



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 37 990 T2 2008.09.11

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 882 065 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 37 990.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/09025

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 933 988.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/048724

(86) PCT-Anmeldetag: 20.02.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 24.12.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 09.12.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 08.08.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 11.09.2008

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

604298 21.02.1996 US

(73) Patentinhaber:

AstraZeneca AB, Södertälje, SE

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

STORMANN, Thomas M., Salt Lake City, UT 84105,
US; SIMIN, Rachel T., Salt Lake City, UT 84105, US;
HAMMERLAND, Lance G., Bountiful, UT 84010,
US; FULLER, Forrest H., La Jolla, CA 92037, US

(54) Bezeichnung: NEUER METABOTROPISCHER GLUTAMAT-REZEPTOR VOM MENSCHEN

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 eingelebt, 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**FACHGEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuresequenzen, die einen neuen menschlichen metabotropen Glutamatrezeptor (mGluR) codieren. Der neue menschliche Rezeptor kann in Wirtszellen exprimiert werden, die verwendet werden können, um nach Agonisten, Antagonisten und modulierenden Molekülen zu suchen, die auf den neuen menschlichen mGluR wirken. Diese Moleküle, die auf den neuen menschlichen mGluR wirken, können verwendet werden, um die Aktivität des neuen menschlichen Rezeptors für die Behandlung von neurologischen Störungen und Erkrankungen zu modulieren.

[0002] Die Erfindung betrifft ebenfalls Nucleinsäuren, die solche Rezeptoren codieren; gentechnisch modifizierte Zellen und Gewebe, die solche Nucleinsäuren enthalten; Antikörper gegen solche Rezeptoren; und Verfahren, die das Vorangehende betreffen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Die nachfolgende Beschreibung stellt eine Zusammenfassung von Informationen zur Verfügung, die für die vorliegende Erfindung relevant sind. Es ist kein Zugeständnis, dass eine der hierin zur Verfügung gestellten Informationen Stand der Technik für die vorliegende beanspruchte Erfindung ist oder dass eine der Veröffentlichungen, auf die speziell oder implizit Bezug genommen wird, Stand der Technik für diese Erfindung ist.

[0004] Glutamat ist der hauptsächliche stimulierende Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) der Säuger. Glutamat stellt seine Wirkungen auf zentrale Neurone durch die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren zur Verfügung, wodurch diese aktiviert werden. Diese Rezeptoren wurden auf der Grundlage der strukturellen Merkmale der Rezeptorproteine, der Art, durch welche die Rezeptoren Signale in die Zelle vermitteln, und der pharmakologischen Profile in zwei Hauptklassen unterteilt, die ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren.

[0005] Die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) sind durch Liganden gesteuerte Ionenkanäle, die sich nach der Bindung von Glutamat öffnen, um den selektiven Einstrom von bestimmten monovalenten und divalenten Kationen zu ermöglichen, wodurch die Zellmembran depolarisiert wird. Zusätzlich können bestimmte iGluRs mit einer relativ hohen Permeabilität für Calcium eine Vielfalt von calciumabhängigen intrazellulären Verfahren aktivieren. Diese Rezeptoren sind Proteinkomplexe mit vielen Untereinheiten, die in ihrer Natur homomer oder heteromer sein können. Die verschiedenen Untereinheiten von iGluR teilen gemeinsame strukturelle Motive einschließlich einer relativ großen aminoterminalen extrazellulären Domäne (ECD), gefolgt von zwei transmembranen Domänen (TMD), einer zweiten kleineren extrazellulären Domäne und einer dritten TMD, bevor sie mit einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne enden. Geschichtlich wurden die iGluRs zunächst pharmakologisch in drei Klassen auf der Grundlage der bevorzugten Aktivierung durch die Agonisten α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure (AMPA), Kainat (KA) und N-Methyl-D-aspartat (NMDA) geteilt. Später brachten molekulare Clonierungsstudien, die mit zusätzlichen pharmakologischen Studien gekoppelt wurden, eine größere Vielfalt der iGluRs hervor, weil mehrere Unterarten von AMPA-, KA- und NMDA-Rezeptoren in dem ZNS von Säugern exprimiert werden (Hollman und Heinemann, Ann Rev Neurosci 17: 31, 1994).

[0006] Die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die nach der Bindung von Glutamat eine Vielfalt von intrazellulären sekundären Botenstoffsystemen aktivieren können. Die Aktivierung von mGluRs in intakten Säugerneuronen kann eine oder mehrere der nachfolgenden Antworten hervorrufen: Aktivierung der Phospholipase C, Zunahmen der Hydrolyse von Phosphoinositid (PI), Ausschüttung von intrazellulärem Calcium, Aktivierung von Phospholipase D, Aktivierung oder Inhibition der Adenylylcyclase, Zunahmen oder Abnahmen der Erzeugung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), Aktivierung der Guanylylcyclase, Zunahmen der Erzeugung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), Aktivierung der Phospholipase A₂, Zunahmen der Ausschüttung von Arachidonsäure und Zunahmen oder Abnahmen in der Aktivität der Ionenkanäle (z. B. Spannung und Liganden gesteuerte Ionenkanäle) (Schoepp und Conn, Trends Pharmacol Sci 14: 13, 1993; Schoepp, Neurochem Int 24: 439, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1, 1995).

[0007] Bisher wurden acht unterschiedliche mGluR-Unterarten durch die molekulare Clonierung isoliert und als mGluR1 bis mGluR8 gemäß der Reihenfolge, in der sie entdeckt wurden, bezeichnet (Nakanishi, Neuron 13: 1031, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1, 1995; Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995). Eine weitere Vielfalt erfolgt durch die Expression von alternativen Spleißformen von bestimmten Unter-

arten von mGluR (Pin et al., PNAS 89: 10331, 1992; Minskami et al., BBRC 199: 1136, 1994; Joly et al., J Neurosci 15: 3970, 1995). Jeder der mGluRs ist strukturell ähnlich, indem sie Membranproteine mit einer einzelnen Untereinheit sind, die eine große aminotermrale ECD, gefolgt von sieben putativen TMDs und einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne von unterschiedlicher Länge besitzen.

[0008] Die acht mGluRs wurden in drei Gruppen auf der Grundlage von Sequenzhomologien von Aminosäuren, den sekundären Botenstoffsystemen, die sie verwenden, und von pharmakologischen Eigenschaften unterteilt (Nakanishi, Neuron 13: 1031, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1, 1995; Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995). Die Aminosäurenhomologie zwischen den mGluRs innerhalb einer gegebenen Gruppe beträgt ungefähr 70%, aber sie fällt auf etwa 40% zwischen den mGluRs in unterschiedlichen Gruppen. Für mGluRs in der gleichen Gruppe läuft diese Verwandtschaft annähernd parallel zu den Ähnlichkeiten in den Mechanismen der Signaltransduktion und den pharmakologischen Eigenschaften.

[0009] Die mGluRs der Gruppe I umfassen mGluR1, mGluR5 und ihre alternativen Spleißvarianten. Die Bindung von Agonisten an diese Rezeptoren führt zu der Aktivierung der Phospholipase C und der nachfolgenden Mobilisierung des intrazellulären Calciums. Es wurden zum Beispiel Oocyten von Xenopus, die rekombinante mGluR1-Rezeptoren exprimieren, verwendet, um diese Wirkung indirekt durch elektrophysiologische Mittel zu zeigen (Masu et al., Nature 349: 760, 1991; Pin et al., PNAS 89: 10331, 1992). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Oocyten erreicht, die rekombinante mGluR5-Rezeptoren exprimierten (Abe et al., J Biol Chem 267: 13361, 1992; Minakami et al., BBRC 199: 1136, 1994; Joly et al., J Neurosci 15: 3970, 1995). In einer anderen Ausführungsform stimulierte die Aktivierung von rekombinanten mGluR1-Rezeptoren, die in Chinesischen Hamsterovarienzellen (CHO) exprimiert wurden, durch Agonisten die Hydrolyse von PI, die Erzeugung von cAMP und die Ausschüttung von Arachidonsäure, wie durch biochemische Standardassays gemessen wurde (Aramori und Nakanishi, Neuron 8: 757, 1992). Im Vergleich stimulierte die Aktivierung von mGluR5-Rezeptoren, die in CHO-Zellen exprimiert wurden, die Hydrolyse von PI und nachfolgend die intrazellulären Calciumdurchgänge, die Stimulation der Erzeugung von cAMP oder die Ausschüttung von Arachidonsäure wurde aber nicht beobachtet (Abe et al., J Biol Chem 267: 13361, 1992). Die Aktivierung von mGluR5-Rezeptoren, die in LLC-PK1-Zellen exprimiert werden, führen jedoch sowohl zu einer erhöhten Erzeugung von cAMP sowie einer Hydrolyse von PI (Joly et al., J Neurosci 15: 3970, 1995). Das Wirksamkeitsprofil der Agonisten für die mGluRs der Gruppe I ist Quisqualat > Glutamat = Ibotenat > (2S,1'S,2'S)-2-Carboxycyclopropyl)glycin(L-CCG-I) > (1S,3R)-1-Aminocyclopentan-1,3-dicarbonsäure (ACPD). Quisqualat ist relativ selektiv für die Rezeptoren der Gruppe I, wenn ein Vergleich mit den mGluRs der Gruppe II und der Gruppe III durchgeführt wird, aber es aktiviert ebenfalls stark ionotrope AMPA-Rezeptoren (Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1, Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995).

[0010] Die mGluRs der Gruppe II schließen mGluR2 und mGluR3 ein. Die Aktivierung dieser Rezeptoren, wenn sie in CHO-Zellen exprimiert werden, hemmt die Aktivität der Adenylylcyclase durch das hemmende G-Protein G₁₉ auf eine Keuchhustentoxin sensitive Art (Tanabe et al., Neuron 8: 169, 1992; Tanabe et al., J Neurosci 13: 1372, 1993). Das Wirksamkeitsprofil der Agonisten für Rezeptoren der Gruppe II ist L-CCG-I > Glutamat > ACPD > Ibotenat > Quisqualat. Vorläufige Studien deuten darauf hin, dass sowohl L-CCG-1 als auch (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-Dicarboxycyclopropyl)glycin(DCG-IV) relativ selektive Agonisten für die Rezeptoren der Gruppe II gegenüber den anderen mGluRs sind (Knopfel et al., J. Med. Chem. 38: 1417, 1995), dass aber DCG-IV eine Agonistenaktivität auch für iGluR zeigt (Ishida et al., Br J Pharmacol 109: 1169, 1993).

[0011] Die mGluRs der Gruppe III schließen mGluR4, mGluR6, mGluR7 und mGluR8 ein. Ähnlich wie die Rezeptoren der Gruppe II sind diese mGluRs negativ an die Adenylylcyclase gekoppelt, um die intrazelluläre Akkumulation von cAMP auf eine Keuchhustentoxin sensitive Art zu hemmen, wenn sie in CHO-Zellen exprimiert werden (Tanabe et al., J Neurosci 13: 1372, 1993; Nakajima et al., J Biol Chem 268: 11868, 1993; Okamoto et al., J Biol Chem 269: 1231, 1994; Duvoistin et al., J Neurosci 15: 3075, 1995). Als eine Gruppe ist ihr Wirksamkeitsprofil ihrer Agonisten (S)-2-Amino-4-phosphonobuttersäure (L-AP4) > Glutamat > ACPD > Quisqualat, aber mGluR8 kann sich leicht unterscheiden, wobei Glutamat potenter als L-AP4 ist (Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995; Duvoisin et al., J Neurosci 15: 3075, 1995). Sowohl L-AP4 als auch (S)-Serin-O-phosphat (L-SOP) sind relativ selektive Agonisten für die Rezeptoren der Gruppe III.

[0012] Schließlich besitzen die acht mGluR-Unterarten einzigartige Muster der Expression innerhalb des ZNS von Säugern, die in vielen Fällen überlappend sind (Masu et al., Nature 349: 760, 1991; Martin et al., Neuron 9: 259, 1992; Ohishi et al., Neurosci 53: 1009, 1993; Tanabe et al., J Neurosci 13: 1372; Ohishi et al., Neuron 13: 55, 1994; Abe et al., J Biol Chem 267: 13361, 1992; Nakajima et al., J Biol Chem 268: 11868, 1993; Okamoto et al., J Biol Chem 269: 1231, 1994; Duvoisin et al., J Neurosci 15: 3075, 1995). Als ein Ergebnis können bestimmte Neurone nur eine bestimmte mGluR-Unterart exprimieren, während andere Neurone mehrere Un-

terarten exprimieren können, die an ähnlichen und/oder unterschiedlichen Orten auf der Zelle lokalisiert sein können (das heißt postsynaptische Dendrite und/oder Zellkörper gegenüber präsynaptischen Enden von Axonen). Daher werden die funktionalen Konsequenzen der Aktivierung von mGluR auf einem bestimmten Neuron von den bestimmten mGluRs, die exprimiert werden, der Affinität der Rezeptoren für Glutamat und den Konzentrationen von Glutamat, mit denen die Zelle in Kontakt kommt, den Signaltransduktionswegen, die durch die Rezeptoren aktiviert werden, und den Orten der Rezeptoren auf der Zelle abhängen. Ein weiteres Maß der Komplexität kann durch mehrere Interaktionen zwischen den mGluR exprimierenden Neuronen in einer bestimmten Gehirnregion eingeführt werden. Als ein Ergebnis dieser Komplexitäten und dem Fehlen von unterartspezifischen Agonisten und Antagonisten von mGluR sind die Rollen von bestimmten mGluRs in physiologischen und pathophysiologischen Verfahren, welche die neuronale Funktion beeinflussen, nicht gut definiert. Dennoch hat die Arbeit mit den zur Verfügung stehenden Agonisten und Antagonisten einige allgemeine Erkenntnisse von den mGluRs der Gruppe I im Vergleich zu den mGluRs der Gruppe II und der Gruppe III ergeben.

[0013] Die Versuche der Aufklärung der physiologischen Rollen der mGluRs der Gruppe I deuten darauf hin, dass die Aktivierung dieser Rezeptoren eine neuronale Erregung auslöst. Verschiedenen Studien zeigten, das ACPD eine postsynaptische Erregung nach der Anwendung an Neurone in dem Hippocampus, dem cerebralen Cortex, dem Cerebellum und dem Thalamus sowie in anderen Hirnregionen hervorrufen kann. Hinweise deuten darauf, dass diese Erregung auf eine direkte Aktivierung der postsynaptischen mGluRs zurückzuführen ist, aber es wurde ebenfalls vorgeschlagen, dass sie durch die Aktivierung der präsynaptischen mGluRs vermittelt werden, was zu einer erhöhten Ausschüttung von Neurotransmittern führt (Baskys, Trends Pharmacol Sci 15: 92, 1992; Schoepp, Neurochem Int 24: 439, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1). Pharmakologische Experimente implizieren die mGluRs der Gruppe I als die Vermittler dieser Erregung. Die Wirkung von ACPD kann durch niedrige Konzentrationen von Quisqualat in der Anwesenheit von Antagonisten von iGluR wiedergegeben werden (Hu und Storm, Brain Res 568: 339, 1991; Greene et al., Eur J Pharmacol 226: 279, 1992) und zwei Phenylglycin-Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie mGluR1 aktivieren, (S)-3-Hydroxyphenylglycin ((S)-3HPG) und (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin ((S)-DHPG), erzeugen ebenfalls die Erregung (Watkins und Collingridge, Trends Pharmacol Sci 15: 333, 1994). Zusätzlich kann die Erregung durch (S)-4-Carboxyphenylglycin ((S)-4CPG), (S)-4-Carboxy-3-hydroxyphenylglycin ((S)-4C3HPG) und (+)-Alpha-methyl-4-carboxymethylglycin ((+)-MCPG), Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie Antagonisten von mGluR1 sind, blockiert werden (Eaton et al., Eur J Pharmacol 244: 195, 1993; Watkins und Collingridge, Trends Pharmacol Sci 15: 333, 1994).

[0014] Andere Studien, welche die physiologischen Rollen von mGluRs untersuchen, deuten darauf, dass eine Aktivierung von präsynaptischen mGluRs sowohl die stimulierende als auch die hemmende synaptische Übermittlung durch die Inhibition der Ausschüttung von Neurotransmittern blockieren kann (Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1). Die präsynaptische Blockierung der stimulierenden synaptischen Übermittlung durch ACPD wurde bei Neuronen im visuellen Cortex, Cerebellum, Hippocampus, Striatum und in der Amygdala beobachtet (Pin et al., Curr Drugs: Neurodegenerative Disorders 1: 111, 1993), während eine ähnliche Blockade der hemmenden synaptischen Übermittlung im Striatum und Bulbus olfactorius gezeigt wurde (Calabresi et al., Neurosci Lett 139: 41, 1992; Hayashi et al., Nature 366: 687, 1993). Mehrere Hinweise deuten darauf, dass die mGluRs der Gruppe II diese präsynaptische Inhibition vermitteln. Die mGluRs der Gruppe II sind stark an der Hemmung der Adenylylcyclase gekoppelt, wie z. B. die α_2 -adrenergen und 5HT_{IA}-serotonergen Rezeptoren, von denen bekannt ist, dass sie die präsynaptische Inhibition der Ausschüttung von Neurotransmittern in anderen Neuronen vermitteln. Die hemmenden Wirkungen von ACPD können ebenfalls von L-CCG-I und DCG-IV nachgeahmt werden, die selektive Agonisten der mGluRs der Gruppe II sind (Hayashi et al., Nature 366: 687, 1993; Jane et al., Br. J. Pharmacol 112: 809, 1994). Des weiteren wurde gezeigt, dass die Aktivierung von mGluR2 die Aktivität des präsynaptischen N-Typ-Calciumkanals stark hemmen kann, wenn der Rezeptor in den sympathischen Neuronen exprimiert wird (Ikeda et al., Neuron 14: 1029, 1995) und von der Blockade dieser Kanäle ist bekannt, dass sie die Ausschüttung von Neurotransmittern hemmen. Schließlich wurde beobachtet, dass L-CCG-I in Konzentrationen, die für die mGluRs der Gruppe II selektiv sind, die durch eine Depolarisierung hervorgerufene Ausschüttung von ³H-Aspartat von Schnitten des Striatums der Ratte gehemmt wird (Lombardi et al., Br J Pharmacol 110: 1407, 1993). Der Nachweis für physiologische Wirkungen der Aktivierung von mGluRs der Gruppe II auf der postsynaptischen Ebene ist begrenzt. Eine Studie deutet jedoch darauf, dass die postsynaptischen Wirkungen von L-CCG-I die Aktivierung des NMDA-Rezeptors in kultivierten Neuronen des Mesencephalons hemmen können (Ambrosini et al., Mol Pharmacol 47: 1057, 1995).

[0015] Physiologische Studien zeigten, dass L-AP4 ebenfalls die stimulierende synaptische Übermittlung von einer Vielfalt von Neuronen des ZNS hemmen kann. Eingeschlossen sind Neurone im Cortex, Hippocampus,

in der Amygdala, im Bulbus olfactorius und Rückenmark (Koerner und Johnson, Excitatory Amino Acid Receptors; Design of Agonists and Antagonists, S. 308, 1992; Pin et al., Curr Drugs: Neurodegenerative Disorders 1: 111, 1993). Die gesammelten Hinweise deuten darauf, dass die Inhibition durch die Aktivierung von präsynaptischen mGluRs vermittelt wird. Da die Wirkungen von L-AP4 von L-SOP nachgeahmt werden können und diese zwei Agonisten selektiv für mGluRs der Gruppe III sind, werden die Mitglieder dieser mGluR-Gruppe als die Vermittler der präsynaptischen Inhibition angesehen (Schoepp, Neurochem Int 24: 439, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1). Es wurde gezeigt, dass in den Neuronen des Bulbus olfactorius die Aktivierung der mGluRs durch L-AP4 die präsynaptischen Calciumströmungen hemmt (Trombley und Westbrook, J Neurosci 12: 2043, 1992). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Mechanismus der präsynaptischen Inhibition, die durch die Aktivierung der mGluRs der Gruppe III hervorgerufen wird, ähnlich zu dem für die mGluRs der Gruppe II ist, das heißt die Blockade der spannungsabhängigen Calciumkanäle und die Inhibition der Ausschüttung von Neurotransmittern. Von L-AP4 ist ebenfalls bekannt, dass es postsynaptisch wirkt, um die bipolaren ON-Zellen in der Retina zu hyperpolarisieren. Es wurde vorgeschlagen, dass diese Wirkung auf die Aktivierung eines mGluRs zurückzuführen ist, der an die cGMP-Phosphodiesterase in diesen Zellen gekoppelt ist (Schoepp, Neurochem Int 24: 439, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1).

[0016] Den metabotropen Glutamatrezeptoren wurden Rollen bei einer Anzahl von normalen Verfahren in dem ZNS von Säugern zugeschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von mGluRs eine Notwendigkeit für die Induktion einer langanhaltenden Potenzierung im Hippocampus und einer langanhaltenden Unterdrückung im Cerebellum ist (Bashir et al., Nature 363: 347, 1993; Bortolotto et al., Nature 368: 740, 1994; Aiba et al., Cell 79: 365, 1994; Aiba et al., Cell 79: 377, 1994). Eine Rolle für die Aktivierung von mGluR in der Nozizeption und der Schmerzfreiheit wurde ebenfalls gezeigt (heller et al., Neuroreport 4: 879, 1993). Zusätzlich wurde vorgeschlagen, dass die Aktivierung von mGluR eine modulierende Rolle bei einer Vielfalt von anderen normalen Verfahren einschließlich der synaptischen Übermittlung, der neuronalen Entwicklung, des neuronalen Todes, der synaptischen Formbarkeit, des räumlichen Lernens, des olfaktorischen Gedächtnisses, der zentralen Kontrolle der Herzaktivität, des Aufwachens, der motorischen Kontrolle und der Kontrolle des vestibulo-okulären Reflexes spielt (für Übersichtsartikel vergl. Nakanishi, Neuron 13: 1031, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1; Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995).

[0017] Keines der Dokumente, die hierin erwähnt werden, werden als Stand der Technik für die Patentansprüche anerkannt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft (1) Nucleinsäuren, die ein vor kurzem identifiziertes metabotropes Glutamatrezeptorprotein codieren, und Fragmente davon; (2) das metabotrope Glutamatrezeptorprotein und Fragmente davon; (3) chimäre Rezeptormoleküle, die eine oder mehrere Domänen, die von dem neuen metabotropen Glutamatrezeptor abgeleitet sind, und eine oder mehrere Domänen, die von einem anderen Rezeptor abgeleitet sind, besitzen; (4) Zelllinien, die das metabotrope Glutamatrezeptorprotein und Fragmente davon exprimieren; (5) Antikörper und Fragmente davon, die auf das metabotrope Glutamatrezeptorprotein, Proteinfragmente und Peptide zielen; (6) Verwendungen solcher Moleküle, Nucleinsäuren, Proteine, Zelllinien und Antikörper; (7) Verfahren zum Absuchen nach einer Verbindung, die den metabotropen Glutamatrezeptor bindet oder dessen Aktivität moduliert.

[0019] Die vorliegende Erfindung offenbart auch Verbindungen und Verfahren zum Modulieren der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors und der Bindung an den metabotropen Glutamatrezeptor. Solche Verbindungen wirken vorzugsweise als Agonisten, Antagonisten oder als allosterische Modulatoren von einer oder von mehreren Aktivitäten des metabotropen Glutamatrezeptors. Durch die Modulierung der Aktivitäten des metabotropen Glutamatrezeptors können verschiedene Wirkungen wie z. B. krampflösende Wirkungen, schützende Wirkungen für Neurone, schmerzlindernde Wirkungen und Wirkungen, die das Wahrnehmungsvermögen verstärken, hergestellt werden.

[0020] Es wurde vorgeschlagen, dass metabotrope Glutamatrezeptoren Rollen bei einer Vielfalt von pathophysiologischen Verfahren und Erkrankungsstadien, die das ZNS betreffen, spielen. Diese schließen Schlaganfall, Schädeltrauma, durch Sauerstoffmangel hervorgerufene und ischämische Verletzungen, Hypoglykämie, Epilepsie und neurodegenerative Erkrankungen wie z. B. die Alzheimer-Krankheit ein (Schoepp und Conn, Trends Pharmacol Sci 14: 13, 1993; Cunningham et al., Life Sci 54: 135, 1994; Hollman und Heinemann, Ann Rev Neurosci 17: 31, 1994; Pin und Duvoisin, Neuropharmacology 34: 1; Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995). Es wird vermutet, dass vieles in der Pathologie dieser Erkrankungen auf eine überhöhte, Glutamat induzierte Erregung von Neuronen des ZNS zurückzuführen ist. Da die mGluRs der Gruppe I den An-

schein haben, die Glutamat vermittelte neuronale Erregung durch postsynaptische Mechanismen und verstärkte präsynaptische Ausschüttung von Glutamat zu erhöhen, kann ihre Aktivierung zu der Pathologie beitragen. Daher können selektive Antagonisten dieser Rezeptoren therapeutisch nützlich sein, insbesondere als Agens, welches Neurone schützt, oder als krampflösendes Mittel. Weil die Aktivierung von mGluRs der Gruppe II und der Gruppe III im Gegensatz hierzu die präsynaptische Ausschüttung von Glutamat und die nachfolgende stimulierende Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen („neurotransmission“) hemmt, können selektive Agonisten dieser Rezeptoren einen ähnlichen therapeutischen Nutzen zeigen. Daher können die verschiedenen mGluR-Unterarten neue Ziele für die Arzneistoffentwicklung für das ZNS darstellen.

[0021] Vorläufige Studien, welche die therapeutischen Möglichkeiten mit den zur Verfügung stehenden Agonisten und Antagonisten von mGluR beurteilen, haben dem Anschein nach widersprüchliche Ergebnisse ergeben. Es wurde zum Beispiel berichtet, dass die Anwendung von ACPD auf Neurone des Hippocampus zu Anfällen und zu einer neuronalen Schädigung führt (Sacaan und Schoepp, Neurosci Lett 139: 77, 1992; Lipparti et al., Life Sci 52: 85, 1993). Andere Studien deuten dagegen darauf, dass ACPD die epileptiforme Aktivität hemmen kann (Taschenberger et al., Neuroreport 3: 629, 1992; Sheardown, Neuroreport 3: 916, 1992) und ebenfalls für Neurone schützende Eigenschaften zeigen kann (Koh et al., Proc Natl Acad Sci USA 88: 9431, 1991; Chiamulera et al., Eur J Pharmacol 216: 335, 1992; Siliprandi et al., Eur J Pharmacol 219: 173, 1992; Pizzi et al., J Neurochem 61: 683, 1993). Es ist wahrscheinlich, dass diese gegensätzlichen Ergebnisse auf das Fehlen einer Selektivität von ACPD und auf die Aktivierung von verschiedenen mGluR-Unterarten zurückzuführen ist. Eine vernünftige Erklärung für die Ergebnisse ist, dass die mGluRs der Gruppe I in den erstgenannten Studien aktiviert wurden, um die stimulierenden Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen zu verstärken, während die letzteren Wirkungen durch die Aktivierung der mGluRs der Gruppe II und/oder der Gruppe III vermittelt wurden, um die präsynaptische Ausschüttung von Glutamat zu hemmen und die stimulierende Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen zu vermindern. Die Beobachtungen, dass (S)-4C3HPG, ein Antagonist der mGluRs der Gruppe I und ein Agonist der mGluRs der Gruppe II, vor audiogenen Anfällen in DBA/2-Mäusen schützt (Thomsen et al., J Neurochem 62: 2492, 1994), während die selektiven Agonisten der mGluRs der Gruppe II, DCG-IV und L-CCG-I, Neurone vor der NMDA und KA induzierten Toxizität schützen (Bruno et al., Eur J Pharmacol 256: 109, 1994; Pizzi et al., J Neurochem 61: 683, 1993), sind ebenfalls übereinstimmend mit dieser Interpretation.

[0022] Es ist offensichtlich, dass die zur Zeit zur Verfügung stehenden Agonisten und Antagonisten der mGluRs sowohl als ein Werkzeug zur Forschung als auch als mögliche therapeutische Agenzien durch das Fehlen von Wirksamkeit und Selektivität von einem begrenzten Nutzen sein können. Weil diese Verbindungen größtenteils Aminosäuren oder Aminosäurederivate sind, besitzen sie zusätzlich begrenzte Bioverfügbarkeiten, welche in-vivo-Studien erschweren, welche die Physiologie, Pharmakologie und das therapeutische Potenzial eines mGluR beurteilen. Die Identifizierung von Agonisten und Antagonisten mit einem hohen Maß an Wirksamkeit und Selektivität für die individuellen mGluR-Unterarten ist daher die größte Notwendigkeit, um das Verständnis der unterschiedlichen Rollen der mGluRs in den physiologischen und pathophysiologischen Verfahren im ZNS von Säugern zu erhöhen. Das Screening von chemischen Bibliotheken mit hohem Durchsatz unter Verwendung von Zellen, die stabil mit individuellen clonierte mGluRs transfiziert sind, bietet einen viel-versprechenden Ansatz zum Identifizieren neuer Hauptverbindungen, die auf die individuellen Rezeptorunterarten wirken (Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995). Diese Hauptverbindungen können als Matrizen für Studien mit extensiven chemischen Modifizierungen dienen, um die Wirksamkeit, die Selektivität für mGluR-Unterarten und für wichtige therapeutische Eigenschaften wie z. B. die Bioverfügbarkeit weiter zu verbessern.

[0023] Mit diesen Informationen im Hintergrund ist es offensichtlich, dass der neue mGluR ein einzigartiges Muster der Expression im ZNS von Säugern im Vergleich zu den anderen mGluR-Unterarten besitzt. Es wird erwartet, dass der neue mGluR ein einzigartiges pharmakologisches Profil für die verschiedenen Agonisten, Antagonisten und modulierenden Moleküle im Vergleich zu den anderen mGluR-Unterarten zeigt. Als ein Ergebnis dieser Faktoren werden Verbindungen, die wirksam und spezifisch auf den neuen mGluR wirken, welcher der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, Wirkungen auf das ZNS von Säugern haben, die unterschiedlich von den Verbindungen sind, die auf andere mGluR-Unterarten wirken. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Verbindungen, die für den neuen mGluR der vorliegenden Erfindung selektiv sind, einzigartige Verwendungen und Vorteile in Bezug auf die Behandlung von verschiedenen Pathophysiologien und Erkrankungsstadien des ZNS besitzen.

[0024] Die bevorzugte Verwendung des Rezeptors und der Verfahren der vorliegenden Erfindung ist das Absuchen nach Verbindungen, welche die Aktivität des neuen metabotropen Glutamatrezeptors modulieren, und die Verwendung solcher Verbindungen, um bei der Behandlung von neurologischen Erkrankungen und Stö-

rungen zu helfen. Andere Verwendungen einschließlich der Diagnose und der Behandlung werden jedoch ebenfalls in Betracht gezogen. Solche Verwendungen basieren auf den neuen metabotropen Glutamatrezeptor, der hierin identifiziert wird, wobei seine Sequenz in [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr.: 1) zur Verfügung gestellt wird und die DNA codierende Sequenz in [Fig. 5](#) (SEQ ID Nr.: 5) zur Verfügung gestellt wird (wobei der offene Leserahmen (ORF) in [Fig. 2](#) (SEQ ID Nr.: 2), Nucleotide 1–2724, dargestellt wird).

[0025] Daher stellt die Erfindung in einem ersten Aspekt ein Nucleinsäuremolekül zur Verfügung, das ein metabotropes Glutamatrezeptorprotein codiert, das mindestens 6 zusammenhängende Aminosäurereste der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 umfasst, wie in [Fig. 1](#) gezeigt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Nucleinsäuremolekül ein gereinigtes oder isoliertes Nucleinsäuremolekül. Vorzugsweise ist das metabotrope Glutamatrezeptorprotein ein menschliches Protein. In besonderen Ausführungsformen umfasst das Nucleinsäuremolekül eine genomische DNA-Sequenz, eine cDNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz. Es werden zwei neue metabotrope Glutamatrezeptorproteine gezeigt, die sich nur in der Anwesenheit oder Abwesenheit einer terminalen Sequenz unterscheiden. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Glutamatrezeptorprotein die SEQ ID Nr.: 1.

[0026] Von besonderem Interesse sind Nucleinsäuremoleküle, die im Wesentlichen ein neues metabotropes Glutamatrezeptorprotein in voller Größe codieren. In bevorzugten Ausführungsformen codiert das Nucleinsäuremolekül daher die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1.

[0027] Es ist anerkannt, dass eine große, jedoch begrenzte Anzahl von unterschiedlichen Nucleinsäuresequenzen aufgrund der Redundanz des genetischen Codes die gleiche Aminosäuresequenz codieren wird. Solche alternativen codierenden Sequenzen liegen innerhalb des Umfangs des vorstehenden Aspekts der Erfindung.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform besitzt das Nucleinsäuremolekül, das die Sequenz ID Nr.: 1 codiert, die Nucleinsäuresequenz von SEQ ID Nr.: 5. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Nucleinsäuremolekül ebenfalls mindestens 18 zusammenhängende Nucleotide der Nucleinsäuresequenz der Nucleotide 2678 bis 2724 der SEQ ID Nr.: 5, die mindestens 6 zusammenhängende Aminosäurereste der Aminosäuresequenz von den Resten 894 bis 908 der SEQ ID Nr.: 1 und vorzugsweise jeden der Aminosäurereste 894 bis 908 codieren.

