca^{2+} als Reaktion auf eine Vielzahl extrazellulärer anorganischer zwei- und dreiwertiger Kationen. Die Anwendung dieses Absuchvorganges erlaubt es, auf eine Wirkung direkt auf dem Ca^{2+}-Rezeptor zu testen. Oocyten, die den Ca^{2+}-Rezeptor exprimieren, reagierten auch auf einige Moleküle, die auf intakten parathyroidalen Zellen wirksam sind, wenn folgendermaßen abgesucht wurde. Hexacyclen verursachte die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} bei einer Konzentration von 135 µM. Neomycin (100 µM) und NPS 382 (5 mM) waren ebenfalls wirksam. Dies liefert ziemlich überzeugende Beweise dafür, daß diese Moleküle auf den Ca^{2+}-Rezeptor oder auf ein anderes, mit dessen Funktion nahe verbundenes Protein wirken.

[0311] Wir haben zum Beispiel Ca^{2+}-Rezeptor-Expression in Oocyten feststellen können, indem wir die $^{45}Ca^{2+}$-Mobilisierung gemessen haben. In diesen Versuchen wurde den Oocyten parathyroidale Rinder-mRNA oder Wasser injiziert, und nach 72 Stunden wurden sie Serum oder 10 mM Neomycin ausgesetzt. Vor der Stimulation wurden die Oocyten mit $^{45}Ca^{2+}$ beladen. Die 20-minütige Stimulation mit Serum führte zu einer intrazellulären $^{45}Ca^{2+}$-Freisetzung, die gegenüber einer Leerstimulation mit Puffer um 45% erhöht war. Eine 20-minütige Stimulation mit 10 mM Neomycin führte zu einer 76%igen Zunahme der $^{45}Ca^{2+}$-Freisetzung. Der Test ist empfindlich genug zur Verwendung beim Clonieren des Ca^{2+}-Rezeptors und hat den Vorteil eines höheren Durchsatzes als die elektrophysiologische Messung des Ca^{2+} aktivierten Cl^--Stroms.

[0312] In einem anderen Beispiel wurde menschliches Osteoklastomgewebe aus Knochenbiopsiegewebe gewonnen. Oocyten, denen aus diesem Gewebe isolierte mRNA injiziert worden war, wurden mit 30 mM Ca^{2+} stimuliert. Die Kontrollen reagierten nicht, während 8 von 12 Oocyten, denen Osteoklastom-mRNA injiziert wurde, angemessen reagierten (**Fig. 34**). Diese Versuche liefern den ersten Beweis, daß die Ca^{2+}-Reaktion von Osteoklasten auf extrazelluläres Ca^{2+} tatsächlich genetisch codiert ist. Die Ergebnisse zeigen auch, daß der Ca^{2+}-Rezeptor der Osteoklasten durch Expression in Xenopus-Oocyten cloniert werden kann.

Beispiel 4: Absuchen von Molekülen auf Ratten-Osteoklasten

[0313] Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten von parathyroidalen Zellen und Ratten-Osteoklasten gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} legen die Annahme nahe, daß ihre Ca^{2+}-Rezeptoren verschieden sind. Während parathyroidale Zellen auf Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} von zwischen 0,5 und 3 mM reagieren, reagieren Osteoklasten nur, wenn der Spiegel des extrazellulären Ca^{2+} über 5 mM steigt. Nichtsdestoweniger ist diese ziemlich hohe Konzentration von Ca^{2+} für Osteoklasten physiologisch; da sie Knochen resorbieren, kann die lokale Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} Spiegel bis zu 30 mM erreichen.

[0314] Das Absuchen von Molekülen in Ratten-Osteoklasten wurde wie folgt ausgeführt: Osteoklasten wurden aus den langen Knochen neugeborener Ratten gewonnen. $[Ca^{2+}]_i$ wurde in einzelnen Zellen mit dem fluorometrischen Indikator Indo-1 gemessen. Sperrain, Spermidin, Neomycin und Verapamil wurden getestet, und keines davon verursachte eine starke Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in Osteoklasten (obwohl geringfigige Reaktionen festgestellt wurden).

[0315] Bei einer Konzentration von 1 mM verursachte Sperrain eine geringe Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ (etwa 10% von der, die von einer maximalen Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} hervorgerufen wurde). Weder Neomycin (10 mM) noch Sperrain (10 oder 20 mM) verursachten eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in Rattenosteoklasten. Neomycin (10 mM) blockierte die von der anschließenden Zugabe von 25 mM extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöste Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ nicht. Eine Vorbehandlung mit Sperrain (20 mM) jedoch senkte die Reaktion auf extrazelluläres Ca^{2+} ab. Verapamil (100 µM) verursachte keine feststellbare Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, doch es blockierte die Reaktion auf extrazelluläres Ca^{2+}.

[0316] Vergleiche zwischen Osteoklasten und parathyroidalen Zellen zeigen, daß Moleküle, die bei letzteren aktiv sind, bei Osteoklasten relativ unwirksam sind. Dies zeigt, daß sich leicht Arzneistoffe entwickeln lassen, die auf einen spezifischen Ca^{2+}-Rezeptor zielen, ohne die auf anderen Ca^{2+}-erkennenden Zellen vorhandenen Rezeptortypen zu beeinflussen. In ähnlicher Weise können Arzneistoffe entwickelt werden, die an zwei oder mehreren solchen Ca^{2+}-Rezeptoren aktiv sind.

[0317] Absuchen auf calcimimetische und calcilytische Wirkung auf dem Osteoklasten-Calciumrezeptor Verbindungen, die eine Wirkung am Osteoklasten-Calciumrezeptor aufweisen, können durch Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in einzelnen Ratten-Osteoklasten, wie vorstehend beschrieben, entdeckt werden. Ein verbesserter Test er-

möglicht den Durchsatz von mittleren bis hohen Mengen einer Verbindung. Dieses neue Verfahren basiert auf der Verwendung von Kaninchenosteoklasten, die mit hoher Ausbeute (10^5 pro Tier) und Reinheit (95% der Zellen sind Osteoklasten) gewonnen werden können. Die Reinheit des Kaninchenosteoklastenpräparats erlaubt es, die Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ auf Zellpopulationen auszuführen. Da das festgestellte Fluoreszenzsignal der durchschnittlichen Populationsreaktion entspricht, wird die interzelluläre Variabilität minimiert und die Präzision des Tests bedeutend erhöht. Dies wiederum ermöglicht es, mehr Verbindungen auf ihre Wirkung hin abzusuchen.

[0318] Kaninchenosteoklasten werden aus 6 Tage alten Kaninchen präpariert. Die Tiere werden durch Dekapitation getötet und die langen Knochen entnommen und in Osteoklastenmedium plaziert (OC-Medium: essentielles Alpha-Minimalmedium mit 5% fötalem Rinderserum und Penicillin/Streptomycin). Die Knochen werden mit einem Skalpell in Stücke geschnitten und in 2 ml OC-Medium in ein konisches 50 ml-Zentrifugenrohr gegeben. Die Knochenstücke werden mit Scheren zerkleinert, bis man eine ziemlich homogene Suspension von Knochenpartikeln erhält. Die Suspension wird mit 25 ml OC-Medium verdünnt und das Präparat 30 Sekunden lang sanft geschwenkt („mit dem Vortexgerät sanft verwirbelt"). Man läßt die Knochenpartikel 2 Minuten absetzen, danach wird der Überstand entfernt und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Knochenpartikel werden, wie soeben beschrieben, in OC-Medium resuspendiert, geschwenkt, sedimentiert und geerntet. Die Überstände der beiden Ernten werden vereinigt und zentrifugiert, und das so erhaltene Zellpräzipitat wird in Percoll resuspendiert. Dann wird die Suspension zentrifugiert, und die weiße viskose Bande unmittelbar unter dem Meniskus wird entfernt und mit OC-Medium gewaschen. Der Schritt der Percollzentrifugierung führt zu einer bedeutenden Verbesserung der Reinheit und erlaubt es, die Osteoklasten bei hohen, für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellpopulationen geeigneten Dichten auszuplattieren. Die Zellen werden auf Glas-Deckgläser ausplattiert, die für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach einem der nachstehend beschriebenen Verfahren geeignet sind. Wenn nötig, kann die Reinheit des Präparates verbessert werden: In diesem Fall werden die Zellen über Nacht gezüchtet und dann mit Ca^{2+}- und Mg^{2+}-freiem Puffer gespült. Die einzellige Schicht wird dann 5 min lang in Ca^{2+}- und Mg^{2+}-freiem Puffer mit 0,02% EDTA und 0,001% Pronase eingetaucht. Dann wird dieser Puffer entfernt und mit OC-Medium ersetzt, und die Zellen können sich 1 bis 2 Stunden erholen, bevor sie mit Fluorometrieindikator beladen werden und die $[Ca^{2+}]_i$ gemessen wird, wie nachstehend beschrieben.

[0319] In einer Ausführungsform erlaubt diese Technik die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in Populationen von Osteoklasten durch Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie. Man läßt die gereinigten Osteoklasten an Glas-Deckgläser von 25 mm Durchmesser anhaften und belädt sie dann mit Indo-1. Die Deckgläser werden in einer Superfusionskammer gesichert und auf den Objekttisch eines Fluoreszenzmikroskops plaziert. Die Verwendung eines Objektivs geringer Vergrößerung (4 x), erlaubt es, ein Objektfeld zu erfassen, das 10 bis 15 Osteoklasten enthält. In einer Variation kann die Fluoreszenz einer jeden Zelle im Objektfeld simultan aufgezeichnet und separat für spätere Analyse gespeichert werden. Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ einer jeden Zelle können abgeschätzt, und die durchschnittliche Reaktion aller Zellen im Objektfeld berechnet werden. In einer anderen Variation kann die Fluoreszenz des ganzen Zellfeldes aufgezeichnet und sofort verarbeitet werden. In beiden Variationen liegen die Enddaten in Form einer durchschnittlichen Reaktion aller Zellen des mikroskopischen Feldes vor. Deshalb wird die interzelluläre Variabilität minimiert und die Präzision des Tests stark erhöht. Dieses Verfahren ermöglicht es, 10–20 Verbindungen pro Woche auf ihre Wirkung am Osteoklasten-Calciumrezeptor abzusuchen.

[0320] In einer stärker bevorzugten Ausführugsform erlaubt diese Technik die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in Populationen von Osteoklasten unter Verwendung eines konventionellen Fluorometers. Man läßt die gereinigten Osteoklasten an rechteckige Glas-Deckgläser anhaften. In einer Variation wird eine Standard-Quarzküvette (1 cm^2) verwendet und die Glas-Deckgläser messen 2 × 1,35 cm. In einer anderen Variation wird eine Mikroküvette (0,5 cm^2) verwendet und die Glas-Deckgläser messen 1 × 0,75 cm. In beiden Fällen werden die Zellen mit Fura-2 oder einem anderen geeigneten Fluorometrieindikator zum Messen der $[Ca^{2+}]_i$ beladen. Die Fluoreszenz der Indikator beladenen Zellen wird, wie vorstehend für die parathyroidalen Rinderzellen beschrieben, aufgezeichnet. Dieses Verfahren erlaubt einen höheren Durchsatz als die Fluoreszenzmikroskopie und ermöglicht es, 20–50 Verbindungen pro Woche auf ihre Wirkung am Osteoklasten-Calciumrezeptor abzusuchen.

[0321] In einer am meisten zu bevorzugenden Ausführungsform kann die Technik dazu verwendet werden, die $[Ca^{2+}]_i$ in Osteoklasten in einer Schale mit 96 Vertiefungen zu messen. Die gereinigten Osteoklasten werden in hoher Dichte in alle Vertiefungen einer Schale mit 96 Vertiefungen ausplattiert und anschließend mit einem geeigneten Fluorometrieindikator beladen. Die Fluoreszenz einer jeden Vertiefung wird mit einem Schalen-Fluorometrielesegerät aufgezeichnet. Dieses Verfahren hat das Potential, durch Robotertechnik vollkommen automatisiert zu werden und würde ein Hochdurchsatz-Absuchen ermöglichen, bei dem 50 bis 100 Verbindungen pro Woche abgesucht werden könnten.

Andere Beispiele für Ca^{2+}-Rezeptoren

[0322] Die folgenden Beispiele demonstrieren, daß es, ebenso wie es Untertypen von Rezeptoren für molekulare Liganden gibt, auch Untertypen von Ca^{2+}-Rezeptoren zu geben scheint, die von Arzneistoffen unterschiedlich beeinflußt werden können. Der Ca^{2+}-Rezeptor von parathyroidalen Zellen erkennt Spiegel von extrazellulärem Ca^{2+} von um die 1,5 mM, wogegen der Ca^{2+}-Rezeptor auf dem Osteoklasten auf Spiegel von um die 10 mM reagiert (Fig. 22). Neomycin oder Sperrain, die den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zelle aktivieren, aktivieren die Ca^{2+}-Rezeptoren auf C-Zellen oder Osteoklasten nicht (Fig. 21 und Fig. 23). Diese Daten stellen den ersten Hinweis auf pharmakologisch unterschiedliche Untertypen von Ca^{2+}-Rezeptoren dar, und diese Daten werden dazu verwendet, Arzneistoffe zu entwerfen und zu entwickeln, die selektiv auf einen bestimmten Typ Ca^{2+}-Rezeptor wirken. Tatsächlich zeigt das Testen von Leitmolekülen solche zellspezifische Wirkungen. Beispielsweise bleibt NPS 449, das Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in Osteoklasten auslöst, auf die $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Zellen wirkungslos. Im Gegensatz dazu wirkt NPS 447, das den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen aktiviert, nur bei 10-fach höherer Konzentration auch auf den Ca^{2+}-Rezeptor der Osteoklasten aktivierend. Schließlich ist Agatoxin 489, obwohl nicht sehr stark bei der Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors der C-Zellen (EC_{50} = 150 µM), ein ziemlich starker Aktivator des parathyroidalen Ca^{2+}-Rezeptors (EC_{50} = 3 µM). Die derzeit in Entwicklung befindlichen Leitmoleküle werden selektiv die Wirkung eines spezifischen Typs Ca^{2+}-erkennender Zellen in vivo beeinflussen.

[0323] Arzneistoffe mit geringerer Spezifität müssen nicht notwendigerweise therapeutisch unerwünscht sein. So sind das Absenken der Osteoklastenaktivität und die Stimulation der Calcitoninsekretion zwei verschiedene Vorgehensweisen zur Inhibition der Knochenresorption. Arzneistoffe, die auf die Ca^{2+}-Rezeptoren auf diesen beiden Zellen zielen, können sehr wirkungsvolle Therapeutika für Osteoporose sein. Da PTH auch an der Regulierung des Knochenmetabolismus beteiligt ist, können Arzneistoffe, die auf den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen wirken, auch nützlich zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Osteoporose sein.

[0324] Die Ergebnisse einiger Testmoleküle werden nachstehend gezeigt. In Tabelle 6 wird die Wirkung von calcimimetischen Molekülen im Vergleich gezeigt. Parathyroidale Rinderzellen und C-Zellen (rMTC 6-23-Zellen) wurden mit Fura-2 und Rattenosteoklasten mit Indo-1 beladen, und die Stärke der angegebenen Moleküle im Mobilisieren von intrazellulärem Ca^{2+} wurde durch Konstruktion kumulativer Konzentrations-Reaktions-Kurven bestimmt. Die als „inaktiv" aufgeführten Moleküle veränderten die $[Ca^{2+}]_i$ nicht, wenn sie bei einer Konzentration von 1 mM getestet wurden.

Tabelle 6

	EC_{50} (µM)		
VERBINDUNG	PARATHYROIDAL	OSTEOKLAST	C-ZELLE
NPS R-568	0,60	200	> 300
NPS S-568	30	---	---
NPS R-467	2	> 100	---
NPS S-467	> 30	---	---
NPS 017	6	inaktiv	150
NPS 447	9	150	---
NPS 456*	15	200	> 100
NPS 015	22	---	inaktiv
NPS 109	40	>300	5
NPS 449	inaktiv	150	---
NPS 468*	30	250	---
Spermin	150	inaktiv	inaktiv
Neomycin	40	inaktiv	inaktiv

*racemisches Gemisch; „inaktiv“ wird als bei einer Konzentration von 1–5 mM keine Zunahme des cytosolischen Ca^{2+} bewirkend definiert

Beispiel 5: Leitmoleküle für den parathyroidalen Ca^{2+}-Rezeptor

[0325] Struktur-Wirkungs-Studien an Polyaminen und Arylalkylaminen führten zum Testen von Molekülen, die strukturell mit NPS 456 verwandt sind. NPS 456 ist ein starker Aktivator des Ca^{2+}-Rezeptors parathyroidaler Zellen. Dieses Molekül ist bemerkenswert, da es nur eine positive Ladung besitzt, aber viel stärker ist als viele mehrbasische Moleküle. Eine kurze (2 min) Vorbehandlung mit PMA verschiebt die Konzentrations-Reaktions-Kurve von NPS 456 nach rechts. Dies weist darauf hin, daß NPS 456 durch den gleichen Mechanismus wirkt, den auch extrazelluläres Ca^{2+} ausnützt. NPS 456 ruft die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in Xenopus-Oocyten hervor, die den Ca^{2+}-Rezeptor parathyroidaler Zellen exprimieren, was eine direkte Wirkung auf den Ca^{2+}-Rezeptor demonstriert (Fig. 33). Ferner enthält NPS 456 einen chiralen Kohlenstoff und existiert daher in zwei isomeren Formen. Beide Isomere wurden synthetisiert und auf ihre Wirkung geprüft. Das R-Isomer, NPS 447, ist 12 mal stärker als das S-Isomer, NPS 448 (Fig. 28). Dies ist der erste Beweis, daß ein Ca^{2+}-Rezeptor ein organisches Molekül in stereospezifischer Weise erkennen kann.

[0326] Da NPS 447 ein strukturell einfaches Molekül mit selektiven und starken Wirkungen auf den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zelle ist, sind Struktur-Wirkungs-Studien zu diesem Leitmolekül einfach. Das Ziel dieser Studien ist es, eine Reihe verwandter Moleküle mit verschiedenen Charakteristika zu erzeugen, aus denen der endgültige Entwicklungskandidat ausgewählt werden kann. Dieser Versuch hat schon einige der Strukturdomänen von NPS 447 offengelegt, die zu seiner Wirkung und Stärke beitragen. Beispielsweise ist die neue Verbindung NPS 459 ein Analogon von NPS 447, die kleiner (MG < 240), jedoch nahezu so stark ist wie das Elternmolekül, wogegen mehrere andere Analoga relativ unwirksam waren. Die interessantesten Moleküle aus diesem Analogon-Projekt können in in vivo-Tests auf ihre Wirkung auf PTH-Sekretion und Ca^{2+}-Spiegel im Serum eingebracht werden (Beispiele 15, 16, 17, 18 und 23).

[0327] Die neue Verbindung NPS 467 ist ein noch kleineres Molekül als NPS 447, ist jedoch beim Verursachen von Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Zellen etwa 3fach stärker als letzteres. Wie NPS 456, so ist auch NPS 467 ein racemisches Gemisch. Die Auftrennung von NPS 467 in seine Enantiomere liefert ein Isomer mit einer noch höheren Stärke als das racemische Gemisch (vgl. Beispiel 10). Es wird erwartet, daß wei-

tere Struktur-Wirkungs-Studien an mit NPS 447 verwandten Molekülen, nämlich NPS 467 und NPS 568, reine Isomere mit größerer Stärke als diese Moleküle in ihrer racemischen Form ergeben.

[0328] Die mit NPS 456 erhaltenen Ergebnisse (Fig. 33) zeigen, daß es oszillatorische Zunahmen des Cl^--Stromes bei Konzentrationen von 100 µM hervorruft. NPS 456 ist das stärkste Aktivierungsmolekül von Xenopus-Oocyten, die den Ca^{2+}-Rezeptor parathyroidaler Zellen exprimieren. Die in diesem Expressionssystem mit Neomycin und NPS 456 erhaltenen Resultate zeigen, daß diese Moleküle direkt auf den Ca^{2+}-Rezeptor wirken.

Beispiel 6: Leitmoleküle für den Osteoklasten-Ca^{2+}-Rezeptor

[0329] Die zur Erhellung des Wirkungsmechanismus von extrazellulärem Ca^{2+} am Osteoklasten angewandte Strategie ähnelte jener, die sich in parathyroidalen Zellen als wirkungsvoll erwiesen hatte. Die ersten Versuche untersuchten die Wirkung von La^{3+} auf $[Ca^{2+}]_i$ in einzelnen Rattenosteoklasten, die mit dem Fluorometrieindikator Indo-1 beladen waren. Wie vorstehend beschrieben, sind dreiwertige Kationen wie La^{3+} impermeabel und blockieren den Ca^{2+}-Einstrom. Niedrige mikromolekulare Konzentrationen von La^{3+} senkten die Ca^{2+} induzierten Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ teilweise wieder ab (Fig. 29). Die Demonstration einer La^{3+}-resistenten Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ liefert einen Beweis für die Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+}. Die Ergebnisse dieser drei Versuche entsprechen jenen, die mit parathyroidalen Zellen erhalten wurden, und legen nahe, daß von extrazellulärem Ca^{2+} ähnliche Mechanismen zur Regulierung der $[Ca^{2+}]_i$ in beiden Zelltypen verwendet werden.

[0330] Eine andere Versuchsreihe zeigte, daß extrazelluläres Mn^{2+} verübergehende Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ hervorrief (Fig. 30(a)), die in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} anhielten (Fig. 30B). Diese Ergebnisse sind ebenso Hinweise auf die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+}. Obwohl Mn^{2+} in manche Zellen eindringen kann, ist es unwahrscheinlich, daß es dies in Osteoklasten tut, da Mn^{2+} die Fluoreszenz von Indo-1 löscht. Also würde man, wenn Mn^{2+} intrazellulär eindringen würde, eine Abnahme und nicht eine Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachten.

[0331] Die mit einer Vielzahl zwei- und dreiwertiger Kationen erhaltenen Ergebnisse stimmen alle mit dem Vorhandensein eines Ca^{2+}-Rezeptors auf der Oberfläche des Osteoklasten überein, der an die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} und Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch spannungsunempfindliche Kanäle gekoppelt ist. Die Ergebnisse zeigen Hinweise auf genetisches Material in menschlichen Osteoklasten, das ein Ca^{2+}-Rezeptorprotein codiert (vgl. nachstehend). Vorübergehende Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$, die von der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} herrühren, genügen, um die osteoklastische Knochenresorption in vitro zu inhibieren. So scheint, wie bei den parathyroidalen Zellen, die Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors ein brauchbares Mittel zur Inhibierung der Wirkung von Osteoklasten zu sein.

[0332] NPS 449 ist derzeit das Leitmolekül für calcimimetische Arzneistoffe an diesem Rezeptor. Es ist ein kleines Molekül (MG < 425), und es mobilisiert intrazelluläres Ca^{2+} in Rattenosteoklasten mit einem EC_{50}-Wert von etwa 150 µM (Fig. 31A und Fig. 31B). Obwohl die Stärke von NPS 449 relativ gering ist, hat es eine einfache Struktur mit nur einer positiven Ladung, und es ist zu erwarten, daß es wünschenswerte pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften aufweist.

[0333] NPS 449 wurde auf seine Fähigkeit geprüft, die Knochenresorption in vitro zu inhibieren. Dies geschah durch morphometrische Analyse der Grübchenbildung an dünnen Scheiben von Rindercorticalis mittels Rasterelektronenmikroskopie. Rattenosteoklasten wurden 24 Stunden lang in Scheiben von Knochen in Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von NPS 449 inkubiert. NPS 449 verursachte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Knochenresorption mit einem IC_{50} von 10 µM. Die vorausgesehenen Resultate liefern den ersten Beweis dafür, daß Moleküle, die an dieser neuen Stelle wirken, die osteoklastische Knochenresorption inhibieren können. Mit Hilfe der Synthesechemie werden stärkere Analoga von NPS 449 hergestellt werden und mit den hier beschriebenen Verfahren getestet werden.

Beispiel 7: Leitmoleküle für den Ca^{2+}-Rezeptor der C-Zellen

[0334] Die Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors der C-Zellen stimuliert die Sekretion von Calcitonin, das knochenresorptionsinhibierend auf die Osteoklasten wirkt. Calcimimetische Arzneistoffe, die die C-Zellen selektiv beeinflussen, sind nützlich bei der Behandlung der Osteoporose.

[0335] Die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} wird als funktioneller Index der Wirkung des Ca^{2+}-Rezeptors verwendet. Das Absuchen in C-Zellen wird durch die Verfügbarkeit von Zellkulturlinien erleichtert, die den

C-Zell-Phänotyp exprimieren (z.B. Zellen von medullärem Ratten-Schilddrüsencarcinom; rMTC 6-23-Zellen). Für die anfängliche Studie wurden drei Arylalkylaminmoleküle ausgewählt. Zwei davon kommen natürlich vor (Agatoxin 489 und Agatoxin 505), das dritte (NPS 019) ist ein synthetisches Agatoxin-Analogon. Von Agatoxin 505 hat sich gezeigt, daß es von extrazellulärem Ca^{2+} induzierte Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ mit einem IC_{50} von 3 µM blockiert. Die inhibitorische Wirkung rührte von einer Blockade des spannungempfindlichen L-Typ-Ca^{2+}-Kanals her, der bei diesen Zellen vorkommt. Im Gegensatz dazu zeigte sich, daß Agatoxin 489 das intrazelluläre Ca^{2+} in rMTC-Zellen mit einem EC_{50}-Wert von 150 µM mobilisierte. Dies war das erste bisher entdeckte organische Molekül, das den Ca^{2+}-Rezeptor der C-Zellen aktivierte. Das synthetische Analogon, NPS 019, war sogar noch stärker und mobilisierte intrazelluläres Ca^{2+} mit einem EC_{50}-Wert von 5 µM (**Fig. 32**). Es ist bedeutsam, daß der einzige strukturelle Unterschied zwischen NPS 019 und Agatoxin 489 das Vorhandensein oder das Fehlen einer Hydroxylgruppe ist. Die Tatsache, daß solche subtilen Strukturunterschiede die Stärke der Moleküle so tiefgreifend beeinflussen, weist auf eine strukturell spezifische Bindungsstelle auf dem Ca^{2+}-Rezeptor hin. Dies wiederum bestärkt die Ansicht, daß sehr starke und selektive Ca^{2+}-Aktivatoren entwickelt werden können.

[0336] NPS 019, das ein kleines Molekül ist (MG < 500), ist ein Leitmolekül für die Entwicklung von Calcimimetika des Ca^{2+}-Rezeptors der C-Zellen und kann in vitro auf seine Fähigkeit getestet werden, die Calcitoninsekretion zu stimulieren. Anschließend wird ein in vivo-Test dann die Fähigkeit dieses Moleküls bestimmen, die Calcitoninsekretion zu stimulieren und die Knochenresorption zu inhibieren. Diese in vivo-Studien werden an Ratten ausgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Studien, von denen zu erwarten ist, daß sie positiv ausfallen werden, werden dann den ersten Beweis dafür liefern, daß ein kleines organisches Molekül, das auf einen neuen Rezeptor wirkt, die Calcitoninsekretion zu stimulieren und die Knochenresorption abzusenken vermag.

Beispiel 8: Calcilytische Wirkung von NPS 021 auf parathyroidale Zellen

[0337] Soll eine Verbindung als Calcilytikum betrachtet werden, so muß sie die Wirkungen von extrazellulärem Ca^{2+} oder einer calcimimetischen Verbindung auf eine extrazelluläres Ca^{2+} erkennende Zelle blockieren. Ein Beispiel einer calcilytischen Verbindung ist NPS 021, dessen Struktur in **Fig. 1** zu finden ist. In mit Fura-2 beladenen parathyroidalen Rinderzellen blockiert NPS 021 durch extrazelluläres Ca^{2+} ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$-Zunahmen. Der IC_{50} von NPS 21 zum Blockieren dieser Reaktion beträgt ungefähr 200 àM; bei Konzentrationen um die 500 àM wird die durch extrazelluläres Ca^{2+} hervorgerufene $[Ca^{2+}]_i$-Zunahme aufgehoben. Bedeutsamerweise verursacht NPS 021 von sich aus keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$, wenn es bei niedrigen $[Ca^{2+}]$ (0,5 mM; **Fig. 37**) getestet wird. Ga^{3+} ist ebenfalls calcilytisch gegenüber Xenopus-Oocyten, die den clonierten Ca^{2+}-Rezeptor exprimieren: Ga^{3+} selbst hat keine Wirkung auf die Cl^--Ströme, die von Gd^{3+}, einem Calcimimetikum, aktiviert werden, doch eine Vorbehandlung mit Ga^{3+} blockiert die Wirkung von Gd^{3+}.

Beispiel 9: NPS 467 vermindert das ionisierte Calcium im Serum

[0338] Verbindungen, von denen gezeigt worden war, daß sie den Ca^{2+}-Rezeptor von parathyroidalen Rinderzellen in vitro aktivieren, wurden in vivo auf ihre hypocalcämische Wirkung getestet. Männliche Sprague-Dawley-Ratten (200 g) wurden eine Woche lang bei einer Niedrigcalciumdiät gehalten und erhielten dann Testsubstanz oder Vehikel als Kontrolle. Drei Stunden nach der intraperitonealen Verabreichung von NPS 467 wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das ionisierte Ca^{2+} im Gesamtblut oder im Serum wurde mit einem Ciba-Corning 634-Analysator nach den mit dem Instrument mitgelieferten Anleitungen gemessen. Das Gesamtcalcium, Albumin und Phosphat des Serums wurden mit auf dem Fachgebiet wohlbekannten Techniken gemessen.

[0339] NPS 467 verursachte eine dosisabhängige Verminderung des Ca^{2+} im Serum oder im Gesamtblut (**Fig. 38**). Mit dem Abfall des Blut-Ca^{2+} zu diesem Zeitpunkt ging ein proportionaler Abfall des Gesamtcalciumspiegels im Blut einher. Es gab keine Veränderung der Serumalbumin- oder Phosphatspiegel bei irgendeiner der untersuchten Dosen. In Vorabstudien verursachte NPS 467 bei Dosen, die ein Absenken des Blut-Ca^{2+} bewirkten, eine dosisabhängige Verringerung der Zirkulationsspiegel von PTH (**Fig. 39**). Die hypocalcämische Wirkung von NPS 467 war innerhalb von drei Stunden maximal und kehrte nach 24 Stunden zu den Spiegeln der Kontrollen zurück (**Fig. 40**).

[0340] NPS R-467 (vgl. Beispiel 16) bewirkte auch eine Abnahme des ionisierten Ca^{2+} im Serum von Ratten, die bei normaler, calciumreicher Ernährung gehalten wurden. Eine einzige Dosis von NPS R-467 (10 mg/kg i.p.) verursachte einen rapiden Abfall im Serumspiegel des ionisierten Ca^{2+}, der nach 1 Std. sein Maximum erreichte (22% Abnahme vom Kontrollspiegel) und bis zu 6 Stunden lang auf diesem abgesenkten Spiegel oder in dessen Nähe verblieb.

Beispiel 10: NPS 467 vermindert das ionisierte Calcium im Serum in stereospezifischer Weise

[0341] NPS 467 ist ein racemisches Gemisch. Die Auflösung von NPS in seine beiden Enantiomere wurde durch Separation auf einer chiralen Säule erreicht. Das R-Isomer war etwa 100mal stärker im Aktivieren des Ca^{2+}-Rezeptors der parathyroidalen Rinderzellen in vitro als das S-Isomer, wie anhand der Fähigkeit der Enantiomere, Zunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in parathyroidalen Zellen hervorzurufen, festgestellt wurde (**Fig. 41**). Desgleichen zeigte eine ähnliche Auflösung der neuen Verbindung NPS 568 in ihre Enantiomere, daß das R-Isomer etwa 40mal stärker im Mobilisieren des intrazellulären Ca^{2+} in parathyroidalen Rinderzellen war als das S-Isomer (vgl. Tabelle 6, vorst.).

[0342] Die Isomere von NPS 467 wurden wie in Beispiel 15 auf ihre Wirkung auf das Serum-Ca^{2+} geprüft. In Übereinstimmung mit den in vitro-Ergebnissen erwies sich das R-Isomer von NPS 467 als stärker als das S-Isomer beim Absenken des Serum-Ca^{2+} in vivo (**Fig. 4**; jede Verbindung wurde bei einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht getestet).

Beispiel 11: NPS 467 vermindert das ionisierte Calcium in einem in vivo-Modell von sekundärem Hyperparathyroidismus

[0343] Ein akzeptiertes und weithin gebräuchliches Tiermodell für sekundären Hyperparathyroidismus aufgrund chronischen Nierenversagens ist die 5/6-nephrektomierte Ratte. Tiere, an denen ein solcher Eingriff vorgenommen wird, werden anfänglich hypocalcämisch, und dann kommt es, um den Ca^{2+}-Spiegel im Serum zu halten, zu einer kompensatorischen Hyperplasie der Nebenschilddrüsen und zu einem erhöhten Spiegel des zirkulierenden PTH. Männliche Sprague-Dawley-Ratten (250 g) wurden 5/6-nephrektomiert, und sie konnten sich 2 Wochen erholen. Zu diesem Zeitpunkt waren sie (aufgrund des hohen Spiegels von Serum-PTH) normocalcämisch. Die Verabreichung von NPS R-467 (10 mg/kg i.p.) verursachte einen rapiden (innerhalb 2 Stunden) Abfall des Spiegels von ionisiertem Ca^{2+} im Serum auf 83% des Spiegels der Kontrollen in einem Tiermodell von sekundärem Hyperparathyroidismus. Dies legt die Annahme nahe, daß Verbindungen dieser An die PTH-Sekretion bei Patienten mit sekundärem Hyperparathyroidismus und hyperplastischen Nebenschilddrüsen wirksam absenken werden.

Beispiel 12: NPS 467 senkt den Spiegel des ionisierte Calciums im Serum von parathyroidektomierten Tieren nicht ab

[0344] Um das primäre Zielgewebe zu bestimmen, auf das NPS 467 beim Hervorrufen einer hypocalcämischen Reaktion wirkt, wurden die Nebenschilddrüsen von Ratten chirurgisch entfernt. Tiere, bei denen eine vollständige Parathyroidektomie vorgenommen wurde, werden hypocalcämisch und sind großenteils vom Calcium aus der Nahrung abhängig, um die Ca^{2+}-Homöostase des Serums beibehalten zu können. Parathyroidektomierte Tiere hatten einen Spiegel von ionisiertem Ca^{2+} im Serum von 0,92 mM, der nach 6 Stunden Fasten allmählich auf 0,76 mM abfiel. Die Verabreichung einer einzelnen Dosis von NPS R-467 (10 mg/kg i.p.) verursachte über einen Zeitraum von 6 Stunden keine Veränderung des Spiegels von ionisiertem Ca^{2+} im Serum. Diese Ergebnisse zeigen, daß für die hypocalcämischen Wirkungen von NPS R-467 intakte Nebenschilddrüsen erforderlich sind. Die Daten zeigen ferner, daß NPS R-467 in vivo auf die Nebenschilddrüsen gerichtet sein kann. Die Ergebnisse stimmen mit der Ansicht überein, daß NPS R-467 in vivo auf den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen wirkt und die PTH-Sekretion absenkt und dadurch den Serumspiegel von ionisiertem Ca^{2+} abfallen läßt.