[0029] Weil die Verwendung eines modifizierten metabotropen Glutamatrezeptorproteins in bestimmten Anwendungen vorteilhaft ist, stellt die Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform ebenfalls ein Nucleinsäuremolekül zur Verfügung, welches das vorstehend beschriebene metabotrope Glutamatrezeptorprotein codiert, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine extrazelluläre Domäne umfasst, die ein Teil der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 ist. In dieser Ausführungsform ist die codierte Aminosäuresequenz im Wesentlichen frei von membranüberspannenden Domänen und intrazellulären Domänteilen, die in der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 enthalten sind. Gleichermassen können die Moleküle der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um Nucleinsäuremoleküle zu entwerfen, die eine oder mehrere Domänen codieren, die ein Teil der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 sind, die aber mindestens eine dieser Domänen nicht einschließen. Die Erfindung stellt daher, wie vorstehend definiert wird, Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die ebenfalls eine transmembrane Domäne eines mGluR8-Rezeptors, die in der Aminosäuresequenz enthalten ist, die in [Fig. 1](#) gezeigt wird und die frei von intrazellulären und extrazellulären Domänen ist, oder extrazelluläre und membranüberspannende Domänen des Rezeptors codieren, die im Wesentlichen frei von der intrazellulären Domäne sind.

[0030] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen codiert das Nucleinsäuremolekül eine extrazelluläre Domäne der SEQ ID Nr.: 1, die transkriptionell an ein zweites Nucleinsäuremolekül gekoppelt ist, das transmembrane und intrazelluläre Domänen eines Proteins codiert, das kein metabotropes Glutamatrezeptorprotein ist (das heißt ein nicht-metabotroper Glutamatrezeptor); die Nucleinsäure codiert ein Fusionsprotein, das aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne aufgebaut ist, die mit einer Domäne aus sieben Transmembransegmenten von SEQ ID Nr.: 1 zusammenhängt, und ist transkriptionell an eine Nucleinsäure gekoppelt, die eine C-terminale intrazelluläre Domäne eines nicht-metabotropen Glutamatrezeptors codiert; die Nucleinsäure codiert ein Fusionsprotein, das aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne aufgebaut ist, die mit einer Domäne aus sieben Transmembransegmenten von SEQ ID Nr.: 1 zusammenhängt, und ist transkriptionell an Nucleinsäuren gekoppelt, die mehrere intrazelluläre Domänen eines nicht-metabotropen Glutamatrezeptors codieren.

[0031] Weil es in bestimmten Anwendungen vorteilhaft ist, den komplementären oder den anticodierenden

DNA-Strang zu verwenden, stellt die Erfindung ebenfalls ein Nucleinsäuremolekül zur Verfügung, das eine Sequenz besitzt, die im Wesentlichen komplementär zu der Sequenz eines Nucleinsäuremoleküls des vorstehenden Aspekts ist. Die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise gereinigte oder isolierte Nucleinsäuremoleküle.

[0032] In dem Kontext dieser Erfindung bedeutet der Ausdruck "gereinigt", dass das vorgegebene Nucleinsäuremolekül oder Polypeptid von anderen Nucleinsäuremolekülen beziehungsweise Polypeptiden getrennt wurde, mit denen es in einer solchen Weise gefunden wird, dass es einen erheblichen Anteil der gesamten Nucleinsäuren Polypeptide, die in einer Herstellung vorliegen, erzeugt. Vorzugsweise macht das vorgegebene Molekül mindestens 1, 5, 10, 50, 75, 85 oder 95 Prozent oder mehr der Moleküle dieser Art (Nucleinsäure oder Polypeptid) aus, die in einer Herstellung vorliegen.

[0033] Der Ausdruck "isoliert" in Bezug auf Nucleinsäure, Polypeptid oder andere Biomoleküle dieser Erfindung bedeutet, dass das Molekül in einer anderen Form vorliegt (das heißt seine Assoziation mit anderen Molekülen) als es in der Natur gefunden wird. Eine isolierte Rezeptornucleinsäure ist zum Beispiel von einer oder von mehreren Nucleinsäuren getrennt, die auf dem gleichen Chromosom vorliegen, und ein isoliertes Polypeptid ist von einer erheblichen Fraktion der anderen Polypeptide getrennt, mit denen es normalerweise in der Natur gefunden wird. Vorzugsweise ist die isolierte Nucleinsäure oder das isolierte Polypeptid von mindestens 90% der anderen Nucleinsäuren, die auf dem gleichen Chromosom liegen, oder der Polypeptide, die normalerweise in der gleichen Zelle gefunden werden, getrennt. Ein Beispiel einer isolierten Nucleinsäure ist eine rekombinante Nucleinsäure. In dieser Anwendung unterscheidet sich der Ausdruck isolierte Nucleinsäure von Clonen, die in einer Bibliothek von Clonen existieren. Er betrifft einen bestimmten Clon, der das gewünschte Material codiert, der von anderen solchen Clonen isoliert ist. Er kann durch rekombinante Standardverfahren erzeugt werden, um innerhalb eines Untersuchungsröhrchens oder innerhalb einer gewünschten Zelle oder eines gewünschten Organismus zu existieren. Er ist vorzugsweise die einzige Nucleinsäure, die in einem Standardvektor cloniert ist, und kann natürlich vorkommende Kontrollsequenzen, die damit assoziiert sind, enthalten oder nicht. Er enthält daher Nucleinsäuren, die von ihrer natürlichen Umgebung isoliert sind und von denen bekannt ist, dass sie die Sequenz enthalten, von der beansprucht wird, das sie vorhanden ist. Es ist vorzugsweise eine homogene Herstellung einer Nucleinsäure, die von anderen zellulären Bestandteilen und von anderen Nucleinsäuren getrennt ist.

[0034] Durch die Bezugnahme auf die Nucleinsäuren und Polypeptide der vorliegenden Erfindung betrifft der Ausdruck "einzigartig" einen Unterschied in der Sequenz zwischen einem Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung und der entsprechenden Sequenz der anderen Rezeptorproteine einschließlich anderer metabotroper Glutamatrezeptorproteine. Die Sequenzen unterscheiden sich daher durch mindestens ein oder einen, vorzugsweise aber durch eine Vielzahl von Nucleotiden oder Aminosäureresten.

[0035] Der Ausdruck "im Wesentlichen komplementär" bedeutet, dass die gereinigte Nucleinsäure an die komplementäre Sequenzregion in einer spezifischen Nucleinsäure unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren kann. Solche Nucleinsäuresequenzen sind besonders als Nachweissonden der Hybridisierung nützlich, um die Anwesenheit einer Nucleinsäure nachzuweisen, die einen bestimmten Rezeptor codiert. Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren nur hoch komplementäre Nucleinsäuresequenzen. Vorzugsweise verhindern solche Bedingungen die Hybridisierung von Nucleinsäuren, die 4 oder mehr Fehlpaarungen von 20 zusammenhängenden Nucleotiden, stärker bevorzugt 2 oder mehr Fehlpaarungen von 20 zusammenhängenden Nucleotiden und am stärksten bevorzugt eine oder mehr Fehlpaarungen von 20 zusammenhängenden Nucleotiden haben. Vorzugsweise ist die Nucleinsäure im Wesentlichen zu mindestens 15, 20, 27 oder 45% der zusammenhängenden Nucleotide der spezifischen Sequenz (z. B. in SEQ ID Nr.: 2) komplementär.

[0036] Im Zusammenhang mit dem neuen Rezeptor und den Fragmenten betrifft der Ausdruck "funktionales Äquivalent" ein Polypeptid, das eine Aktivität besitzt, die an die Stelle von einer oder mehreren Aktivitäten eines bestimmten Rezeptors oder Rezeptorfragments gesetzt werden kann. Dies wird detaillierter in der nachfolgenden Ausführlichen Beschreibung erklärt.

[0037] Mit Bezugnahme auf die verschiedenen Domänen eines metabotropen Glutamatrezeptors betrifft der Ausdruck "im Wesentlichen frei" die Abwesenheit von mindestens dem größten Anteil der bestimmten Domäne, vorzugsweise so, dass tatsächlich keine Aktivität des Interesses, die für diese Domäne spezifisch ist, übrig bleibt. Daher kann/können ein kurzer Anteil/kurze Anteile der bestimmten Sequenz der Domäne übrigbleiben, aber dieser/diese stellt/en eine wesentliche bestimmte Aktivität zur Verfügung, die normalerweise durch die intakte Domäne zur Verfügung gestellt wird.

[0038] Der Ausdruck "umfassen" bedeutet, dass, unabhängig davon, was dem Wort "umfassen" folgt, dieses eingeschlossen ist, darauf aber keine Begrenzung erfolgt. Die Verwendung des Ausdrucks deutet darauf, dass die aufgelisteten Elemente benötigt werden, dass aber andere Elemente optional anwesend sein können oder nicht. Der Ausdruck "im Wesentlichen bestehen aus" bedeutet, dass die aufgelisteten Elemente benötigt werden, dass aber andere Elemente optional anwesend sein können oder nicht, abhängig davon, ob sie die Aktivität oder die Wirkung der aufgelisteten Elemente beeinflussen oder nicht.

[0039] Polypeptide, die den Nucleinsäuremolekülen des vorstehenden Aspekts entsprechen, werden ebenfalls durch die vorliegende Erfindung zur Verfügung gestellt. Ein anderer Aspekt der Erfindung zeichnet sich daher durch ein Polypeptid aus, das mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 der SEQ ID Nr.: 1 besitzt. In bevorzugten Ausführungsformen besitzt das gereinigte Polypeptid zusätzlich mindestens 12, 18 oder 54 zusammenhängende Aminosäuren der SEQ ID Nr.: 1. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst das gereinigte Polypeptid mindestens eine Aminosäure, die zusammenhängend mit den anderen zusammenhängenden Aminosäuren ist der Sequenz, die durch die Reste 894 bis 908 der SEQ ID Nr.: 1 zur Verfügung gestellt wird. In anderen bevorzugten Ausführungsformen umfasst das gereinigte Polypeptid mindestens neun, 12 oder 15 zusammenhängende Aminosäuren der Sequenz, die durch die Reste 894 bis 908 der SEQ ID Nr.: 1 zur Verfügung gestellt wird. In einem anderen Aspekt umfasst das gereinigte Polypeptid des weiteren die Aminosäuresequenz, die durch die Reste 1 bis 893 der SEQ ID Nr.: 1 zur Verfügung gestellt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polypeptid des weiteren eine Sequenz, die fünfzehn Aminosäuren groß ist und die homolog zu der Sequenz am Carboxyl-Schwanz des mGluR8 der Maus ist, die fünfzehn Aminosäuren groß ist. Andere bevorzugte Rezeptorfragmente schließen solche ein, die nur einen extrazellulären Anteil, einen transmembranen Anteil, einen intrazellulären Anteil und/oder einen Anteil mit mehreren Transmembransegmenten (z. B. einen Anteil mit 7 Transmembransegmenten) besitzen, wie im Zusammenhang mit den Nucleinsäuremolekülen der Erfindung beschrieben wird. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polypeptid die Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr.: 1.

[0040] Die Expression einer rekombinanten Nucleinsäure, die einen metabotropen Glutamatrezeptor oder ein Rezeptorfragment codiert, ist ein nützliches Verfahren für die Herstellung von Polypeptiden wie z. B. von solchen, die vorstehend beschrieben werden. In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung daher eine rekombinante Nucleinsäure zur Verfügung, die einen metabotropen Glutamatrezeptor oder ein Rezeptorfragment, wie beschrieben, codiert und die in einem Expressionsvektor cloniert ist. Ein Expressionsvektor enthält die notwendigen Elemente für die Expression einer clonierten Nucleinsäuresequenz, um ein Polypeptid herzustellen. Ein "Expressionsvektor" enthält eine Promotorregion (welche die Initiation der RNA-Transkription reguliert) sowie die DNA-Sequenzen, die, wenn sie in RNA transkribiert werden, die Initiation der Synthese signalisieren werden. Der "Expressionsvektor" schließt Vektoren ein, die DNA-Sequenzen, die darin enthalten sind, exprimieren können, das heißt, die codierenden Sequenzen sind funktionell an andere Sequenzen gebunden, die ihre Expression bewirken können. Es wird impliziert, obwohl es nicht immer deutlich zum Ausdruck gebracht wird, dass diese Expressionsvektoren in dem Wirtsorganismus replizierbar sein müssen, entweder als Episome oder als ein integraler Anteil der chromosomal DNA. Offensichtlich würde ein Fehlen der Replizierbarkeit sie auf wirksamer Weise funktionslos machen. Ein nützliches, nicht aber notwendiges Element eines wirksamen Expressionsvektors ist eine Markierung, die ein Sequenz codiert, das heißt, eine Sequenz, die ein Protein codiert, das zu einer phänotypischen Eigenschaft (z. B. einer Resistenz gegen Tetracyclin) der Zelle führt, die das Protein enthält, welches ermöglicht, dass solche Zellen leicht identifiziert werden können. Zusammengefasst wird dem "Expressionsvektor" eine funktionale Definition gegeben und jede DNA-Sequenz, die in der Lage ist, die Expression von einem vorgegebenen enthaltenen DNA-Code zu exprimieren, wird in diesen Ausdruck eingeschlossen, wenn er auf die vorgegebene Sequenz angewendet wird. Weil zur Zeit solche Vektoren häufig in der Form von Plasmiden vorliegen, werden die Ausdrücke "Plasmid" und "Expressionsvektor" häufig austauschbar verwendet. Es wird jedoch beabsichtigt, dass die Erfindung solche anderen Formen der Expressionsvektoren einschließt, einschließlich viraler Vektoren, die äquivalenten Funktionen dienen und die von Zeit zu Zeit auf dem Fachgebiet bekannt werden.

[0041] Mit Bezugnahme auf Rezeptorproteine bedeutet "biologisch funktional" und "funktionaler Rezeptor", dass das Rezeptormolekül oder ein Teil davon eine normale biologische Aktivität besitzt, die charakteristisch für den normalen Rezeptor in seiner üblichen zellulären Umgebung ist und welche für das Verfahren des Interesses von Bedeutung ist. Solch ein Verfahren kann zum Beispiel ein Bindungsassay oder eine komplexe zelluläre Antwort sein. Vorzugsweise ist ein funktionaler Rezeptor in der Lage, an den normalen zellulären Antwortreaktionen teilzunehmen. Mit Bezugnahme auf einen Expressionsvektor bedeutet "biologisch funktional", dass der Expressionsvektor transkribiert werden kann und dass das Transkriptionsprodukt in der Zelle oder dem Expressionssystem des Interesses translatiert werden kann.

[0042] Die Ausdrücke "transformiert" und "transfiziert" betreffen die Insertion eines fremden genetischen Materials in eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle. Eine solche Insertion wird üblicherweise unter Verwendung von Vektoren wie z. B. Plasmiden oder viralen Vektoren durchgeführt, kann aber ebenfalls andere Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, einschließen.

[0043] Eine rekombinante Nucleinsäure kann die vorstehend beschriebene Nucleinsäure enthalten, die einen metabotropen Glutamatrezeptor, ein Rezeptorfragment oder ein Derivat eines metabotropen Glutamatrezeptors unter der Kontrolle ihrer genomischen regulatorischen Elemente oder unter der Kontrolle von exogenen regulatorischen Elementen einschließlich eines exogenen Promoters codiert. Der Ausdruck "exogen" bedeutet einen Promotor, der *in vivo* normalerweise nicht transkriptionell an die codierende Sequenz des metabotropen Glutamatrezeptors gekoppelt ist.

[0044] Der Expressionsvektor kann in einem anderen Aspekt der Erfindung verwendet werden, um eine prokaryontische oder eine eukaryontische Wirtszelle zu transformieren oder transfizieren. Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft daher eine rekombinante Zelle oder ein rekombinantes Gewebe. Die rekombinante Zelle oder das rekombinante Gewebe ist aus einer rekombinanten Nucleinsäuresequenz des vorstehenden ersten Aspekts aufgebaut und ist eine Zelle, die *in vivo* die Nucleinsäure zu exprimieren. Rekombinante Zellen haben verschiedene Verwendungen, einschließlich der Wirkung als biologische Fabriken zur Herstellung von Polypeptiden, die von der rekombinanten Nucleinsäure codiert werden, und für die Herstellung von Zellen, die einen funktionsfähigen metabotropen Glutamatrezeptor besitzen. Die Zellen, die einen funktionsfähigen metabotropen Glutamatrezeptor enthalten, können verwendet werden, um zum Beispiel nach Agonisten, Antagonisten oder allosterischen Modulatoren des mGluR zu suchen. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Zelle oder das Gewebe, die/das die rekombinante Nucleinsäure enthält, die einen funktionsfähigen metabotropen Glutamatrezeptor codiert, aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus: Zelle des zentralen Nervensystems, Zelle, des peripheren Nervensystems, Hypophysenzelle und Hypothalamuszelle; und die rekombinante Nucleinsäure codiert mindestens 12, 18 oder 54 zusammenhängende Aminosäuren der SEQ ID Nr.: 1. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Wirtszelle eine Oocyte, zum Beispiel eine Oocyte von *Xenopus*. In anderen bevorzugten Ausführungsformen ist die Zelle eine Zelle von NIH-3T3, HeLa, NG115, CHO, HEK 293 und Cos7.

[0045] Ein anderer Aspekt der Erfindung beschreibt ein Verfahren für die Herstellung eines Polypeptidprodukts, welches das Züchten von prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen unter geeigneten Nährstoffbedingungen beinhaltet, die mit einem Expressionsvektor gemäß der Erfindung transformiert oder transfiziert sind. Die Wirtszellen werden in einer Weise gezüchtet, welche die Expression des Polypeptidprodukts ermöglicht. In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung beinhaltet das Verfahren des weiteren die Isolation des Polypeptidprodukts. "Geeignete Nährstoffbedingungen" sind solche, die einer Zelle ermöglichen, die normalen metabolischen Funktionen auszuführen und/oder sich zu vermehren. Die Bedingungen, die für eine bestimmte Zelllinie oder für einen Stamm geeignet sind, werden sich im Allgemeinen unterscheiden, aber die geeigneten Bedingungen für jede einer solchen Zellart sind bekannt oder können durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, bestimmt werden.

[0046] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung beschreibt ein Verfahren zum Erzeugen eines transgenen nicht-menschlichen Säugers durch das Einführen einer Nucleinsäure in die Zelle(n) eines nicht-menschlichen Säugers, wobei die Nucleinsäure im Wesentlichen aus der Sequenz der SEQ ID Nr.: 2 oder einem biologisch funktionalen Teil davon besteht, welcher mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 umfasst, die in [Fig. 1](#) gezeigt werden.

[0047] Das Nucleinsäuremolekül kann daher verwendet werden, um transgene, nicht-menschliche Säuger zur Verfügung zu stellen, die ein Transgen enthalten, das den neuen metabotropen Glutamatrezeptor codiert, oder ein Gen, das die Expression dieses Rezeptors bewirkt, und Verfahren zum Erzeugen eines transgenen nicht-menschlichen Säugers, der eine transgene Nucleinsäure enthält, die den neuen metabotropen Glutamatrezeptor codiert. Vorzugswise wird ein menschlicher metabotroper Glutamatrezeptor verwendet. In bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens der vorliegenden Erfindung codiert die transgene Nucleinsäure einen metabotropen Glutamatrezeptor, verändert die Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors, inaktiviert die Expression des metabotropen Glutamatrezeptors und reguliert die Expression des metabotropen Glutamatrezeptors hoch oder runter.

[0048] Der Ausdruck "transgen" betrifft ein Tier (ebenfalls anwendbar auf eine Pflanze), bei dem ein fremdes Gen in die Chromosomen der Tierzellen eingebaut ist. In vielen Fällen ist das fremde Gen von einer anderen Art abgeleitet, aber das Gen kann ebenfalls ein Derivat eines Gens sein, das normalerweise in dem Tier ge-

funden wird und das in das Chromosom eingebracht wurde. Weil die transgene Nucleinsäure in das Chromosom eingebaut ist, wird sie zusammen mit dem Rest des Chromosoms repliziert.

[0049] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren für das Suchen nach einer Verbindung, die einen metabotropen Glutamatrezeptor bindet oder seine Aktivität moduliert und welche die Sequenz SEQ ID Nr.: 1 besitzt. Das Verfahren betrifft das Einführen des metabotropen Glutamatrezeptors und einer Testverbindung in ein verträgliches Medium und das Überprüfen der Bindung oder der Modulation durch physikalisch nachweisbare Mittel, wodurch die Verbindungen identifiziert werden, die mit dem metabotropen Glutamatrezeptor interagieren oder seine Aktivität modulieren. Eine solche Verbindung ist als ein therapeutisches Molekül, um die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors zu modulieren, oder als ein diagnostisches Agens nützlich, um Patienten zu diagnostizieren, die unter einer Erkrankung leiden, die durch eine abnormale metabotrope Glutamataktivität gekennzeichnet ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der mGluR ein chimärer Rezeptor, der eine extrazelluläre Domäne, welche in der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 enthalten ist, und eine intrazelluläre Domäne eines anderen Rezeptors enthält. Ein solcher chimärer Rezeptor ermöglicht die Aktivierung eines zellulären Signalwegs, der normalerweise durch den neuen mGluR, der hierin beschrieben wird, nicht aktiviert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der metabotrope Glutamatrezeptor ebenfalls durch eine Zelle exprimiert und nach der Verbindung wird durch das Überwachen der Wirkung der Verbindung auf die Zelle gesucht, stärker bevorzugt ist die Zelle eine eukaryontische Zelle. Das Verfahren kann zum Beispiel das Inkontaktbringen einer Zelle, die eine rekombinante Nucleinsäure enthält, die einen metabotropen Glutamatrezeptor codiert, mit dem Agens und den Nachweis einer Veränderung der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors beinhalten. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform beinhaltet das Verfahren einen kompetitiven Bindungsassay mit einem markierten bekannten Bindungsagens. Vorzugsweise wird das Verfahren verwendet, um ein Agens zu identifizieren, das einen metabotropen Glutamatrezeptor moduliert.

[0050] Der Ausdruck "physikalisch nachweisbares Mittel" betrifft hierin das Mittel zum Nachweisen der Interaktion zwischen einem Modulator oder einer bindenden Verbindung mit dem neuen metabotropen Glutamatrezeptormolekül. Solche Mittel können zum Beispiel spektroskopische Verfahren (z. B. fluorometrische Messung von Ca^{2+}), elektrophysikalische Assays und biochemische Assays (z. B. spezifische Enzymaktivität) einschließen. Zusätzlich zu einer Vielfalt von anderen Assays können solche biochemischen Assays den Nachweis der Aktivierung eines zellulären Signalwegs durch einen chimären Rezeptor einschließen, der normalerweise nicht durch das neue mGluR aktiviert wird. Jede Technik weist eine physikalische Eigenschaft oder einen Parameter nach.

[0051] Ein "chimärer Rezeptor" ist einer, der eine Aminosäuresequenz besitzt, die eine Fusion oder eine Assoziation von Sequenzen von zwei oder von mehreren unterschiedlichen Proteinen ist, wobei mindestens eines ein Rezeptorprotein ist. Typischerweise besitzt ein chimärer Rezeptor in dieser Erfindung Aminosäuresequenzen, die Domänen (wie z. B. extrazelluläre, membranüberspannende und intrazelluläre) von zwei oder von mehreren unterschiedlichen Rezeptorproteinen darstellen, wobei eine von ihnen der neue mGluR8 der Erfindung ist.

[0052] Die Identifizierung von Agenzien, die den metabotropen Glutamatrezeptor modulieren, wird durch die Verwendung eines Screeningsystems mit hohem Durchsatz erleichtert. Das Screening mit hohem Durchsatz ermöglicht, dass eine große Anzahl von Molekülen getestet wird. Eine große Anzahl von Molekülen kann zum Beispiel individuell getestet werden, wobei schnelle automatisierte Techniken oder in Kombination mit der Verwendung einer kombinatorischen Bibliothek von Molekülen verwendet werden. Individuelle Verbindungen, welche die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors modulieren können und die in einer kombinatorischen Bibliothek vorhanden sind, können durch die Reinigung und das erneute Testen der Fraktionen der kombinatorischen Bibliothek erhalten werden. Tausende bis Millionen von Molekülen können daher in einer kurzen Zeitspanne abgesucht werden. Aktive Moleküle können als Modelle verwendet werden, um zusätzliche Moleküle zu entwickeln, die eine äquivalente oder erhöhte Aktivität besitzen. Solche Moleküle werden im Allgemeinen ein Molekulargewicht von 10.000, vorzugsweise weniger als 1.000 besitzen. Sie können von dreien ausgewählt werden, die aktiv für Calciumrezeptoren sind, wie von Nemeth et al., PCT/US94/12117 (WO 75/11221) beschrieben, welches hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0053] Die vorliegende Erfindung offenbart ebenfalls, dass Verbindungen, die in den vorstehend beschriebenen Verfahren zum Absuchen identifiziert werden, in einem Verfahren zum Modulierung der Aktivität eines metabotropen Glutamatrezeptors, der die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 besitzt, oder eines Teils oder eines funktionalen Äquivalents verwendet werden können, welches den Schritt des Inkontaktbringens des Rezeptors mit einer Verbindung, die eine oder mehrere Aktivitäten des metabotropen Glutamatrezeptors moduliert, im Allgemeinen entweder die Aktivierung oder die Hemmung der Aktivierung des Rezeptors, einschließt.

[0054] Der metabotrope Glutamatrezeptor wird mit einer ausreichenden Menge einer Verbindung in Kontakt gebracht, welche eine Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors moduliert. Die Modulation der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors ruft einen Anstieg oder eine Verminderung in einer zellulären Antwort hervor, die nach der Aktivierung des metabotropen Glutamatrezeptors erfolgt, wie in der nachfolgenden Ausführlichen Beschreibung beschrieben wird. Typischerweise imitiert die Verbindung entweder eine oder mehrere Wirkungen von Glutamat auf den metabotropen Glutamatrezeptor oder blockiert eine oder mehrere Wirkungen von Glutamat auf den metabotropen Glutamatrezeptor (oder möglicherweise beides). Dieses Verfahren kann in vitro oder in vivo durchgeführt werden.

[0055] Der Ausdruck "imitieren" bedeutet, dass die Verbindung eine ähnliche Wirkung hervorruft, wie in Antwort auf das Inkontaktbringen des Rezeptors mit Glutamat gezeigt wird. Der Ausdruck "blockieren" bedeutet, dass die Anwesenheit der Verbindung eine oder mehrere normale Wirkungen des Inkontaktbringens des Rezeptors mit Glutamat verhindert.

[0056] Im Kontext mit dieser Erfindung bedeutet "in vitro", dass ein Verfahren nicht innerhalb oder durch (eine) lebende Zelle(n) durchgeführt wird. Das Verfahren kann jedoch Zellmembranen und andere Zellanteile oder sogar vollständige, aber nicht lebendige Zellen verwenden. "In vivo" bedeutet, dass das Verfahren innerhalb oder durch (eine) lebende Zelle(n) durchgeführt wird und schließt daher Verfahren ein, die innerhalb oder durch komplexe Organismen wie z. B. Säuger durchgeführt werden.

[0057] Des weiteren beschreibt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Behandlung eines Patienten, der unter einer Erkrankung oder einer Bedingung leidet, die mit dem neuen mGluR der Erfindung in Zusammenhang steht oder die durch ihn und/oder durch die Modulation der Aktivität dieses mGluR beeinflusst werden kann. Im Allgemeinen beinhalten diese Verfahren das Verändern oder das Modulieren von einer oder von mehreren Aktivitäten des mGluR durch die Verabreichung einer Verbindung oder Zusammensetzung an den Patienten. Die Verfahren beinhalten das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer Verbindung, welche die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors moduliert, die Expression des Rezeptors hemmt oder funktionale Rezeptoren zur Verfügung stellt, an einen Patienten, der unter der Erkrankung, Bedingung oder Störung leidet. Solche Verbindungen können zum Beispiel kleine Moleküle sowie Polymere wie Nucleinsäuren einschließen. Eine Vielfalt von Erkrankungen oder Bedingungen kann behandelt werden, einschließlich einer neurologischen Erkrankung oder Störung, die vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt wird, bestehend aus neurodegenerativen Erkrankungen, Excitotoxizität von Glutamat, globaler und fokaler ischämischer und hämorrhagischer Schlaganfall, Schädeltrauma, Verletzung des Rückenmarks, durch Hypoxie induzierte Schädigung von Nervenzellen und Epilepsie. In bevorzugten Ausführungsformen ist die neurodegenerative Erkrankung die Alzheimersche Erkrankung, Parkinsonsche Erkrankung oder Huntingtonsche Erkrankung.

[0058] Die vorliegende Erfindung offenbart ebenfalls die Möglichkeit, Verbindungen, welche die Aktivität eines metabotropen Glutamatrezeptors modulieren, der die Sequenz SEQ ID Nr.: 1 besitzt, in einem Verfahren zur Behandlung zu verwenden, welches die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Verbindung, welche die Aktivität eines metabotropen Glutamatrezeptors moduliert (das heißt, ein Agens, das den metabotropen Glutamatrezeptor moduliert), der die Sequenz SEQ ID Nr.: 1 besitzt, an einen Patienten beinhaltet. (Daher kann das Agens ebenfalls die Aktivität von funktionalen Äquivalenten modulieren). Wie angezeigt, leidet der Patient in einer bevorzugten Ausführungsform unter einer neurologischen Erkrankung oder Störung. In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform besitzt die Verbindung eine Wirkung auf eine physiologische oder pathophysiologische Aktivität. Für die Veranschaulichung, nicht aber zur Einschränkung, können diese Krämpfe, den Schutz der neuronalen Zellen, den Tod neuronaler Zellen, die neuronale Entwicklung, die zentrale Kontrolle der Herzaktivität, das Aufwachen, die Kontrolle der Bewegungen und die Kontrolle des vestibulo-okulären Reflexes einschließen.

[0059] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls gemäß der Erfindung für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer neurologischen Erkrankung oder Störung ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus der Excitotoxizität von Glutamat, globalem und fokalem ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall, Schädeltrauma, Verletzung des Rückenmarks, durch Hypoxie induzierter Schädigung von Nervenzellen und Epilepsie oder neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. Alzheimersche Erkrankung, Parkinsonsche Erkrankung oder Huntingtonsche Erkrankung.

[0060] Die Nucleinsäure kann verabreicht werden, wobei Standardtechniken wie z. B. die Verwendung von retroviralen Vektoren und Liposomen verwendet werden.

[0061] In einem anderen verwandten Aspekt beinhaltet das Verfahren der Behandlung das Verabreichen ei-

ner therapeutisch wirksamen Menge einer Nucleinsäure, welche die Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors hemmt, vorzugsweise eines Rezeptors, der im Wesentlichen aus der Sequenz SEQ ID Nr.: 1 besteht, an einen Patienten.

[0062] Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Arzneimittel, das ein Nucleinsäuremolekül, das spezifisch die Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors hemmt, wobei der metabotrope Glutamatrezeptor mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 umfasst, wie in [Fig. 1](#) gezeigt wird, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst, sowie die Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls, das spezifisch die Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors hemmt, wobei der metabotrope Glutamatrezeptor mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 umfasst, wie in [Fig. 1](#) gezeigt wird, für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer neurologischen Erkrankung oder Störung, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Excitotoxizität von Glutamat, globalem und fokalem ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfall, Schädeltrauma, Verletzung des Rückenmarks, durch Hypoxie induzierter Schädigung von Nervenzellen, Epilepsie oder neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. die Alzheimersche Erkrankung, Parkinsonsche Erkrankung oder Huntingtonsche Erkrankung.

[0063] Nucleinsäuren, welche die Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors hemmen, schließen Antisense-Oligonucleotide, Ribozyme und Nucleinsäuren, die in der Lage sind, durch homologe Rekombination mit einem endogenen Gen, das den Rezeptor codiert, zu kombinieren, ein. Die Zielstellen für hemmende Nucleinsäuren schließen Promotoren, andere regulatorische Agenzien, die auf Promotoren wirken, mRNA, vorprozessierte mRNA und genomische DNA ein. Die Verabreichung kann durchgeführt werden, indem eine transgene Nucleinsäure, die das Agens codiert, zur Verfügung gestellt wird, oder durch jedes andere geeignete Verfahren, das von der Verwendung abhängig ist, auf welche das bestimmte Verfahren gerichtet ist. Vorzugsweise ist die Erkrankung oder die Störung, die durch die Verabreichung einer Nucleinsäure der vorangehenden Aspekte behandelt werden soll, durch einen oder durch mehrere der nachfolgenden Punkte gekennzeichnet: (1) einen abnormalen Spiegel eines Botenstoffs, dessen Herstellung oder Sekretion durch die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors beeinflusst wird und (2) einen abnormalen Spiegel oder eine abnormale Aktivität eines Botenstoffs, dessen Funktion durch die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors beeinflusst wird.

[0064] Ein Patient betrifft einen Säuger, bei dem die Modulation eines metabotropen Glutamatrezeptors eine günstige Wirkung haben wird. Patienten, die eine Behandlung benötigen, welche die Modulation von metabotropen Glutamatrezeptoren involvieren, können unter Verwendung von Standardtechniken, die dem im medizinischen Berufsfeld tätigen Fachmann bekannt sind, identifiziert werden. Vorzugsweise ist ein Patient ein Mensch, der eine Erkrankung oder eine Störung hat, die durch einen oder durch mehrere der nachfolgenden Punkte gekennzeichnet ist: (1) abnormale Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors; (2) abnormalen Spiegel eines Botenstoffs, dessen Herstellung oder Sekretion durch die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors beeinflusst wird und (3) abnormalen Spiegel oder abnormale Aktivität eines Botenstoffs, dessen Funktion durch die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors beeinflusst wird.

[0065] Der Begriff "therapeutisch wirksame Menge" bedeutet eine Menge eines Agens, die zu einem gewissen Ausmaß ein oder mehrere Symptome der Erkrankung oder der Störung in dem Patienten lindert oder die entweder teilweise oder vollständig einen oder mehrere physiologische oder biochemische Parameter, die mit der Erkrankung assoziiert oder für sie verantwortlich sind, auf einen normalen Wert zurückführt.