Beispiel 13: NPS 467 erhöht das intrazelluläre Calcium in menschlichen Nebenschilddrüsen

[0345] Dissoziierte parathyroidale Zellen wurden aus einem Nebenschilddrüsenadenom präpariert, das durch Resektion von einem Patienten mit primärem Hyperparathyroidismus gewonnen wurde. Die Zellen wurden mit Fura-2 beladen und die $[Ca^{2+}]_i$, wie vorstehend beschrieben, gemessen. Sowohl NPS R-467 als auch NPS R-568 verursachten eine konzentrationsabhängige Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Die EC_{50}-Werte für NPS R-467 und NPS R-568 betrugen 20 bzw. 3 µM. Beide Verbindungen sind somit in der Lage, die $[Ca^{2+}]_i$ in pathologischem menschlichem Gewebe zu erhöhen, und es wäre zu erwarten, daß sie die Serumspiegel von PTH und Ca^{2+} in Patienten mit primärem Hyperparathyroidismus absenken.

Beispiel 14: Wirkungsmechanismus von NPS 467 am Calciumrezeptor der parathyroidalen Zelle

[0346] Zur weiteren Untersuchung des Wirkungsmechanismus von NPS 467 auf der Rezeptorebene wurden dissoziierte parathyroidale Rinderzellen verwendet. In Gegenwart von 0,5 mM extrazellulärem Ca^{2+} verursach-

te NPS R-467 eine rapide und vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die in Gegenwart von 1 µM La^{3+} erhalten blieb und durch Vorbehandlung mit PMA (100 nM; 2 min lang) teilweise abgesenkt wurde. Alle diese Resultate stimmen mit einer Wirkung von NPS R-467 am Ca^{2+}-Rezeptor überein. Jedoch wurde die Reaktion des cytosolischen Ca^{2+} auf NPS R-467 aufgehoben, wenn die parathyroidalen Zellen in Ca^{2+}-freiem Puffer suspendiert wurden. Dies legt die Annahme nahe, daß NPS R-467 selbst nicht die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} verursachen kann. Es löst jedoch Reaktionen in parathyroidalen Zellen und in Oocyten aus, wenn eine kleine Menge extrazelluläres Ca^{2+} vorhanden ist. Dies legt die Annahme nahe, daß zum Auslösen einer Reaktion durch NPS R-467 eine teilweise Besetzung der Ca^{2+}-Bindungsstelle erforderlich ist. Um diese Hypothese zu testen, wurden parathyroidale Zellen in Ca^{2+}-freiem Puffer suspendiert und einer submaximalen Neomycinkonzentration ausgesetzt. Es wurde Neomycin verwendet, weil es fast in jeder Hinsicht die Wirkungen von extrazellulärem Ca^{2+} auf parathyroidale Zellen und auf Xenopus-Oocyten, die den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen exprimieren, nachahmt. Die Zugabe von 10 àM Neomycin allein verursachte unter diesen Bedingungen keine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Jedoch löste die anschließende Zugabe von NPS R-467 (30 µM) jetzt eine vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ aus, die, da kein extrazelluläres Ca^{2+} vorhanden war, von der Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+} hergekommen sein mußte.

[0347] Wurden in Ca^{2+}-freiem Puffer gebadete Zellen 30 àM NPS R-467 ausgesetzt, gab es keine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Diese Konzentration von NPS R-467 ist am wirkungsvollsten im Erhöhen der $[Ca^{2+}]_i$, wenn extrazelluläres Ca^{2+} (0,5 mM) vorhanden ist. Jedoch löste die anschließende Zugabe von 10 µM Neomycin nun eine vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ aus. Es ist anzunehmen, daß Neomycin an die gleiche Stelle wie extrazelluläres Ca^{2+} bindet und dieses funktionell ersetzen kann. Die Verwendung einer submaximalen Konzentration, die selbst keine Reaktion verursacht, ergibt eine partielle Besetzung der Ca^{2+} bindenden Stelle und erlaubt die Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors durch NPS R-467.

[0348] Es wurden zusätzliche Studien vorgenommen, um den Wirkungsmechanismus von NPS R-467 weiter zu definieren. Die Zellen wurden noch einmal in Ca^{2+}-freiem Puffer suspendiert, um sicherzustellen, daß jede beobachtete Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ von der Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} herrührte. In diesen Versuchen wurde jedoch eine maximale effektive Neomycinkonzentration (100 µM) verwendet. In Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} riefen 100 µM Neomycin eine rasche und vorübergehende Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ hervor. Die anschließende Zugabe von 30 µM NPS R-467 verursachte keine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Im Gegenversuch wurden 30 µM NPS R-467 vor 100 µM Neomycin hinzugefügt. Wie erwartet, verursachte NPS R-467 keine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Es beeinträchtigte jedoch nicht die $[Ca^{2+}]_i$-Zunahme, die durch die anschließende Zugabe von 100 µM Neomycin hervorgerufen wurde. Diese, mit maximal wirksamen Konzentrationen von NPS R-467 und Neomycin erhaltenen Ergebnisse, legen die Annahme nahe, daß diese beiden Verbindungen nicht an der gleichen Stelle wirken. Vielmehr können die Ergebnisse damit ausreichend erklärt werden, daß man zwei getrennte Stellen auf dem Ca^{2+}-Rezeptor annimmt, nämlich eine, an die Ca^{2+} und Neomycin binden, und eine andere, an die NPS R-467 und strukturell verwandte Verbindungen (wie etwa NPS R-568) binden. Die Bindung von Liganden an die erstere Stelle kann zu einer vollen Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors führen, wogegen die Bindung von Liganden an die letztere Stelle nur dann stattfinden und/oder funktionsrelevant sein kann, wenn die extrazelluläres Ca^{2+} bindende Stelle bis zu einem gewissen, derzeit noch undefinierten Grad besetzt ist. Es ist möglich, daß die Bindung von Liganden an die extrazelluläres Ca^{2+} bindende Stelle eine vorher verborgene Bindungsstelle für NPS R-467 freilegt. Es scheint, daß die NPS R-467 bindende Stelle eine allosterische Stelle ist, die die Rezeptoraktivierung als Reaktion auf die Bindung von Liganden an der extrazelluläres Ca^{2+} bindende Stelle erhöht.

[0349] Die Daten zeigen, daß der Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zelle wenigstens zwei unterschiedliche Stellen für organische Liganden besitzt. Eine Stelle bindet den physiologischen Liganden, extrazelluläres Ca^{2+} und bestimmte organische Polykationen wie Neomycin. Ein Binden an diese Stelle führt zur vollen Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors, einer Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ und der Inhibition der PTH-Sekretion. NPS R-467 und NPS R-568 definieren eine bisher nicht erkannte Bindungsstelle auf dem Ca^{2+}-Rezeptor. Das Binden an dieser Stelle kann nur stattfinden und/oder zu einer vollen Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors führen, wenn die extrazelluläre Ca^{2+}-Bindungsstelle teilweise besetzt ist. Liganden, die an beiden Stellen wirken, bewirken eine Absenkung des Ca^{2+}-Spiegels im Serum in vivo.

Allosterische Stelle auf dem Calciumrezeptor der parathyroidalen Zelle

[0350] Calcimimetische Verbindungen, die den Calciumrezeptor der parathyroidalen Rinderzelle aktivieren, wie NPS R-467 und NPS R-568, verursachen keine Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+}. Vielmehr erhöhen sie die Empfindlichkeit des Ca^{2+}-Rezeptors einer Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} gegenüber und verursachen so eine Verschiebung der Konzentrations-Reaktions-Kurve für

extrazelluläres Ca^{2+} nach links. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, daß sie an der gleichen Stelle auf dem Rezeptor wirken wie extrazelluläres Ca^{2+}. Im Gegensatz dazu verursachen organische und anorganische Polykationen die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} und wirken deshalb vermutlich an der gleichen Stelle wie extrazelluläres Ca^{2+}. Verbindungen wie NPS R-568 wirken vermutlich in allosterischer Weise, und ihre Wirkung hängt von einem gewissen Minimalspiegel von extrazellulärem Ca^{2+} ab. Dies legt die Annahme nahe, daß die teilweise Besetzung der Bindungsstelle des extrazellulären Ca^{2+} auf dem Rezeptor für die Wirksamkeit von Verbindungen wie NPS R-568 erforderlich ist. Dieses Modell stimmt mit den in Beispiel 20 beschriebenen Beobachtungen überein.

[0351] Jedoch sind andere Details des Wirkungsmechanismus von NPS R-568 auf den Ca^{2+}-Rezeptor paxathyroidaler Zellen durch Bindungsstudien, bei denen die spezifische Bindung von radioaktiv (zum Beispiel mit ^{3}H) markiertem NPS R-568 untersucht wurde, genauer erforscht. Es gibt mehrere molekulare Mechanismen, die die Wirkung von NPS R-568 auf den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen erklären könnten. In einem Mechanismus (Modell 1) könnte NPS R-568 an einer Stelle an den Ca^{2+}-Rezeptor binden, die, wenn sie besetzt ist, zur Aktivierung der Rezeptorfunktionalität nicht genügt. Die Aktivierung findet nur statt, wenn ein bestimmter Spiegel der Besetzung der extrazelluläres Ca^{2+} bindenden Stelle(n) erreicht wird. In einem alternativen Mechnismus (Modell 2) könnte die Besetzung der extrazelluläres Ca^{2+} bindenden Stelle latente Bindungsstellen für Verbindungen wie NPS R-568 freilegen. Die Besetzung dieser latenten Stelle durch NPS R-568 erhöht dann die Affinität und/oder Wirksamkeit der Bindung an der Stelle des extrazellulären Ca^{2+}. Beide Mechanismen beziehen eine Form von allosterischer Aktivierung des Ca^{2+}-Rezeptors durch Verbindungen wie NPS R-568 ein. Diese sind nicht die einzigen möglichen Mechanismen, die die Wirkung von Verbindungen wie NPS R-568 auf den Ca^{2+}-Rezeptor der parathyroidalen Zellen erkären könnten. Aus den Ergebnissen der nachstehend beschriebenen Bindungsstudien können andere Wirkungsmechanismen vorgeschlagen werden.

[0352] Um den Wirkungsmechanismus der Verbindungen wie NPS R-568 auf den Ca^{2+}-Rezeptor parathyroidaler Zellen weiter zu untersuchen, können Bindungsstudien mittels ^{3}H-NPS R-568 ausgeführt werden. Die spezifische Bindung von ^{3}H-NPS R-568 an intakte parathyroidale Zellen oder aus parathyroidalen Zellen präparierte Membranen wird zunächst durch auf dem Fachgebiet wohlbekannte Techniken untersucht. Man wird dann die kinetischen Parameter der Bindung als Funktion der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen messen. Spezifisch ist es die Scatchard-Analyse der Daten, die die Zahl der Bindungsstellen und die scheinbare Affinität der Rezeptorstelle für ^{3}H-NPS R-568 aufzeigen wird. Diese Parameter werden dann als eine Funktion der Veränderungen des Spiegels von extrazellulärem Ca^{2+} in dem für den Versuch verwendeten Puffer untersucht werden. Wenn Modell 1 zutreffend ist, müßte ein signifikanter spezifischer Bindungsspiegel in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} vorkommen. Große Veränderungen der kinetischen Parameter der Bindung als Funktion des Spiegels von extrazellulärem Ca^{2+} würden Modell 2 favorisieren. Es wird erwartet, daß verschiedene andere anorganische und organische Polykationen, die vorstehend in anderen Beispielen beschrieben wurden, ähnliche Veränderungen in den Bindugsparametern von ^{3}H-NPS R-568 aufweisen werden, wie dies extrazelluläres Ca^{2+} tut. Dies würde die Sichtweise stützen, wonach diese Polykationen an der Bindungsstelle des extrazellulären Ca^{2+} wirken, die von jener unterschiedlich ist, an die Verbindungen wie NPS R-568 binden.

Beispiel 15: BOPCARI-Clonierungsverfahren 1

[0353] Eine Expressionsclonierungsstrategie bei Xenopus laevis-Oocyten wurde dazu verwendet, die den parathyroidalen Rinder-Calciumrezeptor codierende cDNA zu bestimmen. Diese Techniken werden hier nur kurz beschrieben; eine vollständigere Beschreibung wurde in den vorangegangenen Abschnitten gebracht, die Techniken zum Clonieren weiterer Formen des Ca^{2+}-Rezeptors aus anderen Zelltypen beschreiben. Zuerst wurde poly(A)$^{+}$ angereicherte RNA durch Extraktion mit Guanidiniumthiocyanat, Zentrifugierung über CsCl und Oligo(dT)-Cellulosechromatographie aus Rinder-Nebenschilddrüsen hergestellt. Die Injektion der so erhaltenen poly(A)$^{+}$-angereicherten RNA in Oocyten (25–50 ng/Oocyte) verlieh Sensitivität für hohe extrazelluläre Ca^{2+}-Konzentrationen und das dreiwertige Kation (1–100 µM) Gd^{3+}, wie hier beschrieben, so daß die beiden Kationen calciumaktivierte Chloridströme auslösten. In Kontroll-Eiern, denen Wasser injiziert worden war, wurden keine solchen Ströme ausgelöst. Xenopus laevis-Frösche wurden aufgrund ihrer gewonnenen Oocyten ausgewählt, die aufwiesen (i) ein hoher Reifegrad (d.h. Stadium V, VI); (ii) eine hohe Aktivität von durch Ca^{2+}-Ionophoren wie A23187 aktivierten Cl^{-}-Strömen; (iii) ein hoher Spiegel funktionaler Expression von Gd^{3+} induziertem Cl^{-}-Strom, wenn 25 ng/Oocyte aus Rinder-Nebenschilddrüsen isolierte Gesamt-poly(A)$^{+}$-RNA injiziert wurden. Dann wurde die mRNA der Größenfraktionierung unterworfen, wozu präparative Agarose-Gelelektrophorese mit Strömungskontinuum (Hediger, M.A., Anal. Biochem. 159:280–286 (1986)) verwendet wurde, um Fraktionen von poly(A)+-RNA zu erhalten, die weiter mit den Ca^{2+}-Rezeptor codierenden Transkripten angereichert war. Bei einem Aktivitätspeak (z.B. Oocyten, denen mRNA aus diesen Fraktionen injiziert worden war), der bei einem Größenbereich von 4-5,5 kb erhalten worden war, zeigte sich eine erhöhte Expression von Gd^{3+}

aktivierten Cl^--Strömen. Diese RNA wurde dazu verwendet, eine größenselektierte gerichtete cDNA-Bibliothek im Plasmid pSPORT1 herzustellen, die mit Transkripten von voller Länge angereichert war. Dann wurde aus den DNA-Inserts, die aus 350–500 unabhängigen Clonen dieser Bibliothek vereinigt worden waren, komplementäre Sense-RNA (cRNA) synthetisiert und in Oocyten injiziert. Nach der Injektion von RNA von einem einzelnen Filter mit 350 Kolonien wurden Gd^{3+} aktivierte Cl^--Ströme beobachtet. Die Herstellung und Injektion von cRNA von immer kleineren Pools von Clonen führte zur Isolierung eines einzelnen Clons (BoPCaR 1) mit einem cDNA-Insert von 5,3 kb, der nach der Injektion seiner cRNA in Oocyten eine deutlich verstärkte Ca^{2+}-Rezeptorwirkung exprimierte. Ein Plasmid, das die BoPCaR 1-cRNA (vgl. Plasmid, **Fig. 45**; Restriktionskarte, **Fig. 46**; und partielle Nucleotidsequenz, **Fig. 47**) enthält, wurde bei der ATCC unter der Zugangsnummer ATCC 75416 hinterlegt.

[0354] Die BoPCaR 1-cDNA liegt außerhalb des Größenbereichs der größenselektierten RNA, von der sich erwiesen hatte, daß sie in Xenopus-Oocyten Neomycin ausgelöste Cl^--Kanalaktivität exprimierte. Dies stimmt mit der Möglichkeit überein, daß verschiedene Isoformen oder mehrfache Gene andere Angehörige der Ca^{2+}-Rezeptor-Genfamilie verbergen könnten.

[0355] Es wurden mehrere pharmakologische und biochemische Kriterien angewandt, um diesen Clon als einen parathyroidalen bona fide-Rinder-Ca^{2+}-Rezeptor codierend zu bestimmen. Oocyten, die den clonierten Rezeptor exprimierten, nicht aber Oocyten, denen Wasser injiziert worden war, reagierten auf ansteigende Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} (1,5-5 mM) oder Gd^{3+} (20–600 µM) mit großen Zunahmen der Cl^--Ströme (bis wenigstens 1,8 Mikroampere), die mehrere Male größer waren als jene, die bei Oocyten beobachtet wurden, denen poly(A)+ injiziert worden war. Diese Reaktionen nahmen über einen Zeitraum von einem (1) bis vier (4) Tagen nach der Injektion von aus der BoPCaR 1-cDNA gewonnenen cRNA in die Eier deutlich zu. Weiterhin waren die Konzentrationsbereiche der beiden Kationen, die diese Reaktion auslösten, sehr ähnlich jenen, von denen vorher gezeigt worden war, daß sie in vitro auf parathyroidale Rinderzellen wirkten. Neomycin (20-100 µM), von dem man weiß, daß es die Wirkung von Ca^{2+} auf parathyroidale Zellen getreu nachahmt, verursachte Veränderungen des Cl^--Stroms in Oocyten, die im Wesentlichen mit jenen identisch waren, die von Ca^{2+} oder Gd^{3+} hervorgerufen wurden, und diese fanden über den gleichen Konzentrationsbereich statt, über den dieses Antibiotikum die parathyroidale Funktion in vitro moduliert. Schließlich ergab die in vitro-Translation der aus dem Clon hergestellten RNA ein einzelnes Hauptprotein auf Polyacrylamidgelen mit einem Molekulargewicht von ungefähr 100 kd, dessen Synthese durch die Einbeziehung von Mikrosomen aus Hundepankreas erhöht wurde, wobei es gleichzeitig zu einer Zunahme des scheinbaren Molekulargewichtes um 10–15% kam. Letzteres legt die Annahme nahe, daß der clonierte Rezeptor stark mit Membranen interagiert, wie dies von einem integralen Membranproteinrezeptor erwartet werden kann, und daß er in seiner nativen Form glycosyliert ist. Studien mit dem Lectin Concanavalin A weisen darauf hin, daß der Ca^{2+}-Rezeptor wahrscheinlich ein Glycoprotein ist. Somit stimmen die pharmakologischen Eigenschaften des clonierten Rezeptors, der in Oocyten auf hohem Spiegel exprimiert wird, sowie die bis heute ausgeführten biochemischen Studien mit dessen Identität mit der parathyroidalen Ca^{2+}-Dynamik bei Rindern völlig überein (wie durch Veränderungen der Ca^{2+}-aktivierten Cl^--Stromes in Oocyten exemplifiziert).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

(i) ANMELDER: Nemeth, Edward F.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: CALCIUMREZEPTOR-AKTIVE MOLEKÜLE

(iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Wolf, Greenfield & Sacks, P.C.

(B) STRASSE: 600 Atlantic Avenue

(C) STADT: Boston

(D) BUNDESSTAAT: Massachusetts

(E) LAND: Vereinigte Staaten von Amerika

(F) POSTLEITZAHL: 02210-2204

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUM: Diskette, 5,25 Zoll

(B) COMPUTER: IBM-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS Version 3.3

(D) SOFTWARE: WordPerfect 5.1

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: Nicht verfügbar

(B) EINREICHUNG: Hiermit eingereicht

(C) KLASSIFIZIERUNG: Nicht verfügbar

(viii) INFORMATIONEN ZUM ANWALT/AGENTEN

(A) NAME: Gates, Edward R.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 31.616

(C) REFERENZ-/AKTEN-NR.: B0801/7012

(ix) INFORMATIONEN ZUR FERNMELDEVERBINDUNG

(A) TELEPHON: (617) 720-3500

(B) TELEFAX: (617) 720-2441

(B) TELEX: EZEKIEL

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR. 1

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 2148 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR. 1:

```
CCACGCGTCC GCGGAAAAAA AAAAAAAGTT CCCCACTCTA    40
GTACAGAGAA GGTTGGCAGA GTCGTAAGCC CCCAACCTCT    80
TAAACTTCTC TGCATCTCCA AGGAGAAGGA GGGAAGAGGG   120
GTTCTTTCCG ACCTGAGGAG CTGGATCTGG GGTCCGAGAA   160
CCCCAAGGTA GCACCGGAAA GAACAGCACA GGAGGCGAGA   200
GCGTGCGGTG GCCGGTKGGC GGGAGAACCA GACCCGACKY   240
CGCGGTCCTC GGYGCTGCCG GGKYCCSGGG ACTCAGCTCA   280
GCACGACTGG GAAGCCGAAA GTACTACACA CGGTCTCTGC   320
```

```
ATGATGTGAC TTCTGAAGAC TCAAGAGCCA CCCACTTCAC   360
TAGTCTGCAA TGGAGAAGGC AGAAATGGAA AGTCAAACCC   400
CACGGTTCCA TTCTATTAAT TCTGTAGACA TGTGCCCCCA   440
CTGCAGGGAG TGAGTCGCAC CAAGGGGGAA AGTCCTCAGG   480
GGCCCCCAGA CCACCAGCGC TTGAGTCCCT CTTCCTGGAG   520
AGAAAGCAGA ACTATGGCAC TTTATAGCTG CTGTTGGATC   560
CTCTTGGCTT TTTTCTACCT GGTGCACTTC CGCCTATGGG   600
CCTGACCAGC GAGCCCAAAA GAAAGGGGAC ATTATCCTCG   640
GGGGGCTCTT TCCTATTCAT TTTGGGGTTG MMGTGAAAGA   680
TCAGGATCTA AAGTCGAGGC CGGAGTCCGT GGAGTGTATC   720
AGGTATAATT TCCGAGGATT TCGCTGGTTA CAAGCTATGA   760
TATTTGCCAT AGAGGAAATA AACAGCAGTC CAGCCCTTCT   800
TCCCAACATG ACCCTGGGAT ACAGGATATT CGACACTTGT   840
AACACCGTCT CTAAAGCCTT GGAGGCCACC CTGAGTTTTG   880
TGGCCCAGAA CAAAATTGAC TCTTTGAACC TTGATGAGTT   920
CTGCAACTGC TCAGAGCACA TCCCCTCTAC CATCGCAGTG   960
GTGGGAGCTA CTGGCTCGGG CATCTCCACA GCAGTGGCCA  1000
ACCTGCTGGG GCTCTTCTAC ATCCCCCAGG TCAGCTATGC  1040
CTCCTCCAGC AGACTCCTCA GCAACAAGAA TCAATTCAAG  1080
TCCTTCCTCC GCACCATACC CAATGATGAA CACCAGGCCA  1120
CGGCCATGGC TGACATCATC GAGTACTTCC GCTGGAACTG  1160
GGTGGGCACA ATTGCAGCTG ACGATGACTA TGGCCGGCCA  1200
GGGATCGAGA AGTTTCGAGA GGAAGCTGAG GAGAGGGACA  1240
TCTGCATCGA CTTCAGCGAG CTCATCTCCC AATACTCTGA  1280
TGAGGAAAAG ATCCAGCAGG TGGTGGAGGT GATCCAGAAT  1320
TCCACCGCCA AAGTCATTGT CCGTCTTCTC CAGCGGCCCA  1360
GACCTGGAAC CCCTCATCAA AGAGATCGTC CGGCGCAATA  1400
```

```
TCACAGGCAG GATCTGGCTG GCCAGCGAGS CTGGSCAGCT  1440
CTTCCCTGAT TGCTATGCCC GAGTATTTCC ATGTGGTCGG  1480
AGGCACCATT GGGTTTGGTT TGAAAGCTGG GCAGATCCCA  1520
GGCTTCCGGG AATTCCTGCA GAAAGTCCAC CCCAGGAAGT  1560
CTGTCCACAA TGGTTTTGCC AAGGAGTTTT GGGAAGAAAC  1600
ATTTAACTGC CACCTGCAAG AGGGTGCTAA AGGCCCATTA  1640
CCGGTGGACA CCTTCCTGAG AGGTCACGAA GAAGGAGGTG  1680
CCAGGTTAAG CAACAGTCCC ACTGCCTTCC GACCTCTGTG  1720
CACTGGGGAG GAGAACATCA GCAGTGTCGA GACTCCTTAC  1760
ATGGATTATA CACATTTACG GATATCCTAC AACGTCTACT  1800
TAGCCGTCTA CTCCATTGCT CATGCCCTAC AAGATATATA  1840
CACCTGCATA CCTGGGAGAG GGCTCTTCAC CAACGGTTCC  1880
TGCGCAGATA TCAAGAAGGT TGAAGCTTGG CAGGTCCTGA  1920
AACACCTGCG GCACCTAAAT TTTACCAGCA ATATGGGGGA  1960
GCAAGTAACT TTCGATGAAT GTGGAGACCT GGCAGGGAAC  2000
TATTCCATCA TCAACTGGCA CCTCTCCCCA GAGGACGGCT  2040
CCATAGTGTT TAAGGAAGTT GGATATTACA ATGTCTATGC  2080
CAAGAAAGGA GAGAGACTCT TCATCAATGA TGAAAAAATT  2120
CTGTGGAGTG GATTCTCAAG GGAGGTGC               2148
```

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, das ein Calciumrezeptorpolypeptid codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
(a) Nucleinsäuremolekülen, umfassend die Nucleotidsequenz wie in SEQ ID NO.1 dargestellt;
(b) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleinsäuresequenz des cDNA-Inserts umfassen, das in ATCC 75416 enthalten ist; und
(c) Nucleinsäuremolekülen, die an ein Nucleinsäuremolekül hybridisieren können, das zu einem Molekül nach (a) oder (b) komplementär ist, und einen funktionellen Calciumrezeptor codieren.

2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das eine genomische DNA ist.

3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das eine cDNA ist.

4. Zelle, hergestellt durch Einfügen des Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

5. Zelle nach Anspruch 4, die das Calciumrezeptorpolypeptid aus einem exogen hinzugefügten Nucleinsäuremolekül exprimiert.

6. Verfahren zur Herstellung eines Calciumrezeptorpolypeptids, umfassend das Züchten der Zelle nach Anspruch 5 unter Bedingungen, die die Expression des Polypeptids erlauben, und Gewinnen des Polypeptids aus der Zelle.

7. Calciumrezeptorpolypeptid, das von dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 codiert wird oder durch das Verfahren nach Anspruch 6 erhältlich ist.

8. Antikörper oder Fragment davon, der/das spezifisch an das Calciumrezeptorpolypeptid nach Anspruch 7 bindet.

9. Antikörper nach Anspruch 8, der gegebenenfalls an ein Toxin gekoppelt ist.

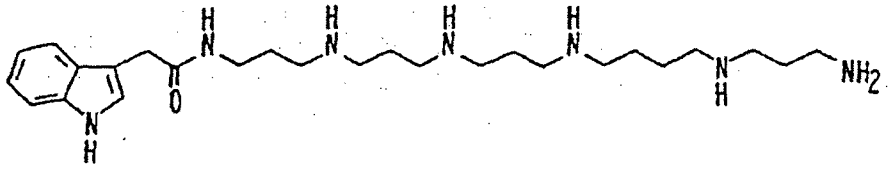
10. Verfahren zur Identifizierung eines Nucleinsäuremoleküls, das einen Rezeptor für anorganische Ionen codiert, umfassend die Schritte des Inkontaktbringens einer Bibliothek aus Nucleinsäuremolekülen mit dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder dem Komplement davon und des Nachweises

der Hybridisierung unter niedrig-stringenten Hybridisierungsbedingungen.

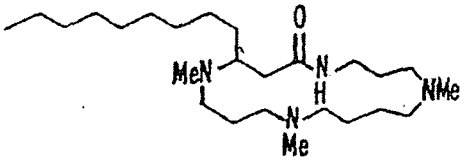
11. Verfahren zur Identifizierung eines Nucleinsäuremoleküls, das einen Rezeptor für anorganische Ionen codiert, umfassend die Schritte des Inkontaktbringens einer Bibliothek aus Nucleinsäuremolekülen mit dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und dem Komplement davon und des Nachweises der Hybridisierung unter hoch-stringenten Hybridisierungsbedingungen.

Es folgen 74 Blatt Zeichnungen

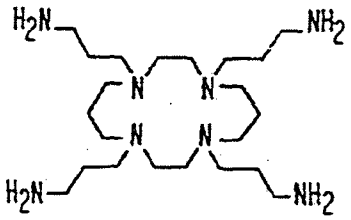
Anhängende Zeichnungen



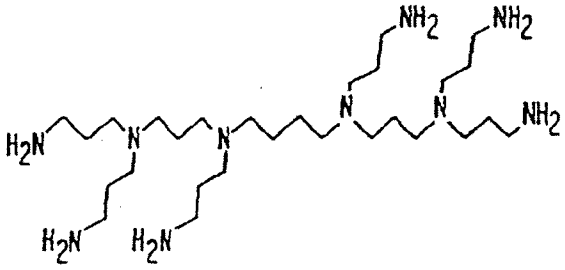
NPS 019



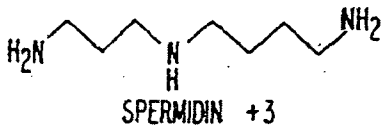
BUDMUNCHIAMIN A (+3)



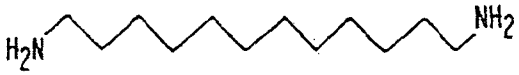
NPS 383 (+8 EC_{50}=150μM)



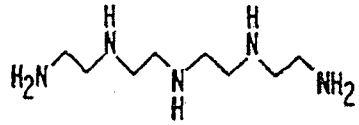
NPS 381 (+10 EC_{50}=100μM)



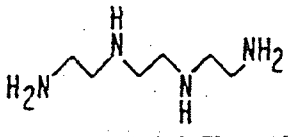
SPERMIDIN +3



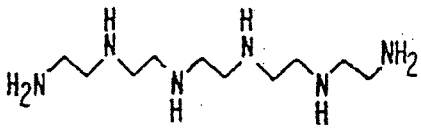
1,12-DIAMINDODECAN -2
(DADD)



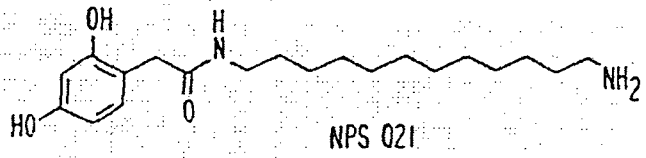
TETRAETHYLENPENTAMIN (+5 EC_{50}=2500μM)



TRIETHYLENTETRAMIN (+4 EC_{50}=8000μM)

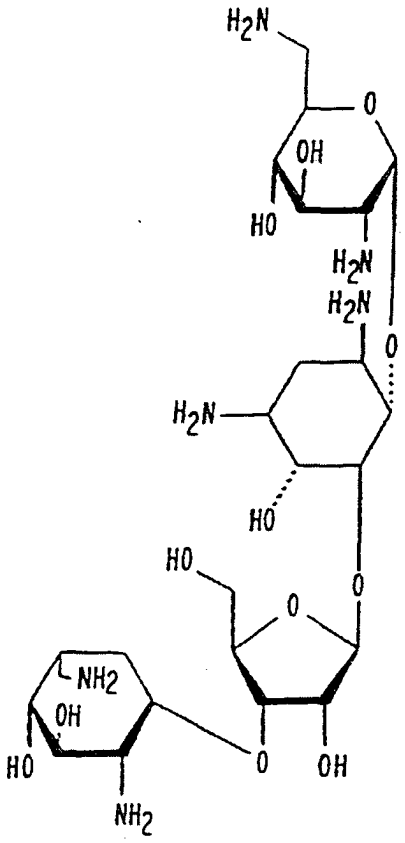


PENTAETHYLENHEXAMIN (+6 EC_{50}=500μM)

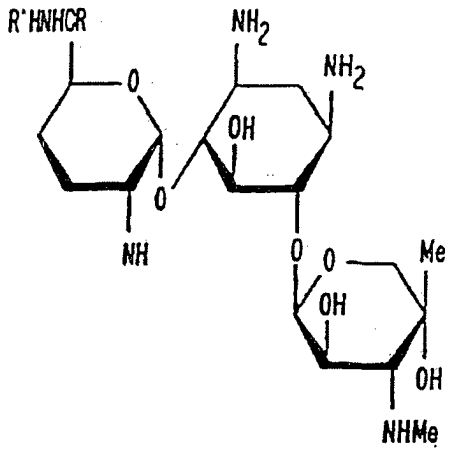


NPS 021

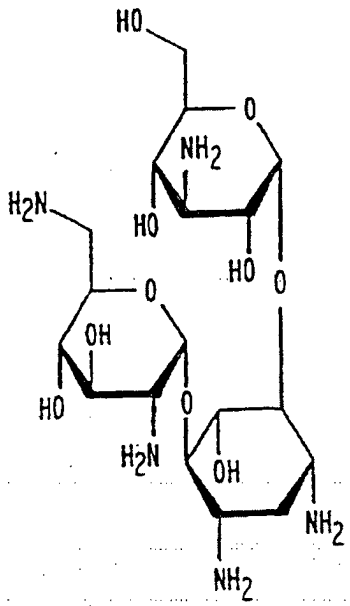
FIG. 1a.



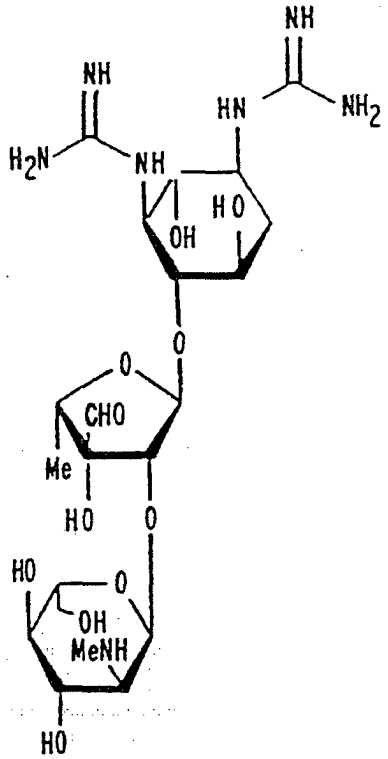
Neomycin B (+6)



Gentamicin (Komplex +5)
C1 R = R' = Me
C2 R = Me; R' = H
C1aR = R' = H

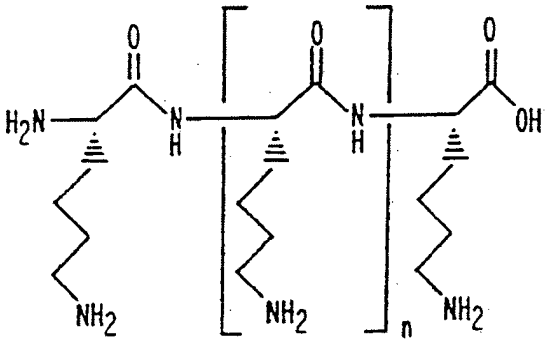


Bekanamycin (+5)

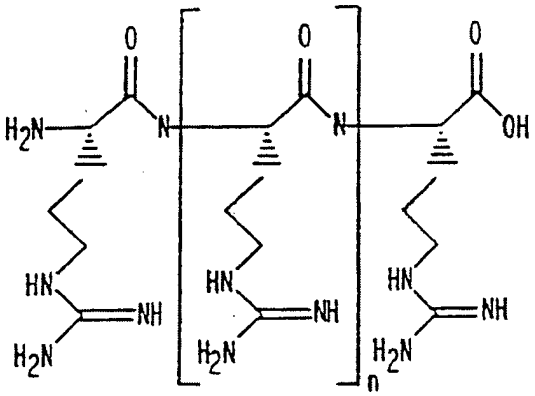


Streptomycin (+3)

FIG 1b



poly-Lys (27 kD) n=210 +210
poly-Lys (14 kD) n=110 +110
poly-Lys (38 kD) n= 55 +55

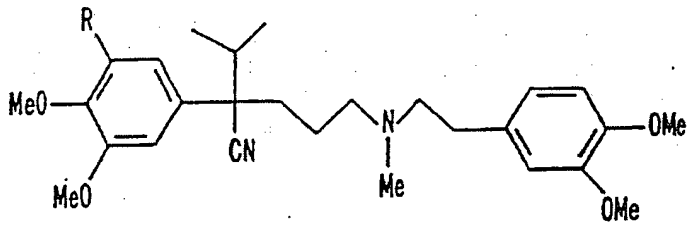


poly-Arg (100 kD) n=640 +640
poly-Arg (40 kD) n= 256 +256

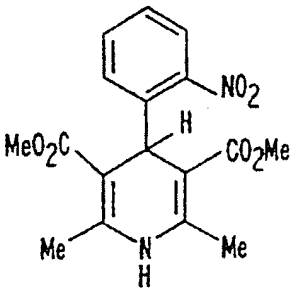
PROTAMIN +21

H N-Pro-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Pro-Val-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
Pro-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-OH

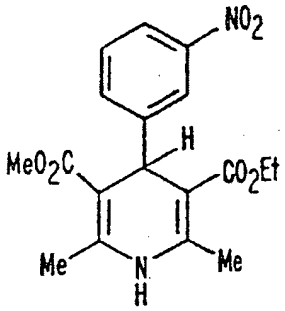
FIG. 1c.



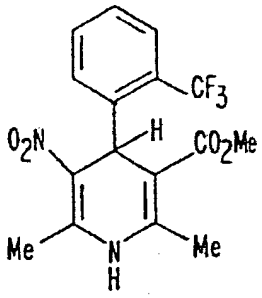
VERAPAMIL R=H +1
D-600 R=OMe +1



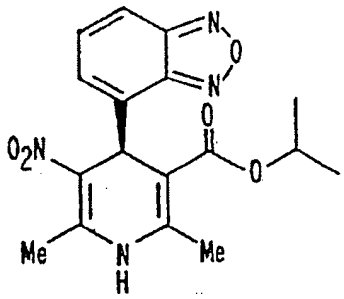
NIFEDIPIN +1



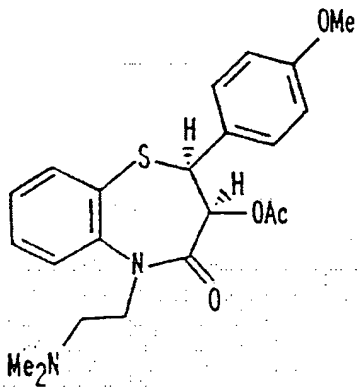
NITRENDIPIN +1



BAY K 8644 +1

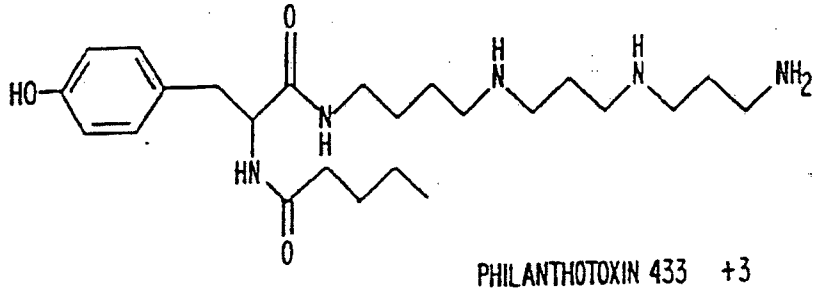


202-791 +1

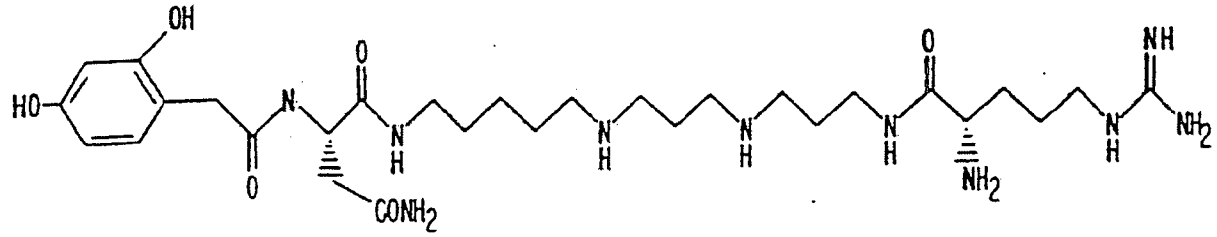


DILTIAZEM +1

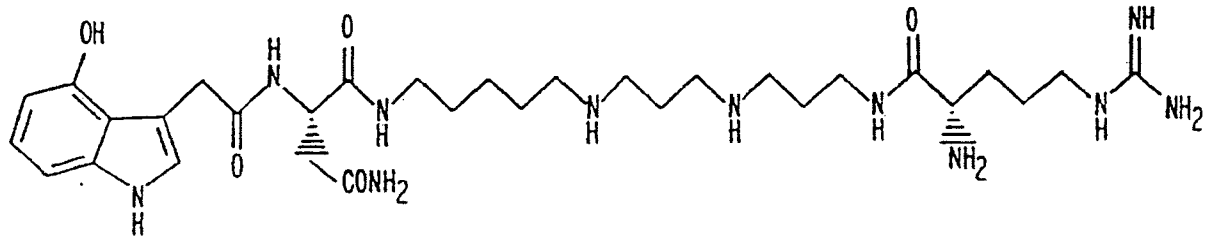
FIG. 1d



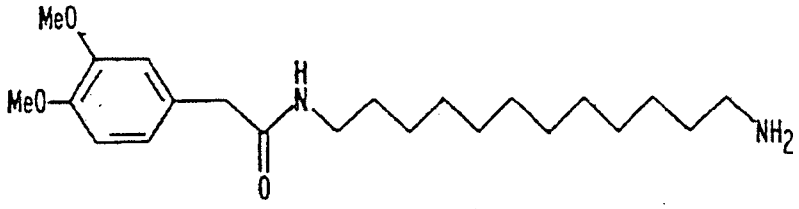
PHILANTHOTOXIN 433 +3



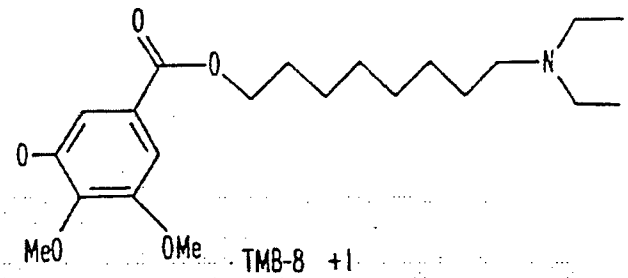
ARGIOTOXIN 636 +4



ARGIOTOXIN 659 +4

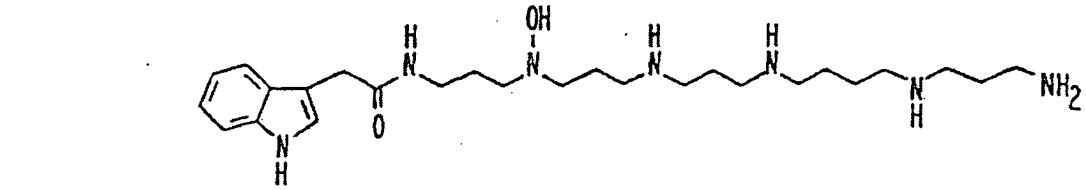


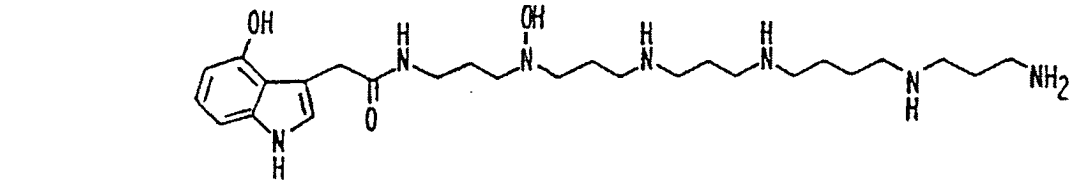
NPS 384

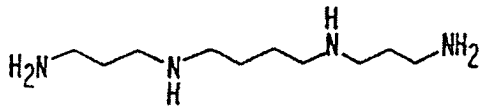


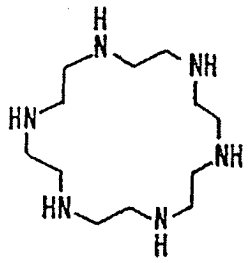
TMB-8 +1

FIG. 1e.









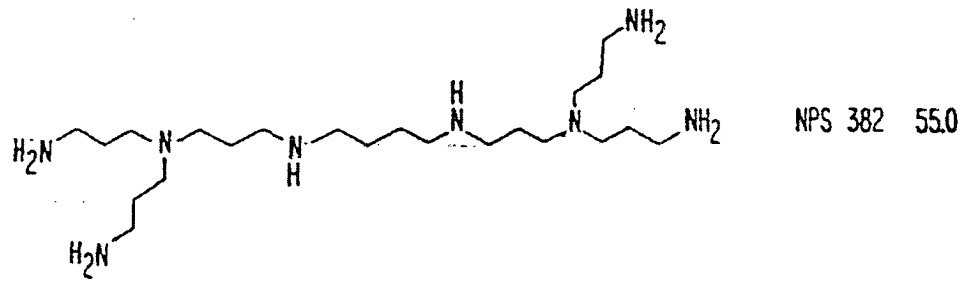


FIG. 1f.

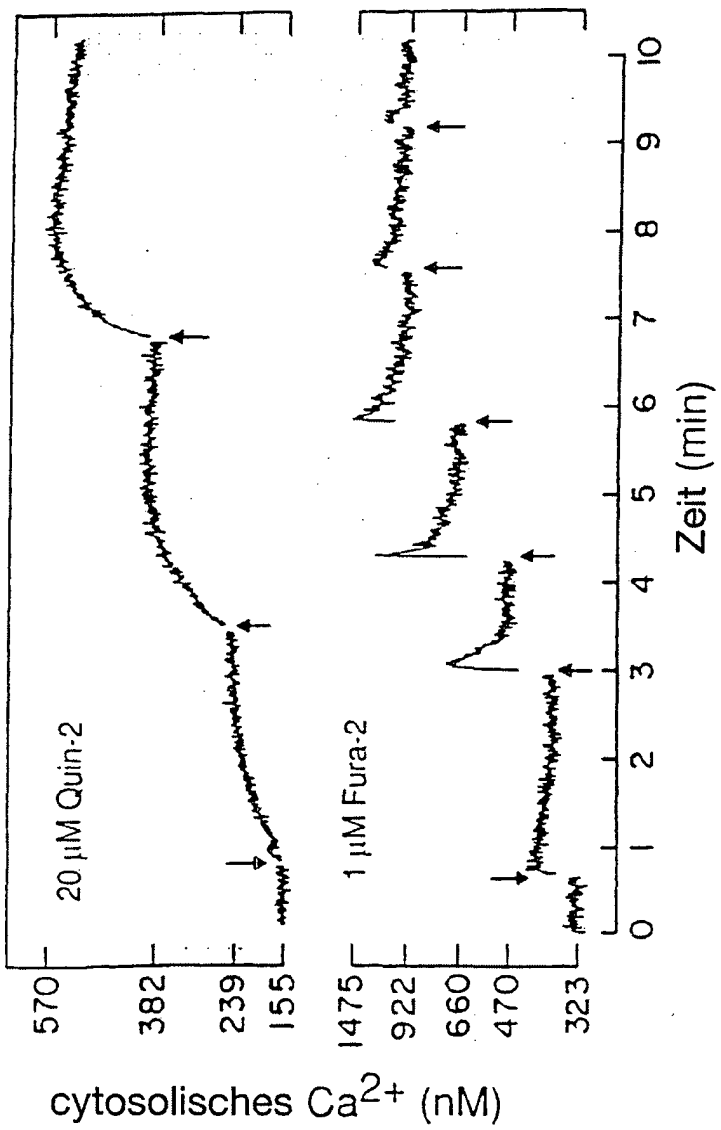

20 µM Quin-2
1 µM Fura-2
570
382
239
155
1475
922
660
470
323
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Zeit (min)
cytosolisches Ca2+ (nM)

FIG. 2.

FIG. 3a.

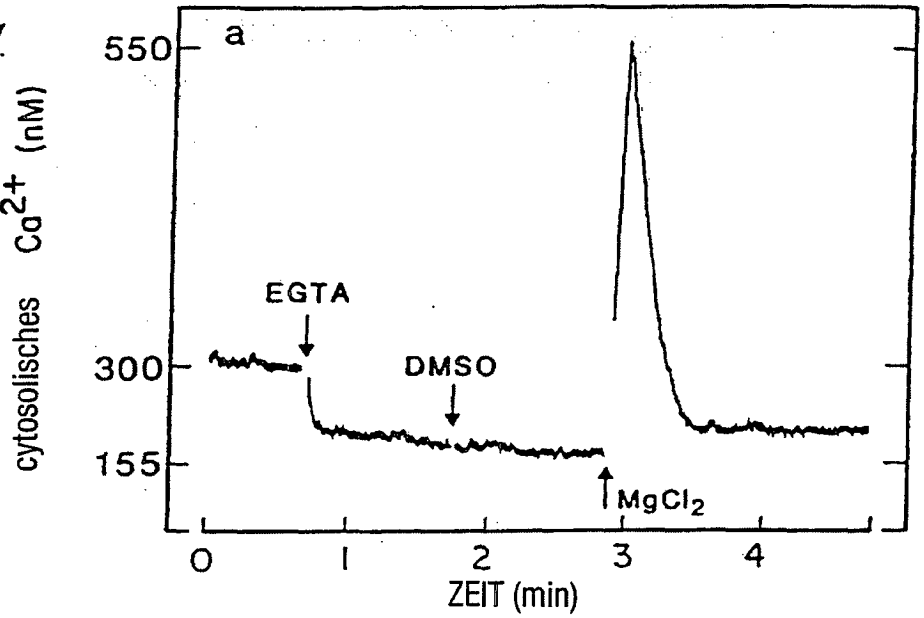


FIG. 3b.

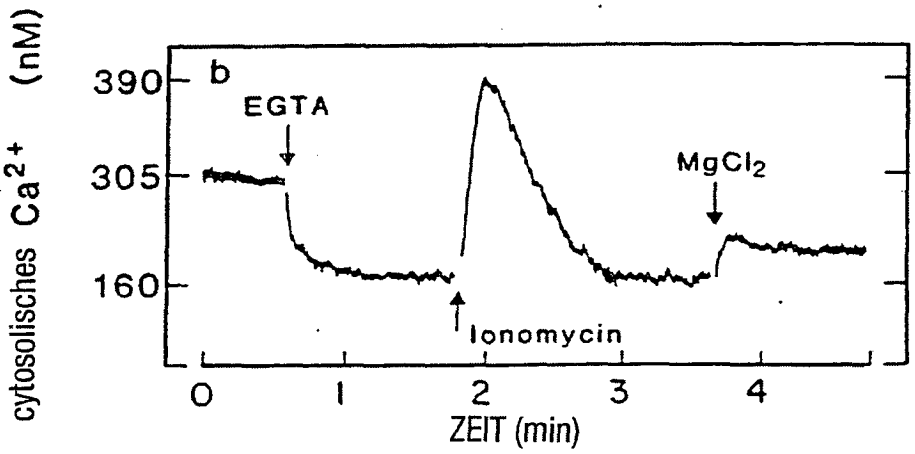


FIG. 3c.

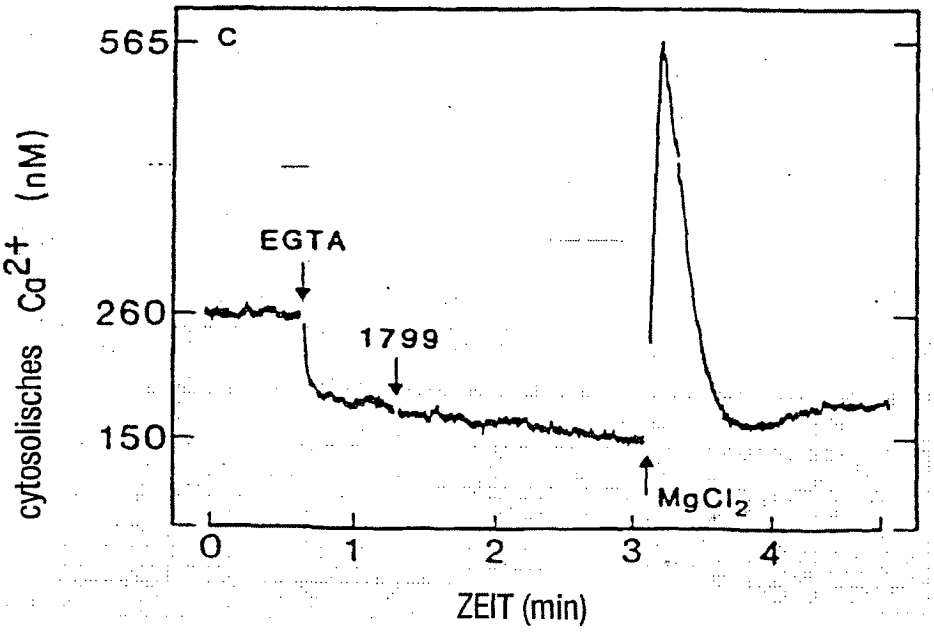


FIG. 4a.

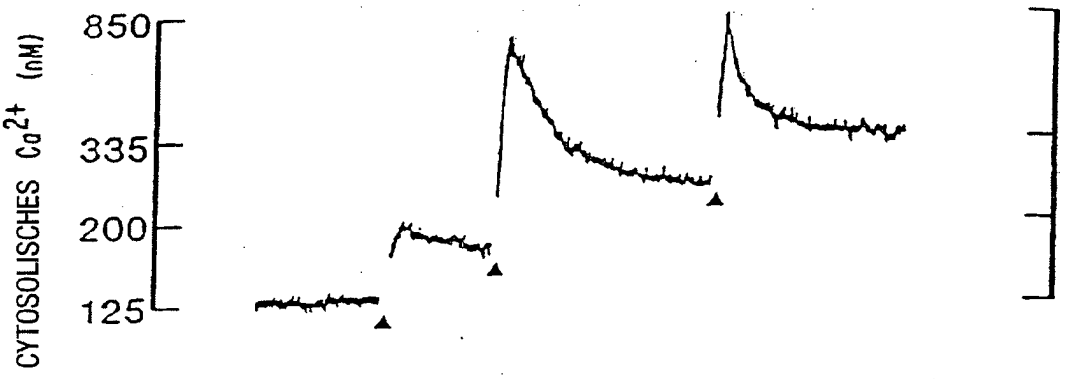


FIG. 4b.



FIG. 4c.

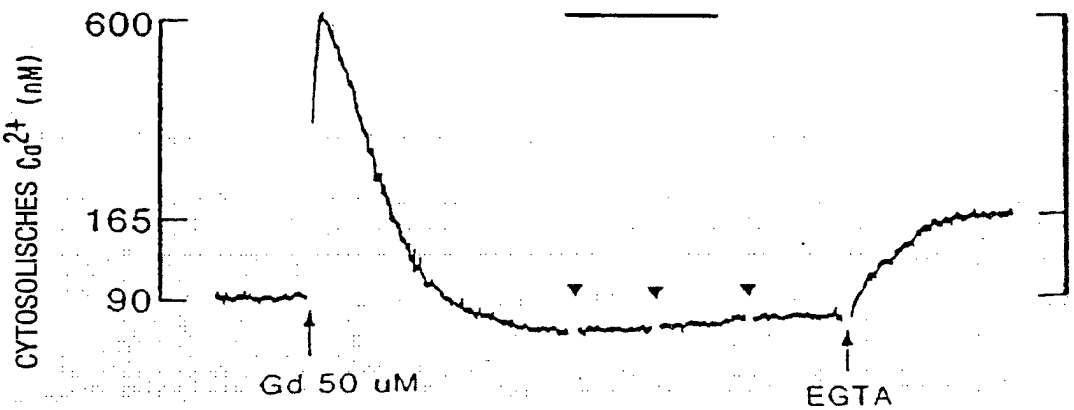


FIG. 5c.

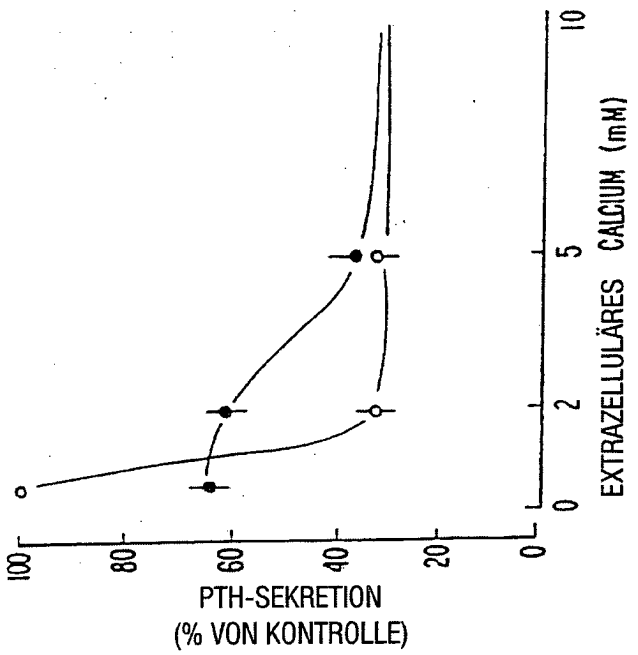


FIG. 5b.

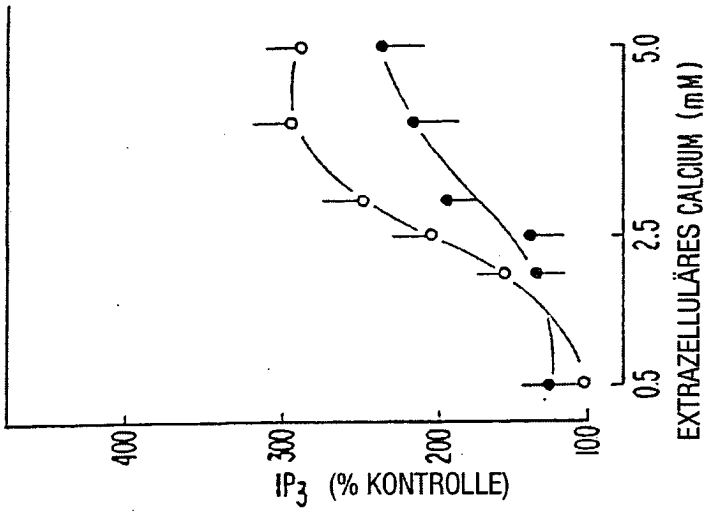
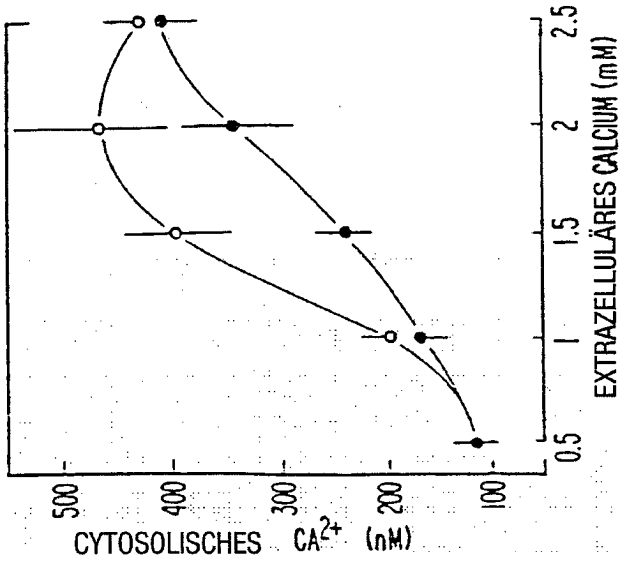


FIG. 5a.



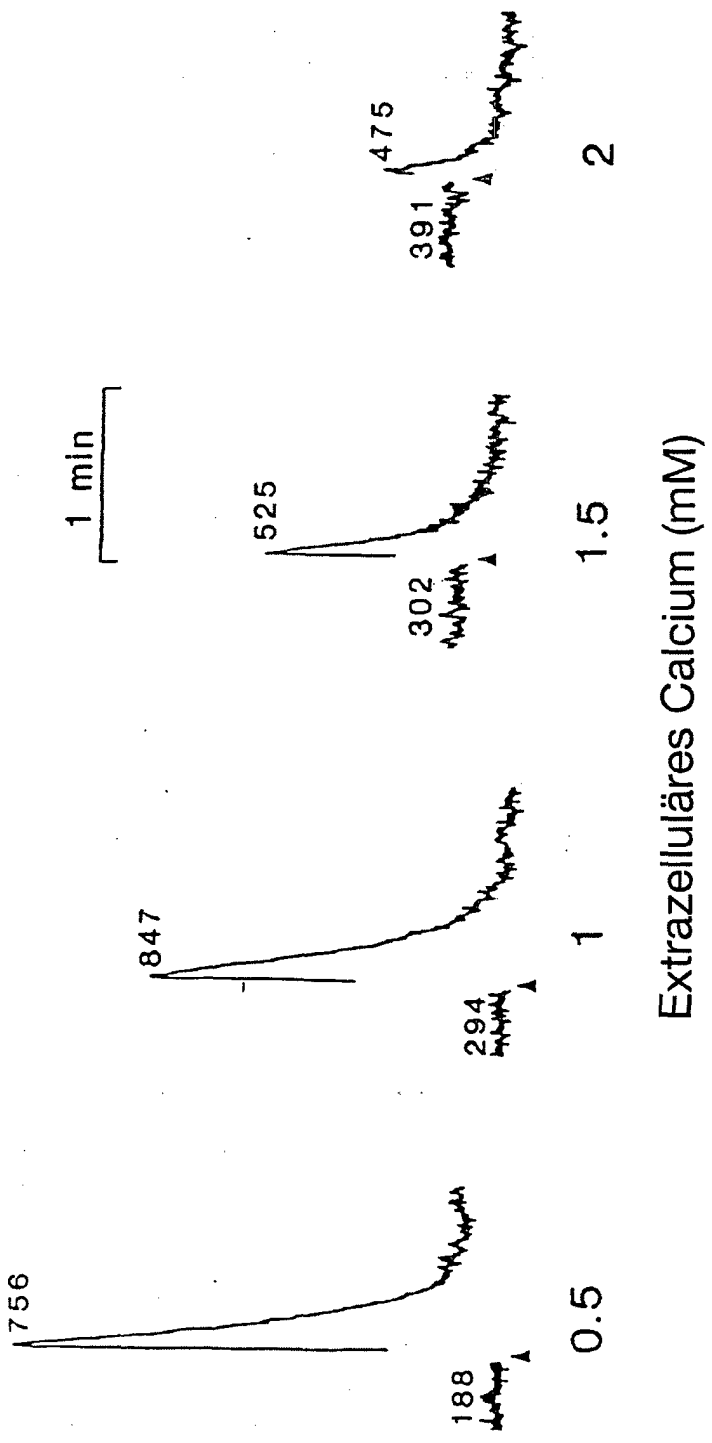

1 min
756
188
0.5
847
294
1
525
302
1.5
475
391
2
Extrazelluläres Calcium (mM)

FIG. 6.

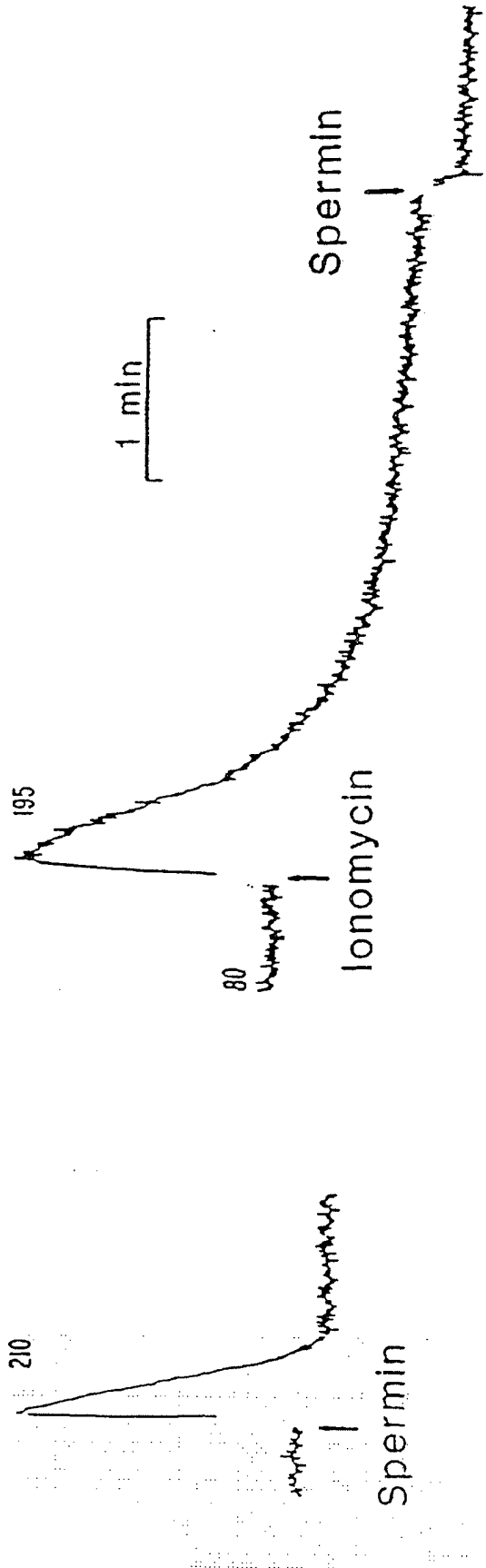


FIG. 7.

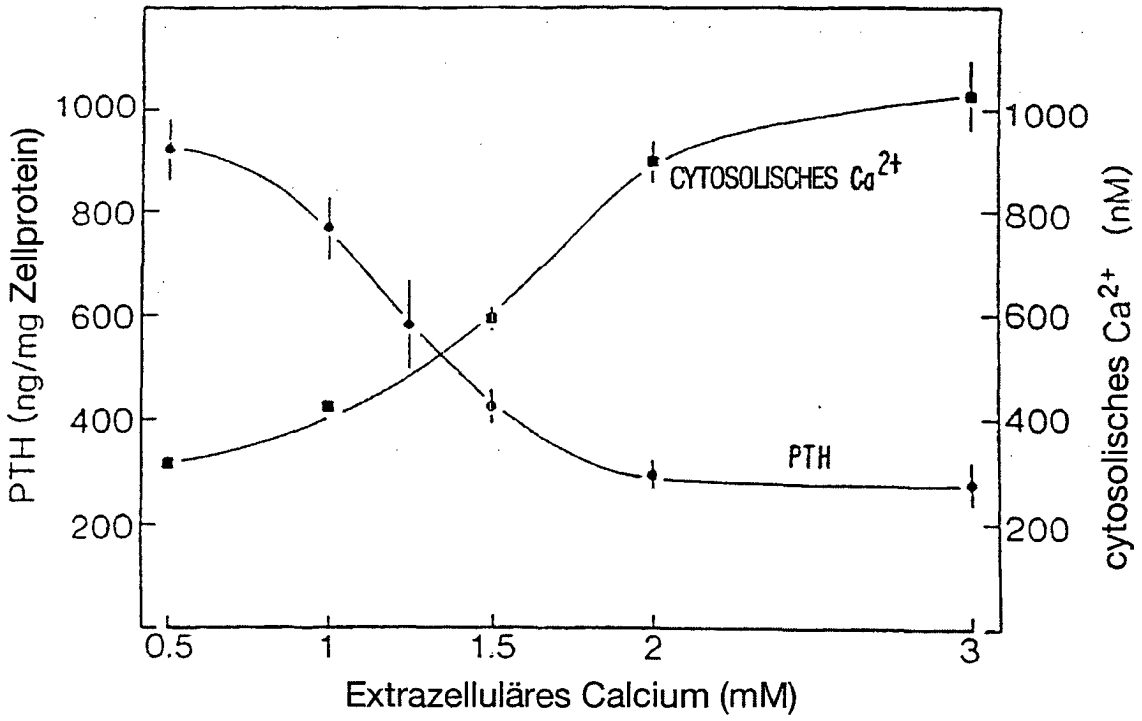

PTH (ng/mg Zellprotein)
1000
800
600
400
200
CYTOSOLISCHES Ca2+
PTH
1000
800
600
400
200
cytosolisches Ca2+ (nM)
0.5
1
1.5
2
3
Extrazelluläres Calcium (mM)

FIG. 8a.