[0066] Mit Bezug auf einen metabotropen Glutamatrezeptor deutet "funktionsfähig" oder "funktional" darauf, dass der Rezeptor mindestens einige der biologisch relevanten Aktivitäten besitzt, die ein solcher Rezeptor unter normalen biologischen Bedingungen (normaler Rezeptor unter normalen zellulären Bedingungen) aufweist, und vorzugsweise im Wesentlichen jede dieser Aktivitäten besitzt. Diese können zum Beispiel spezifische Bindungseigenschaften und eine spezifische enzymatische Aktivität (unter anderen) einschließen.

[0067] Die vorliegende Erfindung beschreibt ebenfalls Agenzien (z. B. Verbindungen und Arzneimittel), die den metabotropen Glutamatrezeptor, der die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr.: 1 besitzt, oder einen Teil oder ein funktionales Äquivalent davon binden können. Vorzugsweise kann das Agens die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors modulieren.

[0068] Die vorliegende Erfindung beschreibt ebenfalls ein Arzneimittel, das aus einem Agens, das den metabotropen Glutamatrezeptor moduliert, und einem physiologisch verträglichen Träger aufgebaut ist. Solche Agenzien können verwendet werden, um Patienten durch das Modulieren der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors zu behandeln.

[0069] Ein pharmazeutisches Agens oder ein Arzneimittel betrifft ein Agens oder eine Zusammensetzung in einer Form, die geeignet für die Verabreichung an einen Säuger, vorzugsweise einen Menschen ist. Überlegungen, welche die Form betreffen, die für die Verabreichung geeignet ist, sind auf dem Fachgebiet bekannt und schließen toxische Wirkungen, die Löslichkeit, die Verabreichungsroute und den Erhalt der Aktivität ein. Pharmakologische Agenzen oder Zusammensetzungen, die in den Blutstrom injiziert werden, sollten zum Beispiel löslich sein. Arzneimittel können ebenfalls als pharmazeutisch verträgliche Salze (z. B. Säureadditionsalze) und Komplexe davon formuliert werden. Die Herstellung von solchen Salzen kann die pharmazeutische Verwendung eines Agens durch die Veränderung seiner physikalischen Eigenschaften erleichtern, ohne dass verhindert wird, dass eine physiologische Wirkung ausgeübt wird.

[0070] Ein anderer Aspekt der Erfindung stellt ein Bindungsagens für einen metabotropen Glutamatrezeptor zur Verfügung, das ein gereinigter Antikörper ist und das selektiv an ein Polypeptid bindet, das die Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 umfasst, die in SEQ ID Nr.: 1 gezeigt werden. Das Bindungsagens bindet vorzugsweise an vorgegebene Polypeptide. Dies bedeutet, dass unter den Bedingungen von begrenztem Agens und der gleichen Anzahl von zugänglichen Polypeptiden eine größere Anzahl (Fraktion) der vorgegebenen Polypeptide als die anderen Polypeptide das Agens binden wird.

[0071] In noch einer bevorzugten Ausführungsform ist das bindende Agens ein Antikörper, der an ein Toxin gekoppelt ist. Bindende Agenzen, die an ein Toxin gebunden sind, können verwendet werden, um das Toxin an eine Zelle abzugeben, die einen bestimmten Rezeptor enthält. Ein Antikörper, der an ein Toxin gekoppelt ist, das auf eine Krebszelle gerichtet ist, die durch einen abnormalen Rezeptor gekennzeichnet ist, kann selektiv die Krebszelle töten.

[0072] Antikörper, die metabotrope Glutamatrezeptoren binden können, besitzen verschiedene Verwendungen, wie z. B. die Verwendung als ein therapeutisches Agens zum Modulieren der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors, als diagnostische Werkzeuge zum Bestimmen der Anzahl und/oder des Orts und/oder der funktionalen Integrität des metabotropen Glutamatrezeptors zur Diagnose einer mit Glutamat assoziierten Erkrankung und als Werkzeuge der Forschung für die Untersuchung der Synthese, Struktur und Funktion des Rezeptors. Antikörper, die gezielt auf den metabotropen Glutamatrezeptor gerichtet sind, sind zum Beispiel nützlich, um aufzuklären, welcher Anteil des Rezeptors ein bestimmtes Molekül wie z. B. den natürlichen Liganden bindet.

[0073] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung oder Störung in einem Patienten, die durch eine normale Anzahl der neuen metabotropen Glutamatrezeptoren oder durch eine Veränderung des neuen metabotropen Glutamatrezeptors gekennzeichnet ist. Solche Veränderungen können zum Beispiel Veränderungen in der Sequenz, eine veränderte Aktivität und einen veränderten Ort einschließen. Das Verfahren beinhaltet die Identifizierung der Anzahl und/oder des Orts und/oder der funktionalen Integrität von einem oder von mehreren metabotropen Glutamatrezeptoren, die mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 umfassen, die in [Fig. 1](#) gezeigt werden. Die Anzahl und/oder der Ort und/oder die funktionale Integrität wird als eine Indikation des Vorliegens der Erkrankung oder der Störung mit denen verglichen, die in Patienten beobachtet werden, die als normal oder erkrankt gekennzeichnet sind.

[0074] Die Diagnosen können unter Verwendung von Agenzen, die den metabotropen Glutamatrezeptor binden, durchgeführt werden. Agenzen, die den metabotropen Glutamatrezeptor modulieren und binden an metabotrope Glutamatrezeptoren binden, und Antikörper, die an metabotrope Glutamatrezeptoren binden, können zum Beispiel für die Diagnose verwendet werden. Vorzugsweise werden die bindenden Agenzen mit einem nachweisbaren Teil wie z. B. einem Radioisotop, einem Enzym (z. B. alkalische Phosphatase), einer fluoreszierenden Markierung, einem schweren Atom oder mit anderen solchen Markierungen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, oder mit einem Marker, der an andere Moleküle bindet, die einen nachweisbaren Teil (z. B. Biotin/Avidin) besitzen, markiert.

[0075] Ein veränderter Rezeptor besitzt eine andere Struktur, als der Rezeptor in normalen Individuen besitzt, und ist mit einer Erkrankung oder einer Störung assoziiert, die einen metabotropen Glutamatrezeptor involviert. Solche Veränderungen können die Funktion des Rezeptors beeinflussen und sie können durch die Untersuchung nach strukturellen Unterschieden zwischen dem veränderten und dem normalen Rezeptor nachgewiesen werden. Die bindenden Agenzen, die an einen veränderten Rezeptor, nicht aber an einen normalen Rezeptor binden, können verwendet werden, um die Anwesenheit eines veränderten Rezeptors zu bestimmen. Zusätzlich kann ein bindendes Agens, das einen normalen Rezeptor, nicht aber einen besonderen, veränderten Rezeptor binden kann, verwendet werden, um die Anwesenheit des besonderen, veränderten Rezeptors

zu bestimmen.

[0076] Auf eine ähnliche Weise kann die Anzahl der Rezeptoren durch die Verwendung von Agenzien, welche den zu testenden Rezeptor binden, bestimmt werden. Solche Assays beinhalten im Allgemeinen ein markiertes bindendes Agens und sie können durchgeführt werden, wobei Standardformate wie z. B. kompetitive, nicht kompetitive, homogene und heterogene Assays verwendet werden.

[0077] In anderen bevorzugten Ausführungsformen ist das Verfahren ein Immunassay, in dem ein Antikörper für einen metabotropen Glutamatrezeptor verwendet wird, um die Anzahl und/oder den Ort und/oder die funktionale Integrität der metabotropen Glutamatrezeptoren zu identifizieren; die Anwesenheit einer Krebskrankung, z. B. eines ektopischen Tumors des zentralen Nervensystems oder des peripheren Nervensystems wird durch das Messen der Anzahl oder der Veränderung des metabotropen Glutamatrezeptors untersucht.

[0078] Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden durch die nachfolgende Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen davon und durch die Ansprüche offensichtlich werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0079] [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr.: 1) zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des neuen menschlichen mGluR8-Proteins, wobei die Ein-Buchstaben-Standardabkürzungen für Aminosäuren verwendet werden.

[0080] [Fig. 2](#) (SEQ ID Nr.: 2) zeigt die 5'- zu 3'-Nucleotidsequenz des codierenden Strangs der cDNA CCX-1, die einen offenen Leserahmen enthält, der das neue menschliche mGluR8-Protein (Nucleotide 1 bis 2724) codiert. Die Ein-Buchstaben-Standardabkürzungen G, A, T und C werden für die vier Desoxynucleotidtriphosphate verwendet.

[0081] [Fig. 3](#) (SEQ ID Nr.: 3) zeigt die 5'- zu 3'-Nucleotidteilsequenz des codierenden Strangs des PCR-Fragments FF6.175. Diese Nucleotidsequenz entspricht den Nucleotiden 2154 bis 2319 in der Nucleotidsequenz von CCX-1.

[0082] [Fig. 4](#) (SEQ ID Nr.: 4) zeigt die 5'- zu 3'-Nucleotidsequenz des codierenden Strangs des PCR-Fragments X120.15. Diese Nucleotidsequenz entspricht den Nucleotiden 2163 bis 2283 in der Nucleotidsequenz CCX-1 und den Nucleotiden 10 bis 130 in der Nucleotidsequenz FF6.175.

[0083] [Fig. 5](#) (SEQ ID Nr.: 5) zeigt die 5'- zu 3'-Nucleotidsequenz des offenen Leserahmens in der cDNA CCX-1 (SEQ ID Nr.: 2), Nucleotide 1 bis 2724. Diese Sequenz codiert die Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr.: 1).

[0084] [Fig. 6A](#) stellt die Entwicklungsstrategie der PCR-Primer für das Spleißvariantenexperiment dar, das in Beispiel 2 beschrieben wird. Die graphischen Darstellungen der Sequenzen des mGluR8 der Maus und des menschlichen mGluR8 werden für die Entwicklung der Primer verglichen, welche die mutmaßliche Region der Spleißvariante flankieren.

[0085] [Fig. 6B](#) zeigt die Ergebnisse des Spleißvariantenexperiments, das in Beispiel 2 beschrieben wird.

[0086] [Fig. 7](#) zeigt die Ergebnisse des funktionalen Aktivierungsexperiments, das in Beispiel 4 beschrieben wird.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

[0087] Die Clonierung der acht Unterarten des metabotropen Glutamatrezeptors der Ratte oder der Maus wurde in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Diese schließen ein: den mGluR1 der Ratte (Matsu et al., Nature 349: 760, 1991; Houamed et al., Science 252: 1318, 1991; Pin et al., Proc Natl Acad Sci 89: 10331, 1992), den mGluR2 der Ratte (Tanabe et al., Neuron 8: 169, 1992), den mGluR3 der Ratte (Tanabe et al., Neuron 8: 169, 1992), den mGluR4 der Ratte (Tanabe et al., Neuron 8: 169, 1992), den mGluR5 der Ratte (Abe et al., J Biol Chem 267: 13361, 1992), den mGluR6 der Ratte (Nakajima et al., J Biol Chem 268: 11868, 1993), den mGluR7 der Ratte (Okamoto et al., J Biol Chem 269: 1231, 1994; Saugstad et al., Mol Pharmacol 45: 367, 1994) und den mGluR8 der Maus (Duvoisin et al., J Neuroscience 15: 3075, 1995). Die Clonierung der Unterarten des menschlichen metabotropen Glutamatrezeptors mGluR1 (Lin et al., Soc Neurosci Abstr 20: 468, 1994), mGluR2 (Flor et al., Eur J Neurosci, in Druck; Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995), mGluR4 (Flor et al., Neuropharmacol 34: 149, 1994), mGluR5 (Minskami et al., Biochem Biophys Res Commun 199: 1136,

1994) und mGluR7 (Flor et al., Soc Neurosci Abstr 20: 468, 1994) wurde ebenfalls beschrieben.

[0088] Die internationale Patentanmeldung Nr.: PCT/US91/09422, eingereicht am 12. Dezember 1991, stellt G-Protein gekoppelte Glutamatrezeptoren zur Verfügung, die von Ratten isoliert und cloniert wurden. Die europäische Patentanmeldung Nr.: 93303520,6, eingereicht am 6. Mai, 1993, stellt einen menschlichen metabotropen Glutamatrezeptor und verwandte DNA-Verbindungen, welche die Anmelder als ein menschliches mGluR1 beschreiben, zur Verfügung. Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein neuer menschlicher metabotroper Glutamatrezeptor.

[0089] Der neue Rezeptor der vorliegenden Erfindung ist ein menschlicher metabotroper Glutamatrezeptor, der mit den metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe III verwandt ist, die mGluR4, mGluR6, mGluR7 und mGluR8 einschließt.

[0090] Der Anmelder ist der erste, der den neuen menschlichen metabotropen Glutamatrezeptor der vorliegenden Erfindung zeigt, sowie der erste, der die Nucleinsäuresequenz bestimmt.

[0091] Nachfolgend befindet sich eine Liste von einigen der Ausdrücke, die in der vorliegenden Offenbarung verwendet werden.

[0092] Der Ausdruck "schmerzlinderndes Mittel" bedeutet eine Verbindung, die in der Lage ist, Schmerzen durch die Veränderung der Empfindung von nozizeptiven Stimuli zu lindern, ohne dass eine Betäubung hervorgerufen wird, die zu dem Verlust des Bewusstseins führt.

[0093] Der Ausdruck "schmerzlindernde Aktivität" bedeutet die Fähigkeit, Schmerz in Antwort auf einen Stimulus zu vermindern, der normalerweise schmerhaft sein würde.

[0094] Der Ausdruck "krampflösende Aktivität" bedeutet die Wirksamkeit bei der Verminderung von Krämpfen wie z. B. von solchen, die durch einfach fokale Anfälle, komplexfokale Anfälle, den Status der Epilepsie und durch Trauma induzierte Anfälle wie von z. B. solchen, die nach einer Kopfverletzung erfolgen, einschließlich einer Kopfoperation.

[0095] Der Ausdruck "bindendes Agens" bedeutet ein Molekül wie z. B. ein kleines Molekül, einen Ligand, Antikörper oder ein Toxin, das/der an einen Rezeptor bindet und die Aktivität des Rezeptors modulieren kann oder nicht.

[0096] Der Ausdruck "Aktivität, die die Wahrnehmung erweitert" bedeutet die Fähigkeit, die Aneignung des Gedächtnisses oder die Ausübung einer erlernten Tätigkeit zu verbessern. "Aktivität, die die Wahrnehmung erweitert", bedeutet ebenfalls die Fähigkeit, Verfahren der normalen rationalen Überlegung und das logische Denken zu verbessern.

[0097] Der Ausdruck "Verstärker der Wahrnehmung" bedeutet eine Verbindung, die das Lernen und das Gedächtnis verbessern kann.

[0098] Der Ausdruck "Wirksamkeit" bedeutet, dass ein statistisch signifikantes Maß der gewünschten Aktivität mit einer ausgewählten Verbindung nachweisbar ist; der Ausdruck "signifikant" bedeutet eine statistische Signifikanz mit dem Wert von $p < 0,05$.

[0099] Der Ausdruck "gesteigerte Schmerzempfindlichkeit" bedeutet eine erhöhte Antwort auf einen Stimulus, der normalerweise schmerhaft ist.

[0100] Der Ausdruck "minimale Nebenwirkung" bedeutet, dass jede Nebenwirkung des Arzneistoffs von einem durchschnittlichen Individuum toleriert wird und dass der Arzneistoff daher für eine Therapie der Zielerkrankung oder -Störung verwendet werden kann. Solche Nebenwirkungen sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Vorzugsweise sind die minimalen Nebenwirkungen solche, die von der FDA als tolerierbar für die Zulassung des Arzneistoffs für eine Zielerkrankung oder -Störung angesehen werden.

[0101] Der Ausdruck "modulieren" bedeutet, dass eine Zunahme oder eine Abnahme bei der Aktivität eines zellulären Rezeptors hervorgerufen wird.

[0102] Der Ausdruck "Muskelrelaxans" bedeutet eine Verbindung, welche die Muskelspannung vermindert.

[0103] Der Ausdruck "Neuralgie" bedeutet Schmerzen im Ausbreitungsgebiet eines Nervs oder von Nerven.

[0104] Der Ausdruck "neurologische Störung oder Erkrankung" bedeutet eine Störung oder Erkrankung des Nervensystems. Beispiele von neurologischen Störungen oder Erkrankungen schließen den globalen und fokalen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall, Schädeltrauma, Verletzung des Rückenmarks, durch Hypoxie induzierte Schädigung von Nervenzellen wie bei einem Herzstillstand oder einer fröcklichen Notlage, Epilepsie und neurodegenerative Erkrankungen ein.

[0105] Der Ausdruck "neurodegenerative Erkrankung" bedeutet eine neurologische Erkrankung, welche die Zellen des zentralen Nervensystems betrifft und zu der progressiven Abnahme der Fähigkeit von Zellen des Nervensystems führt, auf eine richtige Weise zu funktionieren. Beispiele für neurodegenerative Erkrankungen schließen die Alzheimersche Erkrankung, Huntingtonsche Erkrankung und Parkinsonsche Erkrankung ein.

[0106] Der Ausdruck "schützende Aktivität für Neurone" bedeutet die Wirksamkeit bei der Verhinderung des neuronalen Zelltods, wie er z. B. durch neurologische Störungen oder Erkrankungen hervorgerufen wird.

[0107] Der Ausdruck "potent" bedeutet, dass die Verbindung einen EC_{50} -Wert (Konzentration, welche die halbe maximale Aktivierung hervorruft) oder einen IC_{50} -Wert (Konzentration, welche die halbe maximale Hemmung hervorruft) oder einen K_d -Wert (Konzentration, welche die halbe maximale Bindung hervorruft) für einen metabotropen Glutamatrezeptor von weniger als 10 μM , stärker bevorzugt weniger als 100 nM und noch stärker bevorzugt weniger als 1 mM besitzt, wobei Bezug auf eine oder auf mehrere Aktivitäten des Rezeptors genommen wird.

[0108] Der Ausdruck "selektiv" bedeutet, dass eine Verbindung eine gegebene Unterart eines metabotropen Glutamatrezeptors bei einer niedrigeren Konzentration aktiviert, die Aktivierung hemmt und/oder bindet, als bei der Konzentration, bei der die Verbindung einen ionotropen Glutamatrezeptor aktiviert, die Aktivierung hemmt und/oder bindet, oder stärker bevorzugt eine andere Unterart des metabotropen Glutamatrezeptors von einer anderen Klassifizierungsgruppe oder noch stärker bevorzugt eine andere Unterart des metabotropen Glutamatrezeptors der gleichen Klassifizierungsgruppe. Vorzugsweise beträgt der Unterschied der Konzentration 10-fach, stärker bevorzugt, 50-fach und noch stärker bevorzugt 100-fach.

[0109] Der Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge" bedeutet eine Menge einer Verbindung, welche die gewünschte therapeutische Wirkung in einem Patienten hervorruft. Mit Bezug auf eine Erkrankung oder Störung ist es zum Beispiel die Menge, die zu einem gewissen Maß ein oder mehrere Symptome der Erkrankung oder Störung vermindert und entweder teilweise oder vollständig auf normale physiologische oder biochemische Parameter zurückführt, die mit der Erkrankung oder Störung assoziiert sind oder diese hervorrufen. Wenn die Verbindung für die therapeutische Behandlung eines Patienten verwendet wird, wird eine Menge erwartet, die zwischen 0,1 mg/kg bis zu 100 mg/kg liegt, vorzugsweise weniger als 50 mg/kg, stärker bevorzugt weniger als 10 mg/kg, stärker bevorzugt weniger als 1 mg/kg. Vorzugsweise stellt die Menge eine wirksame Konzentration bei einem metabotropen Glutamatrezeptor von etwa 1 nM bis 1 μM der Verbindung zur Verfügung. Die Menge der Verbindung ist abhängig von ihrem EC_{50} (IC_{50} in dem Fall eines Antagonisten) und von dem Alter, der Größe und der Erkrankung, die bei dem Patienten vorliegt.

I. TECHNIKEN

A. Nucleinsäuresequenz eines neuen mGluR

[0110] Die Erfindung betrifft Nucleinsäuresequenzen, die metabotrope Glutamatrezeptoren und Rezeptorfragmente codieren, wie hierin vorstehend definiert wird.

[0111] Die Nucleinsäuresequenzen können so aufgebaut werden, dass sie die Expression der Rezeptorsequenzen in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen ermöglichen. Die gesamte codierende Sequenz oder ein Fragment davon kann zum Beispiel mit einem oder mit mehreren des Nachfolgenden in einem geeigneten Expressionsvektor kombiniert werden, um eine solche Expression zu ermöglichen: (1) eine exogene Promotorsequenz, (2) eine Ribosomenbindungsstelle, (3) ein Polyadenylierungssignal, (4) ein Sekretionssignal. Eine Modifikation kann in den nichttranslatierten 5'-Sequenzen durchgeführt werden, um die Expression in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle zu verbessern; oder Codons können so modifiziert werden, dass das Codon ein bevorzugtes Codon in dem gewählten Expressionssystem ist, während es eine identische Aminosäure codiert. Die Verwendung von solchen bevorzugten Codons wird zum Beispiel in Grantham et al., Nuc Acid Res 9: 43-74 (1981) und Lathe, J Mol Biol 183: 1-12 (1985) beschrieben, welches hiermit durch

Bezugnahme hierin in seiner Gesamtheit aufgenommen wird. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Nucleinsäuresequenz die von SEQ ID Nr.: 2, die einen neuen menschlichen metabotropen Glutamatrezeptor codiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Nucleinsäuresequenz die von SEQ ID Nr.: 5.

[0112] Zusätzlich stellt eine Nucleinsäuresequenz, die einen bestimmten Rezeptor codiert, ein zusätzliches Werkzeug zur Verfügung, um andere verwandte Rezeptoren zu erhalten, zum Beispiel dadurch, dass Nucleinsäuresonden für einen Hybridisierungssassay zur Verfügung gestellt werden. Des Weiteren können Nucleinsäuresequenzen, die zwei oder mehrere unterschiedliche, aber verwandte Rezeptoren codieren, analysiert werden, um die örtlich begrenzten Regionen der Sequenzkonservierung zu bestimmen. Diese konservierten Regionen der Nucleinsäuren sind als Hybridisierungssonden nützlich oder stehen in einer anderen Ausführungsform für die Entwicklung und Synthese von Hybridisierungssonden zur Verfügung, die verwendet werden können, um clonierte Nucleinsäuren zu erhalten, die andere Mitglieder einer Rezeptor-Superfamilie codieren. Konservierte Sequenzen können von einer Analyse der vollständigen Nucleinsäuresequenz von SEQ ID Nr.: 2 und dem Vergleich dieser Sequenz mit den Nucleotidsequenzen, welche die anderen mGluR codieren, abgeleitet werden.

[0113] "Konservierte Regionen der Nucleinsäuren" betreffen Regionen innerhalb von zwei oder mehreren Nucleinsäuren, die metabotrope Glutamatrezeptoren codieren, an die eine bestimmte komplementäre Nucleinsäure unter niedrig stringenten Bedingungen hybridisieren kann. Beispiele von niedriger stringenten Bedingungen, die für das Absuchen nach Nucleinsäuren geeignet sind, welche die metabotropen Glutamatrezeptoren codieren, werden in den nachfolgenden Beispielen und in Abe et al., J Biol Chem 19: 13361 (1996) (welches hiermit durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird) zur Verfügung gestellt. Vorzugsweise unterscheiden sich die konservierten Regionen der Nucleinsäuren durch nicht mehr als 7 von 20 Nucleotiden.

[0114] Die Verwendungen von Nucleinsäuren, welche die clonierten Rezeptoren oder Rezeptorfragmente codieren, schließen einen oder mehrere der nachfolgenden Punkte ein: (1) das Herstellen von Rezeptorproteinen, die zum Beispiel für die Bestimmung der Struktur, zur Analyse der Aktivität eines Moleküls auf einen Rezeptor und zum Erhalten von Antikörpern, die den Rezeptor binden, verwendet werden können; (2) das Sequenzieren zur Bestimmung der Nucleotidsequenz eines Rezeptors, die zum Beispiel als eine Grundlage für den Vergleich mit anderen Rezeptoren zur Bestimmung der konservierten Regionen, zur Bestimmung einzigartiger Nucleotidsequenzen für normale und veränderte Rezeptoren und zur Bestimmung der Nucleotidsequenzen zur Verwendung als Zielstellen für Antisense-Nucleinsäuren, Ribozyme, Nachweissonden für die Hybridisierung oder Primer für die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet werden kann; (3) als Nachweissonden der Hybridisierung für den Nachweis der Anwesenheit eines nativen Rezeptors und/oder eines verwandten Rezeptors in einer Probe; und (4) als PCR-Primer zur Erzeugung bestimmter Regionen von Nucleinsäuresequenzen zum Beispiel für die Erzeugung von Regionen, die mittels Nachweissonden der Hybridisierung getestet werden können.

[0115] Im Allgemeinen besitzen die Nucleinsäuremoleküle dieser Erfindung Nucleinsäuresequenzen, die metabotrope Glutamatrezeptoren in vollständiger Länge, Fragmente von metabotropen Glutamatrezeptoren, Derivate von metabotropen Glutamatrezeptoren vollständiger Länge und Derivate von Fragmenten von metabotropen Glutamatrezeptoren codieren, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind. Diese schließen Nucleinsäuresequenzen ein, welche die Sequenzen umfassen, die in SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 5 zur Verfügung gestellt werden, oder Nucleinsäuresequenzen, welche die Proteinsequenz codieren, die in SEQ ID Nr.: 1 zur Verfügung gestellt wird, oder ihre komplementären Strände. Die Nucleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung können ebenfalls verwendet werden, um Nucleinsäuresequenzen, die unter stringenten Bedingungen an die Nucleinsäuresequenzen SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 5 oder an Fragmente davon hybridisieren, und Nucleinsäuresequenzen zu isolieren, die abgesehen von der Degenerierung des genetischen Codes an die Nucleinsäuresequenzen SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 5 hybridisieren würden.

[0116] Vorteile von Nucleinsäuren mit einer größeren Länge schließen die Herstellung von Proteinfragmenten mit einer größeren Länge, welche die Sequenz eines metabotropen Glutamatrezeptors haben und verwendet werden können, um zum Beispiel Antikörper herzustellen; die erhöhte Spezifität der Nucleinsäuresonde unter höheren stringenten Bedingungen des Hybridisierungssassays und eine höhere Spezifität für Nucleinsäuren von verwandten metabotropen Glutamatrezeptoren unter Hybridisierungsbedingungen mit einer niedrigeren Stringenz ein.

[0117] Für die vorstehend erwähnten Zwecke kann ein Nucleinsäuremolekül verwendet werden, das z. B. eine Region einer Nucleinsäuresequenz von mindestens 15, 25, 35 oder vorzugsweise 55 zusammenhängen-

den Nucleotiden umfasst, die im Wesentlichen komplementär zu einer Sequenzregion in SEQ ID Nr.: 5 ist. Es ist vorteilhaft, wenn in der Region der Nucleinsäuresequenz mindestens drei, neun, 15 oder stärker bevorzugt mindestens 25 zusammenhängende Nucleotide der Nucleinsäuresequenzen eingeschlossen sind, die durch die Nucleotide 2678 bis 2724 der SEQ ID Nr.: 5 zur Verfügung gestellt werden.

[0118] In ähnlicher Weise betrifft die vorliegende Erfindung eine Nucleinsäure, die einen metabotropen Glutamatrezeptor oder ein Fragment davon codiert, der/das eine Nucleinsäuresequenz umfasst, die mindestens 6, vorzugsweise mindestens 12, 18, 30 oder 54 zusammenhängende Aminosäuren oder in bestimmten Ausführungsformen noch stärker bevorzugt mindestens neun oder 15 zusammenhängende Aminosäuren codiert, die durch die Reste 894 bis 908 der SEQ ID Nr.: 1 zur Verfügung gestellt werden. In anderen Ausführungsformen codiert die Nucleinsäure zusätzlich eine Aminosäuresequenz, welche die Reste 1 bis 893 der SEQ ID Nr.: 1 umfasst, oder die Nucleinsäure codiert des weiteren eine Aminosäuresequenz, die zu der 15 Aminosäuren großen Sequenz an dem carboxyterminalen Ende des mGluR8 der Maus homolog ist.

[0119] Des weiteren kann die Nucleinsäure komplementär zu der Nucleinsäuresequenz sein, die entweder die extrazelluläre Bindungsdomäne oder die transmembrane Domäne codiert.

[0120] Die Nucleinsäure, die solche Domänen codiert, kann transkriptionell an eine zweite Nucleinsäuresequenz von einem nicht-metabotropen Glutamatrezeptorprotein gekoppelt sein. Die Nucleinsäuresequenz, die von dem neuen, hierin offenbarten Rezeptor abgeleitet ist, und die extrazelluläre Domäne codiert, kann transkriptionell an eine zweite Nucleinsäure, welche die transmembrane und intrazelluläre codierende Domäne eines nicht-metabotropen Glutamatrezeptors codiert, gekoppelt sein oder eine extrazelluläre Bindungsdomäne kann transkriptionell an eine zweite Nucleinsäure, welche die transmembrane und intrazelluläre codierende Domäne eines metabotropen Glutamatrezeptors codiert, der ein Mitglied einer anderen Klasse oder Unterklasse der mGluRs ist als der Rezeptor, der die Sequenz SEQ ID Nr.: 1 besitzt, gekoppelt sein. Solche Nucleinsäuren, welche die Rezeptorfragmente und die chimären Rezeptoren codieren, werden zum Beispiel in der schweibenden Anmeldung U.S.S.N. 60/001,526 beschrieben, welche hiermit durch Bezugnahme hierin in seiner Gesamtheit aufgenommen wird. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes können verschiedene Kombinationen von Nucleotiden das gleiche Polypeptid codieren. Zahlreiche metabotrope Glutamatrezeptoren und Rezeptorfragmente, welche die gleichen Aminosäuresequenzen besitzen, können daher von unterschiedlichen Nucleinsäuresequenzen codiert werden.

I. CLONIERUNG UNTER VERWENDUNG VON HYBRIDISIERUNGSSONDEN UND PRIMERN

[0121] Das zur Zeit bevorzugte Verfahren für die Isolation von mGluR-Nucleinsäuren basiert auf dem Absuchen durch Hybridisierung. Primer oder Sonden, die für eine Region spezifisch sind und die von einer Nucleinsäure abgeleitet werden, die einen metabotropen Glutamatrezeptor codieren, wie z. B. die Nucleinsäuresequenz SEQ ID Nr.: 2, oder von einer Nucleinsäure abgeleitet werden, welche die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr.: 1 codiert, können für den Start einer DNA-Synthese und einer Amplifikation mittels PCR sowie für eine Identifizierung von bakteriellen Kolonien oder Phagenplaques, welche die clonierte DNA enthalten, die ein Mitglied der mGluR-Familie codiert, unter Verwendung von bekannten Verfahren (z. B. Innis et al., PCR Protocols, Academic Press, San Diego, Ka (1990); Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) verwendet werden.

A. CLONIERUNG DURCH PCR

[0122] Die Spezifität einer Hybridisierung von Primern an eine Ziel-Nucleinsäure, die ein mGluR codiert, kann durch die Veränderung der Hybridisierungsbedingungen eingestellt werden. Wenn die Hybridisierung unter Bedingungen mit einer höheren Stringenz von 50–60°C durchgeführt wird, werden Sequenzen amplifiziert, die mehr als etwa 76% homolog zu den Primern sind. Wenn Bedingungen mit einer niedrigeren Stringenz verwendet werden, indem die Hybridisierung bei 35–37°C durchgeführt wird, werden Sequenzen amplifiziert, die mehr als etwa 40–50% homolog zu den Primern sind.

[0123] Die Analyse von metabotropen Glutamatrezeptoren deutet darauf, dass sie G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind, die sieben konservierte, mutmaßliche transmembrane Domänen besitzen. Ein besonders nützlicher Ansatz ist die Verwendung von degenerierten Primern, die homolog zu den konservierten, mutmaßlichen transmembranen Domänen sind, und die Amplifikation von DNA-Regionen, die diese Sequenzen codieren, unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR). Solche Oligonukleotid-Primer werden daher mit genetischer DNA oder mit cDNA, die aus RNA hergestellt wurde, die aus dem Gewebe der Wahl isoliert wurde, gemischt und die PCR wird durchgeführt. Einiges Experimentieren kann erforderlich sein, um neue G-Protein

gekoppelte Rezeptorsequenzen aus dem Gewebe der Wahl spezifisch zu amplifizieren, weil diese nicht notwendigerweise zu den bereits bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren identisch sein müssen, aber dieses ist für den Fachmann selbstverständlich (vergl. zum Beispiel Buck L und Axel R (1991) Cell 65: 175-187).

B. SONDEN DES HYBRIDISIERUNGSSASSAYS

[0124] Sonden für einen Hybridisierungsassay können auf der Grundlage von Sequenzinformationen entwickelt werden, die von clonierten mGluRs und von Aminosäuresequenzen erhalten werden, die solche Rezeptoren wie z. B. den neuen mGluR codieren, welcher der Gegenstand dieser Erfindung ist. Die Sonden des Hybridisierungsassays können entwickelt werden, um die Anwesenheit der Zielsequenz einer bestimmten Nucleinsäure, die vollständig komplementär zu der Sonde ist, und von Zielsequenzen mit einer geringeren Komplementarität durch die Veränderung der Hybridisierungsbedingungen und der Entwicklung der Sonde nachzuweisen.