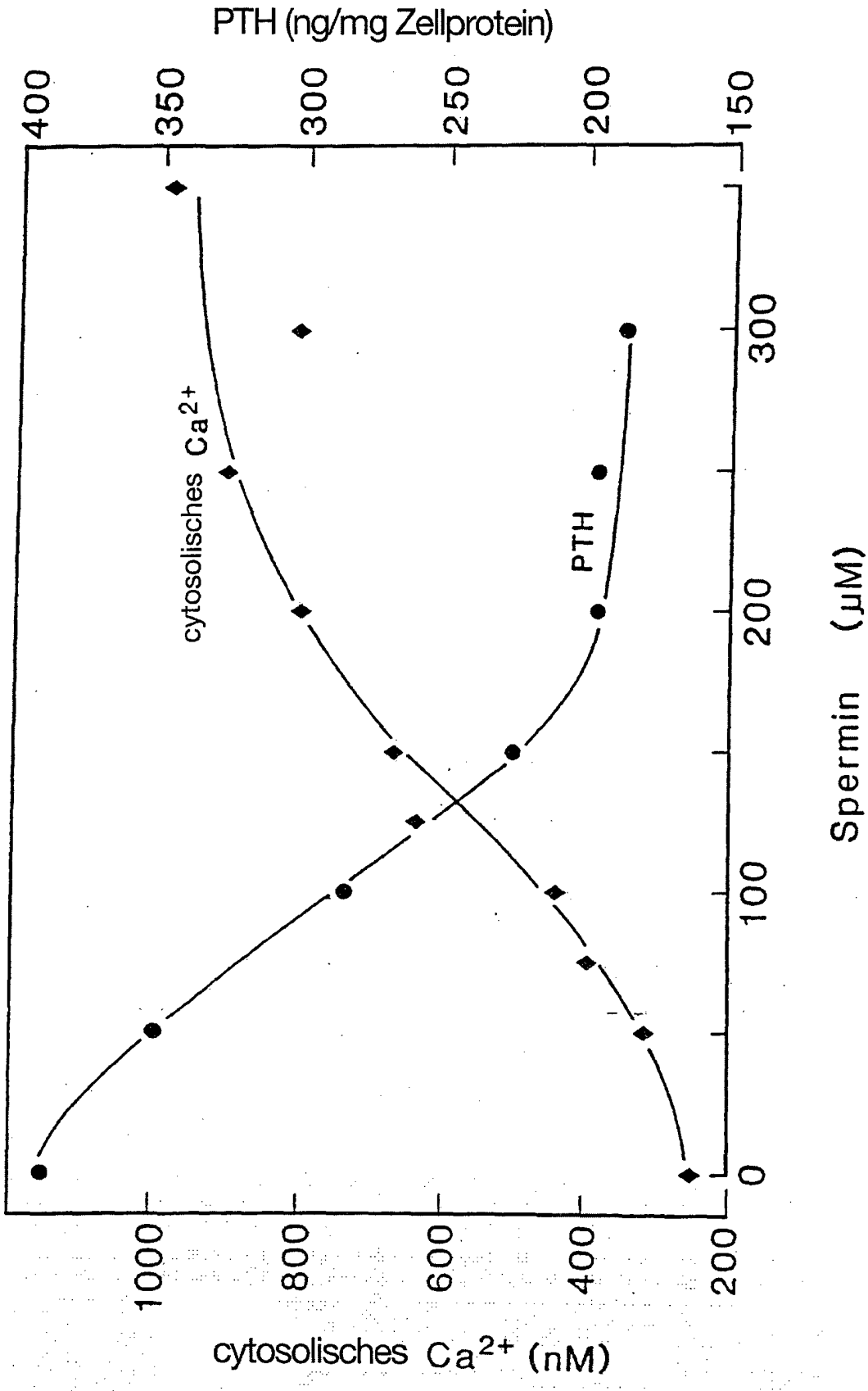

PTH (ng/mg Zellprotein)
400
350
300
250
200
150
cytosolisches Ca2+
PTH
300
200
100
0
Spermin (µM)
1000
800
600
400
200
cytosolisches Ca2+ (nM)

FIG. 8b.

FIG. 9a.

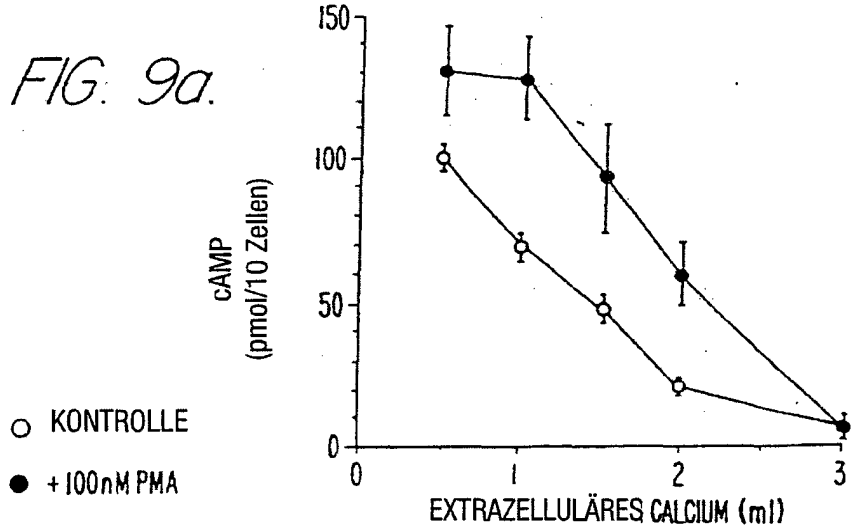


FIG. 9b.

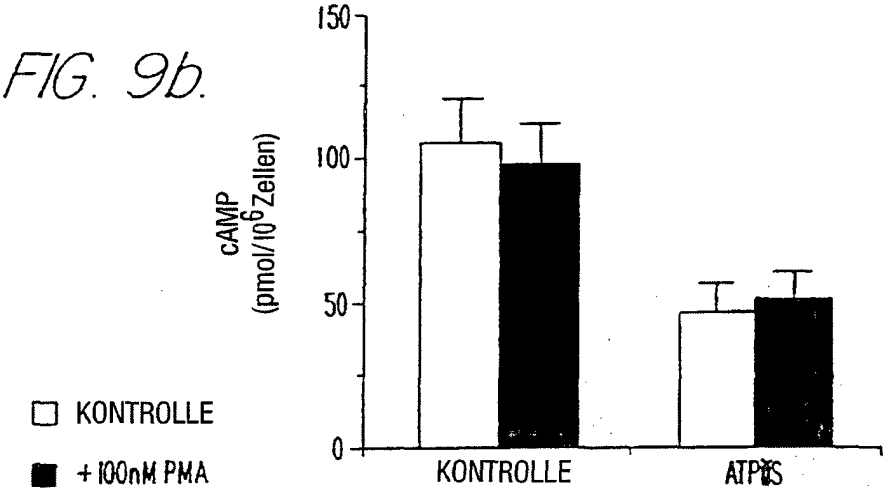
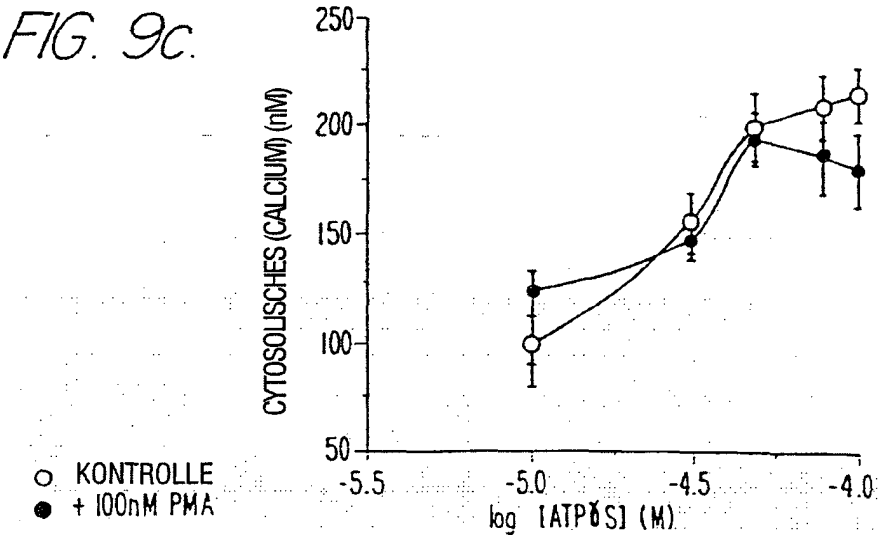


FIG. 9c.



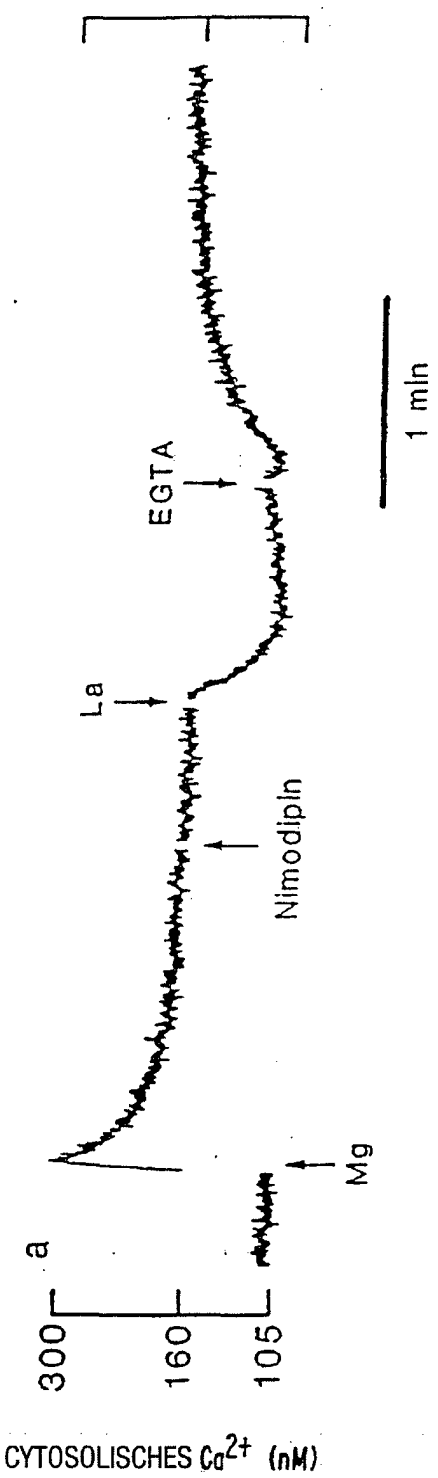


FIG. 10a.

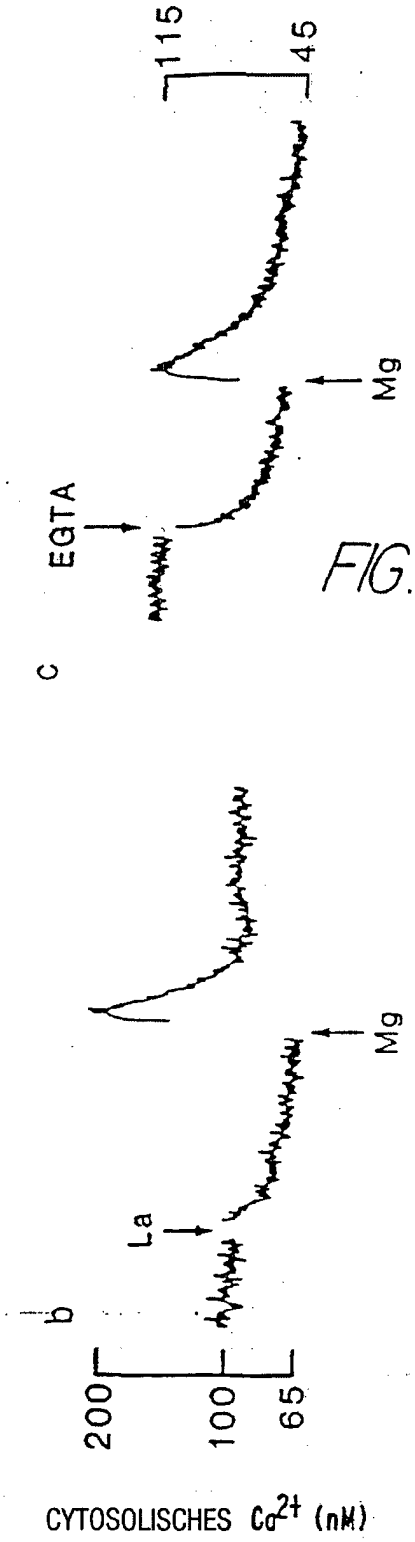


FIG. 10b.

FIG. 10c.

FIG. IIa.

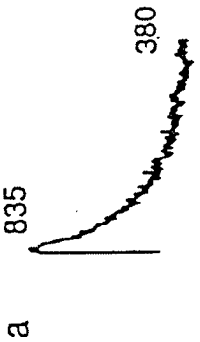


FIG. IIb.

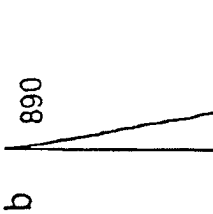


FIG. IIc.

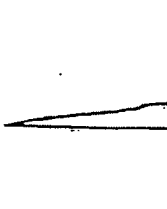


FIG. IId.

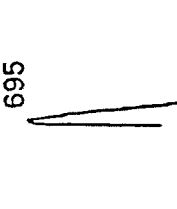


FIG. IIe.

FIG. IIf.



FIG. IIg.

FIG. 11h.

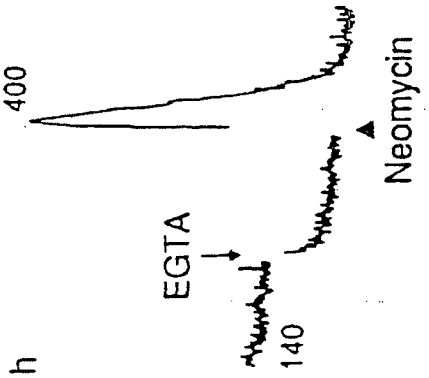


FIG. 11i.

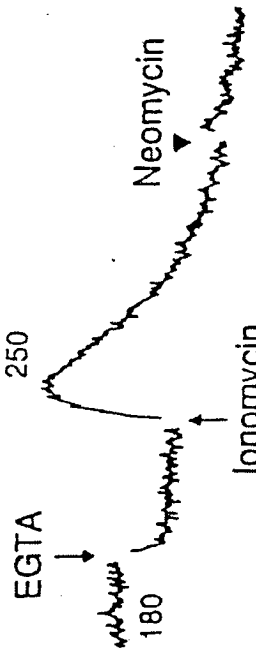


FIG. 12.

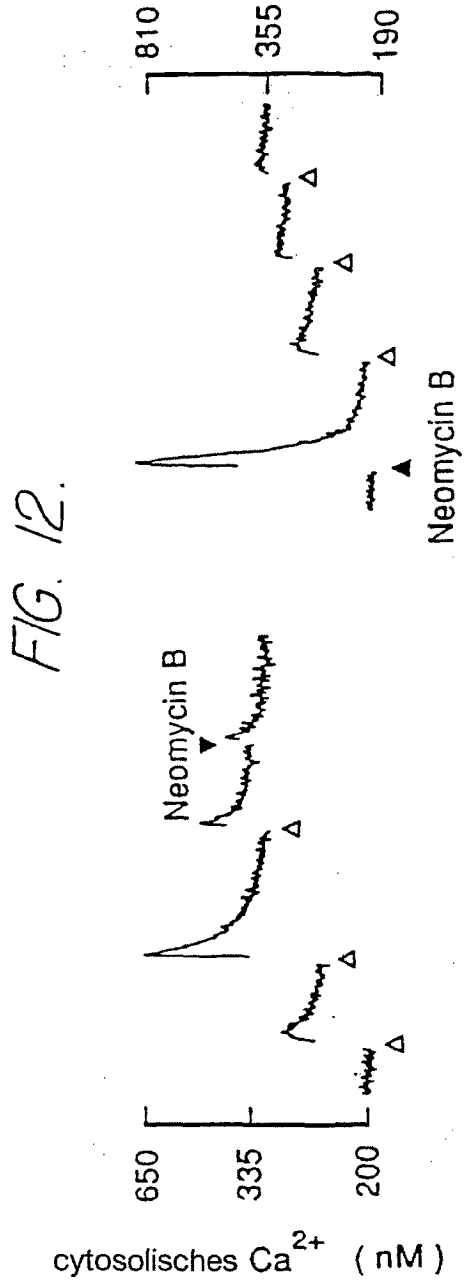


FIG. 13a.

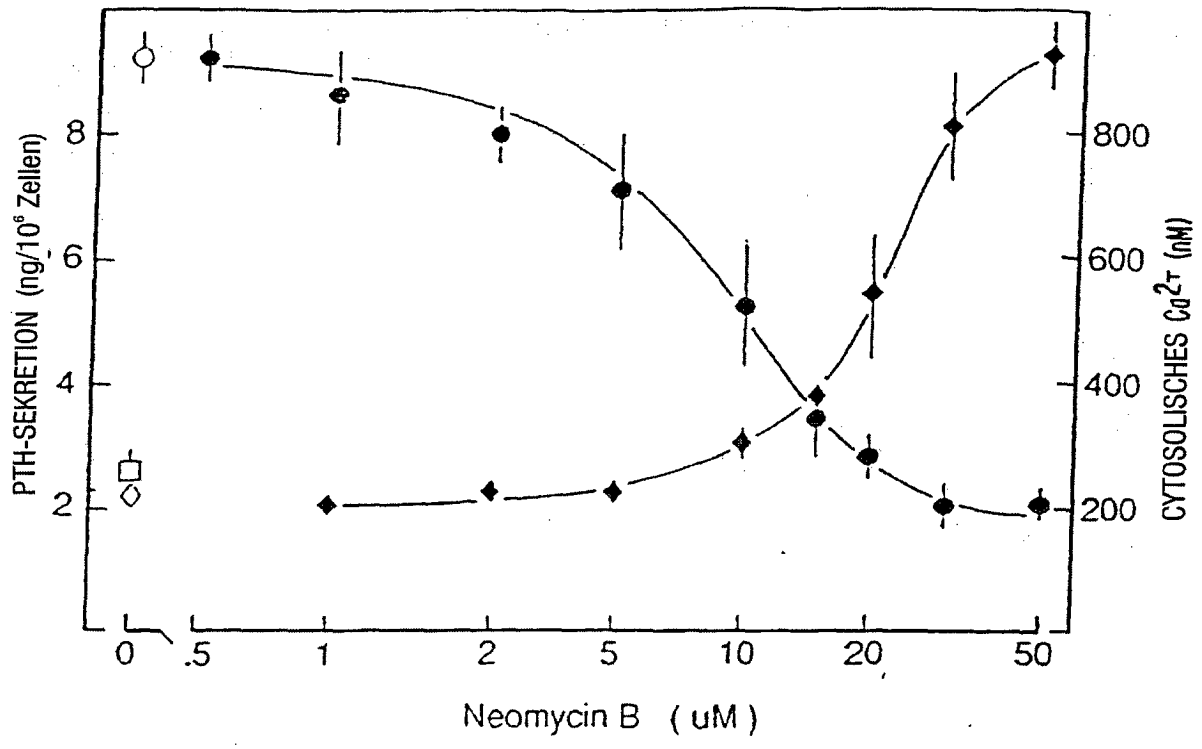
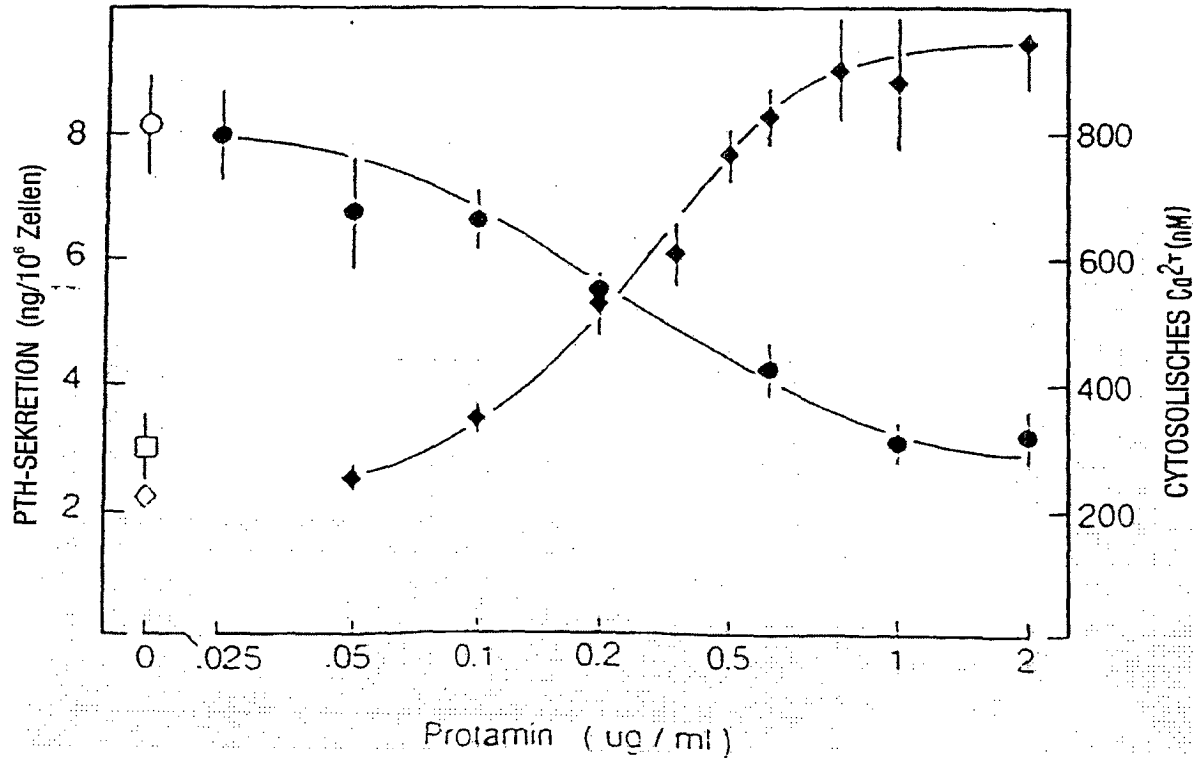


FIG. 13b.



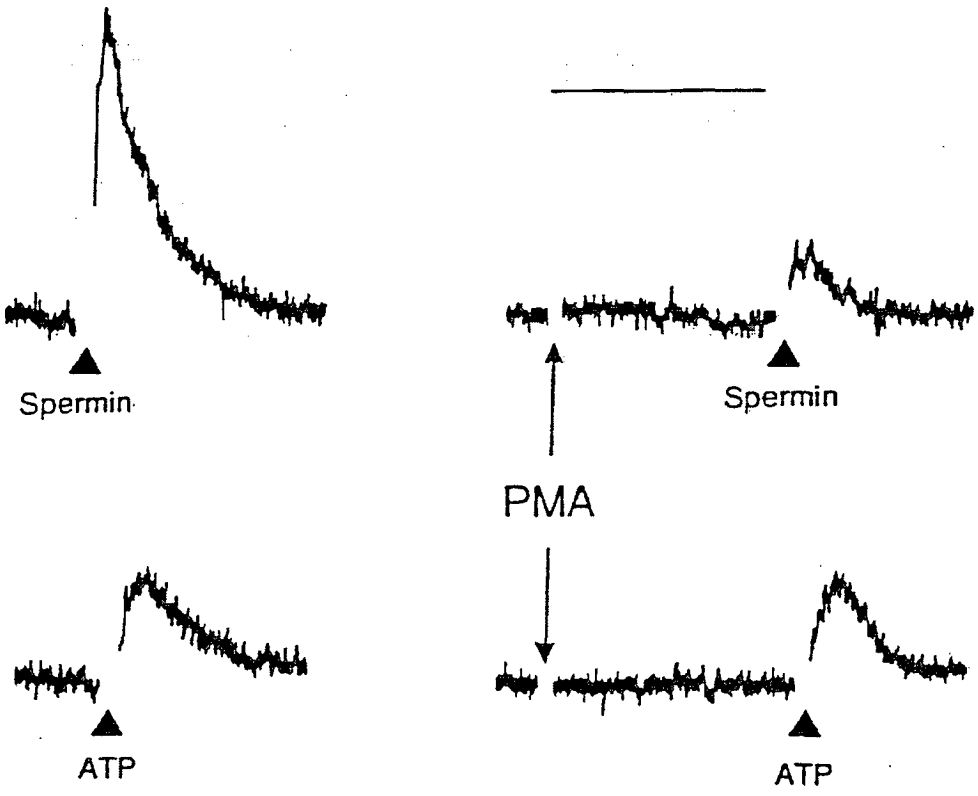
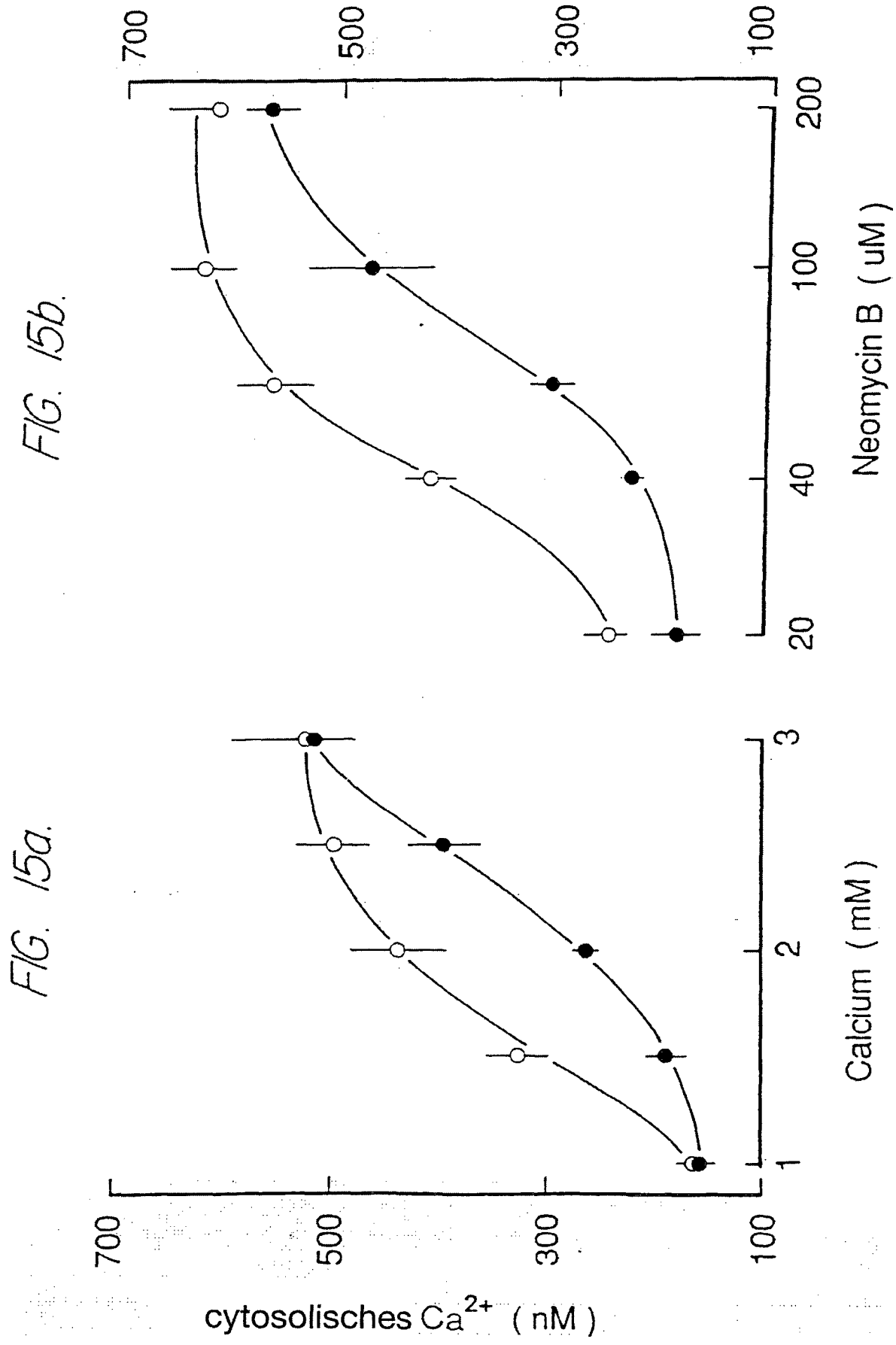


FIG. 14.


FIG. 15a.
FIG. 15b.
cytosolisches Ca^{2+} (nM)
700
500
300
100
Calcium (mM)
1
2
3
Neomycin B (uM)
20
40
100
200

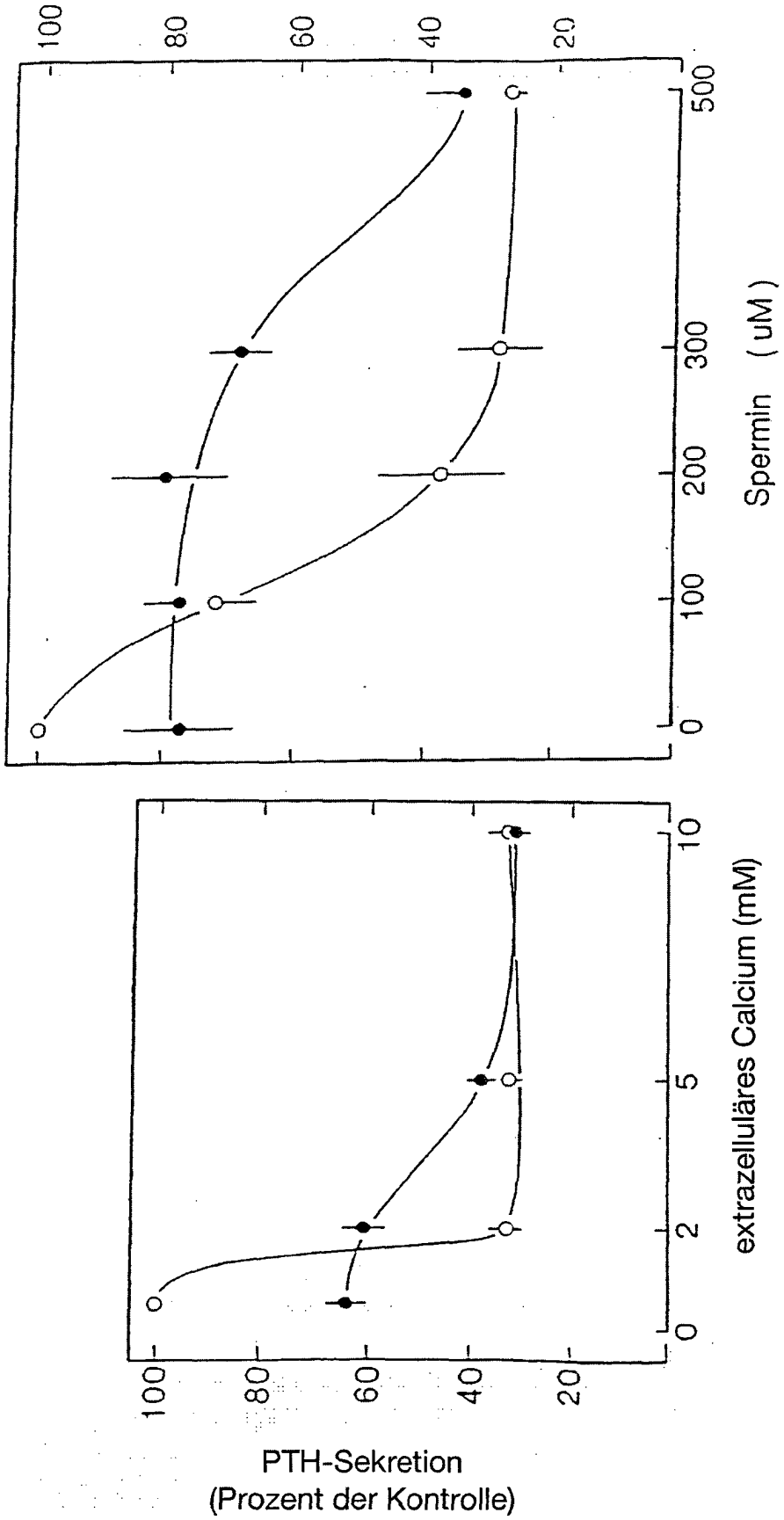


FIG. 16a.

FIG. 16b.

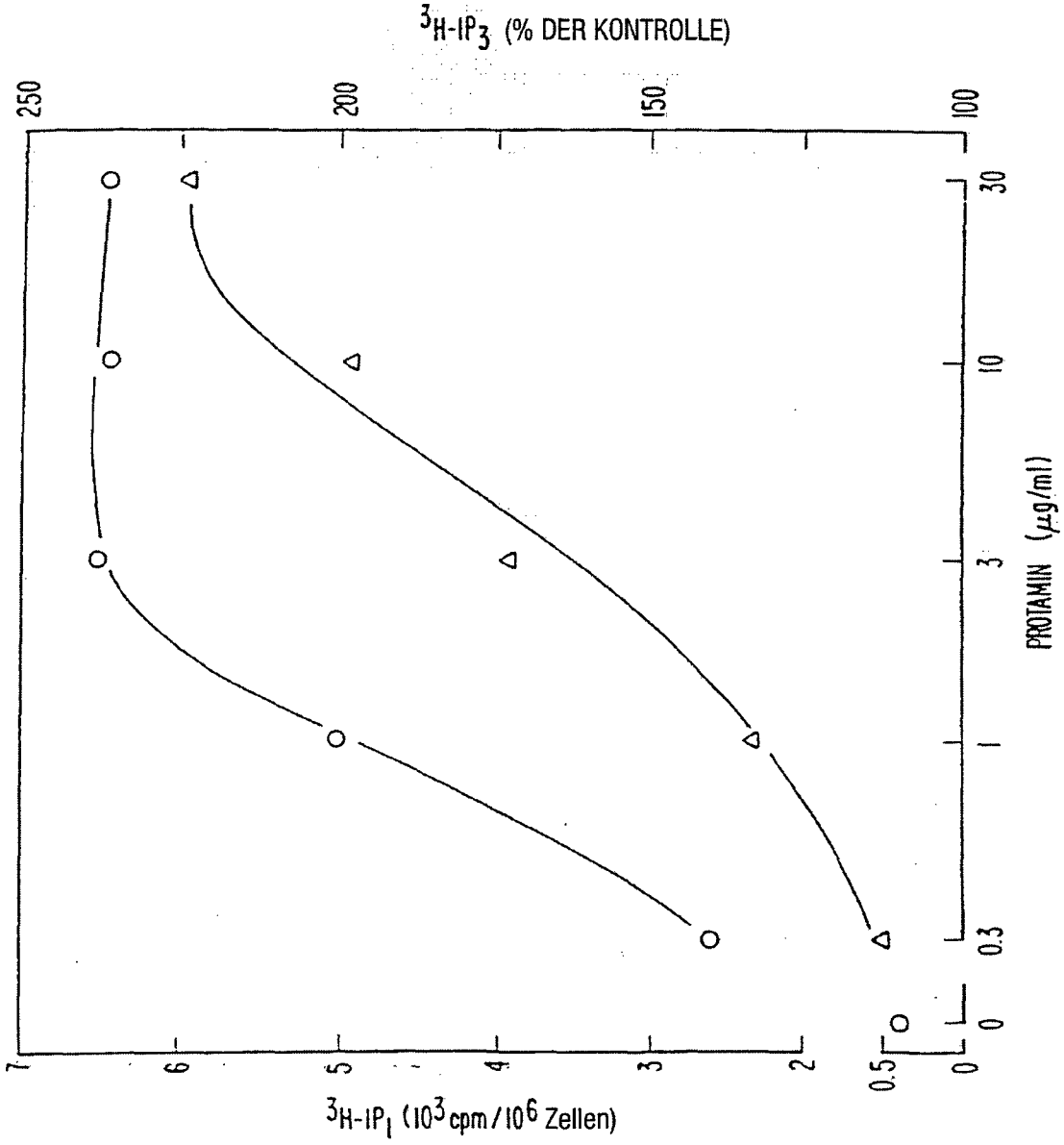

^{3}H-IP$_3$ (% DER KONTROLLE)
250
200
150
100
30
10
3
1
0.3
0
0.5
0
PROTAMIN (µg/ml)
7
6
5
4
3
2
^{3}H-IP$_1$ (10^3cpm/10^6 Zellen)

FIG. 17.

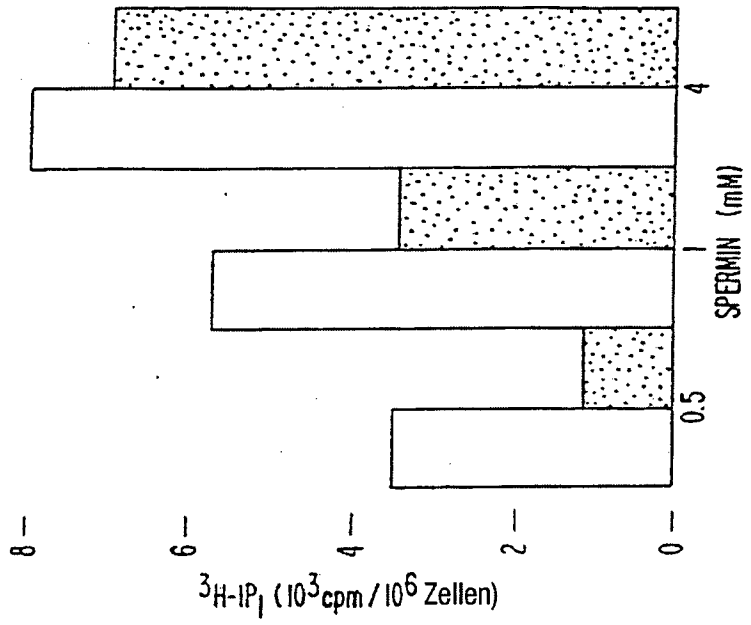


FIG. 18b.

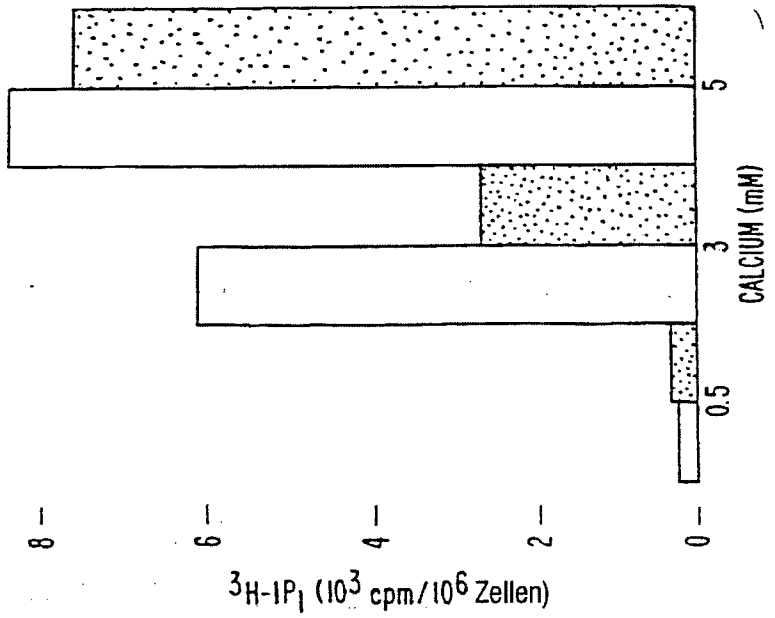


FIG. 18a.

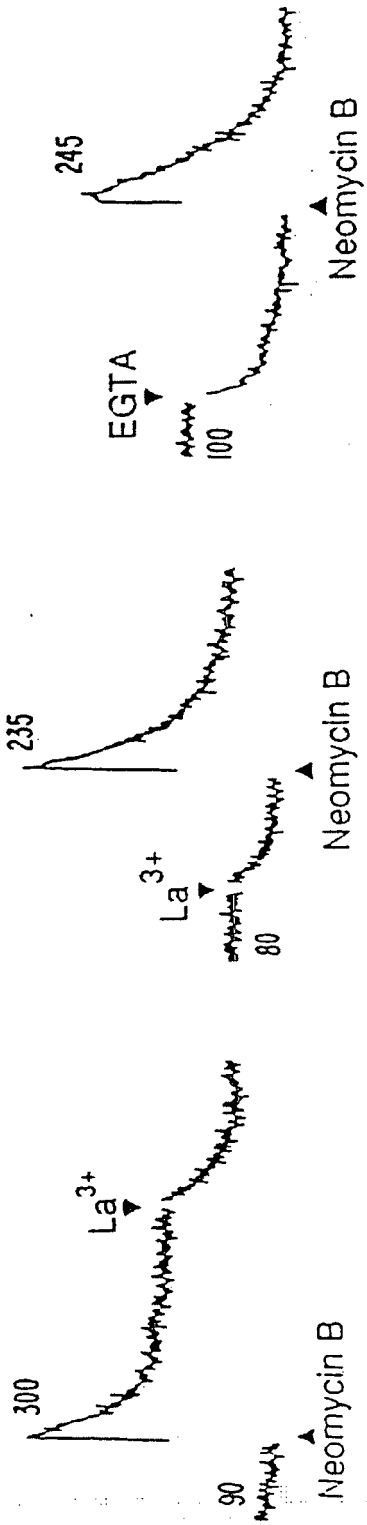

300
La3+
Neomycin B
90
235
La3+
Neomycin B
80
245
EGTA
Neomycin B
100

FIG. 19.

FIG. 20a.

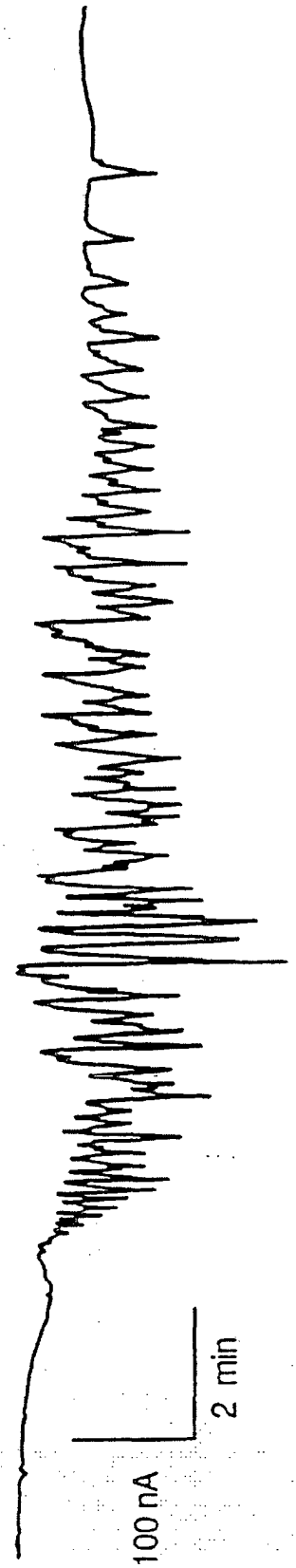
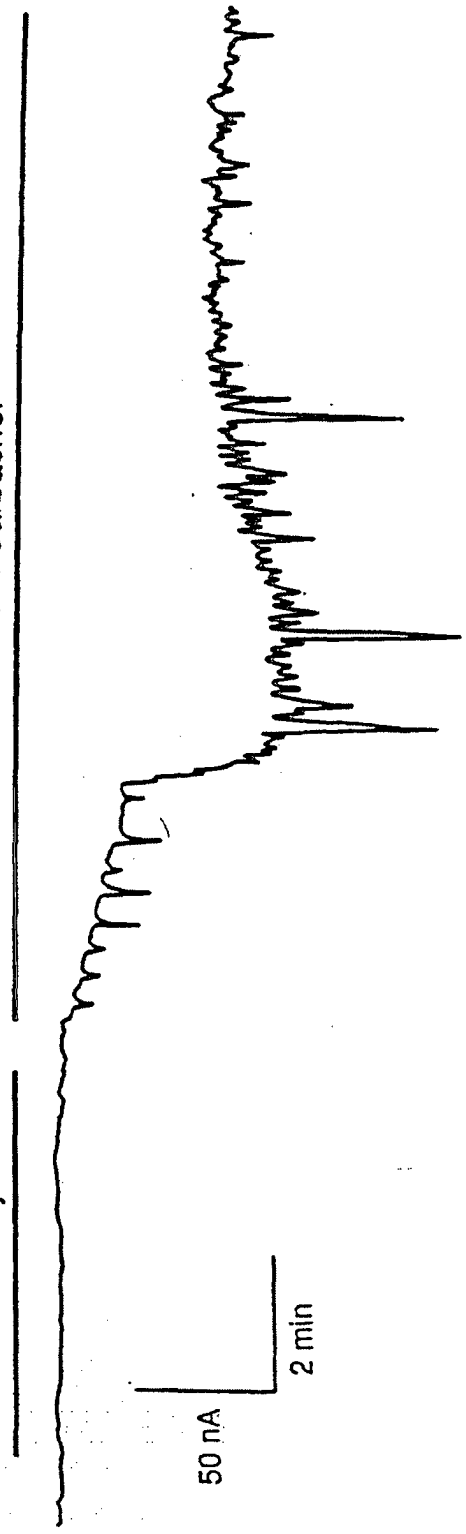


FIG. 20b.



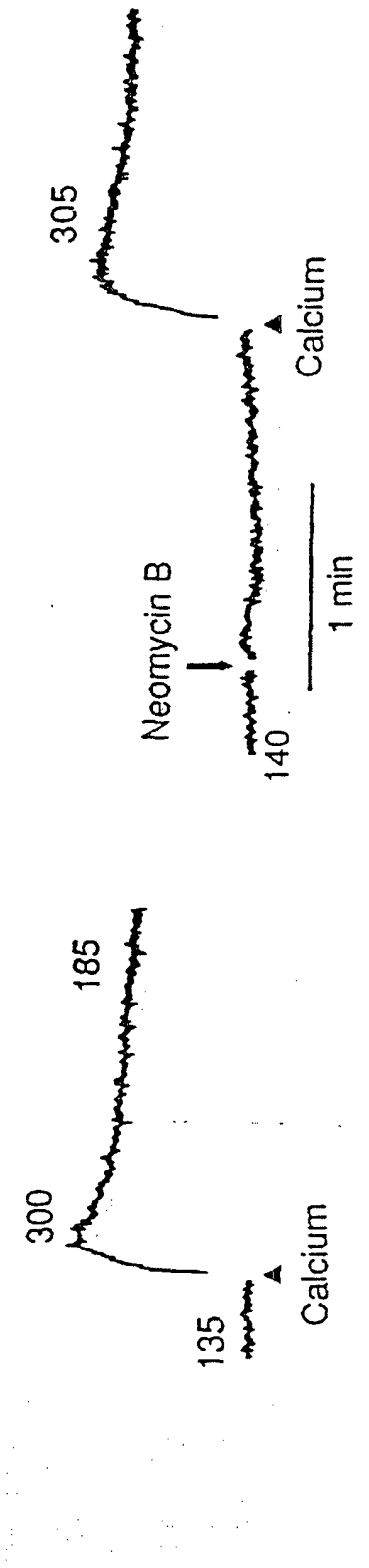


FIG. 21.

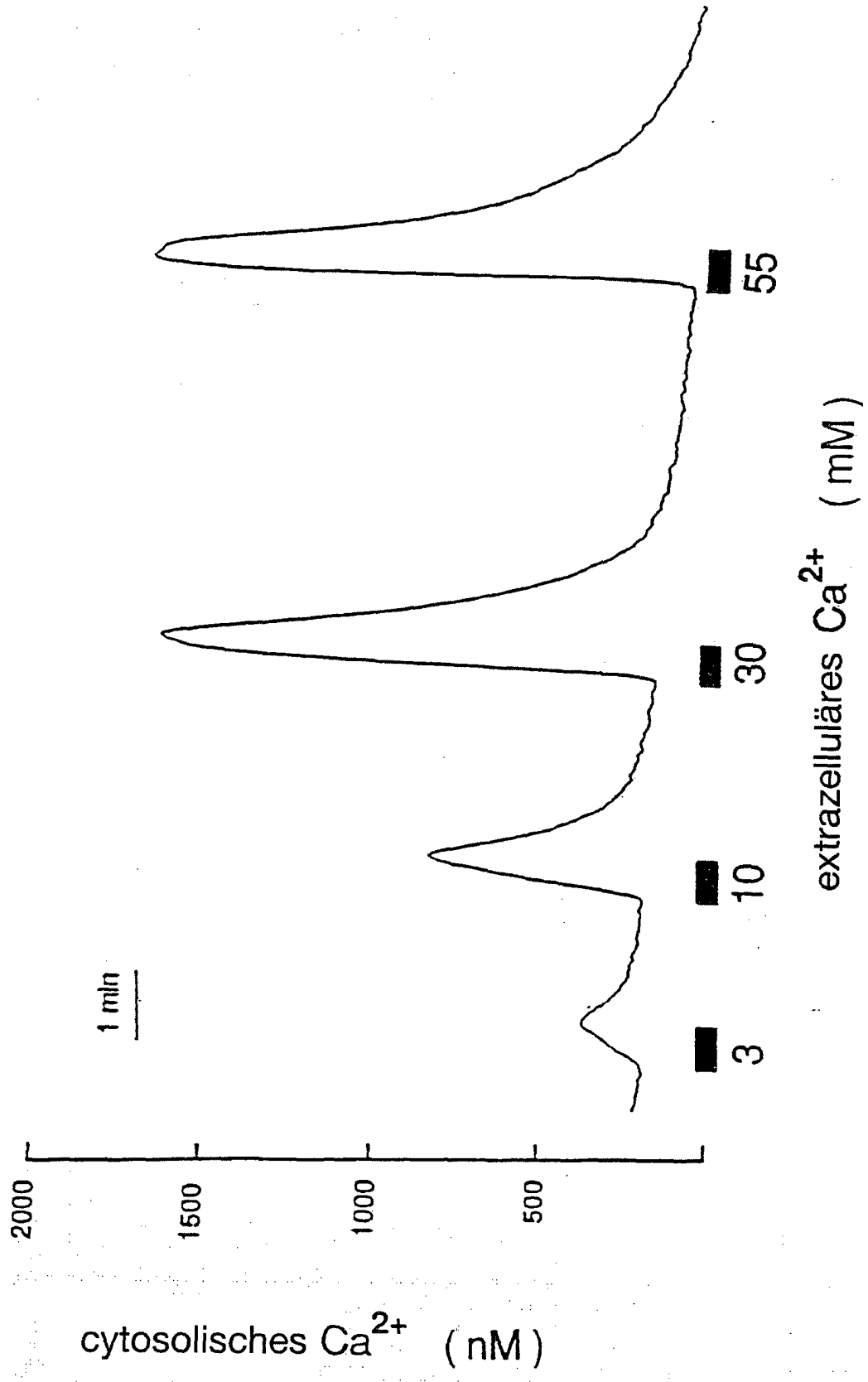

cytosolisches Ca^{2+} (nM)
2000
1500
1000
500
1 min
3
10
30
55
extrazelluläres Ca^{2+} (mM)

FIG. 22.

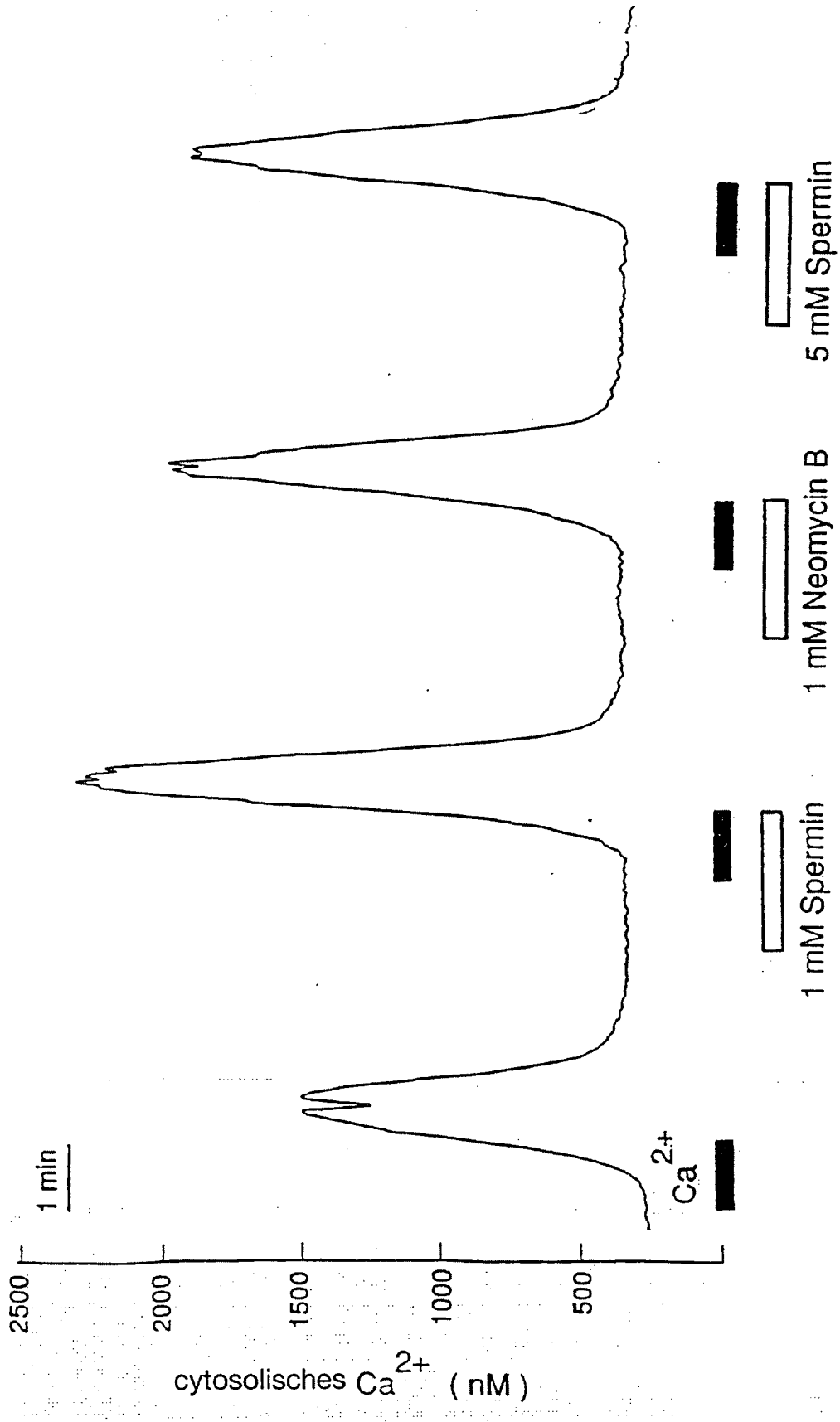

1 min
2500
2000
1500
1000
500
cytosolisches Ca^{2+} (nM)
Ca^{2+}
1 mM Spermin
1 mM Neomycin B
5 mM Spermin

FIG. 23.

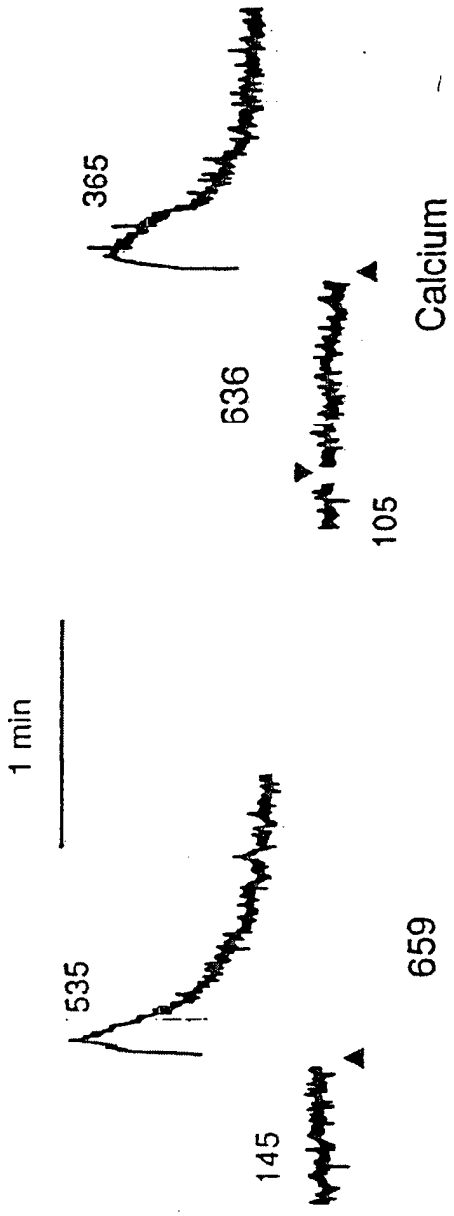


FIG. 24.

FIG. 25a.



FIG. 25b.

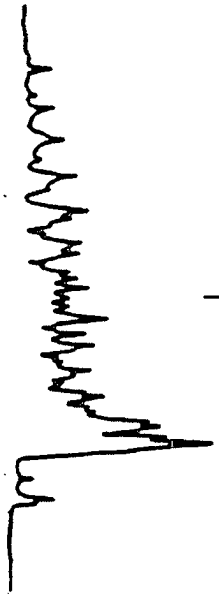
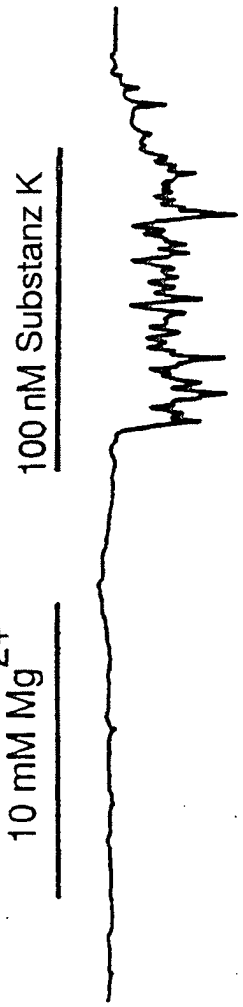


FIG. 25c.



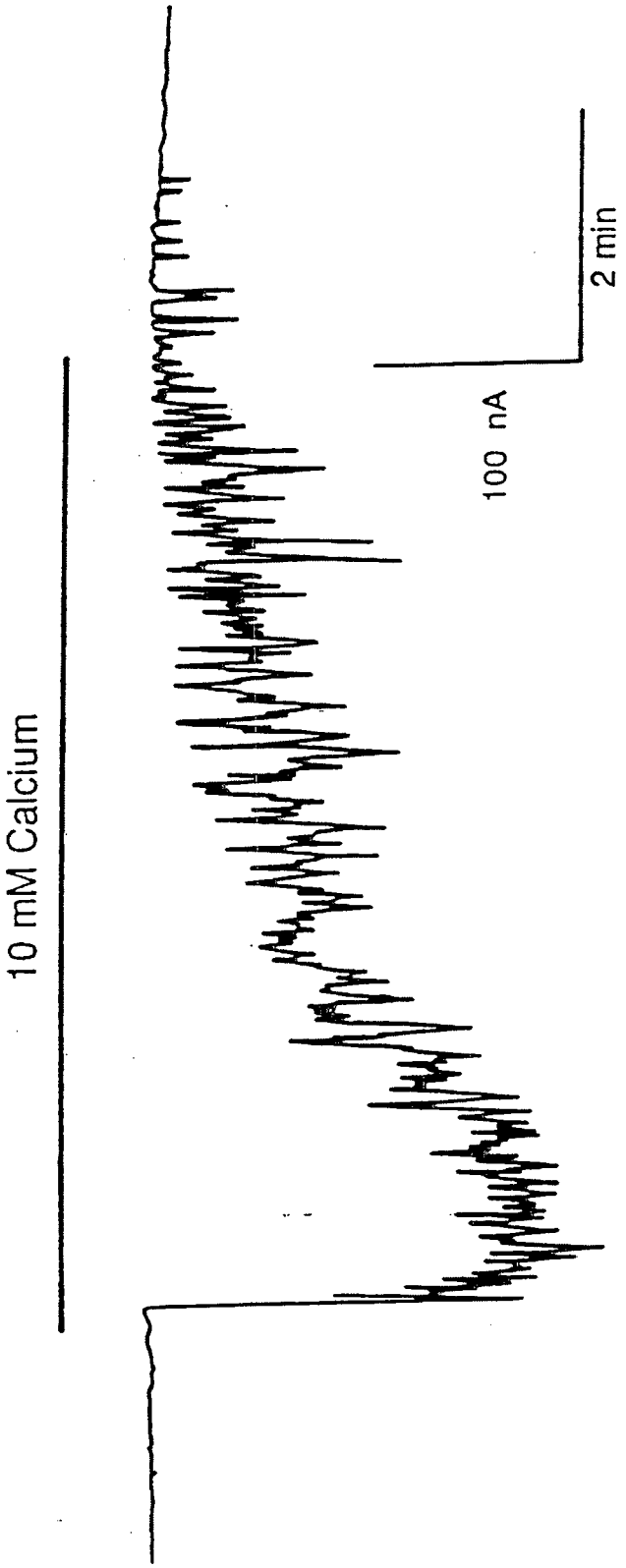


FIG. 26.

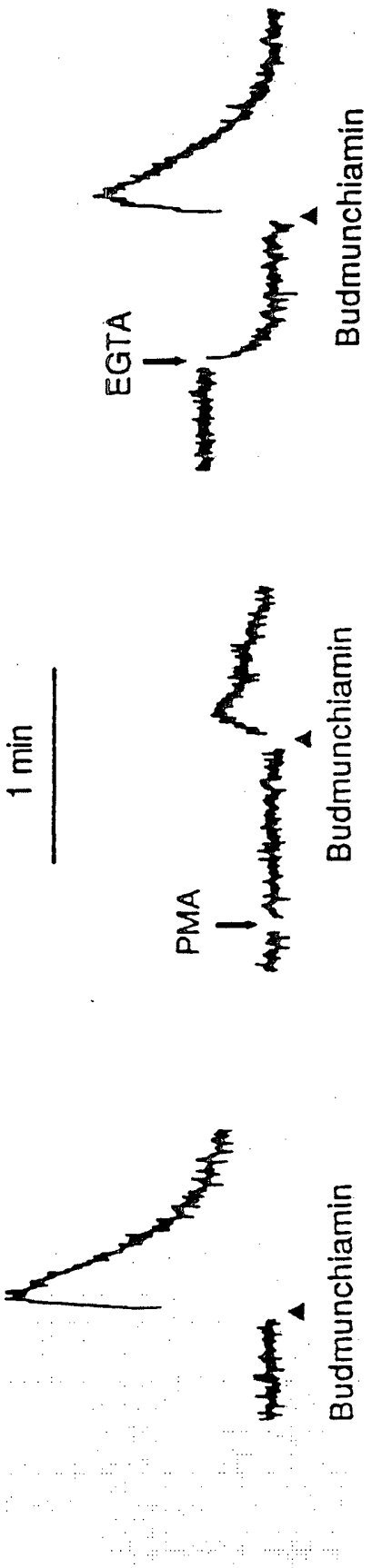

EGTA
Budmunchiamin
1 min
PMA
Budmunchiamin
Budmunchiamin

FIG. 27.

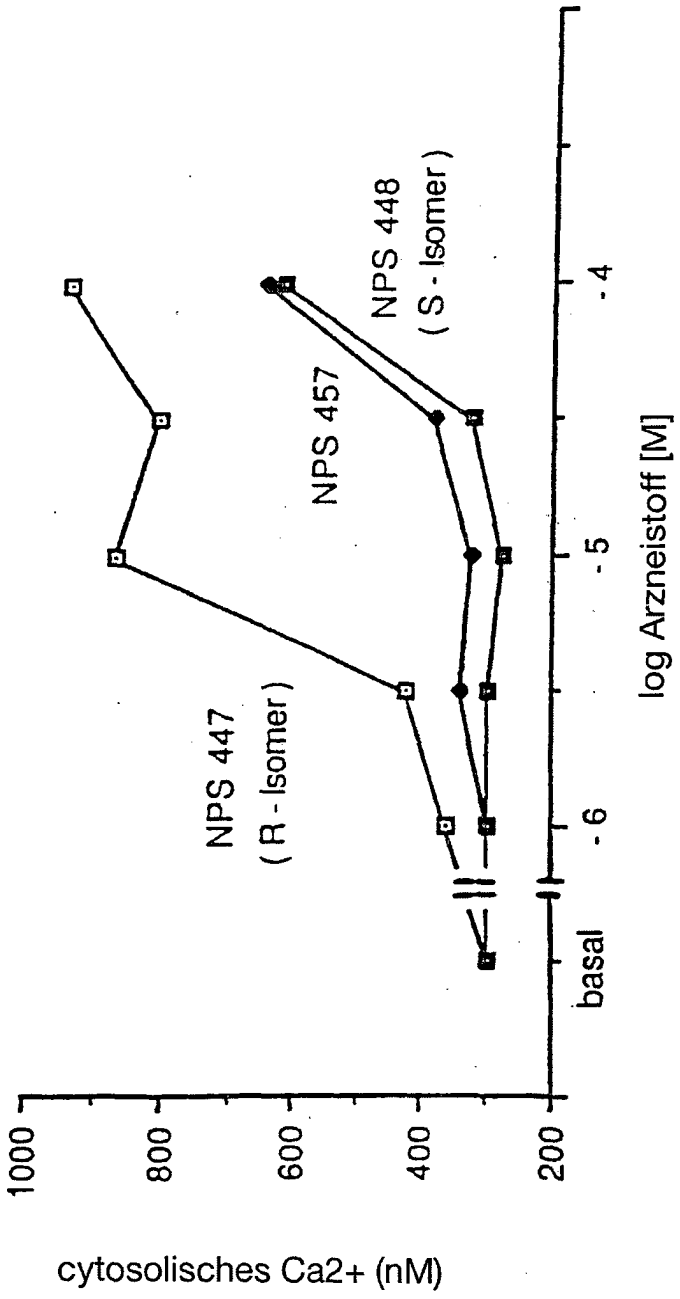

NPS 448
(S - Isomer)
NPS 457
NPS 447
(R - Isomer)
log Arzneistoff [M]
basal
- 6
- 5
- 4
1000
800
600
400
200
cytosolisches Ca2+ (nM)

FIG. 28.