[0125] Die DNA-Sonden, die auf metabotrope Glutamatrezeptoren gerichtet sind, können entwickelt und unter verschiedenen Hybridisierungsbedingungen verwendet werden, um das Ausmaß der Spezifität zu kontrollieren, das für die Hybridisierung an eine Zielsequenz benötigt wird. Faktoren, welche die Entwicklung der Sonde betreffen, wie z. B. die Länge, der G- und C-Gehalt, mögliche Komplementarität zu sich selbst und Waschbedingungen sind auf dem Fachgebiet bekannt (vergl. zum Beispiel Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Habor Laboratory Press (1989), welches hiermit durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird.). Sambrook et al., Molecular Cloning diskutieren ebenfalls die Entwicklung und die Verwendung von degenerierten Sonden auf der Grundlage der Sequenzinformation von Polypeptiden.

[0126] Als eine allgemeine Richtlinie können hochstringente Bedingungen (Hybridisierung bei 50–65°C, 5 × SSPC, 50% Formamid, Waschen bei 50–65°C, 0,5 × SSPC) verwendet werden, um eine Hybridisierung zwischen Nucleinsäuresequenzen zu erhalten, die Regionen besitzen, die mehr als 90% komplementär sind. Bedingungen mit einer niedrigen Stringenz (Hybridisierung bei 35–37°C, 5 × SSPC, 40–45% Formamid, Waschen bei 42°C, 2 × SSPC) können verwendet werden, so dass Sequenzen an die Sonde hybridisieren, die Regionen besitzen, die zu mehr als 35–45% komplementär sind.

[0127] Viele Gewebearten oder Zellen können als eine Quelle für genomische DNA verwendet werden, zum Beispiel einschließlich Plazenta oder Leukocyten des peripheren Bluts. Mit Bezug auf RNA ist die am stärksten bevorzugte Quelle jedoch ein Gewebe oder ein Zelltyp, der erhöhte Mengen des gewünschten Mitglieds der metabotropen Glutamatrezeptorfamilie exprimiert.

B. NEUE DERIVATE VON NUCLEINSÄUREN VON METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTOREN

[0128] Die isolierten Nucleinsäuresequenzen der Erfindung können ebenfalls für die Erzeugung von modifizierten Nucleinsäuren mit einem praktischen Nutzen verwendet werden. Die Nucleinsäuresequenz kann in vitro oder in vivo mutiert werden, zum Beispiel (1) für die Erzeugung von Variationen in den codierenden Regionen, wodurch Varianten oder Derivate des metabotropen Glutamatrezeptors erzeugt werden; (2) für die Bildung neuer Restriktionsstellen für Endonukleasen oder für die Zerstörung von zuvor existierenden Restriktionsstellen zur Erleichterung von weiteren in-vitro-Modifikationen oder (3) für die Bildung neuer Spleißstellen zur Erzeugung von mGluR-Spleißvarianten. Es können Standardtechniken der Rekombination für die Mutagenese wie z. B. die ortsgerichtete in-vitro-Mutagenese (Hutchinson et al., J Biol Chem 253: 6551 (1978); Sambrook et al., Kapitel 15, vorstehend), die Verwendung von TAB®-Linker (Pharmacia) und die PCR-gerichtete Mutagenese verwendet werden, um solche Mutationen zu erzeugen. Zusätzlich können Nucleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung hergestellt und mit Nucleinsäuren rekombiniert werden, die andere Rezeptoren codieren, um Nucleinsäuren zu bilden, die chimäre Rezeptoren codieren. Solche Nucleinsäuren, die chimäre Rezeptoren codieren, werden zum Beispiel in der schwebenden Anmeldung U.S.S.N. 60/001.526 beschrieben, die hiermit durch Bezugnahme hierin in ihrer Gesamtheit aufgenommen wird.

[0129] Bevorzugte Rezeptorfragmente schließen solche ein, die eine funktionale Rezeptoraktivität, eine Bindungsstelle, ein Epitop für die Antikörpererkennung (typischerweise mindestens sechs Aminosäuren) und/oder eine Stelle, an der ein Agonist oder Antagonist des metabotropen Glutamatrezeptors bindet, besitzen. Andere bevorzugte Rezeptorfragmente schließen solche ein, die nur einen extrazellulären Anteil, einen transmembranen Anteil, einen intrazellulären Anteil und/oder einen multiplen transmembranen Anteil (z. B. einen Anteil sieben Transmembranbereichen) besitzen. Solche Rezeptorfragmente besitzen unterschiedliche Verwendungen, wie z. B. die Verwendung zum Erhalten von Antikörpern gegen eine bestimmte Region und die Verwendung zum Bilden von chimären Rezeptoren mit Fragmenten von anderen Rezeptoren, um einen neuen Rezeptor zu

erzeugen, der einzigartige Eigenschaften besitzt. Solche gereinigten Rezeptorfragmente und chimären Rezeptoren werden zum Beispiel in der schwebenden Anmeldung U.S.S.N. 60/001.526 beschrieben, die hiermit durch Bezugnahme hierin in ihrer Gesamtheit aufgenommen wird. Die Erfindung beschreibt daher ebenfalls die Möglichkeit, Derivate von metabotropen Glutamatrezeptoren vollständiger Länge und von Fragmenten davon herzustellen, welche die gleiche oder im Wesentlichen die gleiche Aktivität besitzen wie der metabotrope Glutamatrezeptorvorgänger vollständiger Länge oder das Fragment. Solche Derivate schließen Aminosäurezusatz/-zusätze, -Substitution(en) und -Deletion(en) in dem Rezeptor ein, die den Derivatrezeptor nicht davon abhalten, eine oder mehrere der Aktivitäten des Elternrezeptor auszuüben. Funktionale Äquivalente des metabotropen Glutamatrezeptorproteins schließen solche Derivate ein, sind aber nicht darauf begrenzt.

C. ANTISENSE-OLIGONUCLEOTIDE UND RIBOZYME

[0130] Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme können auf eine Nucleinsäure gerichtet sein, die einen metabotropen Glutamatrezeptor codiert, und können die Proteinexpression der Zielnucleinsäure hemmen. Zahlreiche Mechanismen wurden vorgeschlagen, um die Wirkungen von Antisense-Nucleinsäuren zu erklären. Vergl. zum Beispiel Helene C und Toulme J, Biochimica et Biophysica Acta 1049-99 (1990) und Uhlmann E und Peyman A, Chemical Reviews 90: 543 (1990). Die vorgeschlagenen Mechanismen schließen die Hybridisierung eines Antisense-Oligonucleotids an eine im Entstehen begriffene mRNA, was eine vorzeitige Terminierung der Transkription hervorruft, und das Eingreifen in die Prozessierung der mRNA durch die Hybridisierung an eine Intron/Exon-Verbindungsstelle der prä-mRNA ein. Diese und andere vorgeschlagene Mechanismen für die Inhibition der Aktivität der Nucleinsäure durch ein Antisense-Oligonucleotid basieren auf der Fähigkeit einer Antisense-Nucleinsäure, an eine Zielsequenz der Nucleinsäure zu hybridisieren. Vorzugsweise besitzen die Antisense-Nucleinsäuren 15 Basen in der Länge.

[0131] Ribozyme sind enzymatische RNA-Moleküle, die in der Lage sind, die spezifische Spaltung der RNA zu katalysieren. Die Wirkung von Ribozymen beinhaltet die sequenzspezifische Interaktion des Ribozys mit der komplementären Ziel-RNA, gefolgt von einer endonukleolytischen Spaltung. Verschiedene durch Ribozyme gespaltene Motive wie z. B. der Hammerkopf können hergestellt werden, um spezifisch und wirksam die endonukleolytische Spaltung von spezifischen RNA-Sequenzen zu katalysieren, die metabotrope Glutamatrezeptoren codieren.

[0132] Spezifische Spaltungsstellen der Ribozyme schließen GUA, GUU und GUC ein. Wenn eine Spaltungsstelle identifiziert wurde, können kurze RNA-Sequenzen von zwischen 15 und 20 Ribonucleotiden, welche auf die Region der Ziel-RNA gerichtet sind, welche die Spaltungsstelle enthält, hinsichtlich vorhergesagter struktureller Merkmale beurteilt werden, um die Eignung des Ribozys zu bestimmen. Die Eignung der zur Auswahl stehenden Ziele kann ebenfalls durch das Testen ihrer Zugänglichkeit für eine Hybridisierung mit komplementären Oligonucleotiden beurteilt werden, wobei Ribonucleaseschutz-Assays verwendet werden. Vergl. Draper PCT WO 93/23569, welches hiermit durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird.

[0133] Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme können durch Verfahren hergestellt werden, die auf dem Fachgebiet für die Synthese von RNA- und DNA-Molekülen bekannt sind. Standardtechniken für die chemische Synthese von Nucleinsäuren schließen die chemische Phosphoramidit-Festphasensynthese ein. Spezifische Nucleinsäuren können ebenfalls enzymatisch hergestellt werden, wobei ein Wirt verwendet wird, der mit einem Plasmid transformiert ist, das die gewünschte Nucleinsäure codiert.

[0134] Verschiedene Modifikationen der Nucleinsäure können eingeführt werden, um die intrazelluläre Stabilität und die Halbwertszeit zu erhöhen. Mögliche Modifikationen schließen die Modifikationen des Rückgrats aus Phosphodiester wie z. B. die Verwendung von Phosphorthioat- oder Methylphosphonat-Bindungen ein.

[0135] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme auf eine Nucleinsäure gerichtet, die eine Aminosäuresequenz SEQ ID Nr.: 1 codiert. Stärker bevorzugt sind Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme, die gezielt auf ein Nucleinsäurefragment von SEQ ID Nr.: 2 gerichtet sind.

D. GEN- UND OLIGONUCLEOTIDTHERAPIE

[0136] Eine Gen- und Oligonucleotidtherapie schließen die Verwendung einer Nucleinsäure, die einen funktionsfähigen metabotropen Glutamatrezeptor codiert, und die Verwendung von hemmenden Oligonucleotiden ein. Hemmende Oligonucleotide schließen Antisense-Nucleinsäuren und Ribozyme ein. Eine Gen- und Oligonucleotidtherapie kann ex vivo an Zellen durchgeführt werden, die anschließend in einen Patienten transplan-

tiert werden, oder sie kann durch eine direkte Verabreichung der Nucleinsäure oder des Nucleinsäure-Protein-Komplexes an den Patienten durchgeführt werden.

[0137] Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme können einem Patienten unter Verwendung von verschiedenen Techniken wie z. B. durch nackte Nucleinsäuren, Nucleinsäurezusammensetzungen (zum Beispiel eingeschlossen durch ein Liposom) und durch retrovirale Vektoren verabreicht werden. Miller, Nature 357: 455-460, welches hiermit durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird. Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme können ebenfalls in eine Zelle eingeführt werden, wobei eine Nucleinsäure verwendet wird, die die Antisense-Nucleinsäure oder das Ribozym codiert.

[0138] Die Gentherapie kann durch das Transferieren eines Gens, das einen Rezeptor, vorzugsweise einen metabotropen Glutamatrezeptor codiert, in einen Patienten auf eine Weise, welche die Expression des Rezeptorproteins ermöglicht, erreicht werden. Rekombinante Nucleinsäuremoleküle, die Rezeptorproteinsequenzen codieren, können in eine Zelle in vivo oder ex vivo eingeführt werden. In-vivo-Transfektionstechniken schließen die Verwendung von Liposomen und von retroviralen Vektoren ein. Miller, Nature 357: 455-460, welches hiermit durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird. Eine ex-vivo-Transfektion erhöht die Anzahl der verfügbaren Transfektionstechniken, fügt aber zusätzliche Komplikationen aufgrund der Entfernung und der nachfolgenden Insertion von Zellen in einen Patienten zu.

[0139] In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist die Nucleinsäure, die für die Gentherapie verwendet wird, eine, die SEQ ID Nr.: 1 codiert, stärker bevorzugt SEQ ID Nr.: 2, oder ein Anteil davon, wie hierin vorstehend definiert wird, und/oder die Oligonucleotide, die für die Oligonucleotidtherapie verwendet werden, sind auf eine Nucleinsäure gerichtet, die SEQ ID Nr.: 1, stärker bevorzugt SEQ ID Nr.: 2, codiert.

E. TRANSFIZIERTE ZELLINNEN

[0140] Eine Nucleinsäure, die einen funktionalen metabotropen Glutamatrezeptor exprimiert, kann verwendet werden, um transfizierte Zelllinien zu erzeugen, die einen spezifischen metabotropen Glutamatrezeptor funktionell exprimieren. Solche Zelllinien haben eine Vielfalt von Verwendungen wie z. B. die Verwendung für ein Screening nach Molekülen mit hohem Durchsatz, die in der Lage sind, die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors zu modulieren, und die Verwendung für die Untersuchung der Bindung an einen metabotropen Glutamatrezeptor und für die Verwendung zur Herstellung von Peptiden des metabotropen Glutamatrezeptors.

[0141] Eine Vielfalt von Zelllinien ist in der Lage, exogen exprimierte Rezeptoren mit endogenen funktionalen Antworten zu koppeln. Eine Anzahl dieser Zelllinien (z. B. NIH-3T3, HeLa, NG115, CHO, HEK 293 und COS7) kann getestet werden, um zu bestätigen, dass ihnen ein endogener metabotroper Glutamatrezeptor fehlt. Solche Zelllinien, denen eine Antwort auf externes Glutamat fehlt, können verwendet werden, um stabil transfizierte Zelllinien zu etablieren, die den clonierten metabotropen Glutamatrezeptor exprimieren.

[0142] Die Herstellung dieser stabilen Transfektanten wird durch die Transfektion einer geeigneten Zelllinie mit einem eukaryontischen Expressionsvektor wie z. B. pCEP4 erreicht, in den die codierende Sequenz der cDNA des metabotropen Glutamatrezeptors in die multiple Clonierungsstelle clonierte wurde. Die Expressionsvektoren enthalten eine Promotorregion wie z. B. den Promotor des menschlichen Cytomegalievirus (CMV), welche die Transkription der cDNAs in einer Vielfalt von Säugerzellen auf hoher Ebene antreibt. Zusätzlich enthalten diese Vektoren Gene für die Selektion von Zellen, die stabil die cDNA des Interesses exprimieren. Die selektierbare Markierung in dem pCEP4-Vektor codiert ein Enzym, das eine Resistenz gegen Hygromycin überträgt, ein metabolischer Inhibitor, der zu der Kultur zugegeben wird, um nicht-transfizierte Zellen zu töten. Eine Vielfalt von Expressionsvektoren und Selektionsschemata werden im Allgemeinen beurteilt, um die optimalen Bedingungen für die Herstellung von Zelllinien, welche den metabotropen Rezeptor exprimieren, für die Verwendung in einem Screening-Assay mit hohem Durchsatz zu bestimmen.

[0143] Das wirksamste Verfahren für die Transfektion von eukaryontischen Zelllinien mit Plasmid-DNA variiert mit dem gegebenen Zelltyp. Das Expressionskonstrukt des metabotropen Glutamatrezeptors wird in die kultivierten Zellen durch die geeignete Technik eingeführt, entweder durch eine Calcium-Phosphat-Präzipitation, eine DEAE-Dextran-Transfektion, eine Lipofektion oder eine Elektroporation.

[0144] Zellen, welche die transfizierte DNA stabil eingebaut haben, werden durch ihre Resistenz gegenüber dem Selektionsmedium identifiziert, wie vorstehend beschrieben wird, und clonale Zelllinien werden durch die Expansion der widerstandsfähigen Kolonien hergestellt. Die Expression der cDNA des metabotropen Glutamatrezeptors durch diese Zelllinien wird durch eine Lösungshybridisierung und Northern-Blot-Analyse bewer-

tet werden. Die funktionale Expression des Rezeptorproteins wird durch das Messen der Inhibition der Aktivität der Adenylylatcyclase und die nachfolgende Verminderung bei der Akkumulation von cAMP als Antwort auf extern angewendete Agonisten des metabotropen Glutamatrezeptors oder durch das Messen der Mobilisierung von intrazellulärem Calcium als Antwort auf einen extern angewendeten Agonisten des metabotropen Glutamatrezeptors bestimmt.

[0145] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung codiert die Nucleinsäure, die verwendet wird, um eine stabil transfizierte eukaryontische Zelllinie zu erzeugen, SEQ ID Nr.: 1, stärker bevorzugt ist die Nucleinsäure eine, die durch SEQ ID Nr.: 2 dargestellt wird, oder eine Nucleinsäuresequenz, die einen biologisch funktionalen Teil eines Proteins codiert, das die Aminosäuresequenz besitzt, die in [Fig. 1](#) gezeigt wird, wobei der Teil mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 umfasst, wie in [Fig. 1](#) gezeigt wird.

F. TRANSGENE TIERE

[0146] Transgene Tiere und transformierte Zellen können verwendet werden, um die Wirkungen eines Überschusses oder einer Verminderung des Rezeptors auf die Zellfunktion zu untersuchen. Experimentelle Modellsysteme können verwendet werden, um die Wirkungen in Zell- oder Gewebekulturen, in gesamten Tieren oder in bestimmten Zellen oder Geweben innerhalb von gesamten Tieren oder Gewebekultursystemen zu untersuchen. Die Wirkungen können über bestimmte Zeitintervalle (einschließlich während der Embryogenese) untersucht werden. Transgene nicht-menschliche Säuger sind besonders nützlich als ein in-vivo-Testsystem für die Untersuchung der Wirkungen der Einführung eines metabotropen Glutamatrezeptors, der Regulierung der Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors, das heißt durch das Einführen von zusätzlichen Genen, Antisense-Nucleinsäuren oder Ribozymen, und die Untersuchung der Wirkung der Moleküle, welche die Wirkung von Glutamat auf einen metabotropen Glutamatrezeptor nachahmen oder blockieren.

[0147] Die vorliegende Erfindung stellt experimentelle Modellsysteme für die Untersuchung der physiologischen Rolle eines metabotropen Glutamatrezeptors zur Verfügung. Modellsysteme können erzeugt werden, die verschiedene Maße der Rezeptorexpression besitzen. Die Nucleinsäure, die einen Rezeptor codiert, kann zum Beispiel in Zellen eingebracht werden, die auf natürliche Weise den Rezeptor exprimieren, sodass das Gen in viel größeren Mengen exprimiert wird. In einer anderen Ausführungsform kann ein rekombinantes Gen verwendet werden, um das endogene Gen durch eine homologe Rekombination zu inaktivieren und dadurch eine Zelle, ein Gewebe oder ein Tier zu erzeugen, die/das frei von einem metabotropen Glutamatrezeptor ist.

[0148] Die Inaktivierung eines Gens kann zum Beispiel durch die Verwendung eines rekombinanten Gens hervorgerufen werden, das so aufgebaut wird, dass es eine insertionelle Mutation (z. B. das neo-Gen) enthält. Das rekombinante Gen wird in das Genom einer/eines Empfängerzelle, -gewebes oder -tiers eingebaut und inaktiviert die Transkription des Rezeptors. Ein solches Konstrukt kann in eine Zelle wie z. B. eine embryonalen Stammzelle durch Techniken wie z. B. Transfektion, Transduktion und Injektion eingeführt werden. Stammzellen, denen eine intakte Rezeptorsequenz fehlt, können durch transgene Tiere, die für den Rezeptor defizient sind, hergestellt werden.

[0149] Bevorzugte Testmodelle sind transgene Tiere. Ein transgenes Tier besitzt Zellen, die eine DNA enthalten, die künstlich in eine Zelle eingebracht wurde und in das Genom des Tieres eingebracht wurde, das sich aus dieser Zelle entwickelt. Bevorzugte transgene Tiere sind Primaten, Mäuse, Ratten, Kühe, Schweine, Pferde, Ziegen, Schafe, Hunde und Katzen.

[0150] Eine Vielfalt von Verfahren steht für die Herstellung von transgenen Tieren zur Verfügung. Die DNA kann zum Beispiel in den Pronucleus eines befruchteten Eis vor der Fusion der männlichen und weiblichen Pronuclei injiziert oder in den Nucleus einer embryonalen Zelle injiziert werden (z. B. in den Nucleus eines Zwei-Zell-Embryos), gefolgt von dem Start der Zellteilung (Brinster et al., Proc Natl Acad Sci USA 82: 4438-4442 (1985)). Als ein weiteres Beispiel können Embryos mit Viren, insbesondere Retroviren, infiziert werden, die modifiziert werden, um die Nucleotidsequenzen des metabotropen Glutamatrezeptors zu tragen.

[0151] Pluripotente Stammzellen, die von der inneren Zellmasse des Embryos abgeleitet und in Kultur stabilisiert sind, können in der Kultur manipuliert werden, um Nucleotidsequenzen der Erfindung aufzunehmen. Ein transgenes Tier kann von solchen Stammzellen durch die Implantation in eine Blastocyste hergestellt werden, die in eine Nährmutter implantiert wird, in der es ausgetragen werden kann. Tiere, die für transgene Experimente geeignet sind, können von im Handel erhältliche Standardquellen wie z. B. Charles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY) und Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN) erhalten werden.

[0152] Verfahren für die Züchtung von embryonalen Stammzellen (ES) und die nachfolgende Herstellung von transgenen Tieren durch die Einführung der DNA in die ES-Zellen sind dem Fachmann ebenfalls bekannt, wobei Verfahren wie z. B. die Elektroporation, die Calcium-Phosphat/DNA-Präzipitation und die direkte Injektion verwendet werden. Vergl. zum Beispiel Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach, EJ Robertson, Hersg., IRL Press (1987).

[0153] Die Verfahren für die Manipulationen von Embryos sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Die Verfahren für die Manipulation der Embryos von Nagetieren und für die Mikroinjektion von DNA in den Pronucleus der Zygote sind dem Fachmann gut bekannt (Hogan et al., vorstehend). Die Verfahren der Mikroinjektion für Eier von Fischen, Amphibien und Vögeln werden ausführlich in Houdebine und Chourrout, Experientia 47: 897-905 (1991) beschrieben. Andere Verfahren für das Einführen von DNA in die Gewebe von Tieren werden in dem US-Patent Nr.: 4,945,050 (Sandford et al., 30. Juli, 1990) beschrieben.

[0154] Die Transfektion und Isolation der gewünschten Clone kann durchgeführt werden, wobei Standardtechniken (z. B. EJ Robertson, vorstehend) verwendet werden. Die zufällige Integration eines Gens kann zum Beispiel durch die Co-Transfektion der Nucleinsäure mit einem Gen, das die Resistenz gegen ein Antibiotikum codiert, durchgeführt werden. In einer anderen Ausführungsform wird zum Beispiel das Gen, das die Resistenz gegen ein Antibiotikum codiert, physikalisch an eine Nucleinsäuresequenz gebunden, die einen metabotropen Glutamatrezeptor bindet.

[0155] Die DNA-Moleküle, die in ES-Zellen eingeführt werden, können ebenfalls in das Chromosom durch das Verfahren der homologen Rekombination integriert werden. Capecchi, Science 244: 1288-1292 (1989). Verfahren für die positive Selektion des rekombinanten Ereignisses (z. B. eine Resistenz gegen Neomycin) und eine doppelte positiv-negative Selektion (z. B. Resistenz gegen Neomycin und Resistenz gegen Gancyclovir) und die nachfolgende Identifizierung der gewünschten Clone durch PCR wurden von Capecchi, vorstehend, und Joyner et al., Nature 338: 153-156 (1989) beschrieben, wobei die Lehren davon hierin aufgenommen werden.

[0156] Die abschließende Phase der Herstellung ist, die Ziel-ES-Zellen in Blastocysten zu injizieren und die Blastocysten in pseudoschwangere Weibchen zu transferieren. Die so erhaltenen chimären Tiere werden gezüchtet und der Nachwuchs wird durch Southern-Blot-Verfahren analysiert, um Individuen zu identifizieren, welche die transgene Information tragen.

[0157] Ein Beispiel, das die Herstellung einer transgenen Maus beschreibt, ist, wie nachfolgend beschrieben wird. Bei weiblichen Mäusen wird eine Superovulation angeregt und sie werden mit männlichen Mäusen zusammengebracht. Die gepaarten Weibchen werden durch CO₂-Erstickung oder Genickbruch getötet und die Embryos werden aus den entfernten Eileitern gewonnen. Die umgebenen Kumuluszellen werden entfernt. Pronukleäre Embryos werden anschließend gewaschen und bis zu dem Zeitpunkt der Injektion gelagert.

[0158] Adulte weibliche Mäuse mit einem Zufallszyklus, die vasektomierten Männchen gepaart werden, dienen als Empfänger für die implantierten Embryos. Die weiblichen Empfänger werden zur gleichen Zeit gepaart wie die weiblichen Spender und die Embryos werden operativ in die weiblichen Empfänger übertragen.

[0159] Das Verfahren zur Herstellung von transgenen Ratten ist ähnlich zu dem von Mäusen. Vergl. Hammer et al., Cell 63: 1099-1112 (1990). Die Verfahren für die Herstellung von transgenen Säugern, die nicht zu den Nagetieren gehören, und von anderen Tieren sind auf dem Fachgebiet bekannt. Vergl. zum Beispiel Houdebine und Chourrout, vorstehend, Pursel et al., Science 244: 1281-1288 (1989); und Simms et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988).

[0160] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Nucleinsäure, die für die Herstellung von transformierten Zellen oder transgenen nicht-menschlichen Tieren verwendet wird, die von SEQ ID Nr.: 2 oder Teile davon, die mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 umfassen, wie in [Fig. 1](#) gezeigt wird.

G. NEUES METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTORPROTEIN, DERIVATE UND FRAGMENTE

1. METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTORPROTEINE

[0161] Rekombinante metabotrope Glutamatrezeptorproteine können in einer Vielfalt von Gewebe- und Zellarten einschließlich menschlicher Gewebe- und Zellarten exprimiert werden. Diese rekombinanten Proteine

des metabotropen Glutamatrezeptors können für eine Vielfalt von Zwecken von einem Fachmann verwendet werden. Die rekombinanten Rezeptorproteine können als eine Quelle eines Antigens für die Herstellung von Antikörpern, die gegen metabotrope Glutamatrezeptoren gerichtet sind, einschließlich polyclonaler und monoklonaler Antikörper verwendet werden. Zusätzlich können rekombinante Proteine des metabotropen Glutamatrezeptors für Zwecke der Ermittlung von Arzneistoffen verwendet werden, wobei Verfahren verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind. Die rekombinanten Rezeptorproteine können verwendet werden, um nach Molekülen, die an metabotrope Glutamatrezeptoren binden, zu suchen (einschließlich eines Screenings mit hohem Durchsatz) sowie um nach Molekülen, welche die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors durch die Wirkung als Agonisten, Antagonisten oder allosterische Modulatoren modulieren, zu suchen. Schließlich können rekombinante Proteine des metabotropen Glutamatrezeptors für strukturelle Untersuchungen der Interaktionen von Kleinmolekül-Arzneistoffen mit metabotropen Glutamatrezeptoren, Interaktionen von Antikörpern mit metabotropen Glutamatrezeptoren oder der Interaktionen von anderen Peptiden und Proteinen mit metabotropen Glutamatrezeptoren verwendet werden. Diese Verwendungen der metabotropen Glutamatrezeptorproteine sollen nicht einschränkend sein.

[0162] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das rekombinante metabotrope Glutamatrezeptorprotein ein menschliches metabotropes Glutamatrezeptorprotein und spezifischer ein rekombinantes metabotropes Glutamatrezeptorprotein, das die Aminosäuresequenz besitzt, die in SEQ ID Nr.: 1 dargestellt wird, oder ein biologisch aktiver Teil von dieser Sequenz, der mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 umfasst, wie in [Fig. 1](#) gezeigt wird.

2. DERIVATE DES METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTORS

[0163] Die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um Derivate des beschriebenen Rezeptors herzustellen.

[0164] Derivate eines bestimmten Rezeptors sind funktionale Äquivalente des Rezeptors, die eine ähnliche Aminosäuresequenz besitzen und die zu einem gewissen Maß eine oder mehrere Aktivitäten des verwandten Rezeptors behalten. Der Ausdruck "funktionales Äquivalent" bedeutet ein Protein, dass eine Aktivität besitzt, die gegen eine oder mehrere Aktivitäten eines bestimmten Rezeptors oder Rezeptorfragments ausgetauscht werden kann. Bevorzugte funktionale Äquivalente behalten alle Aktivitäten eines bestimmten Rezeptors oder Rezeptorfragments, aber das funktionale Äquivalent kann eine Aktivität besitzen, die, wenn sie quantitativ gemessen wird, stärker oder schwächer ist als die des verwandten Rezeptors, wie in Standard-Rezeptor-Assays gemessen wird, zum Beispiel durch solche, die hierin offenbart werden. Bevorzugte funktionale Äquivalente besitzen Aktivitäten, die innerhalb von 1% bis 10.000%, vorzugsweise zwischen 10% und 1000% und stärker bevorzugt zwischen 50% und 500% der Aktivität des verwandten Rezeptors besitzen. Funktionale Äquivalente können zum Beispiel Derivate einschließen, die Modifikationen oder Aminosäureveränderungen enthalten, zum Beispiel in der Region eines Rezeptors, welche die Liganden-Bindungsaktivität enthält. Solche Aminosäureveränderungen können entweder die Bindungsaktivität des Rezeptors mit einem bestimmten Bindungsgens erhöhen oder erniedrigen. Funktionale Äquivalente können zum Beispiel ebenfalls Derivate einschließen, die Modifikationen oder Aminosäureveränderungen in dem intrazellulären Domänenanteil des Rezeptors enthalten, die zum Beispiel die Aktivität des Rezeptors erhöhen oder vermindern können, zum Beispiel durch die Erhöhung oder die Verminderung der zellulären Antwort auf die Aktivierung des Rezeptors. Die Derivate besitzen mindestens eine 15% Sequenzähnlichkeit, vorzugsweise eine 70%, stärker bevorzugt 90%, noch stärker bevorzugt 95% Sequenzähnlichkeit mit dem verwandten Rezeptor. Der Ausdruck "Sequenzähnlichkeit" betrifft die "Homologie", die zwischen den Aminosäuresequenzen in den zwei unterschiedlichen Polypeptiden unabhängig von dem Ursprung des Polypeptids beobachtet wird.

[0165] Die Fähigkeit des Derivats, einen Teil der Aktivität zu behalten, kann unter Verwendung von Techniken, die hierin beschrieben werden, gemessen werden. Die Derivate schließen Modifikationen ein, die während oder nach der Translation erfolgen, zum Beispiel durch Phosphorylierung, Glycosylierung, Vernetzung, Acylierung, proteolytische Spaltung, Bindung an ein Antikörpermolekül, Membranmolekül oder an einen anderen Liganden (vergl. Ferguson et al., 1988, Annu Rev Biochem 57: 285-320).

[0166] Spezifische Arten von Derivaten schließen ebenfalls Aminosäureveränderungen ein, wie z. B. Deletionen, Substitutionen, Additionen und Aminosäuremodifikationen. Eine "Deletion" betrifft die Abwesenheit von einem oder von mehreren Aminosäurerest(en) in dem verwandten Polypeptid. Eine "Addition" betrifft die Anwesenheit von einem oder von mehreren Aminosäurerest(en) in dem verwandten Polypeptid. Die Additionen und Deletionen in einem Polypeptid können am Aminoterminus, am Carboxyterminus und/oder intern sein. Eine "Modifikation" einer Aminosäure betrifft die Veränderung einer natürlich vorkommenden Aminosäure, um

eine Aminosäure herzustellen, die nicht natürlich vorkommt. Eine "Substitution" betrifft den Austausch von einem oder von mehreren Aminosäurerest(en) durch (einen) andere(n) Aminosäurerest(e) in dem Polypeptid. Die Derivate können verschiedene Kombinationen der Veränderungen einschließlich mehr als einer Veränderung und verschiedene Arten der Veränderung enthalten.

[0167] Während die Wirkung der Aminosäureveränderung in Abhängigkeit von Faktoren wie z. B. Phosphorylierung, Glycosylierung, Bindungen innerhalb der Kette, der tertiären Struktur und der Rolle der Aminosäure in der aktiven Stelle oder der möglichen allosterischen Stelle variiert, wird es im Allgemeinen bevorzugt, dass die ausgetauschte Aminosäure der gleichen Gruppe angehört wie die Aminosäure, die ausgetauscht wird. Zu einem gewissen Maß enthalten die nachfolgenden Gruppen Aminosäuren, die untereinander ausgetauscht werden können: die basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin; die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure; die neutralen polaren Aminosäuren Serin, Threonin, Cystein, Glutamin, Asparagin und zu einem geringeren Maß Methionin; die nichtpolaren aliphatischen Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin (wobei jedoch aufgrund der Größe Glycin und Alanin näher verwandt sind und Valin, Isoleucin und Leucin näher verwandt sind) und die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Obwohl sie in unterschiedlichen Kategorien klassifiziert werden, scheinen zusätzlich Alanin, Glycin und Serin zu einem gewissen Maß untereinander austauschbar zu sein und Cystein passt zusätzlich in diese Gruppe oder kann zusammen mit den polaren neutralen Aminosäuren klassifiziert werden.

[0168] Während Prolin eine nicht polare neutrale Aminosäure ist, stellt sein Austausch wegen seiner Wirkung auf die Konformation Schwierigkeiten dar. Substitutionen durch oder von Prolin werden daher nicht bevorzugt, außer wenn gleiche oder ähnliche Ergebnisse betreffend die Konformation erhalten werden können. Die Eigenschaften von Prolinresten, welche die Konformation vermitteln, können erhalten werden, wenn einer oder mehrere von ihnen durch Hydroxyprolin (Hyp) ausgetauscht wird.