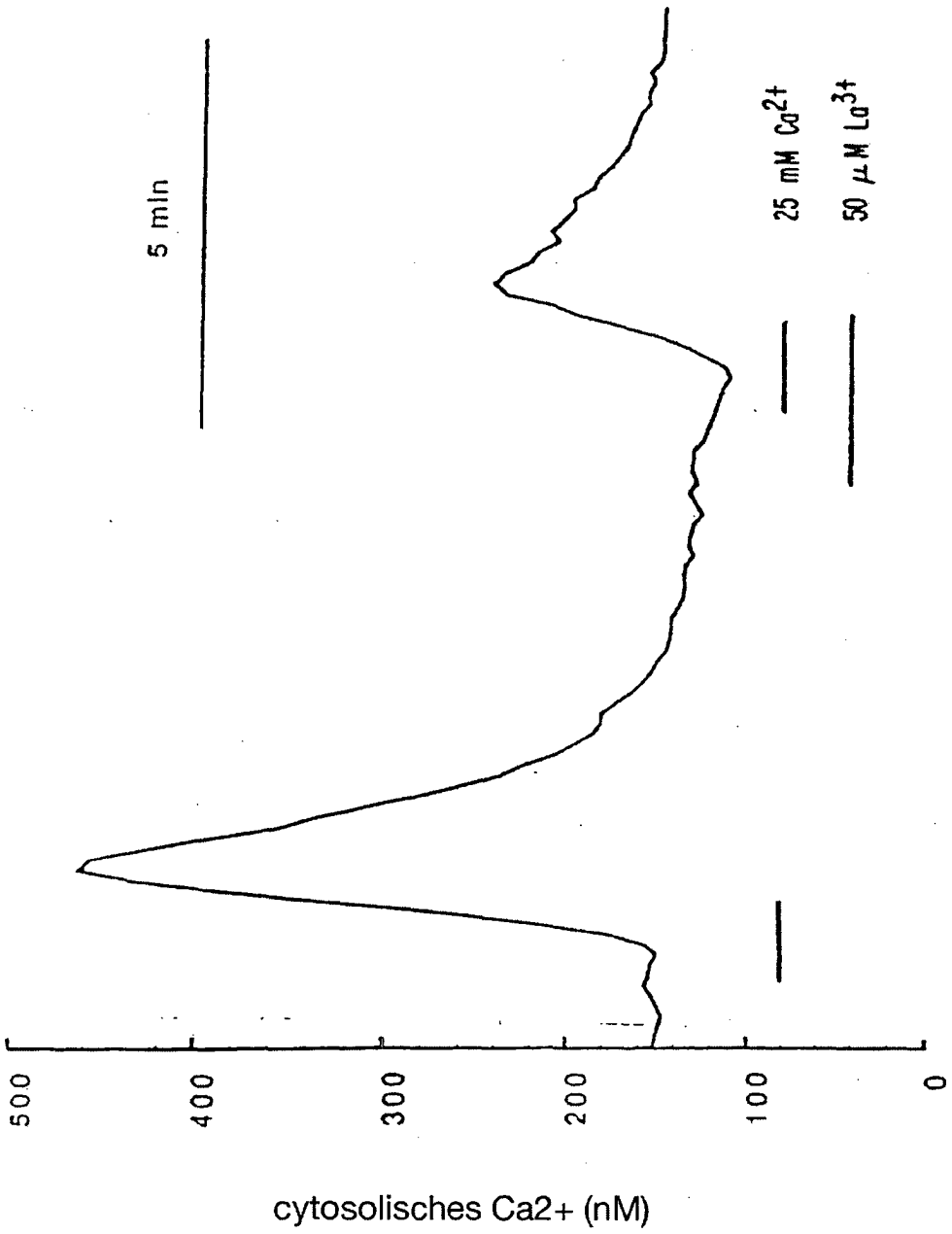
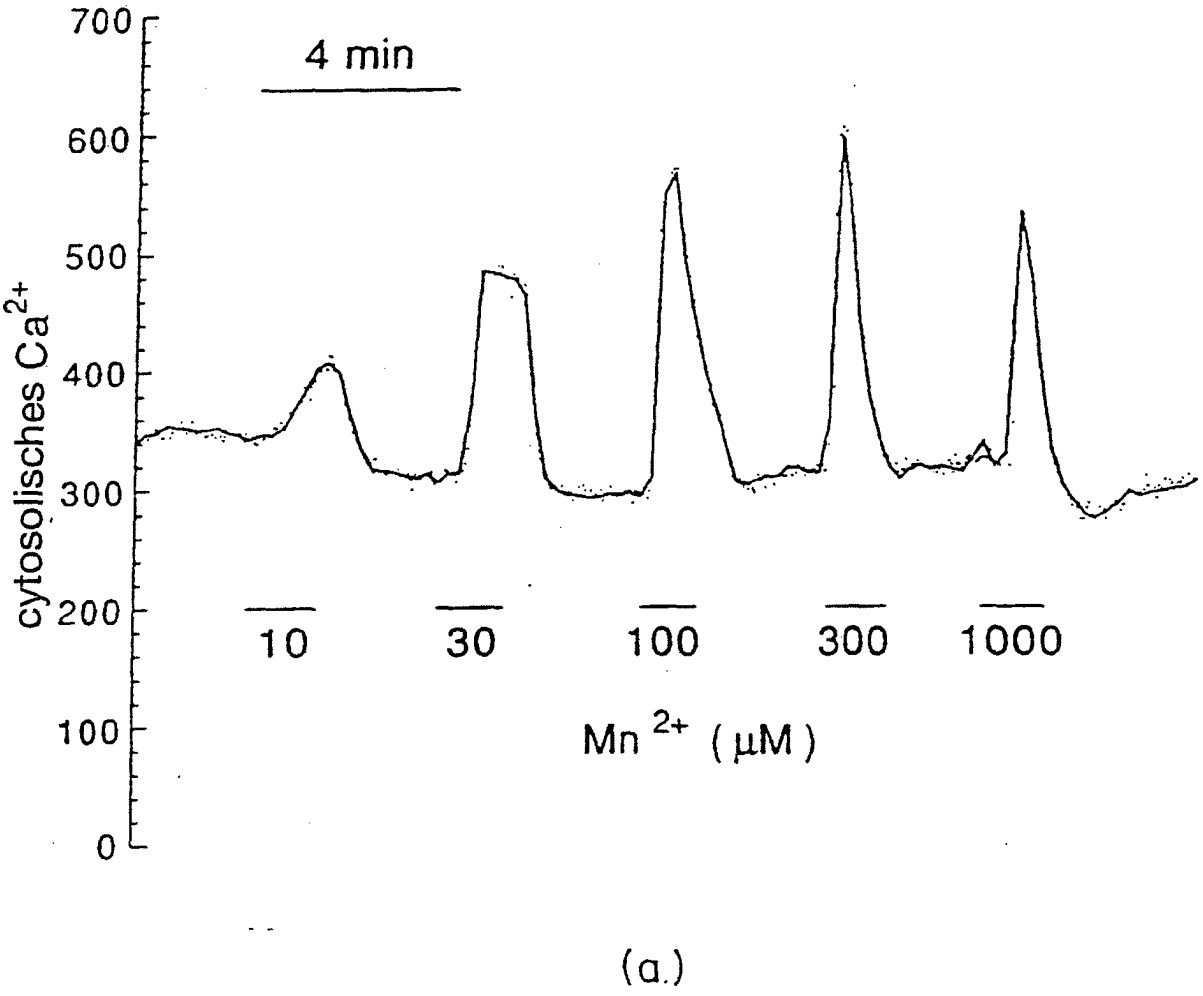

5 min
25 mM Ca^{2+}
50 µM La^{3+}
500
400
300
200
100
0
cytosolisches Ca2+ (nM)

FIG. 29.


700
600
500
400
300
200
100
0
4 min
cytosolisches Ca^{2+}
10
30
100
300
1000
Mn^{2+} (µM)

(a.)

FIG. 30a.

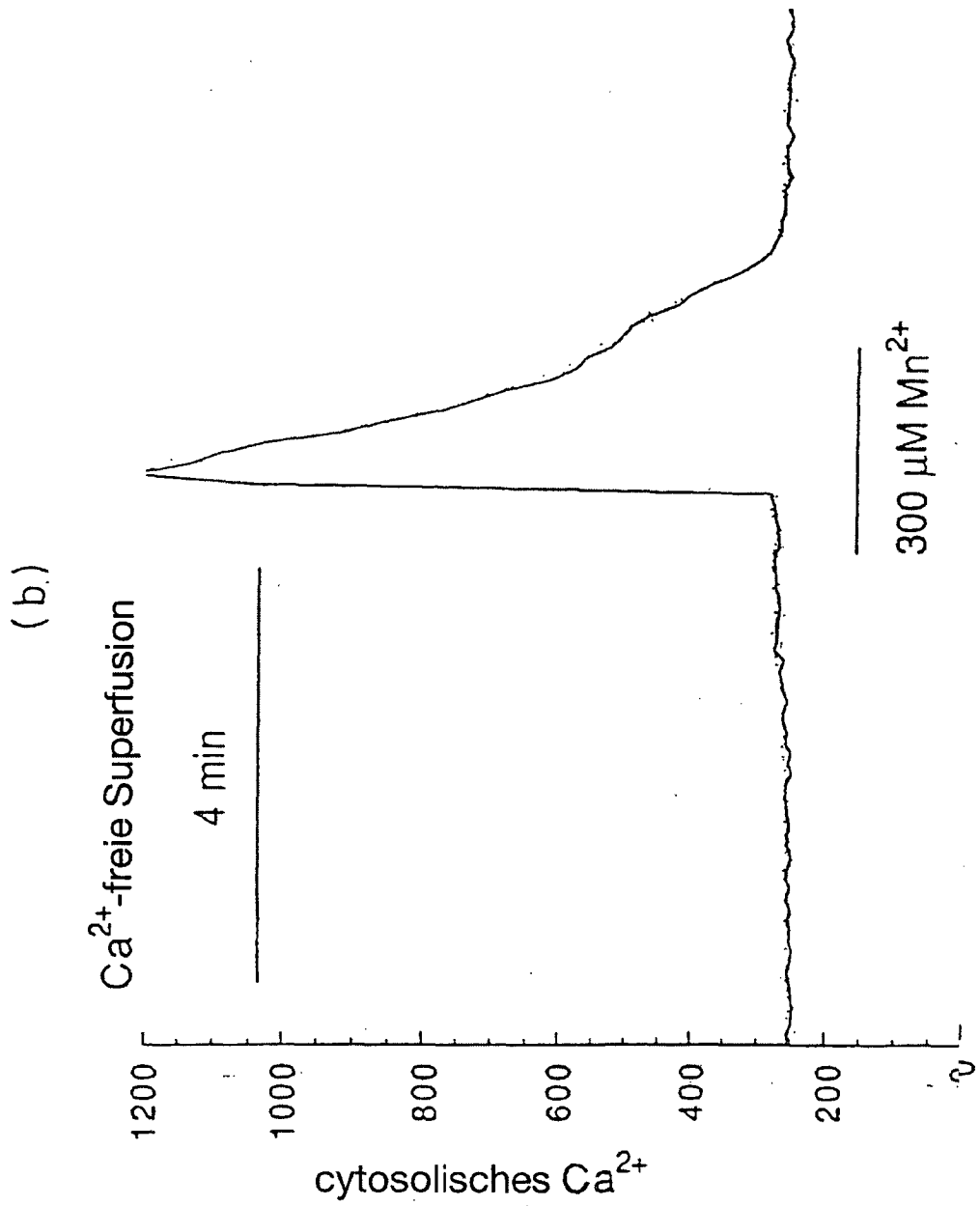

(b.)
Ca2+-freie Superfusion
4 min
300 µM Mn2+
1200
1000
800
600
400
200
cytosolisches Ca2+

FIG. 30b.

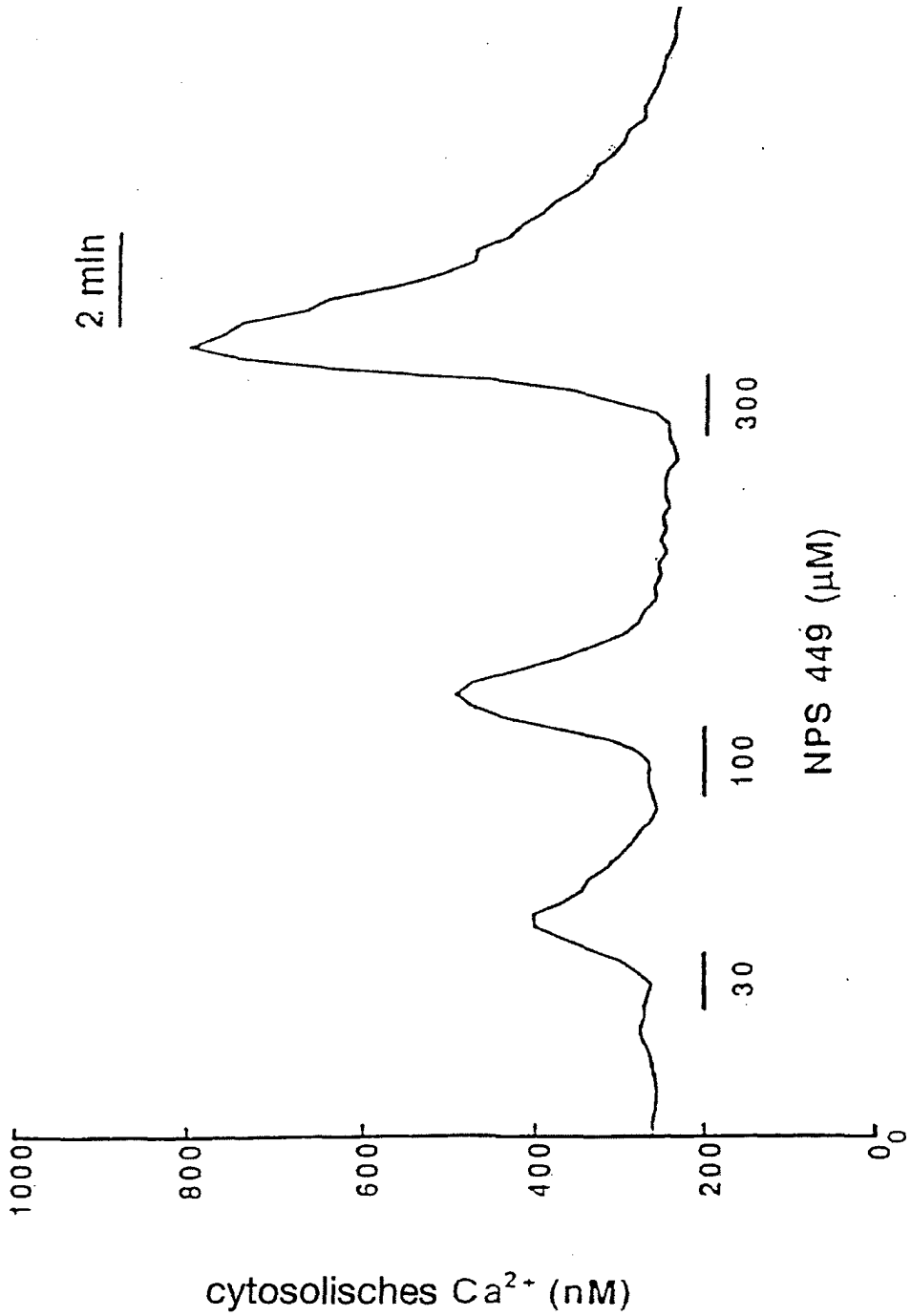

2 min
300
100
30
NPS 449 (µM)
1000
800
600
400
200
0
cytosolisches Ca2+ (nM)

FIG. 31a.

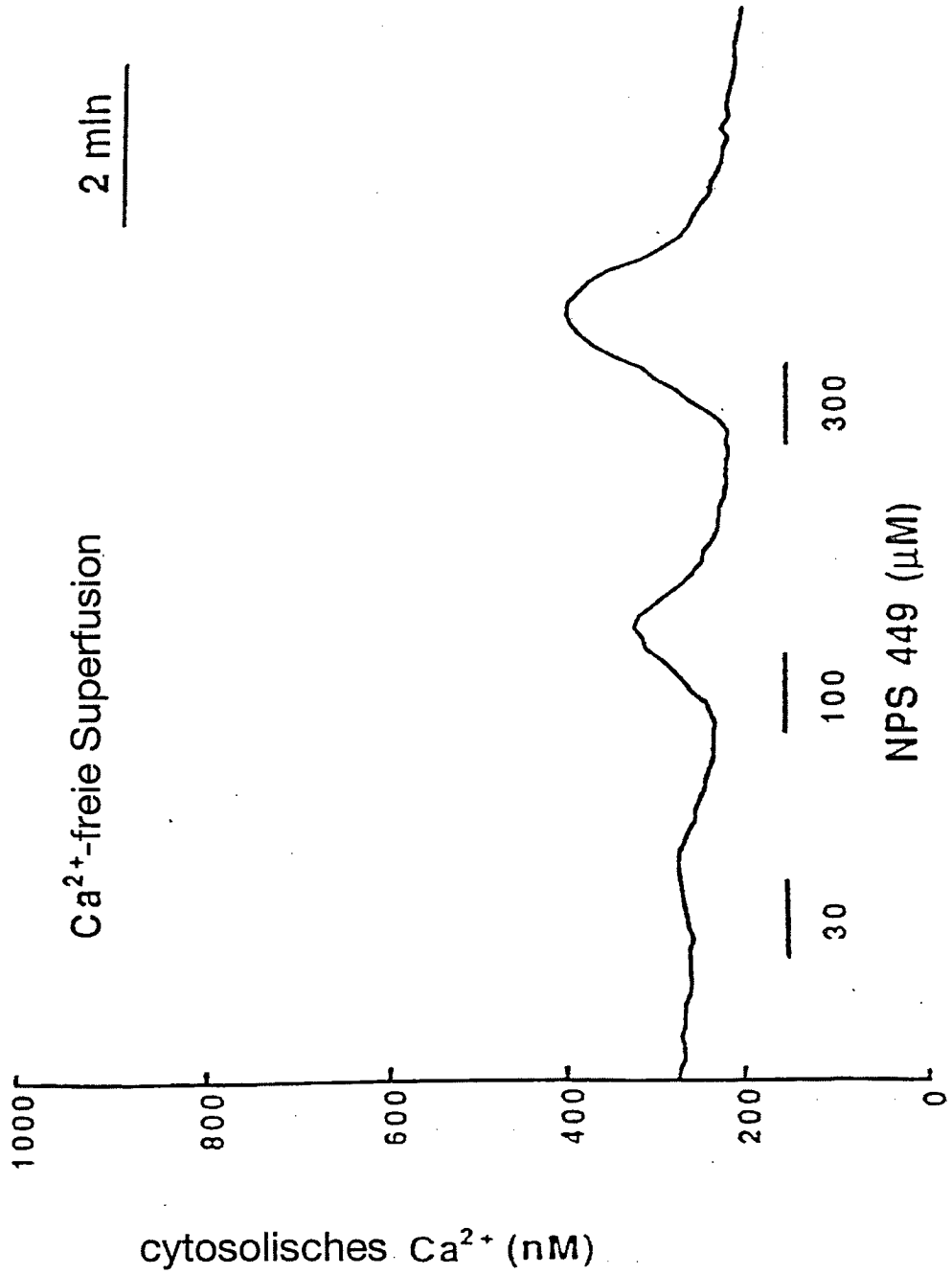

2 min
Ca2+-freie Superfusion
NPS 449 (µM)
30
100
300
1000
800
600
400
200
0
cytosolisches Ca2+ (nM)

FIG. 31b.

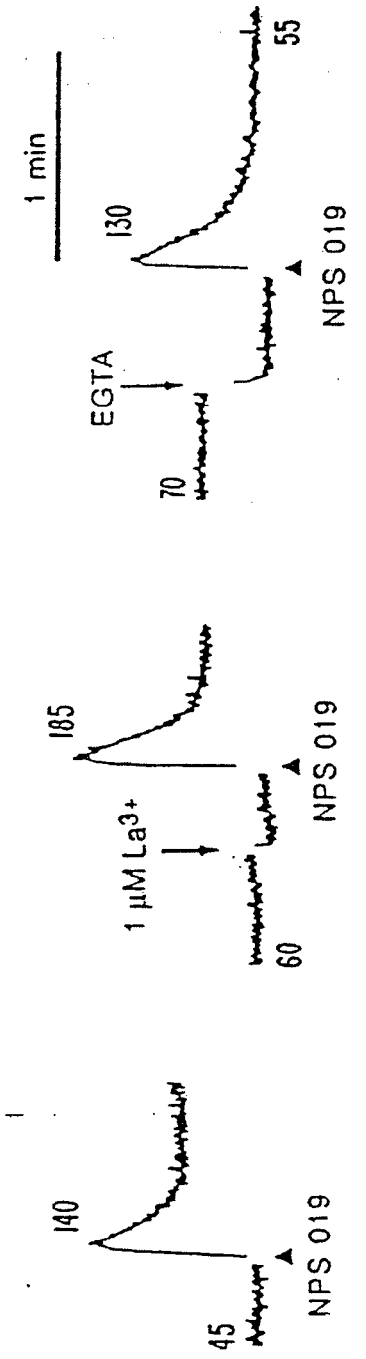


FIG. 32.

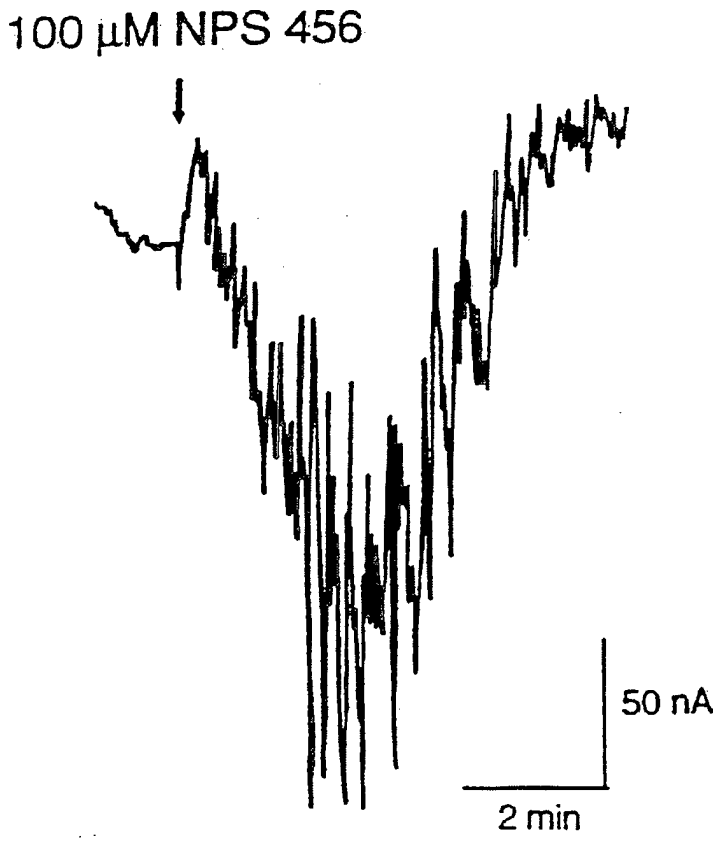


FIG. 33.

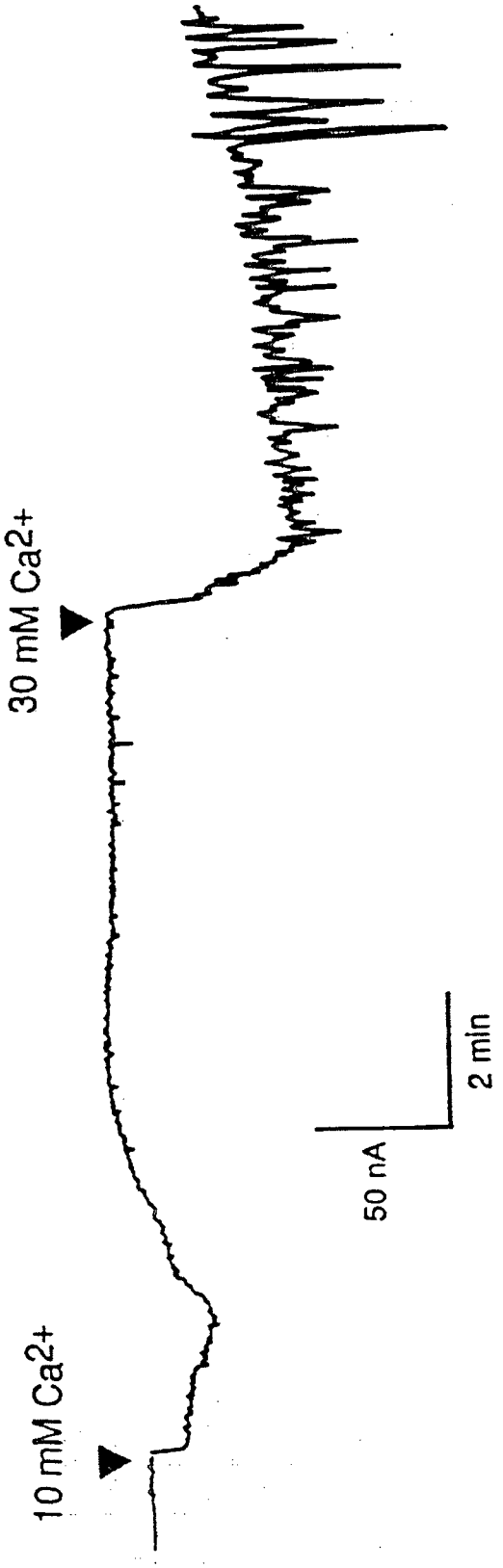


FIG. 34.

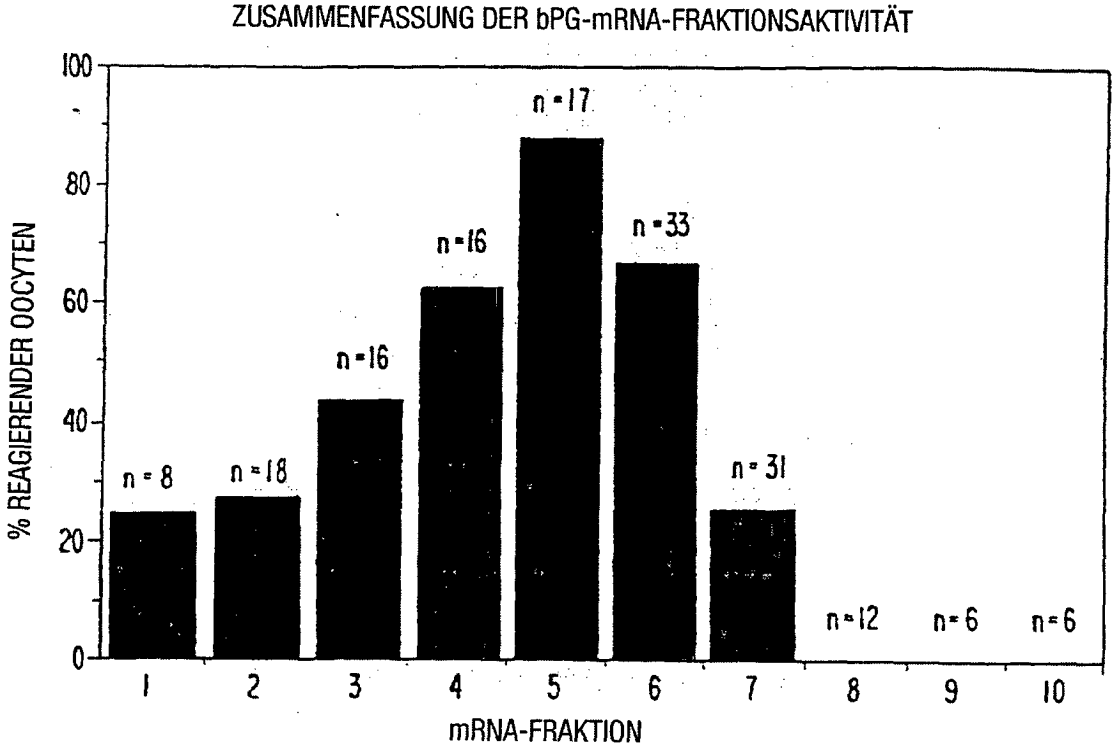

ZUSAMMENFASSUNG DER bPG-mRNA-FRAKTIONSAKTIVITÄT
% REAGIERENDER OOCYTEN
100
80
60
40
20
0
n = 8
n = 18
n = 16
n = 16
n = 17
n = 33
n = 31
n = 12
n = 6
n = 6
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
mRNA-FRAKTION

FIG. 35.

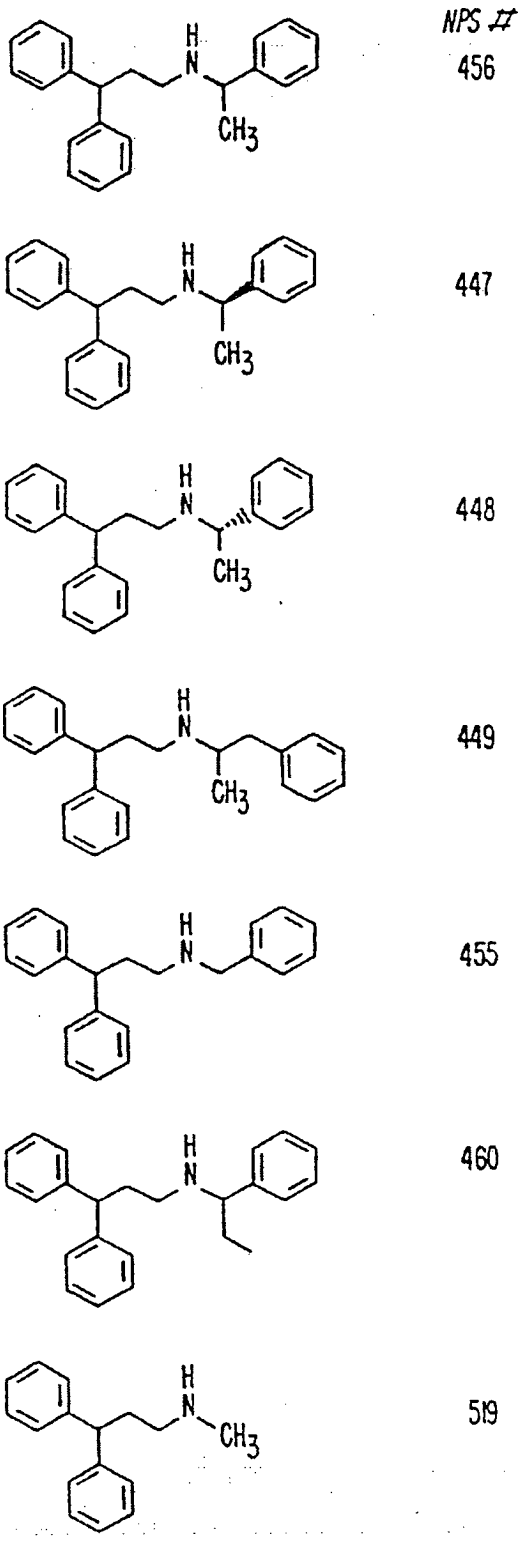


FIG. 36a

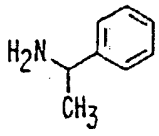
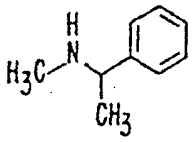
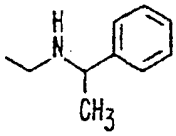
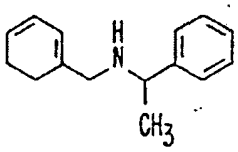
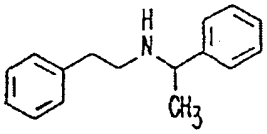
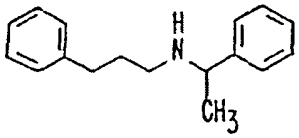
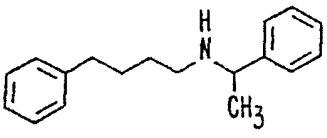
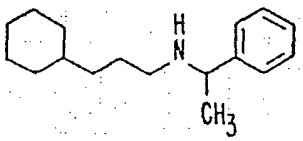
	NPS #
	518
	517
	516
	457
	458
	459
	523
	524

FIG. 36b

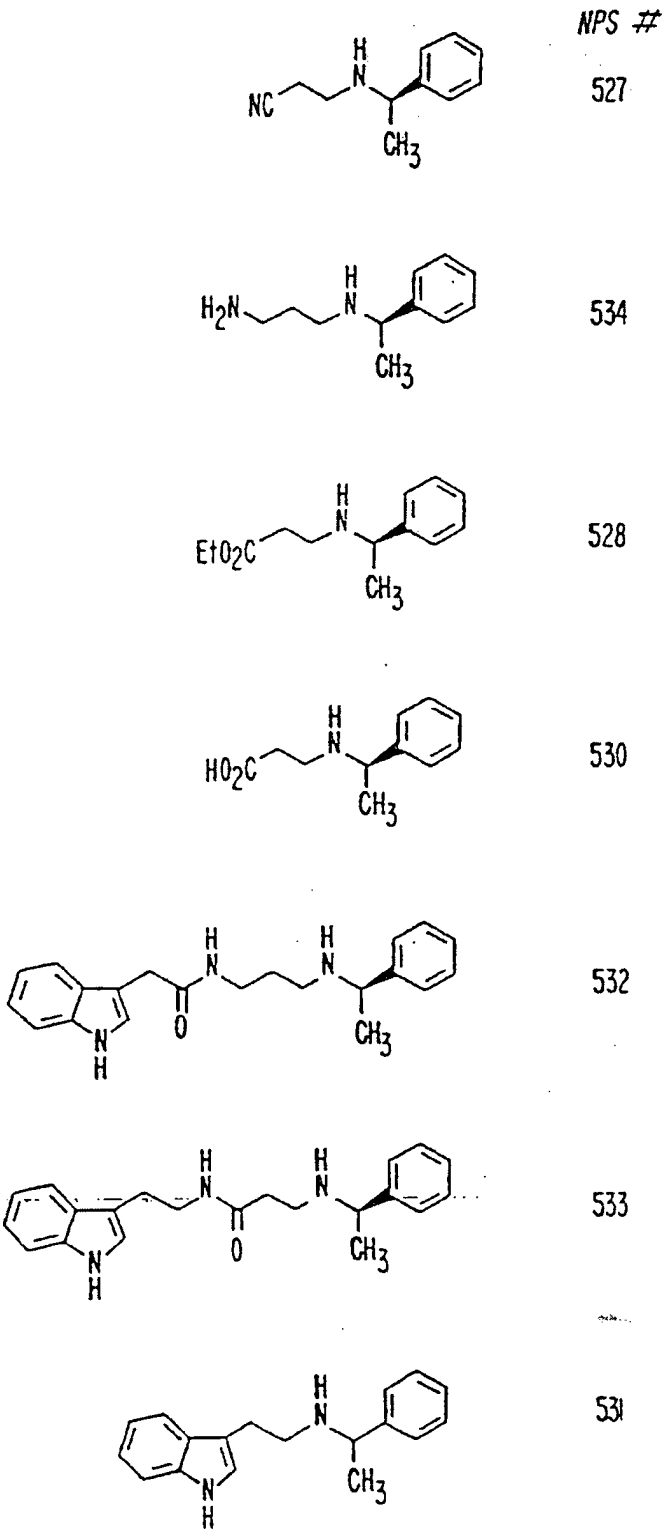


FIG. 36c.