[0169] Beispiele von modifizierten Aminosäuren schließen das Folgende ein: veränderte neutrale Aminosäuren wie z. B. Aminosäuren der Formel $H_2N(CH_2)_nCOOH$, wobei n 2–6 ist, Sarcosin (Sar), t-Butylalanin (t-BuAla), t-Butylglycin (t-BuGly), N-Methylisoleucin (N-Melle) und Norleucin (NLeu); veränderte neutrale aromatische Aminosäuren wie z. B. Phenylglycin, veränderte polare, aber neutrale Aminosäuren wie z. B. Citrullin (Cit) und Methioninsulfoxid (MSO); veränderte neutrale und nichtpolare Aminosäuren wie z. B. Cyclohexylalanin (Cha); veränderte saure Aminosäuren wie z. B. Cysteinsäure (Cya) und veränderte basische Aminosäuren wie z. B. Ornithin (orn).

[0170] Bevorzugte Derivate besitzen eine oder mehrere Aminosäureveränderung(en), welche die Rezeptoraktivität des verwandten Rezeptorproteins nicht signifikant beeinflussen. In den Regionen des metabotropen Glutamatrezeptorproteins, die für die Aktivität des Rezeptors nicht notwendig sind, können Aminosäuren mit einem geringen Risiko der Beeinflussung der Aktivität deletiert, zugefügt oder ausgetauscht werden. In den Regionen, die für die Aktivität des Rezeptors notwendig sind, werden Aminosäureveränderungen weniger bevorzugt, weil dort ein höheres Risiko der Beeinflussung der Aktivität des Rezeptors besteht. Solche Veränderungen sollten konservative Veränderungen sein. Ein oder mehrere Aminosäurereste innerhalb der Sequenz können zum Beispiel durch eine Aminosäure mit einer ähnlichen Polarität ausgetauscht werden, welche als ein funktionales Äquivalent wirkt.

[0171] Konservierte Regionen tendieren dazu, wichtiger als nichtkonservierte Regionen für die Proteinaktivität zu sein. Standardverfahren können verwendet werden, um die konservierten und nichtkonservierten Regionen, die für die Aktivität des Rezeptors wichtig sind, zu bestimmen, wobei in-vitro-Mutagenesetechniken oder Deletionsanalysen und das Messen der Rezeptoraktivität verwendet werden, wie durch die vorliegende Offenbarung beschrieben wird.

[0172] Derivate können hergestellt werden, wobei chemische Standardtechniken und rekombinante Nucleinsäuretechniken verwendet werden. Modifikationen an einem spezifischen Polypeptid können vorsätzlich wie z. B. durch die ortsgerechte Mutagenese oder durch eine Aminosäuresubstitution während der Festphasensynthese sein oder sie können zufällig wie z. B. durch Mutationen in den Wirten, die das Polypeptid herstellen, erfolgen. Polypeptide einschließlich der Derivate können unter Verwendung von Standardtechniken erhalten werden, wie z. B. solche, die in Abschnitt I.G.2, vorstehend, und durch Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) beschrieben werden. Das Kapitel 15 von Sambrook beschreibt zum Beispiel Verfahren für die ortsgerechte Mutagenese der clonierten DNA.

[0173] Ein Beispiel für das Polypeptid, bei dem eine Modifikation durchgeführt wird, ist das des menschlichen metabotropen Glutamatrezeptors und insbesondere ist es ein Polypeptid, das die Aminosäuresequenz besitzt,

die in SEQ ID Nr.: 1 dargestellt wird.

3. FRAGMENTE DES METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTORS

[0174] Die Nucleinsäuremoleküle und Proteine der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um Fragmente des beschriebenen Rezeptors herzustellen.

[0175] Rezeptorfragmente sind Teile des metabotropen Glutamatrezeptors. Rezeptorfragmente binden vorzugsweise ein oder mehrere Bindungsagenzien, die einen Rezeptor vollständiger Länge binden. Bindungsagenzien schließen Liganden wie z. B. Glutamat, Quisqualat, Agonisten, Antagonisten, allosterische Modulatoren und Antikörper ein, die den Rezeptor binden. Fragmente besitzen verschiedene Verwendungen wie z. B. für die Auswahl von anderen Molekülen, die einen Rezeptor binden können.

[0176] Fragmente können hergestellt werden, wobei Standardtechniken wie z. B. die Expression einer clonierten Teilsequenz der Rezeptor-DNA und die proteolytische Spaltung eines Rezeptorproteins verwendet werden. Proteine werden spezifisch durch proteolytische Enzyme wie z. B. Trypsin, Chymotrypsin oder Pepsin gespalten. Jedes dieser Enzyme ist spezifisch für die Art der Peptidbindung, die es angreift. Trypsin katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen, deren Carbonylgruppe zu einer basischen Aminosäure gehört, im Allgemeinen Arginin oder Lysin. Pepsin und Chymotrypsin katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen von aromatischen Aminosäuren, insbesondere von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin.

[0177] Wechselnde Gruppen von gespaltenen Proteinfragmenten werden hergestellt, indem die Spaltung an einer Stelle verhindert wird, die für ein proteolytisches Enzym empfänglich ist. Die Reaktion der E-Aminogruppe von Lysin mit Ethyltrifluorthioacetat in einer milden basischen Lösung ergibt zum Beispiel einen blockierten Aminosäurerest, dessen benachbarte Peptidbindung nicht länger für die Hydrolyse mit Trypsin empfänglich ist. Goldberger et al., Biochemistry 1: 401 (1962). Die Behandlung eines solchen Polypeptids mit Trypsin spaltet daher nur die an den Arginylresten.

[0178] Polypeptide können ebenfalls modifiziert werden, um Peptidbindungen herzustellen, die für die proteolytische, durch ein Enzym katalysierte Hydrolyse empfänglich ist. Die Alkylierung von Cysteinresten mit β-Haloethylaminen ergibt Peptidbindungen, die durch Trypsin hydrolysiert werden. Lindley, Nature 178: 647 (1956).

[0179] Zusätzlich können chemische Reagenzien verwendet werden, welche die Polypeptidketten an spezifischen Resten spalten. Witcop, Adv Protein Chem 16: 221 (1961). Cyanbromid spaltet zum Beispiel Polypeptide an Methioninresten. Gross & Witkip, J Am Chem Soc 83: 1510 (1961).

[0180] Durch die Behandlung eines metabotropen Glutamatrezeptors oder von Fragmenten davon mit verschiedenen Kombinationen von modifizierenden Agenzien, proteolytischen Enzymen und/oder chemischen Reagenzien werden daher zahlreiche, getrennte, überlappende Peptide von unterschiedlicher Länge hergestellt. Diese Peptidfragmente können isoliert und von solchen Verdauansätzen durch chromatographische Verfahren gereinigt werden. In einer anderen Ausführungsform können Fragmente unter Verwendung von geeigneten synthetischen Festphasenverfahren synthetisiert werden.

[0181] Fragmente können ausgewählt werden, um gewünschte biologische Aktivitäten zu besitzen. Ein Fragment kann zum Beispiel nur eine Ligandenbindungsstelle einschließen. Solche Fragmente werden von einem Fachmann leicht unter Verwendung von Routineverfahren identifiziert, um eine spezifische Bindung an das Fragment nachzuweisen. In dem Fall eines metabotropen Glutamatrezeptors kann zum Beispiel eine Nucleinsäure, die ein Rezeptorfragment codiert, exprimiert werden, um das Polypeptidfragment herzustellen, das anschließend mit einem Rezeptorliganden unter geeigneten Bedingungen für die Assoziation in Kontakt gebracht wird, um zu bestimmen, ob der Ligand an das Fragment bindet. Solche Fragmente sind in Screening-Assays für Agonisten und Antagonisten von Glutamat nützlich.

[0182] Andere nützliche Fragmente schließen solche ein, die nur den externen Anteil, den membranüberspannenden Teil oder den intrazellulären Teil des Rezeptors besitzen. Diese Teile werden leicht durch den Vergleich der Aminosäuresequenz des Rezeptors mit solchen von bekannten Rezeptoren oder durch andere Standardtechniken identifiziert. Diese Fragmente sind für die Erzeugung von chimären Rezeptoren mit Fragmenten von anderen Rezeptoren für die Erzeugung eines Rezeptors mit einem intrazellulären Anteil, der die gewünschte Funktion innerhalb der Zelle erfüllt, und einem extrazellulären Anteil nützlich, der dazu führt, dass die Zelle auf die Anwesenheit von Glutamat oder von solchen Agonisten oder Antagonisten, die hierin beschrieben werden, reagiert. Chimäre Rezeptoren können zum Beispiel so aufgebaut werden, dass die intrazel-

Iuläre Domäne an ein gewünschtes enzymatisches Verfahren gekoppelt ist, das leicht durch kolometrische, radiometrische, luminometrische, spektrometrische oder fluorimetrische Analysen nachgewiesen werden kann und das durch die Interaktion des extrazellulären Anteils mit seinem nativen Liganden (z. B. Glutamat) oder mit Agonisten und/oder Antagonisten der Erfahrung aktiviert wird. Zellen, die solche chimären Rezeptoren exprimieren, können verwendet werden, um das Absuchen nach Agonisten und Antagonisten des metabotropen Glutamatrezeptors zu erleichtern.

H. ANTIKÖRPER GEGEN METABOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN

[0183] Metabotrope Glutamatrezeptoren, Derivate und Fragmente davon, welche die antigenen Determinanten behalten, können verwendet werden, um Antikörper herzustellen, die einen metabotropen Glutamatrezeptor erkennen. Polyclonale Antikörper, die einen metabotropen Glutamatrezeptor erkennen, können durch Immunisierung von Kaninchen oder von anderen Tieren mit isolierten Polypeptiden des metabotropen Glutamatrezeptors erhalten werden. Polypeptide, die für die Immunisierung verwendet werden, können das gesamte Rezeptorpolypeptid oder Fragmente davon umfassen.

[0184] In einer anderen Ausführungsform können monoklonale Antikörper, die einen metabotropen Glutamatrezeptor erkennen, durch die Immunisierung von geeigneten Mausstämmen mit isolierten Polypeptiden des metabotropen Glutamatrezeptors erhalten werden. Die Polypeptide, die für die Immunisierung verwendet werden, können ebenfalls das gesamte Rezeptorpolypeptid oder Fragmente davon umfassen, aber ganze Zellen, die ein Polypeptid des metabotropen Glutamatrezeptors exprimieren, können ebenfalls verwendet werden.

[0185] Polypeptide des metabotropen Glutamatrezeptors, die für die Herstellung von Antikörpern verwendet werden, können aus Gewebe oder Zellen, die normalerweise den metabotropen Glutamatrezeptor der Wahl exprimieren, oder von Zellen isoliert werden, die für den Zweck der rekombinanten Expression von solchen Polypeptiden aufgebaut werden, oder sie können durch herkömmliche chemische Festphasenverfahren synthetisiert werden. Polyclonale oder monoklonale Antikörper, die gegen diese Polypeptide gerichtet sind, können unter Verwendung von Standardtechniken hergestellt werden, die dem Fachmann bekannt sind, wie z. B. solchen, die durch Harlow und Lane in Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 beschrieben werden. Polyclonale Antikörper können zum Beispiel hergestellt werden, wie in Shigemoto et al., Neuron 12: 12455-55 (1994) beschrieben wird, welches polyclonale Antikörper beschreibt, die mGluR1 erkennen, welches hiermit durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird. Monoklonale Antikörper, die mGluRs erkennen, können leicht durch einen Fachmann hergestellt werden. Das allgemeine Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern durch Hybridome ist jetzt auf dem Fachgebiet gut bekannt. Vergl. z. B. M Schreier et al., Hybridoma Techniques (Cold Spring Habor Laboratory, 1980); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (Elsevier Biomedical Press 1981); Kennett et al., Monoclonal Antibodies (Plenum Press, 1980); welche hiermit durch Bezugnahme hierin aufgenommen werden. Unsterbliche Antikörper absondernde Zelllinien können ebenfalls durch andere Techniken als die Fusion, z. B. durch die direkte Transformation von B-Lymphocyten mit onkogener DNA oder mit EBV hergestellt werden. Mehrere Antigenquellen können verwendet werden, wenn es erwünscht wird, um die normale Population der B-Lymphocyten herauszufordern, die später in eine unsterbliche Zelllinie umgewandelt werden.

[0186] Die Polypeptide, die für die Herstellung der Antikörper verwendet werden, sind zum Beispiel von einem menschlichen metabotropen Glutamatrezeptor und insbesondere sind es Polypeptide, welche die Aminosäuresequenz besitzen, die in SEQ ID Nr.: 1 dargestellt wird, oder Fragmente davon.

I. mGluR BINDENDE AGENZIEN, DIE AN TOXINE KONJUGIERT SIND

[0187] Die Erfindung beschreibt des weiteren Agenzien, die an den Rezeptor binden, einschließlich Antikörper und Fragmente davon, und die an einen Toxin Teil konjugiert werden können oder die zusammen mit einem Toxin Teil als ein rekombinantes Fusionsprotein exprimiert werden können. Der Toxin Teil wird die Zielzelle binden und in sie eindringen, wobei die Interaktion des bindenden Agens und des entsprechenden Oberflächenrezeptors der Zielzelle verwendet wird. Der Toxin Teil führt zum Tod der Zielzelle. Daher kann die vorliegende Erfindung gezielt auf Zellen, die metabotrope Glutamatrezeptoren besitzen, die kennzeichnend für eine Erkrankung oder Störung wie z. B. Krebs sind, gerichtet sein.

[0188] Geeignete Toxinteile, die an ein bindendes Agens gebunden sind, schließen Proteine wie z. B. das antivirale Protein der Kermesbeere, Abrin, Diphtherie-Exotoxin oder Pseudomonas-Exotoxin; Ricin und Hohen-Energie emittierendes Radionukleotid wie z. B. Kobalt-60 ein. Andere Beispiele von möglichen Toxineinheiten sind im Fachgebiet bekannt. Vergl. zum Beispiel "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Im-

munology, JM Cruse and RE Lewis Jr., (Hrsg.), Carger Press, New York (1989). Der gewählte Toxinteil sollte pharmazeutisch verträglich sein.

[0189] Die Konjugation des bindenden Agens an einen anderen Teil (z. B. ein bakterielles Toxin) kann durch die Bindung der zwei Moleküle unter Verwendung von Standardtechniken erreicht werden, so lange beide Moleküle ihre jeweilige Aktivität behalten. Mögliche Bindungen können durch verschiedene chemische Mechanismen, zum Beispiel durch kovalente Bindung, Affinitätsbindung, Interkalation, Koordinatenbindung und Komplexbildung erhalten werden. Vorzugsweise wird die kovalente Bindung verwendet. Die kovalente Bindung kann entweder durch eine direkte Kondensierung der bestehenden Seitenketten oder durch den Einbau von externen Brückenmolekülen erreicht werden.

[0190] Viele bivalente oder polyvalente Bindungsagentien sind bei der Ankopplung von Proteinmolekülen wie z. B. von einem Antikörper an andere Moleküle nützlich. Repräsentative Bindungsagentien schließen organische Verbindungen wie z. B. Thioester, Carbodiimide, Succinimidester, Diisocyanate, Glutaraldehyde, Diazobenzole und Hexamethylendiamine ein. (Vergl. Killen und Lindstrom, 1984, "Specific killing of lymphocytes that cause experimental autoimmune myasthenia gravis by toxin-acetylcholine receptor conjugates.". J Immunol 133: 1335-2549; Jansen et al., 1982, "Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity.", Immunological Rev 62: 185-216; und Vitetta et al., vorstehend).

J. VERBINDUNGEN, DIE AUF DEN NEUEN METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTOR GERICHTET SIND

[0191] Die agonistischen und antagonistischen Verbindungen von mGluR, die in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben werden, sind mit dem endogenen Agonisten, Glutamat, verwandt (für Übersichtsartikel vergl.: Cockcroft et al., Neurochem Int 23: 583-594, 1993; Schoepp und Conn, Trends Pharmacol Sci 14: 13-20, 1993; Hollman und Heinemann, Annu Rev Neurosci 17: 31-108, 1994; Watkins und Collingridge, Trends Pharmacol Sci 15: 333, 1994; Knopfel et al., J Med Chem 38: 1417, 1995). Solche agonistischen und antagonistischen Verbindungen besitzen einen Säureanteil, im Allgemeinen eine Carbonsäure, aber manchmal eine Phosphonsäure. Vermutlich binden solche Verbindungen dann die mGluRs an der gleichen Stelle wie die Aminosäure Glutamat. Dies wurde für Methylcarboxyphenylglycin bestätigt, von dem gezeigt wurde, dass es ein kompetitiver Antagonist von Glutamat ist (Eaton et al., Eur J Pharm – Mol Pharm Sect 244: 195-197, 1993). Da diese Verbindungen hauptsächlich Aminosäuren oder Aminosäurederivate sind, besitzen sie begrenzte Bioverfügbarkeiten, was in-vivo-Studien behindert, welche die Physiologie, Pharmakologie und das therapeutische Potential von mGluR bewerten. Die zur Zeit erhältlichen Agonisten und Antagonisten von mGluR sind zusätzlich sowohl als Werkzeuge für die Forschung als auch als mögliche therapeutische Agentien von einem begrenzten Nutzen, weil ihnen Potenz und Selektivität fehlt. Die Identifizierung von Agonisten und Antagonisten mit einem hohen Maß an Potenz und Selektivität für die individuellen Unterarten von mGluR ist daher die wichtigste Anforderung, um das Verständnis der verschiedenen Rollen der mGluRs in physiologischen und pathophysiologischen Verfahren im ZNS von Säugern zu erhöhen.

[0192] Die Isolation der Nucleinsäure, die den neuen mGluR der vorliegenden Erfindung codiert, ermöglicht die Expression des Rezeptors in transfizierten Zelllinien und diese Zelllinien können verwendet werden, um nach neuen Verbindungen zu suchen, die an den neuen mGluR binden und seine Aktivität modulieren können. Diese Verbindungen können an der gleichen Stelle wie Glutamat binden oder sie können in einer anderen Ausführungsform an neuen Bindungsstellen des mGluR-Proteins binden. Ein solches Absuchen kann Verbindungen mit einer verbesserten Potenz und Selektivität für den neuen mGluR identifizieren. Diese Verbindungen können ebenfalls andere günstige Eigenschaften wie z. B. eine verbesserte Bioverfügbarkeit besitzen. Solche Verbindungen würden als verbesserte Werkzeuge in der Forschung für das Ableiten der physiologischen und pathophysiologischen Rollen und als mögliche therapeutische Agentien von Nutzen sein.

[0193] Verbindungen, die auf den neuen metabotropen Glutamatrezeptor gerichtet sind, können verschiedene Verwendungen einschließlich therapeutischer Verwendungen und diagnostischer Verwendungen haben. Die Synthesen der Verbindungen, die an die mGluRs binden und ihre Aktivität modulieren können, werden von Nemeth et al. unter dem Titel "Calcium Receptor Active Molecules", internationale Nummer der Veröffentlichung WO 93/04373, und in U.S.S.N. 08/485,038, eingereicht am 7. Juni, 1995 beschrieben, welche hiermit durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit hierin aufgenommen werden, aber für mögliche mGluR aktive Verbindungen sind nicht auf diese Verbindungen beschränkt. Solche Verbindungen, die an einen metabotropen Glutamatrezeptor binden, und solche Verbindungen, die bei der Modulation der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors wirksam sind, können unter Verwendung von Verfahren, die hierin beschrieben werden, identifiziert werden. Diese Verbindungen, die selektiv an den metabotropen Glutamatrezeptor binden können, können therapeutisch oder in einer anderen Ausführungsform als diagnostisches Mittel, um die Anwesenheit des

metabotropen Glutamatrezeptors gegenüber anderen Glutamatrezeptoren zu bestimmen, verwendet werden.

K. MODULATION DER AKTIVITÄT DES METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTORS

[0194] Die Modulation der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors kann verwendet werden, um verschiedene Wirkungen wie z. B. krampflösende Wirkungen, schützende Wirkungen für Neurone, schmerzlindernde Wirkungen, Wirkungen, die die Wahrnehmung verstärken, und Wirkungen der Muskelentspannung herzustellen. Jede dieser Wirkungen besitzt therapeutische Anwendungen. Verbindungen, die therapeutisch verwendet werden, sollten minimale Nebenwirkungen in den therapeutisch wirksamen Dosen besitzen.

[0195] Das Modulieren der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors ruft eine Erhöhung oder eine Verminderung in einer zellulären Antwort hervor, die auf die Aktivierung des metabotropen Glutamatrezeptors erfolgt. Die zellulären Antworten auf die Aktivierung des metabotropen Glutamatrezeptors variieren in Abhängigkeit von der Art des metabotropen Glutamatrezeptors, der aktiviert wird. Im Allgemeinen ruft die Aktivierung eines metabotropen Glutamatrezeptors eine oder mehrere der nachfolgenden Aktivitäten hervor: (1) Aktivierung von Phospholipase C, (2) Zunahmen der Hydrolyse von Phosphoinositid (PI), (3) Ausschüttung von intrazellulärem Calcium, (4) Aktivierung von Phospholipase D, (5) Aktivierung oder Hemmung der Adenylylcyclase, (6) Zunahmen oder Abnahmen der Erzeugung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), (7) Aktivierung der Guanylylcyclase, (8) Zunahmen der Erzeugung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), (9) Aktivierung der Phospholipase A₂, (10) Zunahmen der Ausschüttung von Arachidonsäure und (11) Zunahmen oder Abnahmen in der Aktivität der Ionenkanäle, zum Beispiel durch Spannung und Liganden kontrollierte Ionenkanäle. Die Hemmung der Aktivierung des metabotropen Glutamatrezeptors verhindert, dass eine oder mehrere dieser Aktivitäten erfolgen.

[0196] Die Aktivierung eines bestimmten metabotropen Glutamatrezeptors betrifft die Herstellung von einer oder von mehreren Aktivitäten, die mit der Art des aktivierte Rezeptors assoziiert sind, zum Beispiel: (1) Aktivierung von Phospholipase C, (2) Zunahmen der Hydrolyse von Phosphoinositid (PI), (3) Ausschüttung von intrazellulärem Calcium, (4) Aktivierung der Adenylylcyclase, (5) Zunahmen der Erzeugung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), (6) Aktivierung der Phospholipase A₂, (7) Zunahmen der Ausschüttung von Arachidonsäure und (8) Zunahmen oder Abnahmen in der Aktivität der Ionenkanäle.

[0197] Die Fähigkeit einer Verbindung, die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors zu modulieren, kann überwacht werden, wobei elektrophysiologische und biochemische Assays verwendet werden, die eine oder mehrere der Aktivitäten des metabotropen Glutamatrezeptors messen. Beispiele von solchen Assays schließen die elektrophysiologische Beurteilung der Funktion des metabotropen Glutamatrezeptors in Oocyten von Xenopus, welche die clonierten metabotropen Glutamatrezeptoren exprimieren, die elektrophysiologische Beurteilung der Funktion des metabotropen Glutamatrezeptors in transfizierten Zelllinien (z. B. CHO-Zellen, HEK 293-Zellen, etc.), welche die clonierten metabotropen Glutamatrezeptoren exprimieren, die biochemische Beurteilung der Hydrolyse von PI und der Akkumulation von cAMP in transfizierten Zelllinien, welche die clonierten metabotropen Glutamatrezeptoren exprimieren, die biochemische Beurteilung der Hydrolyse von PI und der Akkumulation von cAMP in Hirnschnitten von Ratten (z. B. hippocampale, kortikale, striatale etc.), fluorimetrische Messungen des cytosolischen Ca²⁺ in kultivierten Körnerzellen des Zerebellums von Ratten und fluorimetrische Messungen des cytosolischen Ca²⁺ in transfizierten Zelllinien ein, welche die clonierten metabotropen Glutamatrezeptoren exprimieren.

[0198] Vor der therapeutischen Verwendung in einem Menschen werden die Verbindungen vorzugsweise in vivo unter Verwendung von Tiermodellen getestet. Tierstudien zur Beurteilung der Wirksamkeit einer Verbindung für die Behandlung verschiedener Erkrankungen oder Störungen oder zur Ausübung einer Wirkung wie z. B. einer schmerzlindernden Wirkung, einer Wirkung, die die Wahrnehmung verstärkt, oder einer Wirkung zur Muskelentspannung können unter Verwendung von Standardtechniken durchgeführt werden.

L. BEHANDLUNG VON NEUROLOGISCHEN ERKRANKUNGEN UND STÖRUNGEN UND ANDEREN ZUSTÄNDEN

[0199] Erkrankungen oder Störungen, die durch das Modulieren der Aktivität eines metabotropen Glutamatrezeptors behandelt werden können, schließen eine oder mehrere der nachfolgenden Arten ein: (1) solche, die durch eine abnormale Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors gekennzeichnet sind; (2) solche, die durch eine abnormale Menge eines extrazellulären oder intrazellulären Botenstoffs gekennzeichnet sind, dessen Herstellung durch die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors beeinflusst wird; (3) solche, die durch eine abnormale Wirkung (z. B. eine unterschiedliche Wirkung in der Art oder der Größe) eines intrazellulären

oder extrazellulären Botenstoffs gekennzeichnet sind, die durch die Aktivität eines metabotropen Glutamatrezeptors selbst verbessert werden kann; und (4) andere Erkrankungen oder Störungen, bei denen die Modulation der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors eine positive Wirkung ausüben wird, zum Beispiel bei Erkrankungen oder Störungen, bei denen die Herstellung eines intrazellulären oder extrazellulären Botenstoffs, die durch die Aktivität des Rezeptors stimuliert wird, eine abnormale Menge eines anderen Botenstoffs kompensiert. Beispiele von extrazellulären Botenstoffen, deren Absonderung und/oder Wirkung durch die Modulierung der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors beeinflusst werden kann, schließen anorganische Ionen, Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Chemokine ein. Beispiele von intrazellulären Botenstoffen schließen intrazelluläres Calcium, cAMP, cGMP, IP₃ und Diacylglycerin ein.

[0200] Die Verbindungen und Verfahren können ebenfalls verwendet werden, um andere Wirkungen wie z. B. eine schmerzlindernde Wirkung, eine Wirkung, die die Wahrnehmung verstärkt, oder eine Wirkung zur Muskelentspannung herzustellen.

[0201] Die beschriebenen Verbindungen und Verfahren können insbesondere bei der Behandlung von neurologischen Erkrankungen und Störungen verwendet werden. Patienten, die unter einer neurologischen Erkrankung oder Störung leiden, können durch klinische Standardverfahren diagnostiziert werden.

[0202] Neurologische Erkrankungen oder Störungen schließen neurodegenerative Erkrankungen, Excitotoxizität von Glutamat, globalen und fokalen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall, Schädeltrauma, Verletzung des Rückenmarks, durch Hypoxie induzierte Schädigung von Nervenzellen und Epilepsie ein. Diese unterschiedlichen Erkrankungen oder Störungen können weiter medizinisch charakterisiert werden. Neurodegenerative Erkrankungen schließen zum Beispiel die Alzheimersche Erkrankung, Parkinsonsche Erkrankung und Huntingtonsche Erkrankung ein.

[0203] Eine andere bevorzugte Verwendung der vorliegenden Erfindung liegt bei der Herstellung von anderen therapeutischen Wirkungen wie z. B. schmerzlindernden Wirkungen, Wirkungen, die die Wahrnehmung verstärken, oder Wirkungen zur Muskelentspannung. Die vorliegende Erfindung wird vorzugsweise verwendet, um eine oder mehrere dieser Wirkungen bei einem Patienten, der eine solche Behandlung benötigt, herzustellen.

[0204] Patienten, die eine solche Behandlung benötigen, können durch medizinische Standardtechniken identifiziert werden. Die Herstellung einer schmerzlindernden Aktivität kann zum Beispiel verwendet werden, um Patienten zu behandeln, die unter klinischen Zuständen von akutem oder chronischem Schmerz einschließlich des Nachfolgenden leiden: präventiver präoperativer Schmerzaufhebung; peripherer Neuropathien wie z. B. solcher, die zusammen mit Diabetes mellitus und der multiplen Sklerose auftreten; Phantomschmerzen in den Gliedmaßen; Kausalgia, Neuralgie, die z. B. bei der Gürtelrose auftritt, zentralem Schmerz, der z. B. bei Verletzungen des Rückenmarks beobachtet wird, gesteigerte Schmerzempfindlichkeit und Allodynie.

M. In-vitro-Diagnostika

[0205] Die unterschiedlichen Moleküle der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um die Diagnose von Erkrankungen, die mit dem metabotropen Glutamatrezeptor assoziiert sind, zu erleichtern. Die Diagnose kann in vitro oder in vivo durchgeführt werden. Die Moleküle der vorliegenden Erfindung können zum Beispiel verwendet werden, um nach Defekten in den metabotropen Glutamatrezeptoren zu suchen.

[0206] Nucleinsäuresonden können verwendet werden, um Defekte in metabotropen Glutamatrezeptoren zu identifizieren, die auf einer genetischen Ebene erfolgen. Hybridisierungssonden, die zu einer Nucleinsäure komplementär sind, die einen Rezeptor codiert, können zum Beispiel verwendet werden, um den Rezeptor zu clonieren. Der clonierte Rezeptor kann in eine Zelle wie z. B. eine Oocyte eingefügt werden und seine Empfindlichkeit für einen mGluR-Liganden wird bestimmt. Ein anderes Beispiel für die Verwendung von Sonden eines Hybridisierungsassays zum Nachweisen von Defekten beinhaltet die Verwendung der Sonden, um die mRNA-Spiegel oder die Anwesenheit von Nucleinsäuresequenzen, die mit einer bestimmten Erkrankung assoziiert sind, nachzuweisen. Ein verminderter mRNA-Spiegel würde mit einer verminderten Menge des exprimierten Rezeptors übereinstimmen.

[0207] Antikörper und Fragmente davon, die ein Antigen eines metabotropen Glutamatrezeptors erkennen können, können verwendet werden, um die Anzahl, die Integrität, die Struktur des Rezeptors zu bestimmen und um Zellen, die metabotrope Glutamatrezeptoren exprimieren, im Körper zu lokalisieren. Antikörper, die auf metabotrope Glutamatrezeptoren gerichtet sind, können zum Beispiel verwendet werden, um die Anzahl der

Rezeptoren auf einer Zelle zu bestimmen; Antikörper, die zwischen den fehlerhaften und normalen Rezeptoren unterscheiden können, können verwendet werden, um die Anwesenheit von fehlerhaften Rezeptoren zu bestimmen; Antikörper, die auf einen metabotropen Glutamatrezeptor gerichtet sind, können verwendet werden, um zu bestimmen, ob eine Erkrankung oder ein chirurgischer Eingriff zu der Ausbreitung von normalen oder abnormalen Zellen führt, welche die metabotrope Glutamatrezeptoren exprimieren, und Antikörper, die auf einen metabotropen Glutamatrezeptor gerichtet sind, können verwendet werden, um Zellen zu lokalisieren, die eine abnormale Anzahl oder Struktur des metabotropen Glutamatrezeptors besitzen, um die nachfolgende Behandlung zu lenken.

N. FORMULIERUNG UND VERABREICHUNG

[0208] Die verschiedenen Moleküle, die durch die vorliegende Erfindung beschrieben werden, können verwendet werden, um verschiedene Erkrankungen oder Störungen durch das Modulieren der Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors zu behandeln. Die Moleküle der Erfindung können für eine Vielfalt von Verabreichungen formuliert werden, einschließlich der systemischen und topischen oder der örtlichen Verabreichung. Techniken und Formulierungen können im Allgemeinen in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Esston, PA gefunden werden.

[0209] Die optimale Formulierung und Art der Verabreichung von Verbindungen der vorliegenden Anwendung an einen Patienten hängen von Faktoren ab, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, wie z. B. der besonderen Erkrankung oder Störung, der erwünschten Wirkung und dem Typ des Patienten. Während die Verbindungen typischerweise verwendet werden, um menschliche Patienten zu behandeln, können sie ebenfalls verwendet werden, um ähnliche oder identische Erkrankungen in anderen Vertebraten wie z. B. Primaten, Nutztiere wie z. B. Schweine, Rinder und Geflügel und Tiere für den Sport und Haustiere wie z. B. Pferde, Hunde und Katzen zu behandeln.

[0210] Vorzugsweise wird die therapeutisch wirksame Menge als eine pharmazeutisch wirksame Zusammensetzung zur Verfügung gestellt. Ein pharmakologisches Agens oder eine pharmakologische Zusammensetzung betrifft ein Agens oder eine Zusammensetzung in einer Form, die für die Verabreichung in einen vielzelligen Organismus wie z. B. einen Menschen geeignet ist. Geeignete Formen hängen teilweise von der Verwendung oder der Route des Eintritts ab, zum Beispiel oral, transdermal oder durch Injektion. Solche Formen sollten dem Agens oder der Zusammensetzung ermöglichen, eine Zielzelle zu erreichen, unabhängig davon, ob die Zielzelle in einem vielzelligen Wirt oder in einer Kultur vorliegt. Pharmakologische Agenzien oder Zusammensetzungen, die in den Blutstrom injiziert werden, sollten zum Beispiel löslich sein. Andere Faktoren sind auf dem Fachgebiet bekannt und schließen Betrachtungen wie z. B. die Toxizität und Formen, die verhindern, dass das Agens oder die Zusammensetzung ihre Wirkung ausübt, ein.

[0211] Die beanspruchten Zusammensetzungen können ebenfalls als pharmazeutisch verträgliche Salze (z. B. als Säureadditionssalze) und/oder Komplexe davon formuliert werden. Pharmazeutisch verträgliche Salze sind bei den Konzentrationen, in denen sie verabreicht werden, nichttoxische Salze. Die Herstellung von solchen Salzen kann die pharmakologische Verwendung durch die Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Zusammensetzung erleichtern, ohne dass die Zusammensetzung daran gehindert wird, ihre physiologische Wirkung auszuüben. Beispiele von nützlichen Veränderungen in den physikalischen Eigenschaften schließen die Verminderung des Schmelzpunkts, um die transmukosale Verabreichung zu erleichtern, und die Erhöhung der Löslichkeit ein, um die Verabreichung von höheren Konzentrationen des Arzneistoffs zu erleichtern.