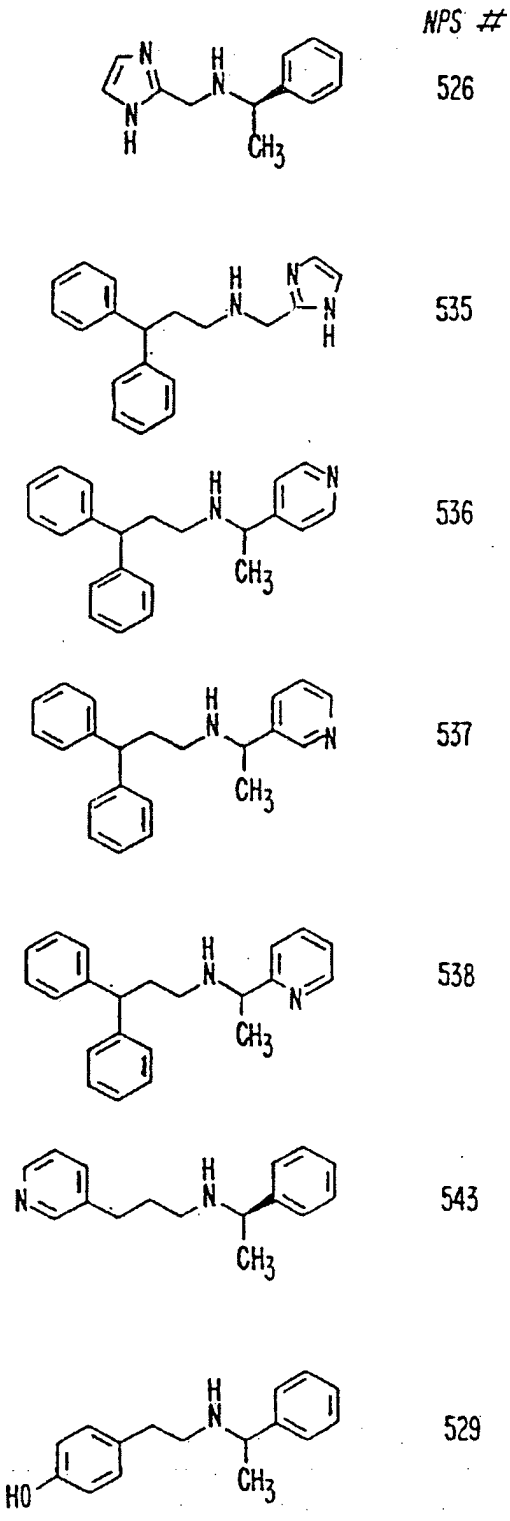


FIG. 36d.

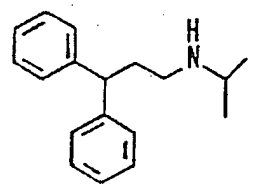
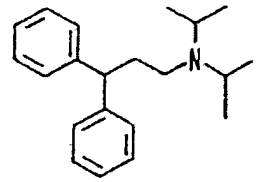
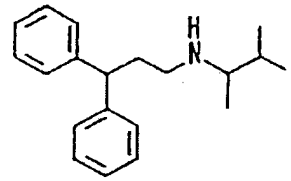
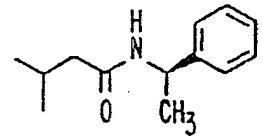
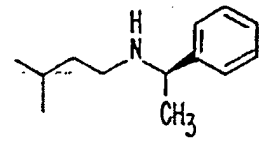
	NPS #
	539
	540
	542
	546
	547

FIG. 36e.

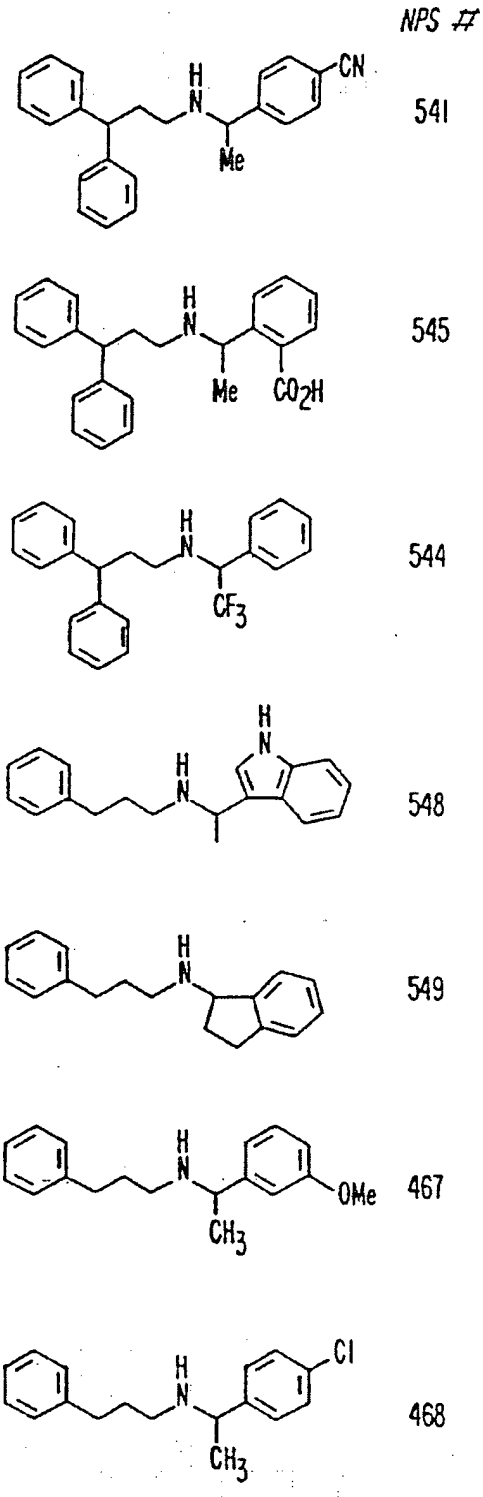

NPS #
CN
H
N
Me
541
H
N
Me
CO2H
545
H
N
CF3
544
H
N
H
N
548
H
N
549
H
N
OMe
CH3
467
Cl
H
N
CH3
468

FIG. 36f.

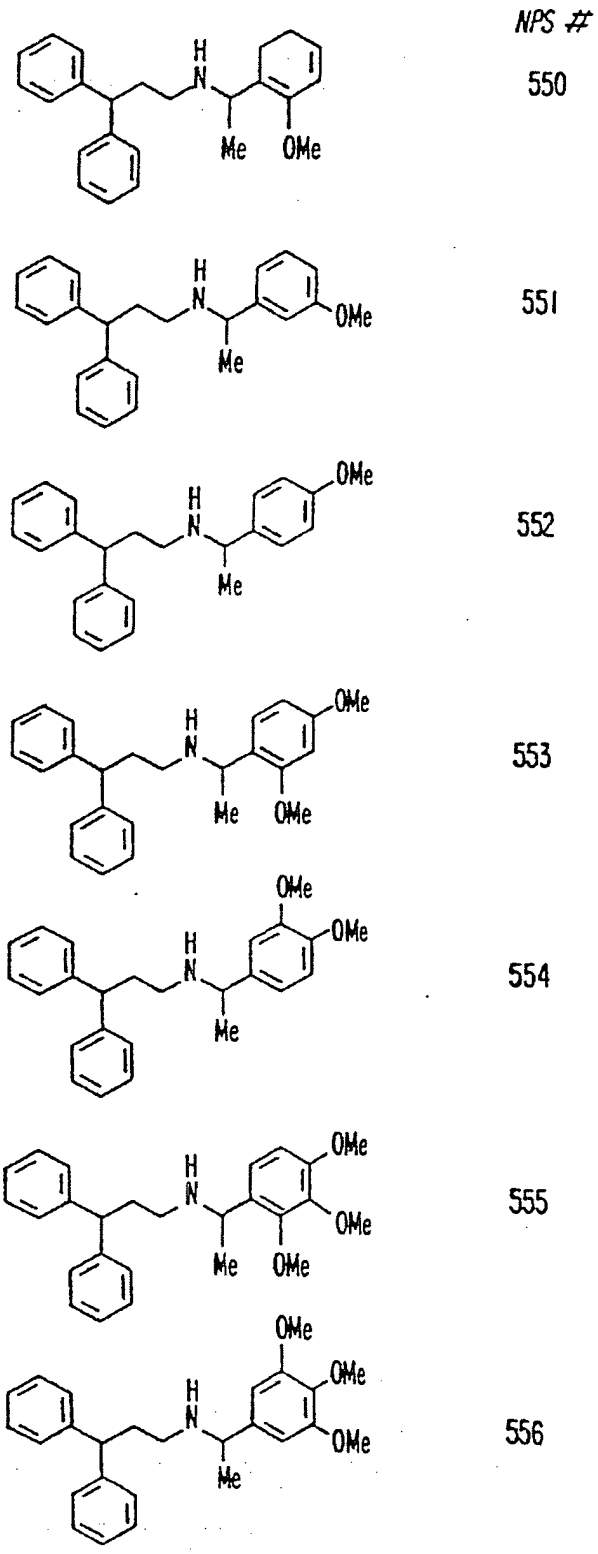


FIG. 36g

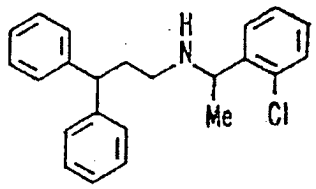
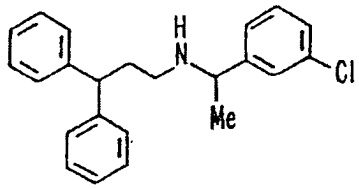
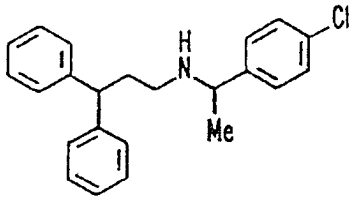
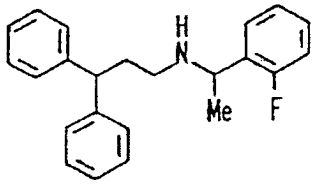
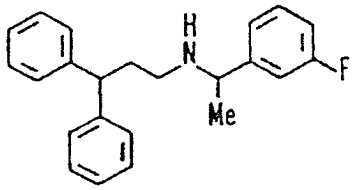
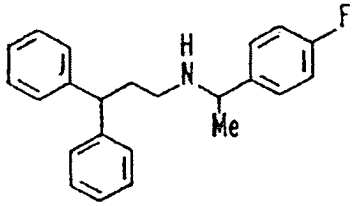
	NPS #
	557
	558
	559
	560
	561
	562

FIG. 36h.

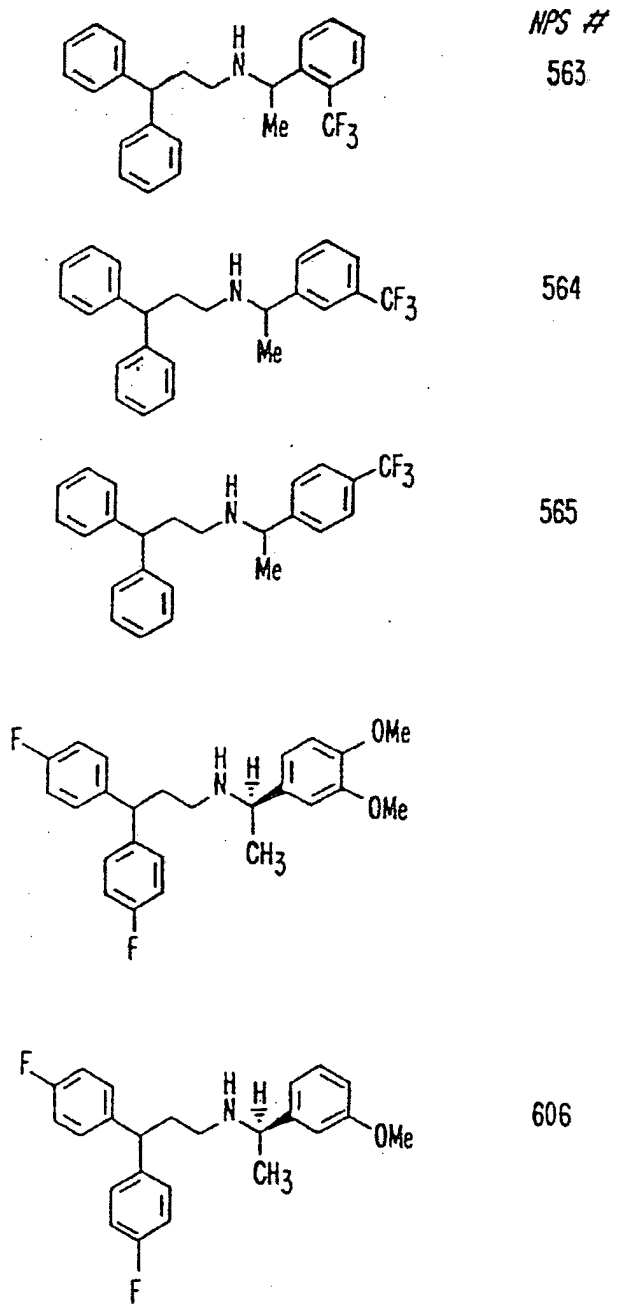


FIG. 361.

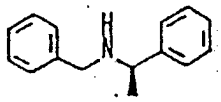
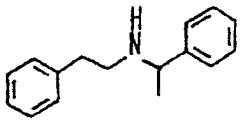
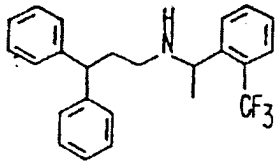
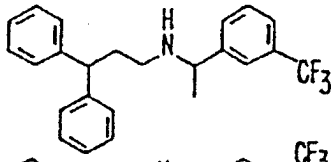
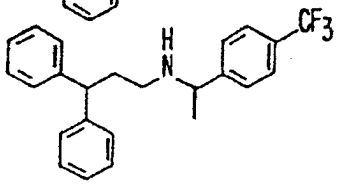
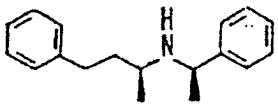
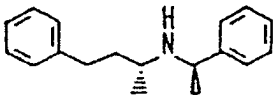
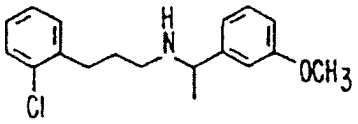
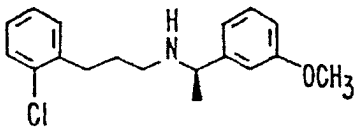
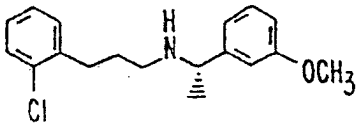
	NPS #
	457
	458
	563
	564
	565
	566
	567
	568
	
	

FIG. 36j.

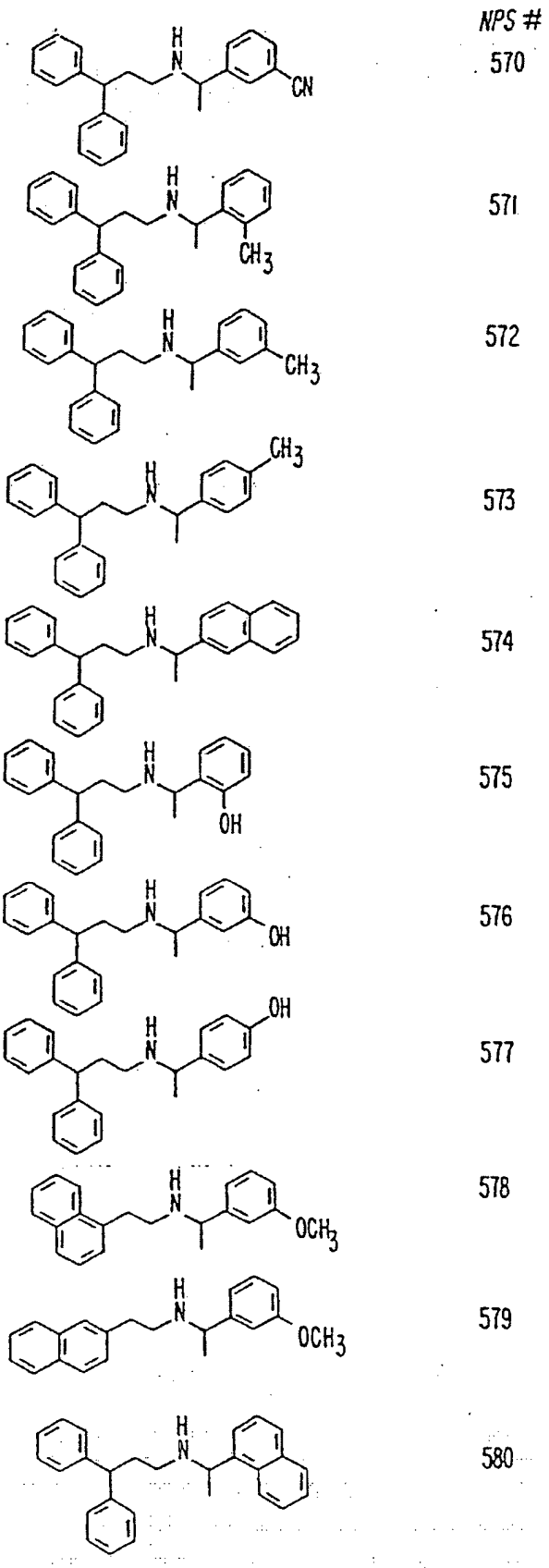


FIG. 36k

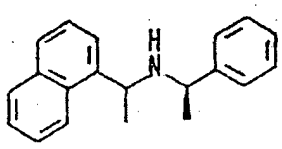
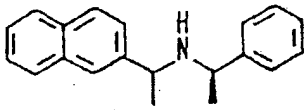
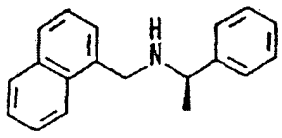
	NPS #
	592
	593
	594

FIG. 36L.

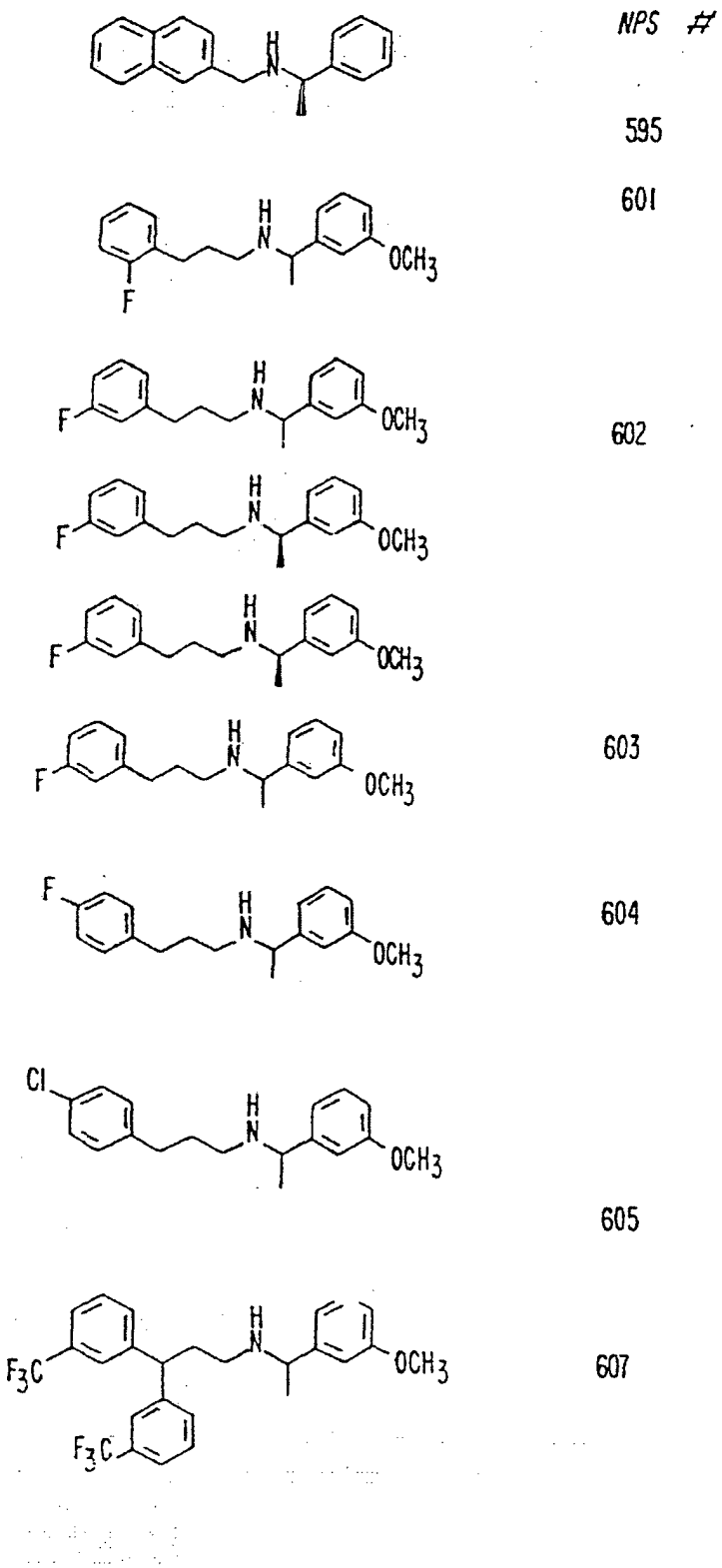


FIG. 36m

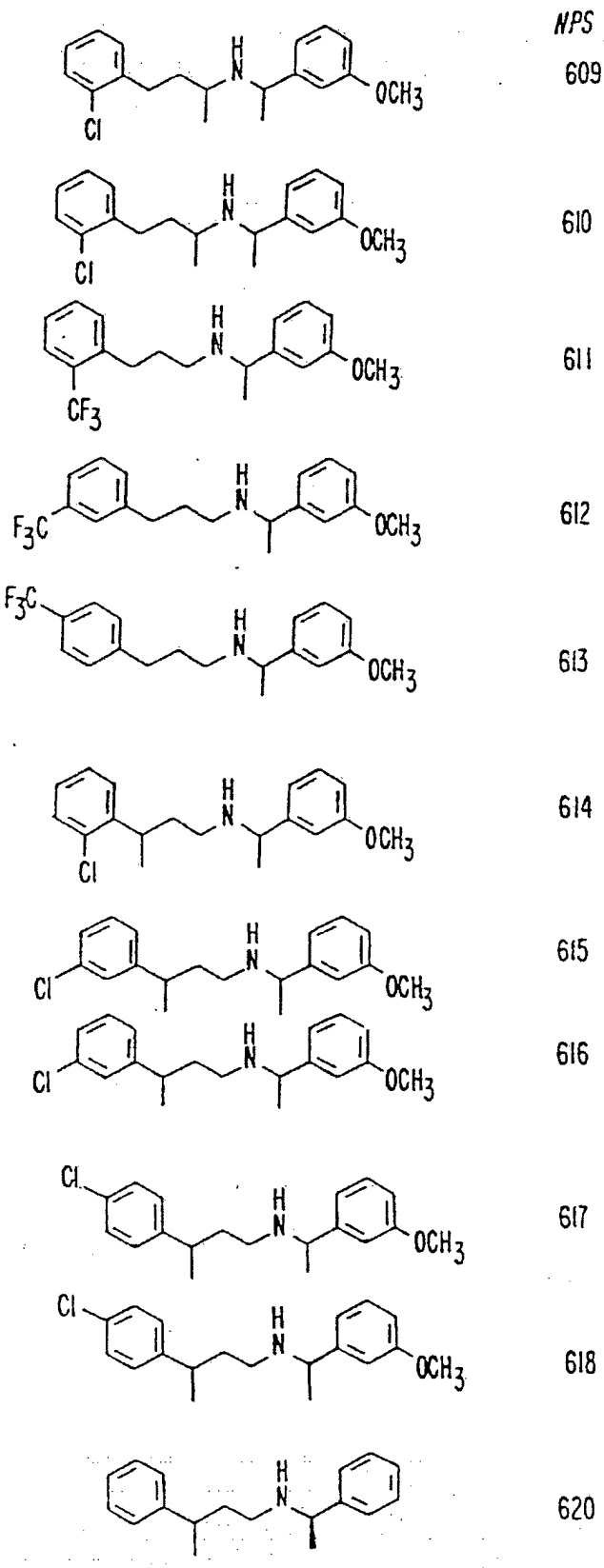


FIG. 36n

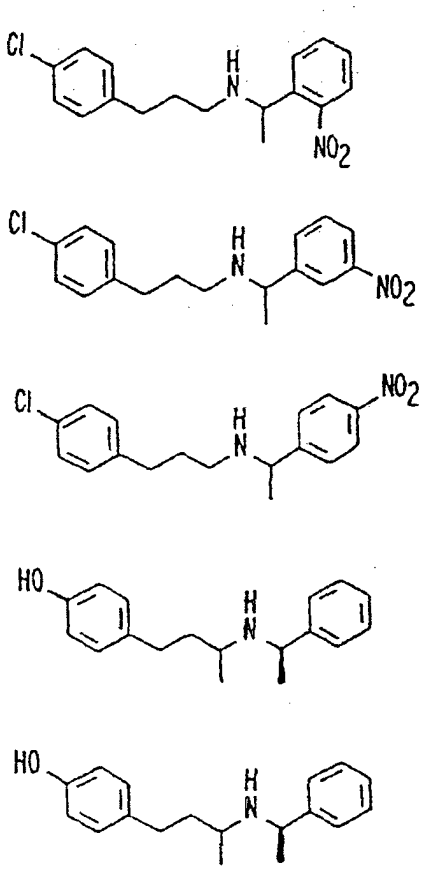
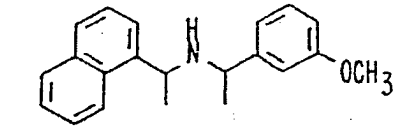
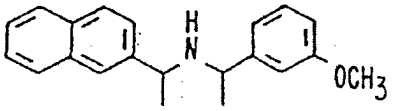


FIG. 360.

NPS #



641



642

FIG. 36p.

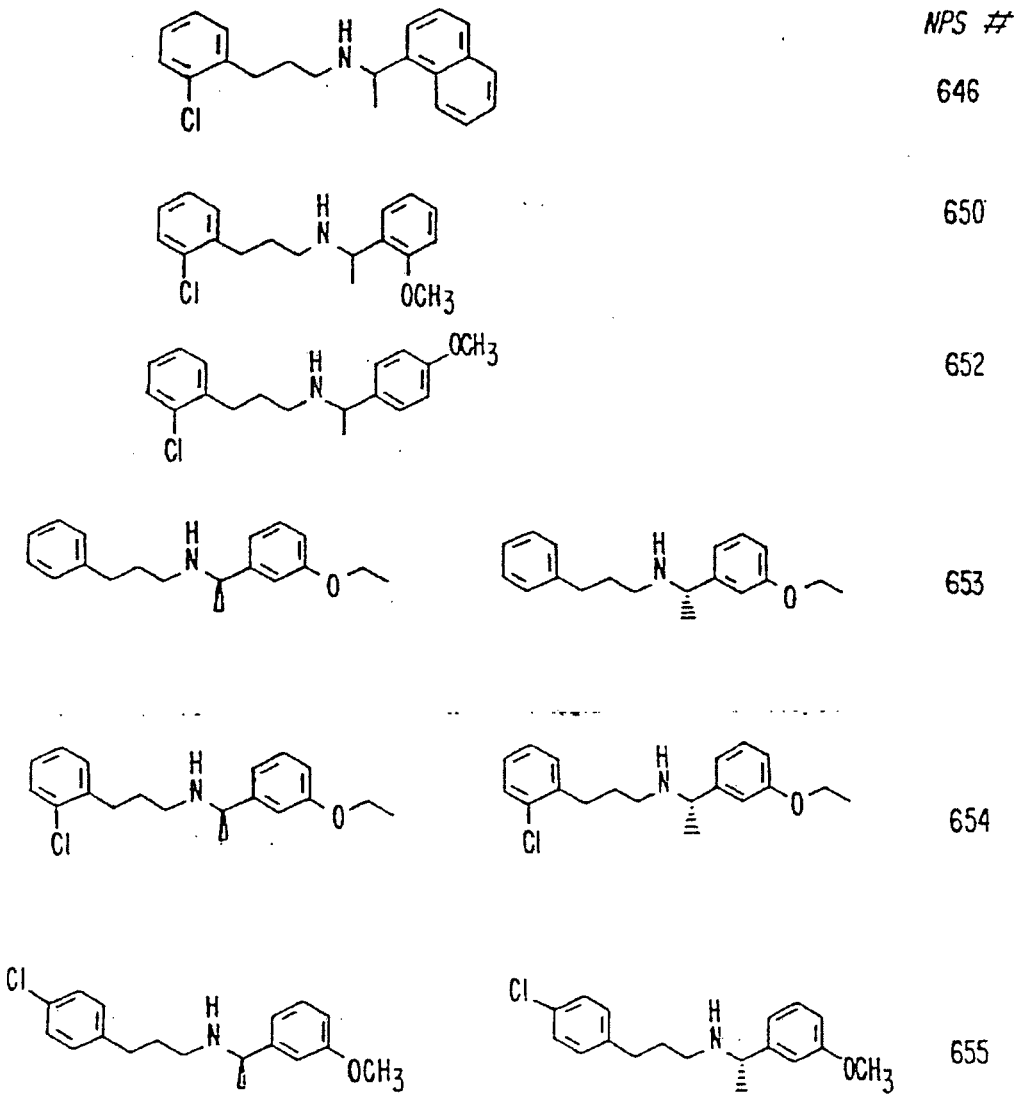


FIG. 36q.

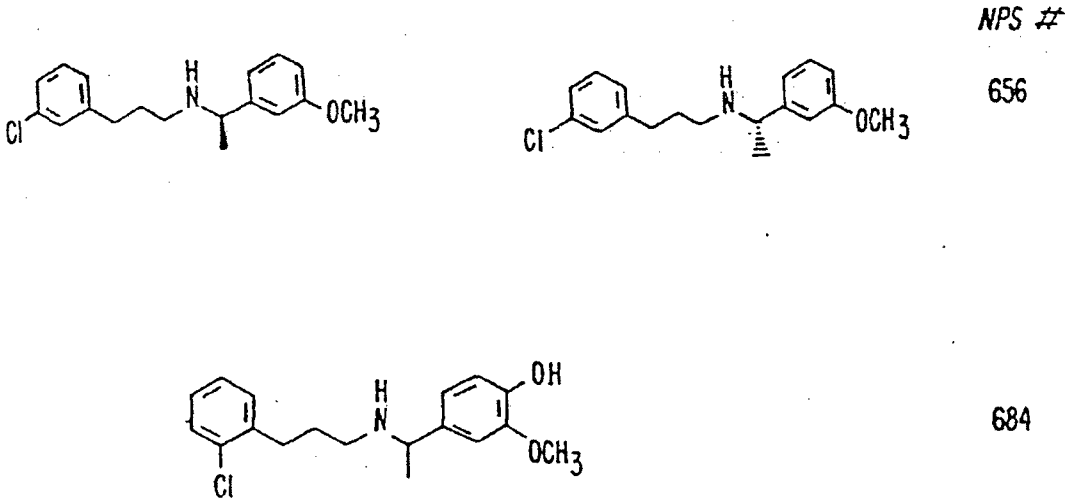


FIG. 36r.

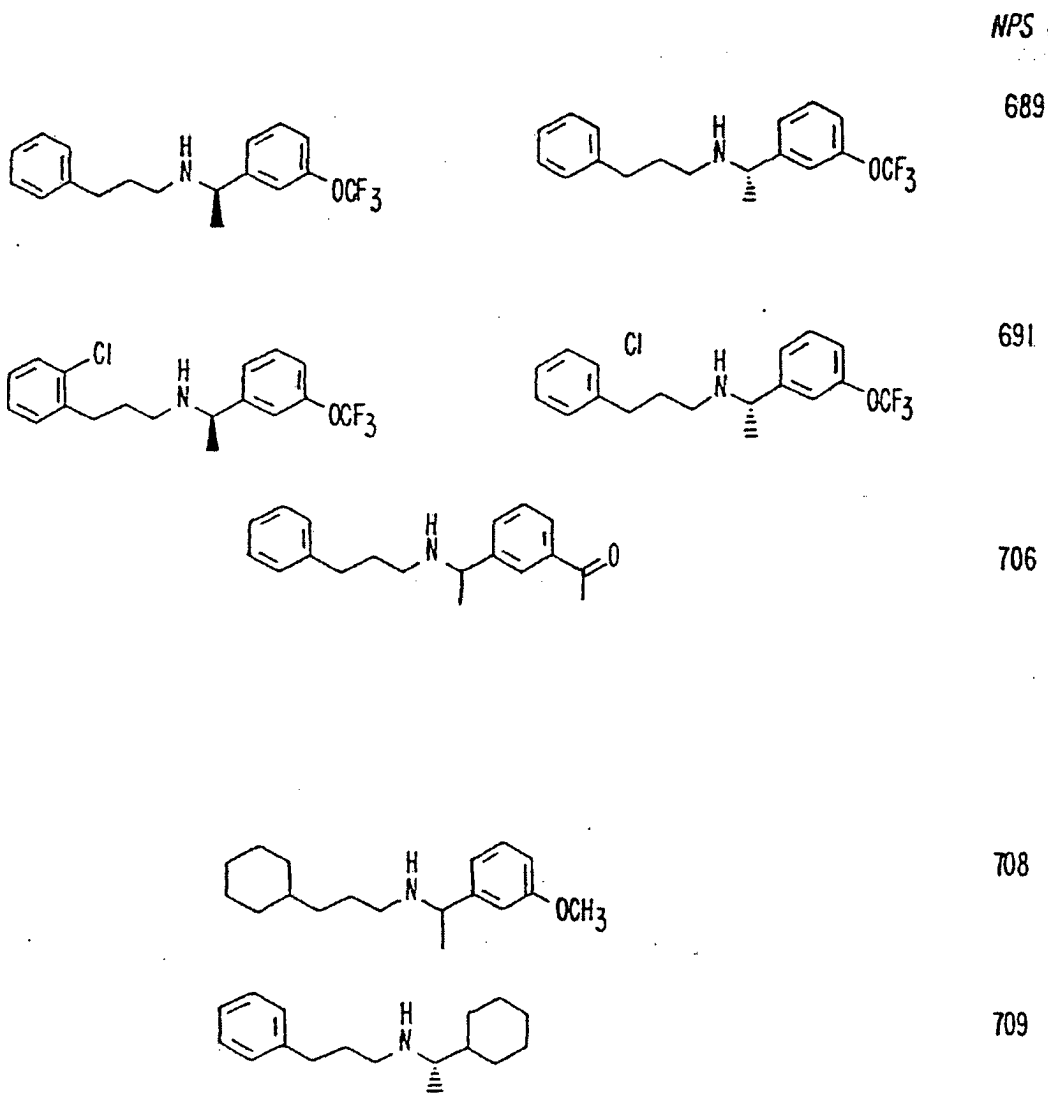


FIG. 36s.

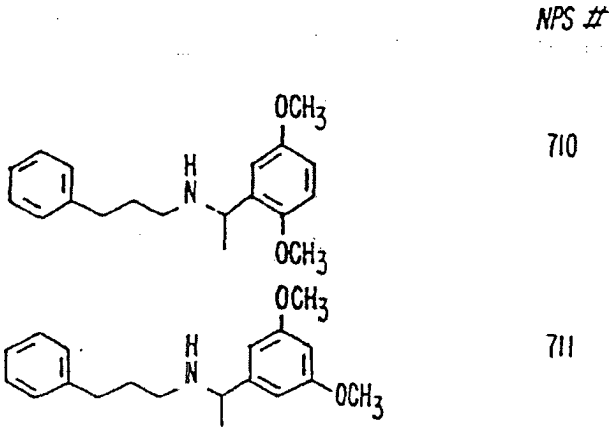


FIG. 36t.

FIG. 37a.

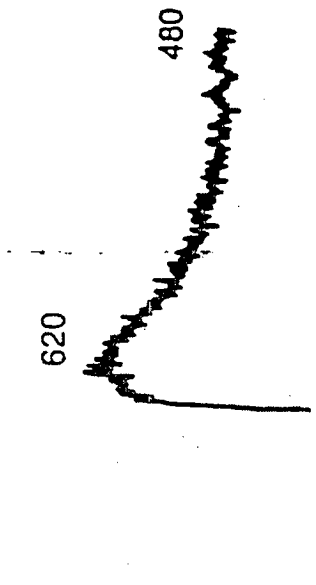
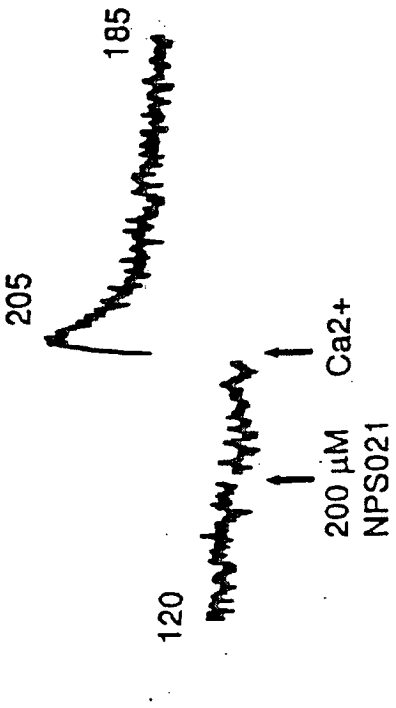


FIG. 37b.



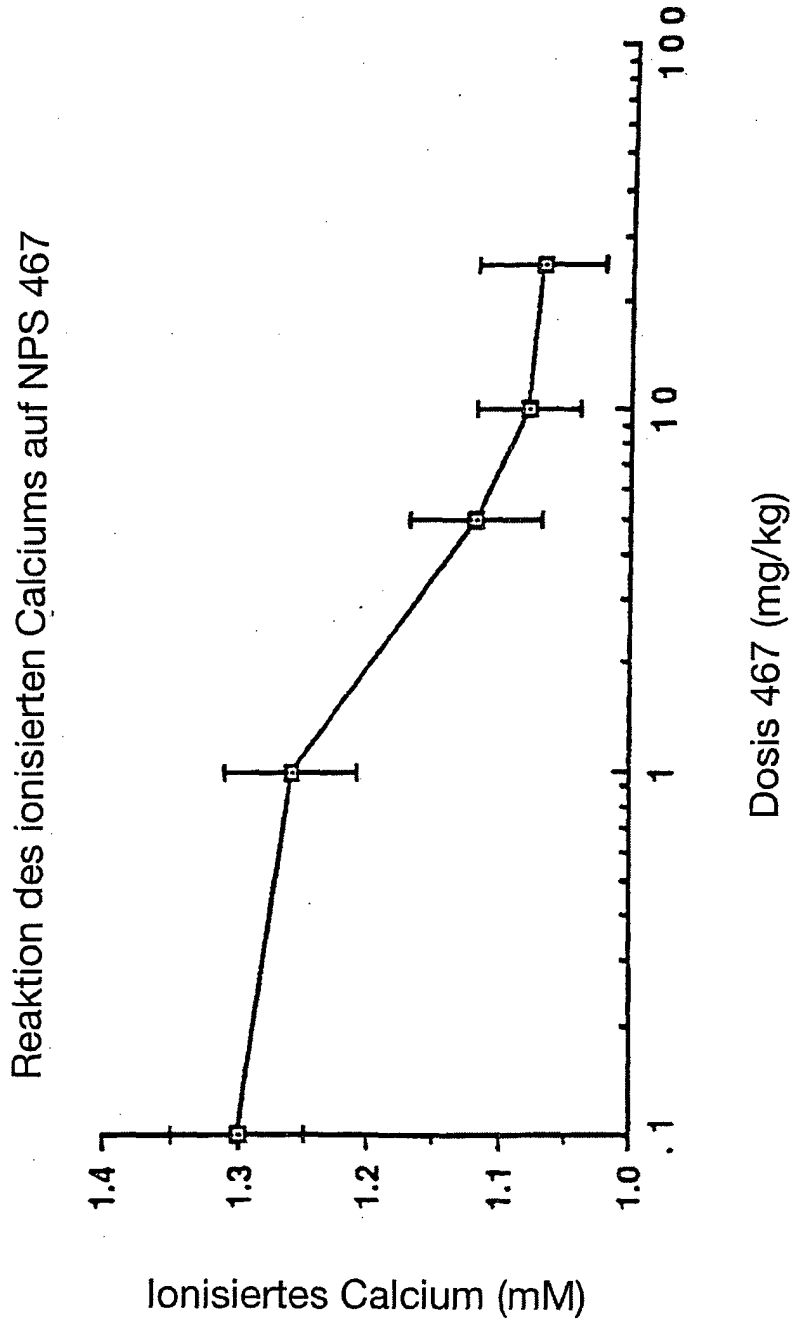

Reaktion des ionisierten Calciums auf NPS 467
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
Ionisiertes Calcium (mM)
.1
1
10
100
Dosis 467 (mg/kg)

FIG. 38

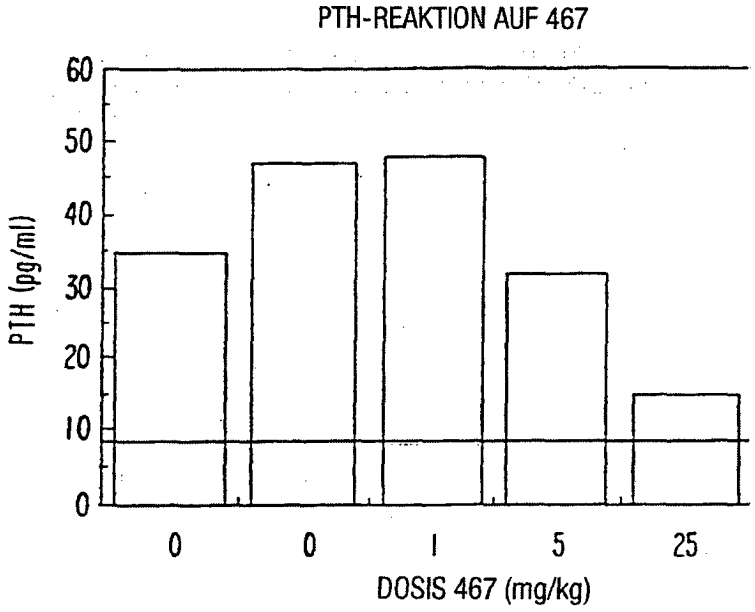

PTH-REAKTION AUF 467
PTH (pg/ml)
60
50
40
30
20
10
0
0
0
1
5
25
DOSIS 467 (mg/kg)

FIG. 39.

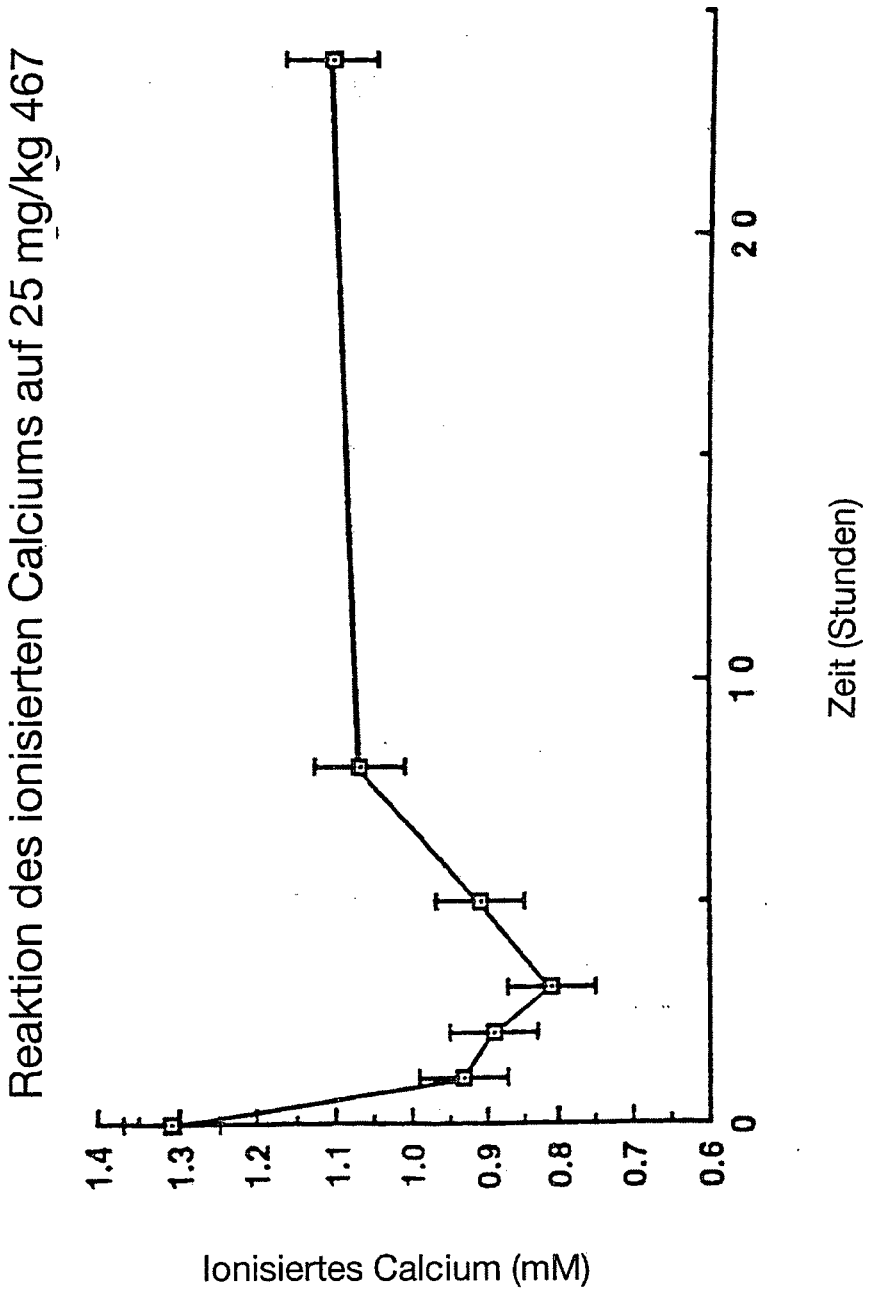

Reaktion des ionisierten Calciums auf 25 mg/kg 467
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
Ionisiertes Calcium (mM)
0
10
20
Zeit (Stunden)

FIG. 40.

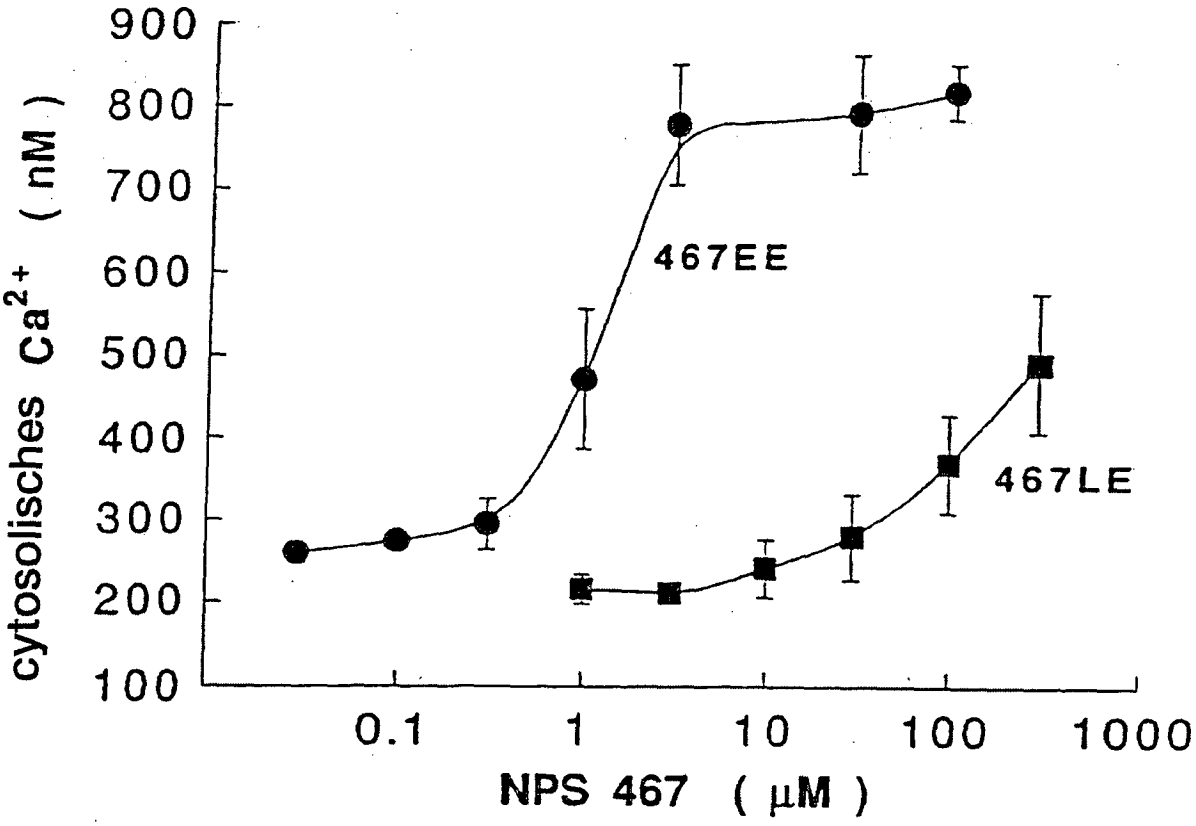

900
800
700
600
500
400
300
200
100
cytosolisches Ca^{2+} (nM)
467EE
467LE
0.1
1
10
100
1000
NPS 467 (µM)

FIG. 41.

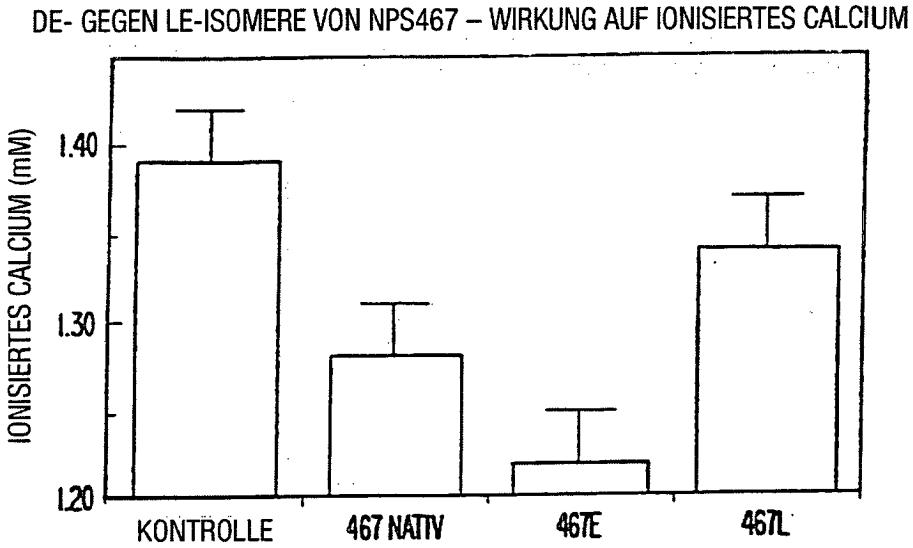

DE- GEGEN LE-ISOMERE VON NPS467 – WIRKUNG AUF IONISIERTES CALCIUM
IONISIERTES CALCIUM (mM)
1.40
1.30
1.20
KONTROLLE
467 NATIV
467E
467L

FIG. 42.

FIG. 43a.

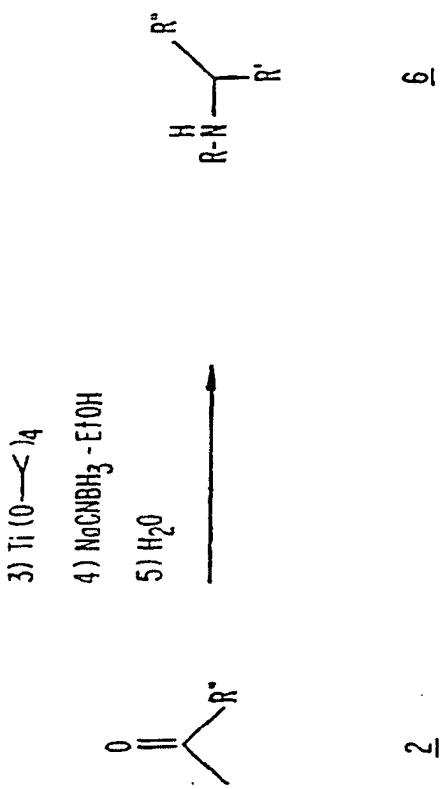
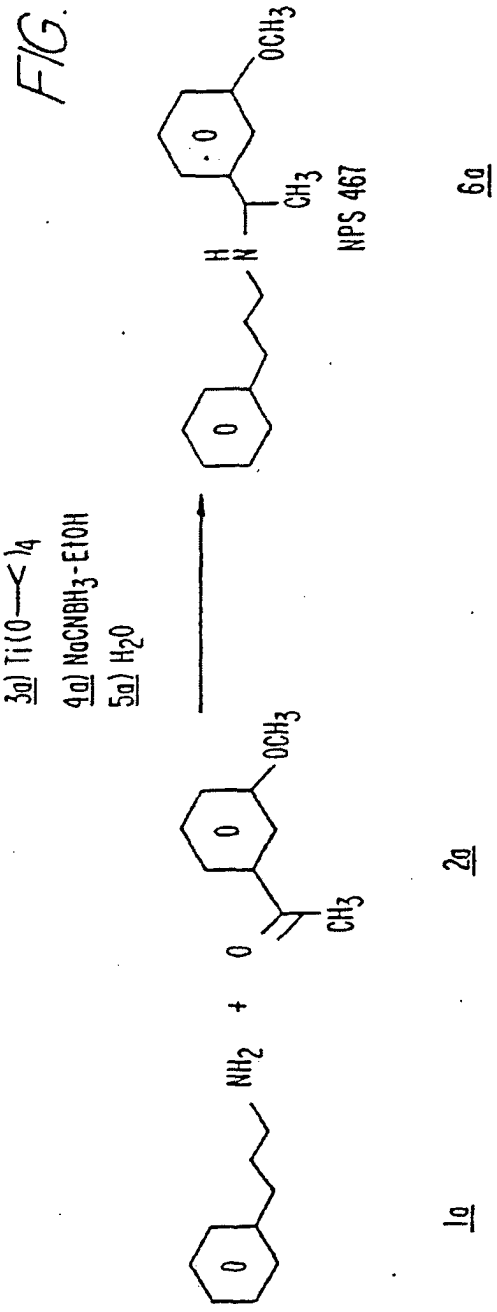


FIG. 43b.



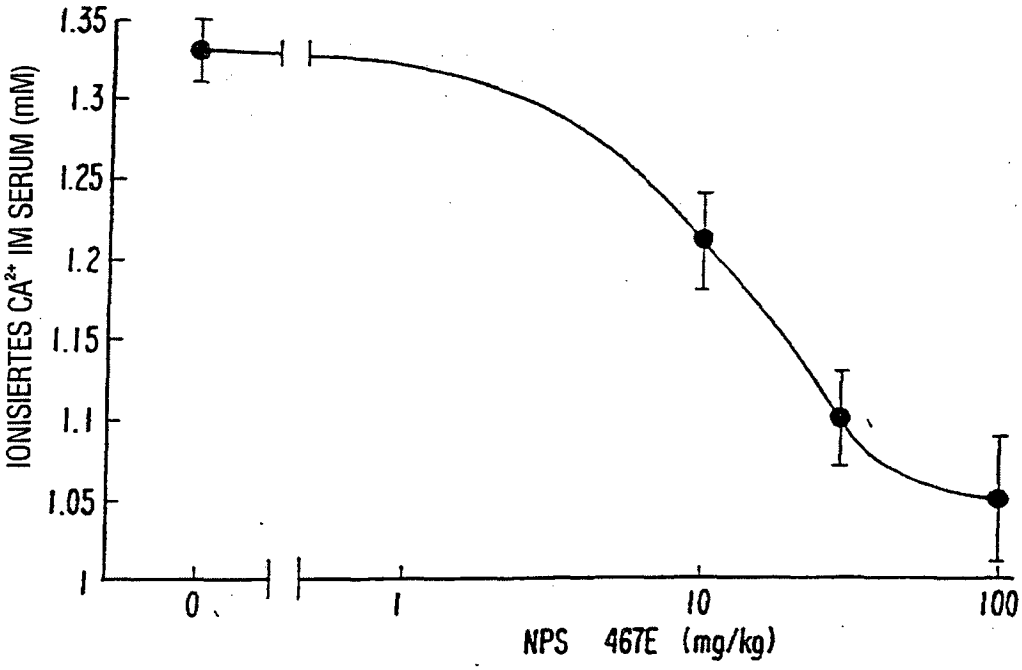

IONISIERTES CA^{2+} IM SERUM (mM)
1.35
1.3
1.25
1.2
1.15
1.1
1.05
1
0
1
10
100
NPS 467E (mg/kg)

FIG. 44.

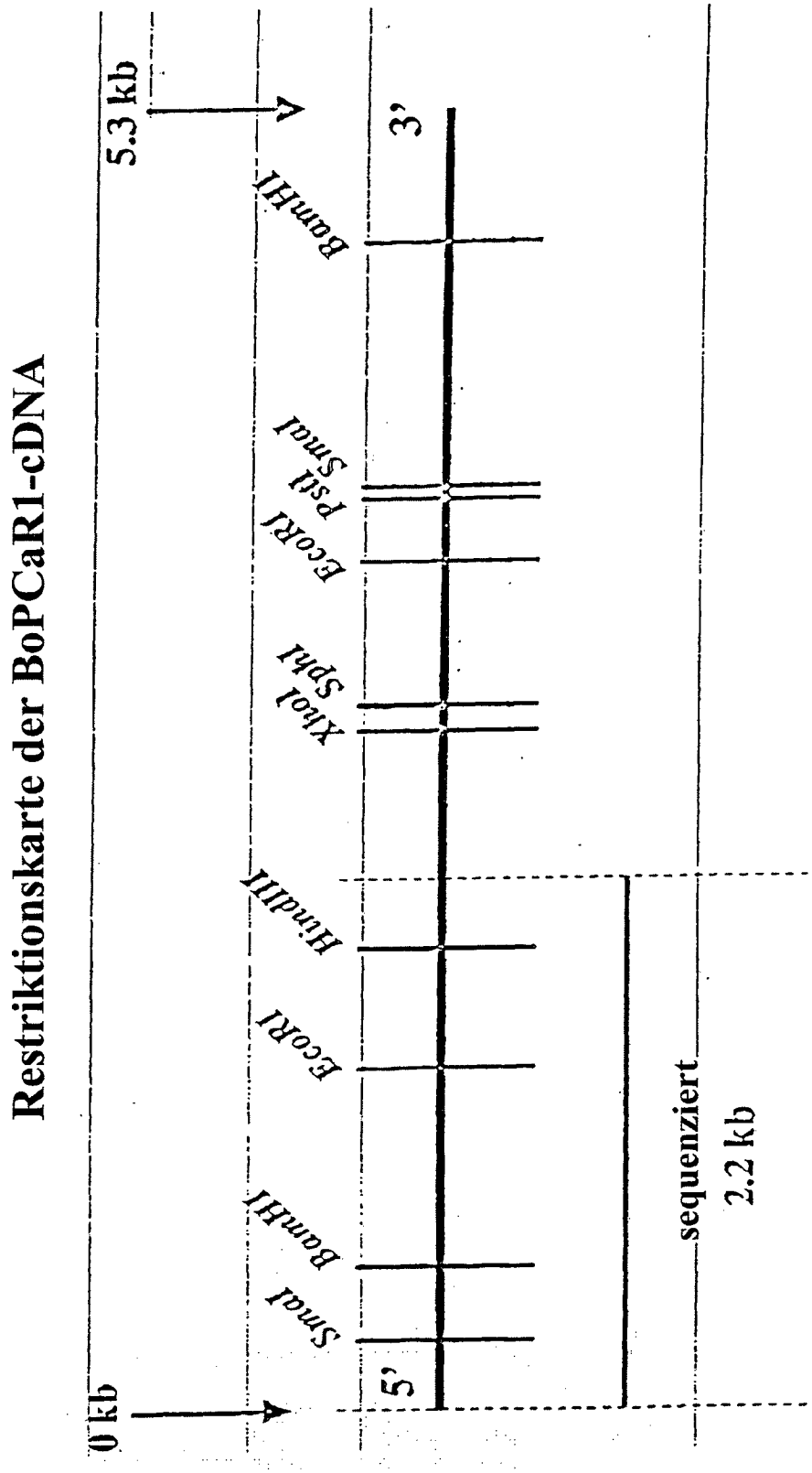
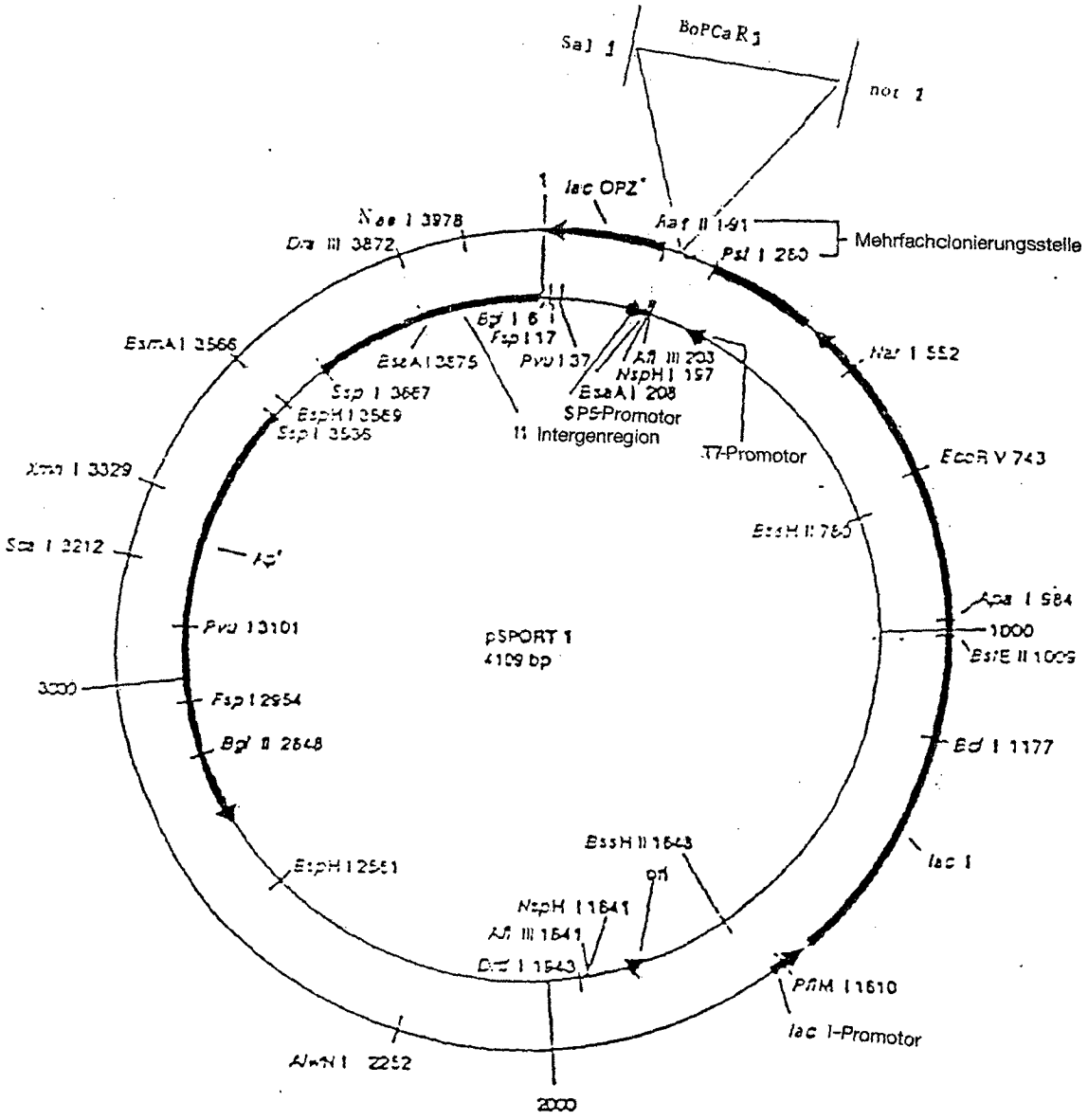

Restriktionskarte der BoPCaR1-cDNA
5.3 kb
0 kb
BamHI
PstI SmaI
EcoRI
XhoI SphI
HindIII
EcoRI
BamHI
SmaI
3'
5'
sequenziert
2.2 kb

FIG. 45



pSPORT 1
4109 bp

FIG. 46

```
   1 CCACGCGTCCGCGGA AAAAAAAAAAAAGTT CCCCACTCTAGTACA GAGAAGGTTGGCAGA

  60 GTCGTAAGCCCCCAA CCTCTTAAACTTCTC TGCATCTCCAAGGAG AAGGAGGGAAGAGGG
 120 GTTCTTTCCGACCTG AGGAGCTGGATCTGG GGTCCGAGAACCCCA AGGTAGCACCGGAAA
 180 GAACAGCACAGGAGG CGAGAGCGTGCGGTG GCCGGTKGGCGGGAG AACCAGACCCGACKY
 240 CGCGGTCCTCGGYGC TGCCGGGKYCCSGGG ACTCAGCTCAGCACG ACTGGGAAGCCGAAA
 300 GTACTACACACGGTC TCTGCATGATGTGAC TTCTGAAGACTCAAG AGCCACCCACTTCAC
 360 TAGTCTGCAATGGAG AAGGCAGAAATGGAA AGTCAAACCCCACGG TTCCATTCTATTAAT
 420 TCTGTAGACATGTGC CCCCACTGCAGGGAG TGAGTCGCACCAAGG GGGAAAGTCCTCAGG
 480 GGCCCCCAGACCACC AGCGCTTGAGTCCCT CTTCCTGGAGAGAAA GCAGAACTATGGCAC
 540 TTTATAGCTGCTGTT GGATCCTCTTGGCTT TTTTCTACCTGGTGC ACTTCCGCCTATGGG
 600 CCTGACCAGCGAGCC CAAAAGAAAGGGGAC ATTATCCTCGGGGGG CTCTTTCCTATTCAT
 660 TTTGGGGTTGMMGTG AAAGATCAGGATCTA AAGTCGAGGCCGGAG TCCGTGGAGTGTATC
 720 AGGTATAATTTCCGA GGATTTCGCTGGTTA CAAGCTATGATATTT GCCATAGAGGAAATA
 780 AACAGCAGTCCAGCC CTTCTTCCCAACATG ACCCTGGGATACAGG ATATTCGACACTTGT
 840 AACACCGTCTCTAAA GCCTTGGAGGCCACC CTGAGTTTTGTGGCC CAGAACAAAATTGAC
 900 TCTTTGAACCTTGAT GAGTTCTGCAACTGC TCAGAGCACATCCCC TCTACCATCGCAGTG
 960 GTGGGAGCTACTGGC TCGGGCATCTCCACA GCAGTGGCCAACCTG CTGGGGCTCTTCTAC
1020 ATCCCCCAGGTCAGC TATGCCTCCTCCAGC AGACTCCTCAGCAAC AAGAATCAATTCAAG
1080 TCCTTCCTCCGCACC ATACCCAATGATGAA CACCAGGCCACGGCC ATGGCTGACATCATC
1140 GAGTACTTCCGCTGG AACTGGGTGGGCACA ATTGCAGCTGACGAT GACTATGGCCGGCCA
1200 GGGATCGAGAAGTTT CGAGAGGAAGCTGAG GAGAGGGACATCTGC ATCGACTTCAGCGAG
1260 CTCATCTCCCAATAC TCTGATGAGGAAAAG ATCCAGCAGGTGGTG GAGGTGATCCAGAAT
1320 TCCACCGCCAAAGTC ATTGTCCGTCTTCTC CAGCGGCCCAGACCT GGAACCCCTCATCAA
1380 AGAGATCGTCCGGCG CAATATCACAGGCAG GATCTGGCTGGCCAG CGAGSCTGGSCAGCT
1440 CTTCCCTGATTGCTA TGCCCGAGTATTTCC ATGTGGTCGGAGGCA CCATTGGGTTTGGTT
1500 TGAAAGCTGGGCAGA TCCCAGGCTTCCGGG AATTCCTGCAGAAAG TCCACCCCAGGAAGT
1560 CTGTCCACAATGGTT TTGCCAAGGAGTTTT GGGAAGAAACATTTA ACTGCCACCTGCAAG
1620 AGGGTGCTAAAGGCC CATTACCGGTGGACA CCTTCCTGAGAGGTC ACGAAGAAGGAGGTG
1680 CCAGGTTAAGCAACA GTCCCACTGCCTTCC GACCTCTGTGCACTG GGGAGGAGAACATCA
1740 GCAGTGTCGAGACTC CTTACATGGATTATA CACATTTACGGATAT CCTACAACGTCTACT
1800 TAGCCGTCTACTCCA TTGCTCATGCCCTAC AAGATATATACACCT GCATACCTGGGAGAG
1860 GGCTCTTCACCAACG GTTCCTGCGCAGATA TCAAGAAGGTTGAAG CTTGGCAGGTCCTGA
1920 AACACCTGCGGCACC TAAATTTTACCAGCA ATATGGGGGAGCAAG TAACTTTCGATGAAT
1980 GTGGAGACCTGGCAG GGAACTATTCCATCA TCAACTGGCACCTCT CCCCAGAGGACGGCT
2040 CCATAGTGTTTAAGG AAGTTGGATATTACA ATGTCTATGCCAAGA AAGGAGAGAGACTCT
2100 TCATCAATGATGAAA AAATTCTGTGGAGTG GATTCTCAAGGGAGG TGC 2148
```

FIG. 47