[0212] Pharmazeutisch verträgliche Salze schließen Säureadditionssalze wie z. B. solche ein, die Sulfat, Hydrochlorid, Phosphat, Sulfamat, Acetat, Citrat, Lactat, Tartrat, Methansulfonat, Ethansulfonat, Benzolsulfonat, p-Toluolsulfonat, Cyclohexylsulfamat und Quinat ein. (Vergl. z. B. vorstehend PCT/US92/03736). Pharmazeutisch verträgliche Salze können von Säuren wie z. B. Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Sulfaminsäure, Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Weinsäure, Malonsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Cyclohexylsulfaminsäure und Chinasäure erhalten werden.

[0213] Pharmazeutisch verträgliche Salze können durch Standardtechniken hergestellt werden. Die freie Base von einer Verbindung wird zum Beispiel in einem geeigneten Lösungsmittel wie z. B. einer wässrigen oder wässrig-alkoholischen Lösung gelöst, welche die geeignete Säure enthält, und sie wird anschließend durch Verdampfung der Lösung isoliert. In einem anderen Beispiel wird ein Salz durch die Reaktion der freien Base und der Säure in einem organischen Lösungsmittel hergestellt.

[0214] Träger oder Excipienten können ebenfalls verwendet werden, um das Verabreichen der Verbindung zu erleichtern. Beispiele von Trägern und Excipienten schließen Calciumcarbonat, Calciumphosphat, verschiedene Zucker wie z. B. Lactose, Glucose oder Saccharose oder Arten von Stärke, Cellulosederivate, Gelatine, pflanzliche Öle, Polyethylenglycole und physiologisch verträgliche Lösungsmittel ein. Die Zusammensetzungen oder die Arzneimittel können über unterschiedliche Routen einschließlich intravenös, intraperitoneal, subkutan und intramuskulär, oral, topisch oder transmukosal verabreicht werden.

[0215] Die Verbindungen der Erfindung können für eine Vielfalt von Arten der Verabreichung einschließlich der systemischen und topischen oder lokalen Verabreichung formuliert werden. Techniken und Formulierungen können im Allgemeinen in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. Auflage, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, gefunden werden.

[0216] Für die systemische Verabreichung wird die orale Verabreichung bevorzugt. Für die orale Verabreichung werden die Verbindungen in herkömmliche orale Dosierungsformen wie z. B. Kapseln, Tabletten und Tonika formuliert.

[0217] In einer anderen Ausführungsform können Injektionen verwendet werden, z. B. intramuskulär, intravenös, intraperitoneal, subkutan, intrathekal oder intracerebroventrikulär. Für die Injektion werden die Verbindungen der Erfindung in flüssigen Lösungen formuliert, vorzugsweise in physiologisch verträglichen Puffern wie z. B. Hank-Salzlösung oder Ringerlösung. In einer anderen Ausführungsform, werden die Verbindungen der Erfindung in einem oder in mehreren Excipienten (z. B. Propylenglykol) formuliert, die im Allgemeinen als sicher akzeptiert sind, wie durch USP-Standards definiert ist. Zusätzlich können die Verbindungen in einer festen Form formuliert und direkt vor der Verwendung erneut gelöst oder suspendiert werden. Gefriergetrocknete Formen sind ebenfalls eingeschlossen.

[0218] Die systemische Verabreichung kann ebenfalls durch transmukosale und transdermale Mittel erfolgen oder die Moleküle können oral verabreicht werden. Für die transmukosale oder transdermale Verabreichung werden Durchdringungsmittel, die für die Barriere geeignet sind, die durchdringen werden soll, in der Formulierung verwendet. Solche Durchdringungsmittel sind im Allgemeinen auf dem Fachgebiet bekannt und schließen zum Beispiel für die transmukosale Verabreichung Gallensalze und Derivate der Fusidinsäure ein. Zusätzlich können Detergentien verwendet werden, um das Durchdringen zu vereinfachen. Eine transmukosale Verabreichung kann zum Beispiel durch Nasensprays oder durch die Verwendung von Zäpfchen erfolgen. Für die orale Verabreichung werden die Moleküle in herkömmliche orale Dosierungsformen der Verabreichung wie z. B. Kapseln, Tabletten und flüssigen Herstellungen formuliert.

[0219] Für die topische Verabreichung werden die Verbindungen der Erfindung als Wundsalben, Salben, Gele oder Cremes formuliert, wie im Allgemeinen auf dem Fachgebiet bekannt ist.

[0220] Wie in den Beispielen gezeigt wird, die hierin zur Verfügung gestellt werden, können die Mengen der verschiedenen Verbindungen dieser Erfindung, die verabreicht werden sollen, durch Standardverfahren bestimmt werden. Im Allgemeinen liegt eine therapeutisch wirksame Menge zwischen etwa 1 nMol und 3 µMol des Moleküls, vorzugsweise zwischen etwa 0,1 nMol und 1 µMol in Abhängigkeit von seinem EC₅₀- oder IC₅₀-Wert und von dem Alter und der Größe des Patienten und von der Erkrankung oder Störung, die bei dem Patienten vorliegt. Im Allgemeinen handelt es sich um eine Menge zwischen etwa 0,1 und 50 mg/kg, vorzugsweise 0,01 und 20 mg/kg des zu behandelnden Tieres.

[0221] Die nachfolgenden Beispiele stellen die Erfindung dar, schränken aber nicht ihren Umfang ein.

II. BEISPIELE

[0222] Es werden nachfolgend Beispiele zur Verfügung gestellt, um unterschiedliche Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung erklären. Diese Beispiele sollen in keiner Weise die offenbare Erfindung einschränken. Stattdessen erklären sie Methoden, durch die der neue mGluR der vorliegenden Erfindung isoliert, in eukaryontischen Systemen exprimiert und die funktionale Aktivität beurteilt werden kann. Sie erklären ebenfalls Methoden, mit denen nach Verbindungen gesucht werden kann, um solche zu identifizieren, die an den neuen mGluR binden oder seine Aktivität modulieren.

BEISPIEL 1: CLONIERUNG VON ANORGANISCHEN IONENREZEPTOREN UND METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTOREN DURCH DIE VERWENDUNG EINER DEGENERIERTEN PRIMER-PCR

[0223] Es wurden Calciumrezeptoren von der Nebenschilddrüse von Rindern und Menschen und der Niere und dem Gehirn von Ratten cloniert (Brown et al., Nature 366: 575, 1993; Garrett et al., J Biol Chem 270: 12919, 1995; Riccardi et al., Proc Natl Acad Sci USA 92: 131, 1995; Ruat et al., Proc Natl Acad Sci USA 92: 3161, 1995). Die Analyse der Calciumrezeptorsequenzen (Rind, Mensch und Ratte) durch den Vergleich der Sequenzdatenbank deutete darauf, dass, während die Sequenzen der Calciumrezeptoren einzigartig waren, sie eine schwache, aber signifikante Homologie (20–30% Identität der Aminosäuren) mit den metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) zeigten. Dieses Ergebnis deutete darauf, dass die Calciumrezeptoren strukturell mit den mGluRs verwandt sind, und sie sich wahrscheinlich von einem gemeinsamen Urgen entwickelt haben. Trotz dieser strukturellen Verwandtschaft sind Calciumrezeptoren pharmakologisch unterschiedlich zu den mGluRs und in Experimenten mit Nebenschilddrüsenzellen von Rindern oder mit Oocyten von Xenopus, die Calciumrezeptoren ektopisch exprimieren, wurden keine Antworten auf die Agonisten von mGluR Glutamat, ACPD und Quisqualat beobachtet.

[0224] Die Entdeckung der Calciumrezeptorsequenzen ermöglichte, die Regionen einer hohen Konservierung der Sequenz zwischen Calciumrezeptoren und mGluRs zu bestimmen. Solche Regionen waren als Leitstrukturen für die Herstellung von Hybridisierungssonden und PCR-Sonden nützlich, die verwendet werden konnten, um cDNA- und genomische DNA-Sequenzen nachzuweisen und zu isolieren, die zusätzliche Mitglieder dieser ausgedehnten Familie von Rezeptoren codieren.

[0225] Die Analyse der Aminosäuresequenzen von Calciumrezeptoren und mGluRs deutet darauf, dass die Sequenzhomologie in mehreren begrenzten Regionen einschließlich Teilen der N-terminalen, mutmaßlichen extrazellulären Domänen, Regionen der mutmaßlichen Domänen mit sieben Transmembranbereichen und der mutmaßlichen intrazellulären Schleifen 1 und 3 am höchsten war. Basierend auf den Homologien in den transmembranen Domänen 2 und 5 und den intrazellulären Schleifendomänen 1 und 3 wurden vier degenerierte Oligonucleotide für die Verwendung in der PCR synthetisiert. Diese Oligonucleotide enthielten die Restriktionsstellen für Xhol oder EcoRI innerhalb ihrer 5'-Enden, um die Subclonierung der amplifizierten Produkte zu erleichtern. Diese waren:

TM2:

CCTGCTCGAGACIA(A,G)(C,T)CGGGGA(A,G)CT(C,T)T(C,G)CTA(C,T)

(C,A)T;

TM5:

CGGAATTCCGTTICGGG(A,T)(C,T)TTGAA(C,G)GC(A,G)(A,T)A(G,C);

CL1:

CCTGCTCGAGTCAAGGCTACG(A,G)(A,G)I(C,A)G(G,A,C,T)GA(G,A)(C,T)T;

CL3:

CGGAATTCCATTGGCTTCGTTGAAI(T,G)T(A,G,C,T)(G,T)C(G,A,T,C) GG.

[0226] Vier unterschiedliche Kombinationen von Primern wurden in den Versuchen verwendet, neue Clone von Ionenrezeptoren und metabotropen Glutamatrezeptoren zu erhalten: TM2 + TM5; TM2 + CL3; CL1 + TM5 und CL1 + CL3. Die PCR-Reaktionen wurden durchgeführt, wobei Bedingungen, die zuvor beschrieben wurden (Abe et al., J Biol Chem 19: 13361, 1992), mit Temperaturen für die Anlagerung zwischen 37°C und 55°C verwendet wurden. Jede Kombination von Primern führte zu Produkten, die eine Größe von etwa 500 bp hatten, wenn sie verwendet wurde, um cDNA oder genomische DNA zu amplifizieren. Bibliotheken von solchen PCR-Produkten wurden durch die Subclonierung der Produkte in einen Plasmidvektor nach der Amplifikation hergestellt. Die Analyse der Produkte führte zu dem Nachweis von Calciumrezeptorsequenzen, fünf mGluR-Sequenzen und von zusätzlichen Sequenzen, die zur Zeit charakterisiert werden.

[0227] Dieses Beispiel wie die anderen Beispiele, die hierin beschrieben werden, soll nicht einschränkend sein. Verschiedene andere hochkonservierte Sequenzregionen können identifiziert und in einer ähnlichen Weise verwendet werden. Solche Fortschritte werden durch die Entdeckung der Calciumrezeptorsequenzen er-

möglich, welche die Identifizierung der am höchsten konservierten Sequenzen zwischen den Calciumrezeptoren und den mGluRs und die Entwicklung von degenerierten PCR-Primern auf der Grundlage dieser Sequenzhomologien ermöglicht. Eine degenerierte PCR kann anschließend verwendet werden, um verwandte DNA-Fragmente zu clonieren. Die clonierten PCR-Produkte wie z. B. solche, die vorstehend beschrieben werden, können anschließend als Hybridisierungssonden verwendet werden, um vollständige genomische Clone und cDNA-Clone vollständiger Länge zu isolieren. Wenn zusätzliche Mitglieder dieser Rezeptorfamilie entdeckt werden und ihre Sequenzen bestimmt werden, wird eine Verfeinerung dieses Ansatzes möglich sein. Die Erfindung hierin ermöglicht daher die Entdeckung anderer Mitglieder dieser Rezeptorfamilie über ein sich wiederholendes Verfahren.

BEISPIEL 2: CLONIERUNG DER SEQUENZ EINES NEUEN MENSCHLICHEN mGLUR

[0228] Die PCR wurde unter Verwendung menschlicher genomicscher DNA als eine Matrize und der degenerierten Primer und unter den Reaktionsbedingungen, die in dem vorstehenden Beispiel angezeigt wurden (Abe et al., J Biol Chem 19: 13361, 1992), durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden für eine Elektrophorese im Agarosegel verwendet und solche, deren Größe etwa 500 bp entsprach, wurden nach der Spaltung mit den Restriktionsendonucleasen Xhol und EcoRI subcloniert. Die Analyse der DNA-Sequenz der Subclone über die Sequenzierung der doppelsträngigen DNA mit Sequenase Version 2.0 (US Biochemical) identifizierte Sequenzen für den menschlichen Calciumrezeptor und verschiedene menschliche mGluR-Sequenzen. Die meisten der Letzteren wurden leicht als menschliche Homologe von bekannten mGluRs der Ratte identifiziert. Ein Subclon wurde jedoch unter denen gefunden, die von der CL1 + CL3-Amplifikationsreaktion hergestellt wurden, der einzigartig schien. Eine Analyse der Teilsequenz des Clons FF6.175 (vergl. SEQ ID Nr.: 3) deutete darauf hin, dass er starke Homologien zu den Nucleotidsequenzen von mGluR4, mGluR6 und mGluR7 der Ratte besitzt. Die Translation der Nucleotidsequenz von FF6.175 zeigte eine Aminosäuresequenz, die homolog zu den mGluR4, 6 und 7 der Ratte war, die aber einzigartige Aminosäureunterschiede zeigte. Dies deutete darauf, das FF6.175 nicht das menschliche Homolog von mGluR4, mGluR6 oder mGluR7 codierte, sondern stattdessen ein neues mGluR codierte, der wahrscheinlich ein Mitglied dieser Subfamilie ist.

[0229] Die nachfolgende Veröffentlichung der Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen von mGluR8 der Maus (Duvoisin et al., J Neuroscience 15: 3075, 1995) bestätigte diese Hypothese. Die Nucleinsäureteilsequenz von FF6.175 (SEQ ID Nr.: 3) zeigte eine 92,2% Sequenzidentität mit der entsprechenden Region der Nucleinsäuresequenz von mGluR8 der Maus. Des weiteren zeigte die Aminosäuresequenz, die durch die Nucleinsäureteilsequenz von FF6.175 codiert wurde, eine 96,4% Identität mit der entsprechenden Aminosäuresequenz des mGluR8 der Maus. Diese Verhältnisse lassen annehmen, dass FF6.175 ein PCR-Fragment ist, das von der menschlichen genomicschen DNA abgeleitet ist, die wahrscheinlich einen menschlichen mGluR8 codiert.

[0230] Spezifische PCR-Primer (FF6.175 RTS: 5'-CTA CAT TGA CTA TGG AGA GCA GCG-3', FF6.175.RTS3: 5'-GAC CAT CAA GAG GAT ACT GTA TCC-3') wurden basierend auf der Teilsequenz der Nucleinsäure von FF6.175 kommerziell synthetisiert (Midland Certified Reagent Company). Die PCR wurde unter Verwendung von 100 ng menschlicher genomicscher DNA (Clontech), 0,1 µM von jedem Primer, 1 × Perkin Elmer PCR-Puffer, 0,2 mM dNTPs und 1,25 Einheiten des Enzyms AmpliTaq in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Ein GeneAmp PCR System 9600 wurde verwendet, um 25 Zyklen der PCR durchzuführen: 94°C für 15 Sekunden, 50°C für 15 Sekunden und 72°C für 15 Sekunden, gefolgt von 10 Minuten Extension bei 72°C. Das so erhaltene 121 bp große Produkt wurde in pTBlue (Novagen) subcloniert und pX120.15 genannt. Das clonierte PCR-Produkt wurde für eine Sequenzanalyse der DNA mittels einer doppelsträngigen DNA-Sequenzierung mit Sequenase Version 2.0 (US Biochemical) verwendet und es wurde bestätigt, das X120.15 einem 121 bp großen Subfragment (Nucleotide 10 bis 130) des ursprünglichen PCR-Products FF6.175 entsprach. Die Sequenz dieses Clons wird in SEQ ID Nr.: 4 gezeigt.

[0231] pX120.15 wurde mit EcoRI linearisiert und als eine Matrize verwendet, um eine ³²P-markierte Antisense-Ribosonde mit der T7-RNA-Polymerase (Ambion) zu synthetisieren. Human Multiple Tissue Northern-Blots (Clontech) wurden für 18 Stunden bei 60°C in 400 mM NaPO₄, pH-Wert 7,2, 1 mM EDTA, 5% SDS, 1 mg/ml BSA, 100 µg/ml mit Ultraschall behandelter Lachssperma-DNA, 50% Formamid und 1 × 10⁶ ZpM/ml der Ribosonde hybridisiert. Die Membrane wurden viermal für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 × SSC, 0,05% SDS gewaschen, gefolgt von zweimal Waschen für 30 Minuten bei 65°C mit 0,1 × SSC, 0,1% SDS. Die Membranen wurden anschließend für die Autoradiographie verwendet.

[0232] Die Northern-Blot-Analyse zeigte, dass eine etwa 3,8 kb große mRNA, die an die Ribosonde X120.15 unter hochstringenten Bedingungen hybridisierte, weitläufig überall in dem menschlichen Gehirn (16 von 16

untersuchten Regionen) mit der größten Expression in dem Nucleus subthalamicus und im cerebralen Cortex exprimiert wurde. Um einen cDNA-Clon vollständiger Länge zu erhalten, der dieser mRNA entspricht, wurde eine cDNA-Bibliothek des menschlichen cerebralen Cortex in dem Phagenvektor LambdaDR2 (Kat. # HL 1143X Clontech) abgesucht, wobei das PCR-Produkt X120.15 als Sonde verwendet wurde. X120.15 wurde mit ^{32}P durch zufälliges Priming markiert, wobei der Decaprime II-Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers (Ambion) verwendet wurde. Etwa 9×10^5 Phagenplaques wurden als Duplikate auf Hybond-N-Filter (Amersham) übertragen. Diese Filter wurden für 18 Stunden bei 42°C in 400 mM NaPO₄, pH-Wert 7,2, 1 mM EDTA, 5% SDS, 1 mg/ml BSA, 100 µg/ml mit Ultraschall behandelter Lachssperma-DNA, 50% Formamid und etwa 3×10^5 ZpM/ml der Sonde hybridisiert. Die Filter wurden zweimal für jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 × SSC, 1% SDS gewaschen, anschließend einmal für 30 Minuten bei 55°C mit 0,1 × SSC, 1% SDS und für die Autoradiographie verwendet. Ein einziger Hybridisierungsclon (CCX-1) wurde isoliert und in das Plasmid pDR2 durch die Konversion cre-loxP gewonnen. Dieser Clon wurde pCCX-1 genannt und für eine Sequenzanalyse der DNA über das Sequenzieren doppelsträngiger DNA mit Sequenase Version 2.0 (US Biochemical) verwendet.

[0233] Die Nucleotidsequenz der cDNA-Insertion, die in pCCX-1 enthalten ist, wird in SEQ ID Nr.: 2 dargestellt. Die cDNA CCX-1 ist etwa 3850 bp lang und enthält 515 Basenpaare der nichttranslatierten 5'-Sequenz, einen offenen Leserahmen von 2724 bp und etwa 610 bp der nichttranslatierten 3'-Sequenz. Die Unklarheit betreffend die Länge der nichttranslatierten 3'-Region ist auf Schwierigkeiten bei der Etablierung der genauen Anzahl der Nucleotide in dem PolyA-Schwanz begründet. Der 2724 bp große offene Leserahmen (Nucleotide 1 bis 2724, SEQ ID Nr.: 5) ist zu 91,8% mit der Nucleotidsequenz von mGluR8 der Maus (Duvoisin et al., J Neuroscience 15: 3075, 1995) von den Nucleotiden 1 bis 2677 identisch. Eine Insertion, die 55 Nucleotid groß ist und die in der cDNA des mGluR8 der Maus nicht vorhanden ist, beginnt bei Nucleotid 2678 der cDNA CCX-1 und erstreckt sich bis Nucleotid 2732. Die Nucleotidsequenz von 2733 bis 2779 der cDNA CCX-1 zeigt dann erneut eine starke Homologie (89,4% Identität) mit den 47 Nucleotiden, die dem TGA-Codon der mGluR8-cDNA der Maus vorangehen.

[0234] Der 2724 bp große offene Leserahmen der cDNA CCX-1 codiert ein Protein, das 908 Aminosäuren groß ist (SEQ ID Nr.: 1), von genau der gleichen Größe wie das mGluR8-Protein der Maus. Die Aminosäuresequenz der neuen menschlichen mGluR ist zu 97,5% mit der Aminosäuresequenz bis zum Rest 893 des mGluR8 der Maus (Duvoisin et al., J Neuroscience 15: 3075, 1995) identisch. Wegen dieser Sequenzidentität wird der neue menschliche mGluR hierin als menschlicher mGluR8 bezeichnet. Als ein Ergebnis der Insertion der 55 Nucleotide, die zwei Stopp-Codons (TAATAG) bei den Nucleotiden 2725 bis 2730 im Leserahmen besitzen, unterscheiden sich jedoch die 15 C-terminalen Aminosäuren, die von der CCX-1-cDNA codiert werden, vollständig von den entsprechenden 15 Aminosäuren am C-Ende des mGluR8-Proteins der Maus.

[0235] Die Tatsache, dass die Nucleotide 2735 bis 2779 in der nichttranslatierten 3'-Region der cDNA CCX-1 15 Aminosäuren codieren würden, von denen 14 zu den entsprechenden 15 Aminosäuren am C-Ende des mGluR-Proteins der Maus identisch sind, weist deutlich darauf hin, dass ein alternatives Spleißen eine zweite menschliche mGluR8-mRNA herstellen könnte. Diese mRNA-Spleißvariante, der die Insertion der 55 Nucleotide fehlt, würde ein menschliches mGluR8-Protein mit einer C-terminalen Aminosäuresequenz codieren, die zu der Sequenz des mGluR8-Proteins der Maus fast identisch ist.

[0236] Ein auf PCR-basierendes Experiment wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Insertion der 55 Nucleotide in der CCX-1-cDNA ein alternatives Spleißen widerspiegelt, um zwei menschliche mGluR8-mRNAs herzustellen, die zwei unterschiedliche C-terminale Aminosäuresequenzen codieren. Spezifische PCR-Primer (CCX.2: 5'-GAT GTA CAT CCA GAC AAC AAC AC-3', Nucleotide 2430 bis 2452 von CCX-1) und (CCX.14: 5'-CAG ATT GTG CCA TTT CCC TGT TTC-3', komplementär zu den Nucleotiden 2781 bis 2804 von CCX-1) wurden entwickelt, um die mutmaßlichen C-terminalen Spleißverbindungsstellen zu flankieren (kommerziell synthetisiert von Midland Certified Reagent Company, Midland, TX). Diese Primer wurden verwendet, um je 10 ng der cDNA des menschlichen cerebralen Cortex, des Nucleus subthalamicus und der Retina (Clontech, Palo Alto, CA) unter den Reaktionsbedingungen zu amplifizieren, die vorstehend für die Amplifikation des PCR-Produkts X120.15 beschrieben wurden. Die Amplifikation von etwa 20 ng der pCCX1-Plasmid-DNA wurde als eine Positivkontrolle verwendet. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden über ein 2% Agarosegel (Nu-sieve® GTG®, FMC, Rockland, ME) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) durch einen kapillaren Transfer geblottet. Die Membran wurde für 18 Stunden bei 37°C in 5 × SSC, 25 mM NaPO₄, pH-Wert 7,5, 5 × Denhardt, 5 mM EDTA, 0,1% Pyrophosphat, 1% SDS, 30% Formamid, 100 µg/ml Heringssperma-DNA mit einer 24-mer-Oligonucleotidsonde (CCX.17: 5'-GGA AAT GAC AGA CCA AAT GGC GAG-3', Nucleotide 2617 bis 2640 von CCX-1) hybridisiert. 100 ng von CCX.17 wurden mit ^{32}P unter Verwendung der T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs, Beverly, MA) markiert, über

eine TE-10-Säule (Clontech) gereinigt und die gesamte Reaktion wurde für eine Hybridisierung verwendet. Die Membran wurde viermal bei Raumtemperatur für jeweils 5 Minuten in $2 \times$ SSC, 0,1% SDS und zweimal für jeweils 30 Minuten in $0,2 \times$ SSC, 0,1% SDS bei 45°C gewaschen. Die Membran wurde für eine Autoradiographie verwendet.

[0237] Die Ergebnisse dieses Experiments werden in **Fig. 6** gezeigt. Ein PCR-Produkt, das 357 Nucleotide groß ist und das mit dem markierten CCX.17-Oligonucleotid hybridisierte, wurde von der cDNA von dem Nucleus subthalamicus, dem cerebralen Cortex und der Retina amplifiziert. Dieses Produkt war in der Größe zu dem identisch, das erhalten wurde, wenn die Plasmid-DNA pCCX-1 als eine Matrize verwendet wurde, was darauf hinweist, dass eine mRNA-Art, die der cDNA CCX-1 (hmGluR 375) entspricht, in allen drei dieser Gewebe exprimiert wird. Ein zusätzliches PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 320 Nucleotiden, das mit dem markierten CCX.17-Oligonucleotid (hmGluR 320) hybridisierte, wurde jedoch ebenfalls aus diesen drei Gewebearten amplifiziert.

[0238] Diese Ergebnisse zeigen, dass zwei unterschiedliche mGluR8-mRNA-Arten aus dem alternativen Spleißen entstehen und dass beide in der menschlichen Retina und in den zwei Regionen des menschlichen Gehirns, die untersucht wurden, exprimiert werden. Die Ergebnisse stimmen mit der Schlussfolgerung überein, dass die mRNA-Art, die zu dem PCR-Produkt, hmGluR 320, das 320 Nucleotide groß ist, in **Fig. 6** führt, eine menschliche mGluR8-mRNA darstellt, in der das 55 Nucleotide große Fragment während des Spleißens entfernt wurde. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Eliminierung dieses Segments zu einer mRNA führt, die ein menschliches mGluR8-Protein codiert, in dem 14 der 15 Aminosäuren an dem C-Ende zu dem C-Ende des mGluR8-Proteins der Maus identisch sind. Im Gegensatz dazu stellt die zweite mRNA-Art, die zu dem PCR-Produkt, hmGluR 375, das 375 Nucleotide groß ist, in **Fig. 6** führt, eine menschliche mGluR8-mRNA dar, die der cDNA CCX-1 entspricht. Das 55 Nucleotide große Segment wird in dieser mRNA während des Spleißens erhalten und führt zu einem zweiten menschlichen mGluR8-Rezeptorprotein mit einer unterschiedlichen, 15 Aminosäuren großen Sequenz am C-Ende (SEQ ID Nr.: 1), die sich vollständig von der 15 Aminosäuren großen Sequenz am C-Ende des mGluR8 der Maus unterscheidet.

BEISPIEL 3: KONSTRUKTION VON pHMGR8b

[0239] Die DNA pCCX-1 wurde mit Xhol und XbaI gespalten, um ein Fragment freizusetzen, das sich von dem Nucleotid 825 in der CCX-1-cDNA bis zu dem Ende des PolyA-Schwanzes erstreckte. Dieses Fragment (~2,5 kb) wurde in die Xhol- und XbaI-Stellen des Säuger-Expressionsvektors pcDNA I/Amp (Invitrogen) subclonierte und der so erhaltene Clon wurde pHMGR8-3' genannt. Die PCR-Primer (CCX.6b: 5'-CAT GGG CCC TGA TGG AAG CTT CCA GAA GGT G-3', CCX.9: 5'-GAT GAA TCC CGA GCA ATT CGC TCC-3') wurden kommerziell synthetisiert (Midland Certified Reagent Company) und verwendet, um ein PCR-Produkt, das die Nucleotide -108 bis 1184 des neuen menschlichen mGluR enthielt, von etwa 20 ng pCCX-1 unter den PCR-Bedingungen, die vorstehend für die Amplifikation des PCR-Produkts X120.15 beschrieben wurden, zu amplifizieren. Das so erhaltene 1,3 kb große PCR-Produkt wurde mit HindIII und EcoRI gespalten und in die entsprechenden Stellen des pHMGr8-3' subclonierte, um ein Expressionskonstrukt des neuen menschlichen mGluR in vollständiger Länge herzustellen. Das so erhaltene Expressionsplasmid (pHMR8b) wurde für eine Sequenzanalyse der DNA mittels der doppelsträngigen DNA-Sequenzierung mit Sequenase Version 2.0 (US Biochemicals) verwendet, um zu bestätigen, dass das subklonierte HindIII-EcoRI-Fragment keine PCR induzierten Mutationen enthält.

BEISPIEL 4: FUNKTIONALE AKTIVIERUNG DES NEUEN METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTORS, DER IN OOCYTEN VON XENOPUS EXPRIMIERT WURDE

[0240] Dieses Beispiel beschreibt die Aktivierung des neuen mGluR unter Verwendung einer Expressionsanalyse mit Oocyten von Xenopus. Die DNA pHMGR8b wurde durch die Restriktionsenzymspaltung linearisiert und die Sensestrang-cRNA mit Kappenstruktur wurde durch die Transkription mit der T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Die in vitro-transkribierte RNA wurde durch eine Präzipitation mit Ethanol konzentriert und die Größe und Integrität der RNA wurde auf denaturierenden Agarosegelen bestimmt. Die cRNAs für die Untereinheit des G-Protein gekoppelten einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanals (GIRK) der Ratte (Kubo et al., Nature 364: 802, 1993) und die Untereinheit des einwärtsgleichrichtenden Herz (CIR)-Kaliumkanals der Ratte (Ashford et al., Nature 370: 456, 1994; Krapivinsky et al., Nature 374: 135, 1995) wurden auf eine ähnliche Weise synthetisiert.

[0241] Die Oocyten von Xenopus wurden gemäß einem Standardprotokoll isoliert. In individuelle Oocyten wurde ein Gemisch von cRNA, das 5 ng HmGR8b, 1,5 ng GIRK und 1,5 ng CIR enthielt, oder ein zweites Kon-

trollgemisch, das nur 1,5 ng GIRK und 1,5 ng CIR enthielt, injiziert. Nach einer Inkubation von 4 Tagen wurde bei den Oocyten eine Spannungsklemme bei einem Haltepotential von -90 mV unter Verwendung üblicher Zwei-Elektroden-Spannungsklemmentechniken angebracht. Die Oocyten wurden mit einer Kochsalzlösung, die 25 mM KCl, 75 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH-Wert 7,5 enthielt, durchspült. Die Anwesenheit von 25 mM KCl verlagert das Gleichgewichtspotential von Kaliumionen (E_K) zu einem positiveren Potential (etwa -40 mV) und dies ermöglicht den Nachweis von Strömen durch die GIRK/CIR bei negativen Potentialen bis etwa -40 mV. Spannungsanstiege (Dauer 1 sec) wurden verwendet, um die Amplitude des Stroms bei Potentialen von -130 mV bis $+20$ mV unter kontrollierten Bedingungen und in der Anwesenheit von L-Glutamat zu bestimmen.

[0242] In einer Kochsalzlösung, die 25 mM KCl enthielt, stellte einen Spannungsanstieg von -130 mV bis $+20$ mV einen einwärtsgleichrichtenden Strom mit Potentialen von weniger als -40 mV (vergl. [Fig. 7](#), Kontrolle) für Oocyten her, in die das cRNA-Gemisch GIRK/CIR oder das cRNA-Gemisch HmGR8b/GIRK/CIR injiziert wurde. Die nach innen gerichtete Strömung ist in Oocyten, die GIRK/CIR exprimieren, typisch und zeigt das Grundniveau der Aktivierung von GIRK/CIR an.

[0243] In Oocyten, in die das cRNA-Gemisch HmGR8b/GIRK/CIR injiziert wurde, wurde die nach innen gerichtete Strömung durch die Verabreichung von 100–300 μ M L-Glutamat weiter erhöht und die Netto-Zunahmen des Stroms überstiegen typischerweise 1000 nA bei einem Membranpotential von -130 mV (vergl. [Fig. 7](#), 300 μ M L-Glutamat). Keine Veränderungen in den Stromamplituden wurden über -40 mV beobachtet. Diese Wirkung der Verabreichung von L-Glutamat wurde bei Oocyten, in die nur die cRNAs GIRK/CIR injiziert wurde, nicht beobachtet. Diese Daten deuten daraufhin, dass die Coexpression von HmGR8b und der cRNAs GIRK/CIR in Oocyten von *Xenopus* eine robuste Aktivierung des GIRK/CIR-Kaliumkanalkomplexes über die Aktivierung eines funktionalen menschlichen mGluR8-Rezeptors durch L-Glutamat herstellt.

BEISPIEL 5: KONSTRUKTION DES pCEP4-HmGR8b

[0244] Die Plasmid-DNA pHmGR8b wurde mit HindIII gespalten und die gespaltenen HindIII-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (New England Biolabs) in glatte Enden umgewandelt, wobei Standardbedingungen verwendet wurden (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Die DNA wurde anschließend mit XbaI gespalten und das 3,4 kb große Fragment, das den menschlichen mGluR8 codierte, wurde in Agarose mit einem niedrigen Schmelzpunkt nach der elektrophoretischen Trennung von der pcDNA I Amp-Vektor-DNA isoliert. Das 3,4 kb große Fragment wurde anschließend in dem im Handel erhältlichen episomalen Säuger-Expressionsvektor pCEP4 (Invitrogen) subclonierte. Um dies zu erreichen, wurde die Plasmid-DNA pCEP4 zuerst mit PvuII und anschließend mit NheI gespalten. Das 3,4 kb große und mit glatten Enden versehende XbaI-Fragment, das den menschlichen mGluR8 codiert, wurde anschließend in die PvuII- und NheI-Stellen von pCEP4 ligiert. Das so erhaltene Plasmid wurde pCEP4-HmGR8b genannt und seine Integrität wurde durch die Kartierung mittels Restriktionsenzymen und der doppelsträngigen DNA-Sequenzierung unter Verwendung von Sequenase Version 2.0 (US Biochemical) bestätigt.

BEISPIEL 6: TRANSFEKTION UND STABILE EXPRESSION DES NEUEN mGluR IN SÄUGERZELLEN

[0245] Dieses Beispiel stellt ein Verfahren für die Herstellung von stabil transfizierten Säugerzelllinien, die den neuen menschlichen mGluR exprimieren, zur Verfügung, es soll aber nicht einschränkend sein. Menschliche embryonale Nierenzellen (293, ATCC, CRL 1573) werden in einem Routineverfahren gezüchtet. Die Zellen werden in 10 cm-Zellkulturschalen in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (D-MEM), das 10% fötales Rinderserum (FBS) und 1 × Penicillin-Streptomycin (Life Technologies) enthält, ausplattiert, so dass sie nach einer Inkubation über Nacht ungefähr 70% konfluent sind. Um DNA für die Transfektion herzustellen, wird das Plasmid pCEP4-HmGR8b mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und in sterilem Wasser mit einer Konzentration von 1 μ g/ μ l resuspendiert. 14 Mikrogramm der Plasmid-DNA werden mit der Liposomenformulierung LipofectAMINE™ (Life Technologies) für 20 Minuten in 1,7 ml serumfreiem Opti-MEM (Life Technologies) inkubiert. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur werden 6,8 ml Opti-MEM zu dem Transfektionsgemisch zugegeben. Diese Lösung wird zu den Zellen zugegeben, die zweimal mit 5 ml Opti-MEM als Waschlösung gespült wurden. Die Zellen und das Transfektionsgemisch werden bei 37°C für 5 Stunden inkubiert und nach dieser Zeitspanne werden 8,5 ml Opti-MEM/20%FBS zugegeben, um die Konzentration von FBS auf 10% zu bringen. Nach einer Inkubation über Nacht wird das Medium zurück zu D-MEM mit 10% FBS, 1 × Penicillin-Streptomycin und 2 mM Glutamin gewechselt. Nach einer zusätzlichen Inkubation für 24 h werden die Zellen mit Trypsin gelöst und erneut in Medium ausplattiert, das 200 μ g/ml Hygromycin (Boehringer Mannheim) enthält. Diese Zellen, die wachsen, sollten pCEP4-HmGR8b enthalten, welches das Resistenzgen gegen Hygromycin codiert. Individu-

elle clonale Zelllinien werden gewonnen und gezüchtet, wobei Standardtechniken der Gewebekultur verwendet werden. Unterkulturen sowohl von individuellen clonalen Zelllinien als auch Pools von vielen solcher Zelllinien können durch die Trennung in frisches Gewebekulturmedium und das Ausplattieren in frische Kulturschalen bei einer Teilung der Zellen von 1:10 hergestellt werden. Die Expression der neuen menschlichen mGluR-mRNA der vorliegenden Erfindung in clonalen Zelllinien kann durch die Northern-Blot-Analyse bewertet werden, um Zelllinien zu identifizieren, die hohe Spiegel der mRNA-Expression zeigen.

BEISPIEL 7: FUNKTIONALE AKTIVIERUNG DES NEUEN mGluR, DER IN SÄUGERZELLEN EXPRIMIERT WIRD

[0246] Der neue menschliche mGluR ist wahrscheinlich ein Mitglied der Gruppe III der mGluR-Unterfamilie, die den mGluR4 der Ratte und des Menschen (Tanabe et al., Neuron 8: 169, 1992; Flor et al., Neuropharmacol 34: 149, 1994), den mGluR6 der Ratte (Nakajama et al., J Biol Chem 268: 11868, 1993), den mGluR7 der Ratte und des Menschen (Okamoto et al., J Biol Chem 269: 1231, 1994; Flor et al., Soc Neurosci Abstr 20: 468, 1994) und den mGluR8 der Maus (Duvoisin et al., J Neuroscience 15: 3075, 1995) einschließt. Es wird erwartet, dass ähnlich wie bei diesen anderen mGluRs der Gruppe III der neue menschliche mGluR einen G_i-gekoppelten Rezeptor codiert (hemmend an die Adenylylcyclase gekoppelt). Säugerzelllinien, die stabil mit dem Expressionskonstrukt pCEP4-HmGR8b transfiziert sind, können verwendet werden, um die Glutamat induzierte Hemmung der Adenylylcyclase zu untersuchen, die durch die Aktivierung des menschlichen mGluR8 vermittelt wird. Die Aktivität der Adenylylcyclase kann durch die Messung der Akkumulation von cAMP nach dem Kontakt der transfizierten Zellen mit Forskolin in Anwesenheit oder Abwesenheit von Glutamat oder von anderen Agonisten von mGluR beurteilt werden, wie vorstehend beschrieben wird (Tanabe et al., Neuron 8: 169, 1992; Nakajama et al., J Biol Chem 267: 2437, 1992). Kurz zusammengefasst werden die clonalen Zellen in Platten mit 12 Vertiefungen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung ausgesät und man lässt sie für 3 Tage wachsen. Nach einer Vorinkubation für 20 Minuten bei 37°C in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die 1 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) enthält, werden die Zellen in frischem PBS, das 10 µM Forskolin, 1 mM IBMX und die Testagonisten enthält, für 10 Minuten inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und die Reaktion wird mit Ethanol gestoppt. Die cAMP-Spiegel werden mittels eines Radioimmunassays mit einem Kit (Amersham) gemessen. Für die Behandlung mit dem Keuchhustentoxin (PTX) werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PTX für 11 Stunden bei 37°C vorinkubiert.

BEISPIEL 8: REKOMBINANTER REZEPTOR-BINDUNGSASSAY

[0247] Das Folgende ist ein Beispiel eines schnellen Screening-Assays, um Verbindungen zu erhalten, die an die Glutamat-Bindungsstelle des neuen menschlichen mGluRs binden. Der Screening-Assay misst die Bindung der Verbindungen an die rekombinanten mGluRs, die in stabil transfizierten Säugerzellen exprimiert werden (O'Hara et al., Neuron 11: 41, 1993). Man lässt die Zellen, die stabil mit dem Expressionskonstrukt pCEP4-HmGR8b transfiziert sind, bis zur Konfluenz wachsen, spült sie zweimal mit PBS und erntet sie durch das Abschaben in PBS. Die geernteten Zellen werden durch Zentrifugation bei 1000 UpM für 5 Minuten bei 4°C pelletiert und bei -70°C gefroren. Die Zellmembranen werden durch das zweimalige Homogenisieren des Pellets in 50 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,4), 10 mM EDTA, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,1 mM D,L-Benzylbernsteinsäure, 10 µg/ml Trypsininhibitor aus Truthahneiweis; die Zentrifugation bei 30.000 × g für 10 Minuten bei 4°C, die anschließende Behandlung mit DNase und die Gewinnung durch Zentrifugation hergestellt. Die Membransuspensionen werden zweimal gewaschen und in 50 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,4), 2,5 mM CaCl₂ (Tris/Ca) resuspendiert und die Gesamtproteinkonzentration wird auf 450–675 µg/ml eingestellt. Für die Bindungsassays werden 25 µl 200 nM [³H]Glutamat (Dupont NEN) zu 225 µl der Membransuspension in Anwesenheit oder Abwesenheit eines kalten Kompetitors (10 mM Glutamat) zugegeben und auf Eis für 1 Stunde inkubiert. Die Assays werden durch die schnelle Zugabe von vier ml eiskaltem Tris/Ca-Puffer und die sofortige Gewinnung der Membranen auf Whatman-GF/C-Filtern durch eine Vakuumfiltration gestoppt. Zehn ml Optifluor (Packard) werden zu den Filtern in Szintillationsgefäß en zugegeben und die gebundene Radioaktivität wird durch Szintillationszählung quantifiziert.

[0248] Das vorstehende Beispiel soll nicht einschränkend sein. In einem breiteren Zusammenhang können ähnliche Bindungsassays, die andere Radioliganden verwenden, die an die Glutamat-Bindungsstelle oder andere Stellen auf dem menschlichen mGluR binden, von dem Fachmann entwickelt werden. Solche Assays können verwendet werden, um die Bindung von Verbindungen an rekombinant exprimierte Rezeptoren oder Rezeptorfragmente zu messen. Die Verbindungen, die an den neuen menschlichen mGluR binden, können anschließend auf ihre Fähigkeit, eine oder mehrere funktionale Aktivitäten dieses mGluR zu modulieren, untersucht werden.

BEISPIEL 9: ABSUCHEN NACH MOLEKÜLEN UNTER VERWENDUNG VON OOCYTES VON XENOPUS

[0249] Oocyten, die mit dem cRNA-Gemisch HmGR8b/GIRK/CIR injiziert werden, wie in Beispiel 4 beschrieben wird, stellen ein System für die Bewertung der Wirkungen neuer Verbindungen auf den neuen menschlichen mGluR durch das Messen der Aktivität des einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanals zur Verfügung. Die funktionale Aktivierung des menschlichen mGluR8 in der Abwesenheit von Glutamat oder von anderen bekannten Agonisten von mGluR (Aktivität als Agonist); die Betonung auf der Aktivierung des menschlichen mGluR8 durch Glutamat oder durch andere bekannte Agonisten von mGluR (positive allosterische Modulation); oder die Blockierung der Aktivierung des menschlichen mGluR8 durch Glutamat oder durch andere bekannte Agonisten von mGluR (Aktivität als Antagonist) kann für Verbindungen bewertet werden.

BEISPIEL 10: ABSUCHEN NACH MOLEKÜLEN UNTER VERWENDUNG VON REKOMBINANTEN mGluRs,
DIE IN STABIL TRANSFIZIERTEN ZELLINNEN EXPRIMIERT WERDEN

[0250] Die Zelllinien, die stabil mit den Expressionskonstrukten des neuen menschlichen mGluR transfiziert werden, wie in Beispiel 6 beschrieben wird, können verwendet werden, um die Affinität von Verbindungen zu dem neuen menschlichen mGluR zu bewerten, indem Bindungsassays verwendet werden, die in Beispiel 8 beschrieben werden.

[0251] Zusätzlich können Zelllinien, die stabil mit den Expressionskonstrukten des menschlichen mGluR8 transfiziert sind, wie in Beispiel 6 beschrieben wird, verwendet werden, um die Wirkungen der Verbindungen auf den neuen menschlichen mGluR8 zu bewerten, indem die Herstellung von Forskolin stimuliertem cAMP gemessen wird, wie in Beispiel 7 beschrieben wird. Die funktionale Aktivierung des menschlichen mGluR8 wird die Forskolin stimulierte Herstellung von cAMP in solchen Zelllinien hemmen.

[0252] In einer anderen Ausführungsform können Zelllinien, die den menschlichen mGluR8 in Kombination mit den Untereinheiten der GIRK- und CIR-Kaliumkanäle coexprimieren, verwendet werden, um die Wirkung der Verbindungen auf den neuen mGluR8 zu beurteilen. Wie in dem Fall der Oocyten von Xenopus (Beispiel 4) sollte die funktionale Aktivierung des menschlichen mGluR8 zu einer Aktivierung der Aktivität der GIRK/CIR-Kaliumkanäle in den Zelllinien führen, die den menschlichen mGluR8, GIRK und CIR coexprimieren.

[0253] Die funktionale Aktivierung des menschlichen mGluR8 in Abwesenheit von Glutamat oder von anderen bekannten Agonisten von mGluR (Aktivität als Agonist); die Betonung auf der Aktivierung des menschlichen mGluR8 durch Glutamat oder durch andere bekannte Agonisten von mGluR (positive allosterische Modulation); oder die Blockierung der Aktivierung des menschlichen mGluR8 durch Glutamat oder durch andere bekannte Agonisten von mGluR (Aktivität als Antagonist) kann für die Verbindungen bewertet werden.

[0254] Andere Ausführungsformen finden sich in den nachfolgenden Ansprüchen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

- (i) Anmelder: NPS Pharmaceuticals, Inc.
420 Chipeta Way, Suite 240
Salt Lake City, UT 84108
USA
- (ii) ÜBERSCHRIFT DER ERFINDUNG: NEUER METABOTROPISCHER GLUTAMAT-REZEPTOR VOM MENSCHEN
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 16
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: Lyon & Lyon
(B) STRASSE: 633 West Fifth Street
Suite 4700
(C) STADT: Los Angeles
(D) BUNDESLAND: Kalifornien
(E) LAND: USA
(F) PLZ: 90071-2066
- (v) COMPUTER LESBARE FORM:
(A) ART DES MEDIUMS: 3,5" Diskette, 1,44 Mb-Speicher
(B) COMPUTER: IBM kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: IBM P.C. DOS 5.0
(D) SOFTWARE: FastSEQ für Windows 2.0
- (vi) DERZEITIGE DATEN DER ANMELDUNG:
(A) ANMELDUNGNUMMER: PCT/US97/09025
(B) DATUM DER EINREICHUNG: 6. Mai, 1997
(C) KLASIFIZIERUNG:
- (vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:
(A) ANMELDUNGNUMMER: 08/604,298
(B) DATUM DER EINREICHUNG: 21. Februar, 1996
- (viii) INFORMATIONEN BEZÜGLICH ANWALT/VERTRETER:
(A) NAME: Warburg, Richard J.
(B) REGISTRIERUNGNUMMER: 32,327
(C) REFERENZ/AKTENNUMMER: 212/044-PCT
- (ix) INFORMATIONEN BEZÜGLICH DER TELEKOMMUNIKATION:
(A) TELEFON: (213) 489-1600
(B) TELEFAX: (213) 955-0440
(C) TELEX: 67-3510

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	908 Aminosäuren
(B) ART:	Aminosäure
(C) STRANGFORM:	Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 1:

```

Met Val Cys Glu Gly Lys Arg Ser Ala Ser Cys Pro Cys Phe Phe Leu
 1           5          10          15

Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Trp Ile Leu Thr Met Met Gln Arg Thr His
 20          25          30

Ser Gln Glu Tyr Ala His Ser Ile Arg Val Asp Gly Asp Ile Ile Leu
 35          40          45

Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Glu Arg Gly Val Pro Cys
 50          55          60

Gly Glu Leu Lys Lys Glu Lys Gly Ile His Arg Leu Glu Ala Met Leu
 65          70          75          80

Tyr Ala Ile Asp Gln Ile Asn Lys Asp Pro Asp Leu Leu Ser Asn Ile
 85          90          95

Thr Leu Gly Val Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp Thr Tyr Ala
100         105         110

Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Glu Lys Asp Ala
115         120         125

Ser Asp Val Lys Cys Ala Asn Gly Asp Pro Pro Ile Phe Thr Lys Pro
130         135         140

Asp Lys Ile Ser Gly Val Ile Gly Ala Ala Ser Ser Val Ser Ile
145         150         155         160

Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Lys Ile Pro Gln Ile Ser Tyr
165         170         175

Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu Ser Asp Asn Thr Arg Tyr Asp Phe Phe
180         185         190

Ser Arg Val Val Pro Pro Asp Ser Tyr Gln Ala Gln Ala Met Val Asp
195         200         205

Ile Val Thr Ala Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu Ala Ser Glu
210         215         220

Gly Asn Tyr Gly Glu Ser Gly Val Glu Ala Phe Thr Gln Ile Ser Arg
225         230         235         240

Glu Ile Gly Gly Val Cys Ile Ala Gln Ser Gln Lys Ile Pro Arg Glu
245         250         255

Pro Arg Pro Gly Glu Phe Glu Lys Ile Ile Lys Arg Leu Leu Glu Thr
260         265         270

Pro Asn Ala Arg Ala Val Ile Met Phe Ala Asn Glu Asp Asp Ile Arg
275         280         285

Arg Ile Leu Glu Ala Ala Lys Lys Leu Asn Gln Ser Gly His Phe Leu
290         295         300

```

DE 697 37 990 T2 2008.09.11

Trp Ile Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile Ala Pro Val Tyr Gln
 305 310 315 320
 Gln Glu Glu Ile Ala Glu Gly Ala Val Thr Ile Leu Pro Lys Arg Ala
 325 330 335
 Ser Ile Asp Gly Phe Asp Arg Tyr Phe Arg Ser Arg Thr Leu Ala Asn
 340 345 350
 Asn Arg Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Phe Trp Glu Glu Asn Phe Gly
 355 360 365
 Cys Lys Leu Gly Ser His Gly Lys Arg Asn Ser His Ile Lys Lys Cys
 370 375 380
 Thr Gly Leu Glu Arg Ile Ala Arg Asp Ser Ser Tyr Glu Gln Glu Gly
 385 390 395 400
 Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr Ser Met Ala Tyr Ala Leu
 405 410 415
 His Asn Met His Lys Asp Leu Cys Pro Gly Tyr Ile Gly Leu Cys Pro
 420 425 430
 Arg Met Ser Thr Ile Asp Gly Lys Glu Leu Leu Gly Tyr Ile Arg Ala
 435 440 445
 Val Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro Val Thr Phe Asn Glu Asn
 450 455 460
 Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Ile Thr Asn
 465 470 475 480
 Lys Ser Thr Glu Tyr Lys Val Ile Gly His Trp Thr Asn Gln Leu His
 485 490 495
 Leu Lys Val Glu Asp Met Gln Trp Ala His Arg Glu His Thr His Pro
 500 505 510
 Ala Ser Val Cys Ser Leu Pro Cys Lys Pro Gly Glu Arg Lys Lys Thr
 515 520 525
 Val Lys Gly Val Pro Cys Cys Trp His Cys Glu Arg Cys Glu Gly Tyr
 530 535 540
 Asn Tyr Gln Val Asp Glu Leu Ser Cys Glu Leu Cys Pro Leu Asp Gln
 545 550 555 560
 Arg Pro Asn Met Asn Arg Thr Gly Cys Gln Leu Ile Pro Ile Ile Lys
 565 570 575
 Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val Val Pro Val Phe Val Ala Ile
 580 585 590
 Leu Gly Ile Ile Ala Thr Thr Phe Val Ile Val Thr Phe Val Arg Tyr
 595 600 605
 Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val
 610 615 620
 Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ser Ile Thr Phe Leu Met Ile
 625 630 635 640
 Ala Ala Pro Asp Thr Ile Ile Cys Ser Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly
 645 650 655
 Leu Gly Met Cys Phe Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg
 660 665 670

Ile His Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Ser Val Thr Ala Pro Lys
 675 680 685

Phe Ile Ser Pro Ala Ser Gln Leu Val Ile Thr Phe Ser Leu Ile Ser
 690 695 700

Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Val Trp Phe Val Val Asp Pro Pro His
 705 710 715 720

Ile Ile Ile Asp Tyr Gly Glu Gln Arg Thr Leu Asp Pro Glu Lys Ala
 725 730 735

Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Ser Asp Leu Ser Leu Ile Cys Ser
 740 745 750

Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile
 755 760 765

Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Thr Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly
 770 775 780

Phe Thr Met Tyr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile
 785 790 795 800

Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu Lys Met Tyr Ile Gln Thr Thr
 805 810 815

Thr Leu Thr Val Ser Met Ser Leu Ser Ala Ser Val Ser Leu Gly Met
 820 825 830

Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Gln Asn
 835 840 845

Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr
 850 855 860

Met Gln Ser Lys Leu Ile Gln Lys Gly Asn Asp Arg Pro Asn Gly Glu
 865 870 875 880

Val Lys Ser Glu Leu Cys Glu Ser Leu Glu Thr Asn Ser Lys Ser Ser
 885 890 895

Val Glu Phe Pro Met Val Lys Ser Gly Ser Thr Ser
 900 905

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 3833 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 2:

GC	GGGCGCCG	GTGGGAGTAT	TTGTTATTCA	CATGGAAGAG	AC	TTGGCGCC	TGCTAGGCCA	60						
G	C	T	CAGCCCC	CTCAGCCCAG	A	GATCAGCCA	CAA	GTCGCG	CG	CTGTGCTC	GC	CTCACGCG	120	
G	C	G	G	GGCGGGCGG	G	GGCGGTGACA	TGGAGCTGCG	GG	CCCCCGGC	GG	GCTTCCTC	180		
C	C	G	GG	ACCGCGCC	C	TGCGGGGAG	CAGGGAAATAA	TT	CTGCTACA	A	GGCTGATTT	CA	AGGACATG	240
A	T	T	G	CTGCGCC	T	CAGGAACC	TCAGATGTT	A	ATT	T	TTTG	AC	CTTCCAG	300
A	T	T	G	CTCAT	C	TAA	TTAAGGA	A	AA	A	AA	TT	CAACTG	360
G	C	A	G	TTAAGGA	A	AA	AAAATTG	A	AC	CTT	AGGG	GT	CTGATGGA	420
C	A	G	T	TTGCTAATGC	C	CACAGAGGCC	CCACAGAGGCC	T	TTT	CCC	CCAT	GG	GGCCCTGAT	480
G	T	A	G	GCCTCAGGTG	G	TGCCCTTTC	GTGCCCTTTC	T	TCT	GTGGCA	AG	AATAAA	ACT	540
T	T	GGG	T	TTGCAATA	C	CACCTGTGG	AGAAAATGGT	A	TGCGAGGG	A	AGCGATCAG	C	CCTCTTGC	600
T	GG	T	CTT	CTCTTGACCG	C	CAAGTTCTA	CTGGATCCTC	A	CAATGATGC					

AAAGAACTCA	CAGCCAGGAG	TATGCCATT	CCATACGGGT	GGATGGGGAC	ATTATTTGG	660
GGGGTCTCTT	CCCTGTCAC	GCAAAGGGAG	AGAGAGGGGT	GCCTTGCGGG	GAGCTGAAGA	720
AGGAAAAGGG	GATTCACAGA	CTGGAGGCCA	TGCTTATGC	AATTGACCAG	ATTAACAAGG	780
ACCCTGATCT	CCTTCCAAC	ATCACTCTGG	GTGTCCGCAT	CCTCGACACG	TGCTCTAGGG	840
ACACCTATGC	TTGGAGCAG	TCTCTAACAT	TCGTGCAGGC	ATTAATAGAG	AAAGATGCTT	900
CGGATGTGAA	GTGTGCTAAT	GGAGATCCAC	CCATTTCAC	CAAGCCGAC	AAGATTTCTG	960
GCGTCATAGG	TGCTGCAGCA	AGCTCCGTG	CCATCATGGT	TGCTAACATT	TTAAGACTTT	1020
TTAAGATACC	TCAAATCAGC	TATGCATCCA	CAGCCCCAGA	GCTAAGTGT	AACACCAGGT	1080
ATGACTTTT	CTCTCGAGTG	CTTCCGCTG	ACTCCTACCA	AGCCCAAGCC	ATGGTGGACA	1140
TCGTGACAGC	ACTGGGATGG	AATTATGTTT	CGACACTGGC	TTCTGAGGGG	AACTATGGTG	1200
AGAGCGGTGT	GGAGGCCTTC	ACCCAGATCT	CGAGGGAGAT	TGGTGGTGT	TGCATTGCTC	1260
AGTCACAGAA	AATCCCACGT	GAACCAAGAC	CTGGAGAATT	TGAAAAAAATT	ATCAAACGCC	1320
TGCTAGAAC	ACCTAATGCT	CGAGCAGTGA	TTATGTTTG	CAATGAGGAT	GACATCAGGA	1380
GGATATTGGA	AGCAGCAAAA	AAACTAAAC	AAAGTGGGC	TTTCTCTGG	ATTGGCTCAG	1440
ATAGTTGGGG	ATCCAAAATA	GCACCTGTCT	ATCAGCAAGA	GGAGATTGCA	GAAGGGGCTG	1500
TGACAATT	GCCCCAAAGA	GCATCAATTG	ATGGATTTGA	TCGATACATT	AGAACCGAA	1560
CTCTTGCCAA	TAATCGAAGA	AATGTGTGGT	TTGCAGAATT	CTGGGAGGAG	AATTTGGCT	1620
GCAAGTTAGG	ATCACATGGG	AAAAGGAACA	GTCATATAAA	GAAATGCACA	GGGCTGGAGC	1680
GAATTGCTCG	GGATTCATCT	TATGAACAGG	AAGGAAAGGT	CCAATTGTA	ATTGATGCTG	1740
TATATTCCAT	GGCTTACGCC	CTGCACAATA	TGCACAAAGA	TCTCTGCCCT	GGATACATTG	1800
GCCTTGTCC	ACGAATGAGT	ACCATGATG	GGAAAGAGCT	ACTTGGTTAT	ATTGGGGCTG	1860
TAATTTTAA	TGGCAGTGT	GGCACTCTG	TCATTTTAA	TGAAAACGGA	GATGCTCCTG	1920
GACGTTATGA	TATCTCCAG	TATCAAATAA	CCAACAAAAG	CACAGATAC	AAAGTCATCG	1980
GCCACTGGAC	CAATCAGCTT	CATCTAAAAG	TGGAAGACAT	GCAGTGGGCT	CATAGAGAAC	2040
ATACTCACCC	GGCGTCTGTC	TGCAAGCCTG	CGTGTAAAGCC	AGGGGAGAGG	AAGAAAACGG	2100
TGAAAGGGGT	CCCTTGCTGC	TGGCACTGTG	AACGCTGTG	AGGTTACAAC	TACCAGGTGG	2160
ATGAGCTGTC	CTGTGAAC	TGCCCTCTGG	ATCAGAGACC	CAACATGAAC	CGCACAGGCT	2220
GCCAGCTTAT	CCCCATCATC	AAATTGGAGT	GGCATTCTCC	CTGGGCTGTG	GTGCCTGTGT	2280
TTGTTGCAAT	ATTGGGAAATC	ATCGCCACCA	CCTTGTGAT	CGTGACCTTT	GTCCGCTATA	2340
ATGACACACC	TATCGTGAAGG	GCTTCAGGAC	CGGAACCTAG	TTACGTGCTC	CTAACGGGA	2400
TTTTCTCTG	TTATTCAATC	ACGTTTTAA	TGATTGAGC	ACCAGATACA	ATCATATGCT	2460
CCTCCGACG	GGTCTTCCTA	GGACTTGGCA	TGTGTTTCAG	CTATGCAGCC	CTTCTGACCA	2520
AAACAAACCG	TATCCACCGA	ATATTGAGC	AGGGGAAGAA	ATCTGTCACA	GCGCCCAAGT	2580
TCATTAGTCC	AGCATCTCG	CTGGTGTATCA	CCTTCAGCCT	CATCTCCGTC	CAGCTCTTG	2640
GAGTGTGTTG	CTGGTTGTT	GTGGATCCCC	CCCACATCAT	CATTGACTAT	GGAGAGCAGC	2700
GGACACTAGA	TCCAGAGAAG	GCCAGGGGAG	TGCTCAAGT	TGACATTCT	GATCTCTCAC	2760
TCATTGTTTC	ACTTGGATAC	AGTATCCTCT	TGATGGTCAC	TTGTAUTGTT	TATGCCATTA	2820
AAACGAGAGG	TGTCCCAGAG	ACTTCAATG	AAGCCAAACC	TATTGGATTT	ACCATGTATA	2880
CCACCTGCAT	CATTTGGTTA	GCTTCATCC	CCATCTTTT	TGGTACAGCC	CAGTCAGCAG	2940
AAAAGATGTA	CATCCAGACA	ACAACACTTA	CTGTCTCCAT	GAGTTAAAGT	GCTTCAGTAT	3000
CTCTGGGCAT	GCTCTATATG	CCCAAGGTTT	ATATTATAAT	TTTCATCCA	GAACAGAATG	3060
TCAAAAAACG	CAAGAGGAGC	TTCAAGGCTG	TGGTACAGC	TGCCACCATG	CAAAGCAAAC	3120
TGATCCAAA	AGGAAATGAC	AGACCAAATG	GCGAGGTGAA	AAGTGAACTC	TGTGAGAGTC	3180
TTGAAACAA	CAGTAAGTCA	TCTGTAGAGT	TTCCGATGGT	CAAGAGCGGG	AGCACTTCCT	3240
AATAGATCTT	CCTCTACAA	GACAACATAT	ATCAGTTACA	GCAATCATTC	AATCTGAAAC	3300
AGGGAAATGG	CACAATCTGA	AGAGACGTGG	TATATGATCT	TAAATGATGA	ACATGAGACC	3360
GCAAAAATTC	ACTCCTGGAG	ATCTCCGTAG	ACTACATCA	ATCAAATCAA	TAGTCAGTCT	3420
TGTAAGGAAC	AAAAATTAGC	CATGAGCCAA	AAGTATCAAT	AAACGGGGAG	TGAAGAAACC	3480
CGTTTATAC	AATAAAACCA	ATGAGTGTCA	AGCTAAAGTA	TTGCTTATT	ATGAGCAGTT	3540
AAAACAAATC	ACAAAAGGAA	AACTAATGTT	AGCTCGTGA	AAAAATGCTG	TTGAAATAAA	3600
TAATGTCTGA	TGTTATTCTT	GTATTTTCT	GTGATTGTGA	GAACCTCCGT	TCCTGTCCCA	3660
CATTGTTAA	CTTGATATAAG	ACAATGAGTC	TGTTTCTTGT	AATGGCTGAC	CAGATTGAAG	3720
CCCTGGGTTG	TGCTAAAAAT	AAATGCAATG	ATTGATGCAT	GCAATT	TTTACAAATAA	3780
TTTATTTCTA	ATAATAAAGG	AATGTTTGC	AAATGTTAAA	AAAAAA	AAA	3833

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | | |
|-----|-------------|----------------|
| (A) | LÄNGE: | 166 Basenpaare |
| (B) | ART: | Nucleinsäure |
| (C) | STRANGFORM: | Einzelstrang |
| (D) | TOPOLOGIE: | linear |

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 3:

CCCCCACATC	TACATTGACT	ATGGAGAGCA	GCGGACACTA	GATCCAGAGA	AGGCCAGGGG	60
AGTGCTCAAG	TGTGACATTT	CTGATCTCTC	ACTCATTGTT	TCACCTGGAT	ACAGTATCCT	120
CTTGATGGTC	ACTTCTACTG	TTTATGCCAT	AAAAACGAGA	GGTGTG		166

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 121 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(D) ANDERE INFORMATIONEN: Der Buchstabe "N" steht für A, C, T oder G.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 4:

CTACATTGAC TATGGAGAGC AGCGNACACT AGATCCAGAG AAGGCCAGGG GAGTGCTCAA	60
GTGTGACATT TCTGATCTCT CACTCATTG TTCACTTGGG TACAGTATCC TCTTGATGGT	120
C	121

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2724 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 5:

ATGGTATGCG AGGAAAGCG ATCACGCCTCT TGCCCTTGTT TCTTCCTCTT GACGCCAAG	60
TTCTACTGGA TCCTCACAAAT GATGCAAAGA ACTCACAGCC AGGAGTATGC CCATTCCATA	120
CGGGTGGATG GGGACATTAT TTGGGGGGGT CTCTTCCCTG TCCACGCAA GGGAGAGAGA	180
GGGGTGCCTT GTGGGGAGCT GAAGAAGGAA AAGGGGATTG ACAGACTGGA GGCCATGCTT	240
TATGCAATTG ACCAGATTAA CAAGGACCC GATCTCCTTT CCAACATCAC TCTGGGTGTC	300
CGCATCCTCG ACACGTGCTC TAGGGACACC TATGCTTGG AGCAGTCTCT AACATTCGTG	360
CAGGCATTAA TAGAGAAAAGA TGCTTCGGAT GTGAAGTGTG CTAATGGAGA TCCACCCATT	420
TTCACCAAGC CCGACAAGAT TTCTGGCGTC ATAGGTGCTG CAGCAAGCTC CGTGTCCATC	480
ATGGTTGCTA ACATTTAAC ACTTTAACG ATACCTCAA TCAGCTATGC ATCCACAGCC	540
CCAGAGCTAA GTGATAACAC CAGGTATGAC TTTTCTCTC GAGTGGTTCC GCCTGACTCC	600
TACCAAGCCC AAGCCATGGT GGACATCGTG ACAGCACTGG GATGGAATTG TGTTTCGACA	660
CTGGCTTCTG AGGGGAACTA TGTTGAGAGC GGTGTTGAGG CCTTCACCCA GATCTCGAGG	720
GAGATTGGTG GTGTTGCTAT TGCTCAGTCA CAGAAATCTC CACGTGAACC AAGACCTGGG	780
GAATTTGAAA AAATTATCAA ACCGCTGCTA GAAACACCTA ATGCTCGAGC AGTGATTATG	840
TTTGCCTAATG AGGATGACAT CAGGAGGATA TTGGAAAGCAG CAAAAAAACT AAACCAAAGT	900
GGGCATTTC TCTGGATTGG CTCAGATAGT TGGGGATCCA AAATAGCACC TGTCTATCAG	960
CAAGAGGAGA TTGCAGAAGG GGCTGTGACA ATTTGCCCA AACGAGCATIC AATTGATGGG	1020
TTTGATCGAT ACTTTAGAAC CCGAACTCTT GCCAATAATC GAAGAAATGT GTGGTTTGCA	1080
GAATTCTGGG AGGAGAATTG TGCTGCAAG TTAGGATCAC ATGGGAAAAG GAACAGTCAT	1140
ATAAAGAAAT GCACAGGGCT GGAGCGAAAT GCTCGGGATT CATCTTATGA ACAGGAAGGA	1200
AAGGTCAAAT TTGTAATTGA TGCTGTATAT TCCATGGCTT ACGCCCTGCA CAATATGCAC	1260
AAAGATCTCT GCCCTGGATA CATTGGCCTT TGTCACGAA TGACTACCATT TGATGGGAAA	1320
GAGCTACTTG GTTATATTG GGTGTAAAT TTTAATGGCA GTGCTGGCAC TCCTGTCACT	1380
TTTAATGAAA ACGGAGATGC TCCGGACGT TATGATATCT TCCAGTATCA AATAACCAAC	1440
AAAAGCACAG AGTACAAAGT CATCGGCCAC TGGACCAATC AGCTCTATCT AAAAGTGGAA	1500
GACATGCGAGT GGGCTCATAG AGAACACATACT CACCCGGCGT CTGCTCTGAG CCTGCCGTGT	1560
AAGCCGGGG AGAGGAAGAA AACGGTGAAGA GGGGTCCCTT GCTGCTGGCA CTGTGAACGC	1620
TGTGAAGGTT ACAACTACCA GGTGGATGAG CTGTCCTGTG AACTTTGCCCT TCTGGATCAG	1680
AGACCCAACA TGAACCGCAC AGGCTGCCAG CTTATCCCCA TCATCAAATT GGAGTGGCAT	1740
TCTCCCTGGG CTGTGGTGCC TGTGTTGTT GCAATATTGG GAATCATCGC CACCACCTT	1800
GTGATCGTGA CTTTGTCGCG CTATAATGAC ACACCTATCG TGAGGGCTTC AGGACCGGAA	1860
CTTAGTTACG TGCTCCCTAAC GGGGATTTT CTCTGTTATT CAATCACGTT TTTAATGATT	1920
GCAGCACCAG ATACAATCAT ATGCTCCCTC CGACGGGTCT TCCTAGGACT TGGCATGTGT	1980
TTCAAGCTATG CAGCCCTCT GACCAAAACA AACCGTATCC ACCGAATATT TGAGCAGGGG	2040
AAGAAATCTG TCACAGCGCC CAAGTTCAATT AGTCCAGCAT CTCAAGCTGGT GATCACCTTC	2100
AGCCTCATCT CCGTCCAGCT CCTGGAGTG TTTGTCGGT TTGTTGTGGA TCCCCCCCCAC	2160
ATCATCATTG ACTATGGAGA GCAGCGGACA CTAGATCCAG AGAAGGCCAG GGGAGTGGCTC	2220
AAGTGTGACA TTTCTGATCT CTCACTCATT TGTCACCTTG GATACAGTAT CCTCTTGATG	2280

GTCACTTGTA	CTGTTTATGC	CATTAAAACG	AGAGGGTGTCC	CAGAGACTTT	CAATGAAGCC	2340
AAACCTATTG	GATTACCAT	GTATACCACC	TGCATCATT	GGTAGCTT	CATCCCCATC	2400
TTTTTGGTA	CAGCCCAGTC	AGCAGAAAAG	ATGTACATCC	AGACAAACAC	ACTTACTGTC	2460
TCCATGAGTT	TAAGTGCTTC	AGTATCTCTG	GGCATGCTCT	ATATGCCCAA	GGTTTATATT	2520
ATAATTTTC	ATCCAGAACAA	GAATGTTCAA	AAACGCAAGA	GGAGCTTCAA	GGCTGTGGTG	2580
ACAGCTGCCA	CCATGCAAAG	CAAACGTATC	AAAAAAGGAA	ATGACAGACC	AAATGGCGAG	2640
GTGAAAAGTG	AACTCTGTGA	GAGTCTTGAA	ACCAACAGTA	AGTCATCTGT	AGAGTTCCG	2700
						2724
	ATGGTCAAGA	GCGGGAGCAC	TTCC			

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | | |
|-----|-------------|---------------|
| (A) | LÄNGE: | 33 Basenpaare |
| (B) | ART: | Nucleinsäure |
| (C) | STRANGFORM: | Einzelstrang |
| (D) | TOPOLOGIE: | linear |

(ix) MERKMAL:

- | | | |
|-----|-----------------------|---|
| (D) | ANDERE INFORMATIONEN: | Der Buchstabe "N" steht für Inosin.
Der Buchstabe "R" steht für A oder G.
Der Buchstabe "Y" steht für C oder T.
Der Buchstabe "S" steht für C oder G.
Der Buchstabe "M" steht für C oder A. |
|-----|-----------------------|---|

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 6

CCTGCTCGAG ACNARYCGGG ARCTYTTSCTA YMT

33

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | | |
|-----|-------------|---------------|
| (A) | LÄNGE: | 31 Basenpaare |
| (B) | ART: | Nucleinsäure |
| (C) | STRANGFORM: | Einzelstrang |
| (D) | TOPOLOGIE: | linear |

(ix) MERKMAL:

- | | | |
|-----|-----------------------|---|
| (D) | ANDERE INFORMATIONEN: | Der Buchstabe "N" steht für Inosin.
Der Buchstabe "W" steht für A oder T.
Der Buchstabe "Y" steht für C oder T.
Der Buchstabe "S" steht für C oder G.
Der Buchstabe "R" steht für A oder G. |
|-----|-----------------------|---|

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 7

CGGAATTCCG TTNCGGGWYT TGAASGCRWA S

31

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | | |
|-----|-------------|---------------|
| (A) | LÄNGE: | 32 Basenpaare |
| (B) | ART: | Nucleinsäure |
| (C) | STRANGFORM: | Einzelstrang |
| (D) | TOPOLOGIE: | linear |

(ix) MERKMAL:

- (D) ANDERE INFORMATIONEN: Der Buchstabe "R" steht für A oder G.
Der Buchstabe "N" in Position 24 steht für Inosin.
Der Buchstabe "M" steht für A oder C.
Der Buchstabe "N" in Position 27 steht für A, C, T oder G.
Der Buchstabe "Y" steht für C oder T.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 8

CCTGCTCGAG TCAAGGCTAC GRRNMNGAR YT

32

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | |
|-----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 34 Basenpaare |
| (B) ART: | Nucleinsäure |
| (C) STRANGFORM: | Einzelstrang |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |

(ix) MERKMAL:

- (D) ANDERE INFORMATIONEN: Der Buchstabe "N" in Position 26 steht für Inosin.
Der Buchstabe "K" steht für T oder G.
Der Buchstabe "N" in Position 29 steht für A, C, T oder G.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 9

CGGAATTCCA TTTGGCTTCG TTGAANKTNK CNNG

34

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | |
|-----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 24 Basenpaare |
| (B) ART: | Nucleinsäure |
| (C) STRANGFORM: | Einzelstrang |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 10

CTACATTGAC TATGGAGAGC AGCG

24

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | |
|-----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 24 Basenpaare |
| (B) ART: | Nucleinsäure |
| (C) STRANGFORM: | Einzelstrang |

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 11

GACCATCAAG AGGATACTGT ATCC

24

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	23 Basenpaare
(B) ART:	Nucleinsäure
(C) STRANGFORM:	Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 12

GATGTACATC CAGACAACAA CAC

23

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	24 Basenpaare
(B) ART:	Nucleinsäure
(C) STRANGFORM:	Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 13

CAGATTGTGC CATTTCCTG TTTC

24

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	24 Basenpaare
(B) ART:	Nucleinsäure
(C) STRANGFORM:	Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 14

GGAAATGACA GACCAAATGG CGAG

24

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	31 Basenpaare
(B) ART:	Nucleinsäure
(C) STRANGFORM:	Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NR.: 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- | | |
|-----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 24 Basenpaare |
| (B) ART: | Nucleinsäure |
| (C) STRANGFORM: | Einzelstrang |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 16

GATGAATCCC GAGCAATTG CTCC

24

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, welches ein metabotropes Glutamatrezeptorprotein codiert, welches mindestens 6 zusammenhängende Aminosäurereste der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Aminosäuresequenz codiert, welche die Aminosäurereste 894 bis 908 der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst.
3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Nucleinsäuremolekül ein metabotropes Glutamatrezeptorprotein codiert, welches die Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst.
4. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, welches die Sequenz wie in [Fig. 5](#) gezeigt umfasst.
5. Nucleinsäuremolekül, welches einen Teil der Sequenz eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst, wobei der Teil eine Länge von mindestens 18 Nucleotiden hat und mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt codiert.
6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, welches mindestens 18 zusammenhängende Nucleotide der Nucleinsäuresequenz der Nucleotide 2678 bis 2724 wie in [Fig. 5](#) gezeigt umfasst.
7. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5 oder 6, welches mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt codiert.
8. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 5 bis 7, welches eine Aminosäuresequenz codiert, welche eine extrazelluläre Domäne umfasst, welche in der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt enthalten ist, wobei die codierte Aminosäuresequenz im wesentlichen frei ist von membranüberspannenden Domänen und intrazellulären Domanteilen,
oder ein Nucleinsäuremolekül, welches eine dazu komplementäre Sequenz hat.
9. Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei das Nucleinsäuremolekül transkriptional mit einem zweiten Nucleinsäuremolekül verbunden ist, welches Transmembran- und intrazelluläre Domänen eines nicht-metabotropen Glutamatrezeptors codiert, oder ein Nucleinsäuremolekül, welches eine dazu komplementäre Sequenz hat.
10. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 5 bis 7, welches eine Aminosäuresequenz codiert, welche eine extrazelluläre Domäne und membranüberspannende Domänen umfasst, welche in der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt enthalten sind,
wobei die codierte Aminosäuresequenz im wesentlichen frei ist von intrazellulären Domänteilen,
oder ein Nucleinsäuremolekül, welches eine dazu komplementäre Sequenz hat.
11. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 5 bis 7, welches eine Aminosäuresequenz codiert,

welche eine Transmembrandomäne eines mGluR8-Rezeptors umfasst, welcher in der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt enthalten ist, wobei die codierte Aminosäuresequenz im wesentlichen frei ist von intrazellulären und extrazellulären Domänen, oder ein Nucleinsäuremolekül, welches eine dazu komplementäre Sequenz hat.

12. Nucleinsäuremolekül, welches eine Nucleinsäuresequenz hat, welche komplementär zu der Sequenz eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 11 ist.

13. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 12, welches eine genomische DNA-Sequenz, eine cDNA-Sequenz, oder eine RNA-Sequenz umfasst.

14. Polypeptid, welches mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst, und welches durch ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 13 codiert wird.

15. Polypeptid nach Anspruch 14, welches die Aminosäurereste der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst, welche die intrazelluläre Domäne eines mGluR8-Rezeptors umfassen.

16. Polypeptid nach Anspruch 14 oder 15, welches mindestens 12 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst.

17. Biologisch funktioneller Expressionsvektor, welcher ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 13 umfasst.

18. Prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, welche mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 17 transformiert oder transfiziert ist.

19. Wirtszelle nach Anspruch 18, wobei die Wirtszelle eine Vertebratenzelle ist.

20. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptidprodukts, wobei das Verfahren umfasst: Züchten von prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, welche mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 19 transformiert oder transfiziert sind, unter geeigneten Nährstoffbedingungen, so dass die Expression des Polypeptidprodukts gewährleistet ist, welches von dem Nucleinsäuremolekül, welches in dem Expressionsvektor eingefügt ist, codiert wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20, welches weiterhin die Isolierung des Polypeptidprodukts umfasst.

22. Verfahren zum Erzeugen eines nicht-menschlichen transgenen Säugers, welches den Schritt des Einfügens eines Nucleinsäuremoleküls in einen nicht-menschlichen Säuger umfasst, wobei das Nucleinsäuremolekül im wesentlichen aus einer Nucleinsäuresequenz besteht, welche ein Protein mit der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt codiert, oder einen biologisch funktionalen Teil davon, welcher mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 904 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst.

23. Verfahren zum Screenen auf eine Verbindung, welche an einen metabotropen Glutamatrezeptor bindet oder die Aktivität eines metabotropen Glutamatrezeptors moduliert, wobei der metabotrope Glutamatrezeptor im wesentlichen aus der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt besteht, oder einen biologisch funktionalen Teil davon, welcher mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst, das Verfahren umfassend:

(a) Einbringen des metabotropen Glutamatrezeptors und einer potentiellen Verbindung in ein verträgliches Medium; und

(b) Überwachen der Bindung oder Modulation durch physikalisch nachweisbare Mittel, dabei Identifizieren derjenigen Verbindungen, welche mit dem metabotropen Glutamatrezeptor interagieren oder die Aktivität des metabotropen Glutamatrezeptors modulieren.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei der metabotrope Glutamatrezeptor ein chimärer Rezeptor ist mit (a) einer extrazellulären Domäne, welche eine Aminosäuresequenz hat, welche in der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt enthalten ist; und

(b) einer intrazellulären Domäne eines Rezeptors, welcher sich von dem Rezeptor mit der Aminosäuresequenz wie in [Fig. 1](#) gezeigt unterscheidet.

25. Verfahren nach Anspruch 23, welches einen kompetitiven Bindungsassay mit einem bekannten markierten Bindungssagens umfasst.
26. Verfahren nach Anspruch 23, wobei der metabotrope Glutamatrezeptor von einer Zelle exprimiert wird, welches weiterhin das Überwachen der Wirkung der Verbindung auf die Zelle umfasst.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Zelle eine eukaryontische Zelle ist.
28. Arzneimittel, welches das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.
29. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer neurologischen Erkrankung oder Störung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glutamatexcitotoxizität, globaler und fokaler ischämischer und hämorrhagischer Schlaganfall, Schädeltrauma, Rückenmarksverletzung, Sauerstoffmangel-induzierte Nervenzellschädigung, Epilepsie, oder neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimersche Krankheit, Parkinsonsche Krankheit oder Huntingtonsche Krankheit.
30. Arzneimittel, welches ein Nucleinsäuremolekül umfasst, welches die Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors spezifisch hemmt, wobei der metabotrope Glutamatrezeptor mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger, und wobei das Nucleinsäuremolekül ein Antisenseoligonucleotid oder ein Ribozym ist, welches gegen eine Nucleinsäure gerichtet ist, welche den metabotropen Glutamatrezeptor codiert.
31. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls, welches die Expression eines metabotropen Glutamatrezeptors spezifisch hemmt, wobei der metabotrope Glutamatrezeptor mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer neurologischen Erkrankung oder Störung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glutamatexcitotoxizität, globaler und fokaler ischämischer und hämorrhagischer Schlaganfall, Schädeltrauma, Rückenmarksverletzung, Sauerstoffmangel-induzierte Nervenzellschädigung, Epilepsie, oder neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimersche Krankheit, Parkinsonsche Krankheit oder Huntingtonsche Krankheit, wobei das Nucleinsäuremolekül ein Antisenseoligonucleotid oder ein Ribozym ist, welches gegen eine Nucleinsäure gerichtet ist, welche den metabotropen Glutamatrezeptor codiert.
32. Agens, welches einen metabotropen Glutamatrezeptor bindet, wobei das Agens ein gereinigter Antikörper ist, und wobei das Agens in der Lage ist, ein Polypeptid, welches die Aminosäuresequenz der Reste 894 bis 908 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfasst, selektiv zu binden, und ein pharmazeutisch verträglicher Puffer.
33. Bindendes Agens nach Anspruch 32, wobei der Antikörper an ein Toxin gekoppelt ist.
34. In vitro-Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung eines Patienten, umfassend die Schritte:
(a) Identifizieren der Anzahl oder Lokalisation eines oder mehrerer metabotroper Glutamatrezeptoren in dem Patienten, wobei die metabotropen Glutamatrezeptoren mindestens 6 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 894 bis 908 wie in [Fig. 1](#) gezeigt umfassen; und
(b) Vergleichen der Anzahl oder Lokalisation mit derjenigen, die in einem normalen Patienten beobachtet wird, oder in einem Patienten, von dem bekannt ist, dass er die Erkrankung oder den Zustand hat.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

10	20	30	40	50	60	70
*	*	*	*	*	*	*
MVCEGKRSAS CPCFFLTLAK FYWILTMQR THSQEYAHSI RVDGDIILGG LFPVHAKER GVPGEKLKE						
80	90	100	110	120	130	140
*	*	*	*	*	*	*
KGIIHRLEAML YAIDQINKDP DLLSNITLGV RILOTCRDT YALEQSLTFV QALIEKDASD VKCANGDPP						
150	160	170	180	190	200	210
*	*	*	*	*	*	*
FTKPOKISGV IGAAASSVSI MVANILRLFK IPQISYASTA PELSONTRYO FFSRVVPPDS YQAQAMVDIV						
220	230	240	250	260	270	280
*	*	*	*	*	*	*
TALGWNYVST LASEGNYGES GVEAFTQISR EIGGVCIAQS QKIPREPRPG EFEKIIKRLL ETPNARAVIM						
290	300	310	320	330	340	350
*	*	*	*	*	*	*
FANEDDIRRI LEAAKKLNQS GHFLWIGSOS WGSKIAPVYQ QEEIAEGAVT ILPKRASIDG FDRYFRSRTL						
360	370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*	*
ANNRRNVWFA EFWEENFGCK LGSHGKRNSH IKKCTGLERI ARDSSYEQEG KVQFVIDAVY SMAYALHNMH						
430	440	450	460	470	480	490
*	*	*	*	*	*	*
KDLCPGYIGL CPRMSTIDGK ELLGYIRAVN FNNGSAGTPVT FNENGDAAPGR YDIFQYQITN KSTEYKVIGH						
500	510	520	530	530	550	560
*	*	*	*	*	*	*
WTNQLHLKVE DMQWAHREHT HPASVCSLPC KPGERKKTVK GVPCCWHCER CEGNYQVDE LSCELCPLDQ						
570	580	590	600	610	620	630
*	*	*	*	*	*	*
RPNMNRTGCQ LIPIIKLEWH SPWAVVPVFV AILGIIATTF VIVTFVRYND TPIVRASGRE LSYVLLTGIF						
640	650	660	670	680	690	700
*	*	*	*	*	*	*
LCYSITFLMI AAPDTIICSF RRVFLGLGMC FSYALLTKT NRIHRIFEQG KKSVTAPKFI SPASQLVITF						
710	720	730	740	750	760	770
*	*	*	*	*	*	*
SLISVQLLGV FWFWVVDPFH IIIDYGEQRT LDPEKARGVL KCDISDLSLI CSLGYSILLM VTCTVYAIKT						
780	790	800	810	820	830	840
*	*	*	*	*	*	*
RGVPETFNEA KPIGFTMYTT CIIWLAFIPI FFGTAQSAEK MYIQTTTLTV SMSLSASVSL GMLYMPKVYI						
850	860	870	880	890	900	
*	*	*	*	*	*	
I IFHPEQNQ KRKRSFKAVV TAATMQSKLI QKGNDRPNGE VKSELCESLE TNSKSSVEFP MVKSGSTS						

Fig. 1

.506 -496 -486 -476 -466 -456
 * * * * * *

GCGGCCGCCG GTGGAGTAT TTGTTATTCA CATGGAAGAG ACTTGGCGCC TGCTAGGCCA

-446 -436 -426 -416 -406 -396
 * * * * * *

GCTCAGCCCC CTCAGCCCCAG AGATCAGCCA CAAGTGCAGC CGCTGTGCTC GCCTCACGCG

-386 -376 -366 -356 -346 -336
 * * * * * *

GCGGCCGGCGG CGGCAGGGCGG GCAGCGTGACA TGGAGCTGCG GGCCCCCGGC GGGCTTCCTC

-326 -316 -306 -296 -286 -276
 * * * * * *

ACCGCGCCCT CTGCGGGGAG CAGGAAATAA TTCTGCTACA AGGCTGATT CAAGGACATG

-226 -256 -246 -236 -226 -216
 * * * * * *

AATTGTTGAC CTCATCCCAA CATCAGAACCC TCAGATGTTA TAATTTTGCA ACCATTCCAG

-206 -196 -186 -176 -166 -156
 * * * * * *

GCAAGTTGAT CTTATAAGGA AATAAAATG AACCTTAGGG GTCTGATGGA AATTCACTGT

-146 -136 -126 -116 -106 -96
 * * * * * *

GACATTCAAA TCAAGAAAAC TTGCTAATGC CCACAGAGCC TTTTCCCCAT GGGCCCTGAT

-86 -76 -66 -56 -46 -36
 * * * * * *

GGTAGCCTCC AGAAGGTGCA GCCTCAGGTG GTGCCCTTC TTCTGTGGCA AGAATAAACT

-26 -16 -6 5 15 25
 * * * * * *

TTGGGTCTTG GATTGCAATA CCACCTGTGG AGAAAATGGT ATGGGAGGGGA AAGCGATCAG

35 45 55 65 75 85
 * * * * * *

CCTCTTGCCC TTGTTCTTC CTCTTGACCG CCAAGTTCTA CTGGATCCTC ACAATGATGC

95 105 115 125 135 145
 * * * * * *

AAAGAACTCA CAGCCAGGAG TATGCCATT CCATACGGGT GGATGGGGAC ATTATTTGG

155 165 175 185 195 205
 * * * * * *

GGGGTCTCTT CCCTGTCCAC GCAAAGGGAG AGAGAGGGGT GCCTTGTGGG GAGCTGAAGA

215 225 235 245 255 265
 * * * * * *

AGGAAAAGGG GATTACAGA CTGGAGGCCA TGCTTATGC AATTGACCAG ATTAACAAGG

Fig. 2A

275	285	295	305	315	325
*	*	*	*	*	*
ACCCCTGATCT CCTTCCAAC ATCACTCTGG GTGTCCGCAT CCTCGACACG TGCTCTAGGG					
335	345	355	365	375	385
*	*	*	*	*	*
ACACCTATGC TTGGGAGCAG TCTCTAACAT TCGTGCAGGC ATTAATAGAG AAAGATGCTT					
395	405	415	425	435	445
*	*	*	*	*	*
CGGATGTGAA GTGTGCTAAT GGAGATCCAC CCATTTCAC CAAGCCCCGAC AAGATTTCTG					
455	465	475	485	495	505
*	*	*	*	*	*
GCGTCATAGG TGCTGCAGCA AGCTCCGTGT CCATCATGGT TGCTAACATT TTAAGACTTT					
515	525	535	545	555	565
*	*	*	*	*	*
TTAAGATAACC TCAAATCAGC TATGCATCCA CAGCCCCAGA GCTAAGTGAT AACACCAGGT					
575	585	595	605	615	625
*	*	*	*	*	*
ATGACTTTT CTCTCGAGTG GTTCCGCCTG ACTCCTACCA AGCCAAGCC ATGGTGGACA					
635	645	655	665	675	685
*	*	*	*	*	*
TCGTGACAGC ACTGGGATGG AATTATGTT CGACACTGGC TTCTGAGGGG AACTATGGTG					
695	705	715	725	735	745
*	*	*	*	*	*
AGAGCGGTGT GGAGGCCTTC ACCCAGATCT CGAGGGAGAT TGGTGGTGTT TGCATTGCTC					
755	765	775	785	795	805
*	*	*	*	*	*
AGTCACAGAA AATCCCACGT GAACCAAGAC CTGGAGAATT TGAAAAAATT ATCAAACGCC					
815	825	835	845	855	865
*	*	*	*	*	*
TGCTAGAAAC ACCTAATGCT CGAGCAGTGA TTATGTTGC CAATGAGGAT GACATCAGGA					
875	885	895	905	915	925
*	*	*	*	*	*
GGATATTGGA AGCAGCAAAA AACTAAACC AAAGTGGCA TTTCTCTGG ATTGGCTCAG					
935	945	955	965	975	985
*	*	*	*	*	*
ATAGTTGGGG ATCCAAAATA GCACCTGTCT ATCAGCAAGA AGAGATTGCA GAAGGGGCTG					
995	1005	1015	1025	1035	1045
*	*	*	*	*	*
TGACAATTT GCCCAAACGA GCATCAATTG ATGGATTGAG TCGATACTTT AGAAGCCGAA					

Fig. 2B

1055	1065	1075	1085	1095	1105
*	*	*	*	*	*
CTCTGCCAA TAATCGAAGA AATGTGTGGT TTGCAGAATT CTGGGAGGAG AATTTGGCT					
1115	1125	1135	1145	1155	1165
*	*	*	*	*	*
GCAAGTTAGG ATCACATGGG AAAAGGAACA GTCATATAAA GAAATGCACA GGGCTGGAGC					
1175	1185	1195	1205	1215	1225
*	*	*	*	*	*
GAATTGCTCG GGATTCATCT TATGAACAGG AAGGAAAGGT CCAATTGTA ATTGATGCTG					
1235	1245	1255	1265	1275	1285
*	*	*	*	*	*
TATATTCCAT GGCTTACGCC CTGCACAATA TGACACAAAGA TCTCTGCCCT GGATACATTG					
1295	1305	1315	1325	1335	1345
*	*	*	*	*	*
GCCTTTGTCC ACGAATGAGT ACCATTGATG GGAAAGAGCT ACTTGTTAT ATTGGGGCTG					
1355	1365	1375	1385	1395	1405
*	*	*	*	*	*
TAAATTTAA TGGCAGTGCT GGCACTCCTG TCACTTTAA TGAAAACGGA GATGCTCCTG					
1415	1425	1435	1445	1455	1465
*	*	*	*	*	*
GACGTTATGA TATCTTCCAG TATCAAATAA CCAACAAAAG CACAGAGTAC AAAGTCATCG					
1475	1485	1495	1505	1515	1525
*	*	*	*	*	*
GCCACTGGAC CAATCAGCTT CATCTAAAAG TGGAAGACAT GCAGTGGGCT CATAGAGAAC					
1535	1545	1555	1565	1575	1585
*	*	*	*	*	*
ATACTCACCC GGCCTCTGTC TGCAAGCTGC CGTGTAAGCC AGGGGAGAGG AAGAAAACGG					
1595	1605	1615	1625	1635	1645
*	*	*	*	*	*
TGAAAGGGGT CCCTTGCTGC TGGCACTGTG AACGCTGTGA AGTTACAAC TACCAGGTGG					
1655	1665	1675	1685	1695	1705
*	*	*	*	*	*
ATGAGCTGTC CTGTGAACCT TGCCCTCTGG ATCAGAGACC CAACATGAAC CGCACAGGCT					
1715	1725	1735	1745	1755	1765
*	*	*	*	*	*
GCCAGCTTAT CCCCCATCATC AAATTGGAGT GGCATTCTCC CTGGGCTGTG GTGCCTGTGT					
1775	1785	1795	1805	1815	1825
*	*	*	*	*	*
TTGTTGCAAT ATTGGGAATC ATGCCACCA CCTTTGTGAT CGTGACCTT GTCCGCTATA					
1835	1845	1855	1865	1875	1885
*	*	*	*	*	*
ATGACACACC TATCGTGAGG GCTTCAGGAC GCGAACCTAG TTACGTGCTC CTAACGGGA					

Fig.2C

1895 *	1905 *	1915 *	1925 *	1935 *	1945 *
TTTTCTCTG TTATTCAATC ACGTTTTAA TGATTGCAGC ACCAGATACA ATCATATGCT					
1955 *	1965 *	1975 *	1985 *	1995 *	2005 *
CCTTCCGACG GGTCTTCCTA GGACTGGCA TGTGTTTCAG CTATGCAGCC CTTCTGACCA					
2015 *	2025 *	2035 *	2045 *	2055 *	2065 *
AAACAAACCG TATCCACCGA ATATTTGAGC AGGGGAAGAA ATCTGTCACA GCGCCCAAGT					
2075 *	2085 *	2095 *	2105 *	2115 *	2125 *
TCATTAGTCC AGCATCTCAG CTGGTGATCA CCTTCAGCCT CATCTCCGTC CAGCTCCTTG					
2135 *	2145 *	2155 *	2165 *	2175 *	2185 *
GAGTGTGTTGT CTGGTTTGTT GTGGATCCCC CCCACATCAT CATTGACTAT GGAGAGCAGC					
2195 *	2205 *	2215 *	2225 *	2235 *	2245 *
GGACACTAGA TCCAGAGAAAG GCCAGGGGAG TGCTCAAGTG TGACATTTCT GATCTCTCAC					
2255 *	2265 *	2275 *	2285 *	2295 *	2305 *
TCATTTGTTCACTTGGATAC AGTATCCTCT TGATGGTCAC TTGTAATGTT TATGCCATTA					
2315 *	2325 *	2335 *	2345 *	2355 *	2365 *
AAACGAGAGG TGTCAGAG ACTTTCAATG AAGCCAAACC TATTGGATT ACCATGTATA					
2375 *	2385 *	2395 *	2405 *	2415 *	2425 *
CCACCTGCAT CATTGGTTA GCTTTCATCC CCATCTTTTG TGGTACAGCC CAGTCAGCAG					
2435 *	2445 *	2455 *	2465 *	2475 *	2485 *
AAAAGATGTA CATCCAGACA ACAACACTTA CTGTCTCCAT GAGTTAACGT GCTTCAGTAT					
2495 *	2505 *	2515 *	2525 *	2535 *	2545 *
CTCTGGGCAT GCTCTATATG CCCAAGGTTT ATATTATAAT TTTTCATCCA GAACAGAAATG					
2555 *	2565 *	2575 *	2585 *	2595 *	2605 *
TTCAAAAAACG CAAGAGGAGC TTCAAGGCTG TGGTGACAGC TGCCACCATG CAAAGCAAAC					
2615 *	2625 *	2635 *	2645 *	2655 *	2665 *
TGATCCAAAA AGGAAATGAC AGACCAAATG GCGAGGTGAA AAGTGAACTC TGTGAGAGTC					
2675 *	2685 *	2695 *	2705 *	2715 *	2725 *
TTGAAACCAA CAGTAAGTCA TCTGTAGAGT TTCCGATGGT CAAGAGCGGG AGCACTTCCT					

Fig. 2D

2735	2745	2755	2765	2775	2785
*	*	*	*	*	*
AATAGATCTT CCTCTACCAA GACAACATAT ATCAGTTACA GCAATCATTG AATCTGAAAC					
2795	2805	2815	2825	2835	2845
*	*	*	*	*	*
AGGGAAATGG CACAATCTGA AGAGACGTGG TATATGATCT TAAATGATGA ACATGAGACC					
2855	2865	2875	2885	2895	2905
*	*	*	*	*	*
GCAAAAATTC ACTCCTGGAG ATCTCCGTAG ACTACAATCA ATCAAATCAA TAGTCAGTCT					
2915	2925	2935	2945	2955	2965
*	*	*	*	*	*
TGTAAGGAAC AAAAATTAGC CATGAGCCAA AAGTATCAAT AAACGGGGAG TGAAGAAC					
2975	2985	2995	3005	3015	3025
*	*	*	*	*	*
CGTTTATAC AATAAACCA ATGAGTGTCA AGCTAAAGTA TTGCTTATTG ATGAGCAGTT					
3035	3045	3055	3065	3075	3085
*	*	*	*	*	*
AAAACAAATC ACAAAAGGAA AACTAATGTT AGCTCGTGA AAAATGCTG TTGAAATAAA					
3095	3105	3115	3125	3135	3145
*	*	*	*	*	*
TAATGTCTGA TGTTATTCTT GTATTTTCT GTGATTGTGA GAACTCCCGT TCCTGTCCCC					
3155	3165	3175	3185	3195	3205
*	*	*	*	*	*
CATTGTTAA CTTGTATAAG ACAATGAGTC TGTTCTTGT AATGGCTGAC CAGATTGAAG					
3215	3225	3235	3245	3255	3265
*	*	*	*	*	*
CCCTGGGTTG TGCTAAAAAT AAATGCAATG ATTGATGCAT GCAATTTTT ATACAAATAA					
3275	3285	3295	3305	3315	
*	*	*	*	*	
TTTATTTCTA ATAATAAAGG AATGTTTGC AAATGTTAAA AAAAAAAA AAA					

Fig. 2E

10 20 30 40 50
* * * * *
CCCCCACATC TACATTGACT ATGGAGAGCA GCGGA~~C~~ACTA GATCCAGAGA

60 70 80 90 100
* * * * *
AGGCCAGGGG AGTGCTCAAG TGTGACATT CTGATCTCTC ACTCATTGT

110 120 130 140 150
* * * * *
TCACTTGGAT ACAGTATCCT CTTGATGGTC ACTTCTACTG TTTATGCCAT

160
*
TAAAACGAGA GGTGTC

Fig. 3

10 20 30 40 50
* * * * *
CTACATTGAC TATGGAGAGC AGCGNACACT AGATCCAGAG AAGGCCAGGG

60 70 80 90 100
* * * * *
GAGTGCTCAA GTGTGACATT TCTGATCTCT CACTCATTTG TTCACTTGGA

110 120
* *
TACAGTATCC TCTTGATGGT C

Fig. 4

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 * * * * * * * * * *
 ATGGTATGCG AGGAAAGCG ATCAGGCTCT TGCCTCTGT CTCTCCCTT GACCGCAAG TCTACTGGA TCCCTACAAT GATGCCAAGA ACTCACAGCC
 * * * * * * * * * *
 AGGAGTATGC CCATTCCATA CGGGGGATG GGGACATTAT 130 140 150 160 170 180 190 200
 * * * * * * * * * *
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 * * * * * * * * * *
 TCTCTCCCTG TTGGGGGGT CTCTCCCTG TCCACGCCAA GGGAGAGAGA GGGGGAGCT GTGGGGAGCT
 * * * * * * * * * *
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 * * * * * * * * * *
 GAAGAAGGAA AAGGGGATTTC ACAGACTGGA GGCCATGCTT TATGCAATTG ACCAGATTAA CAAGGACCTT GAICCTCTT CCAACATCAC TCTGGGTGTC
 * * * * * * * * * *
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 * * * * * * * * * *
 CGCATCTCG ACACGTGCTC TAGGGACACC TATGCTTGG AGGAGTCTCT AACATTGCTG CAGGCCATTAA TAGAGAAAGA TGCTTCGGAT GTGAAGTGTC
 * * * * * * * * * *
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 * * * * * * * * * *
 CTAATGGAGA TCCACCCATT TTCAACAGC CCGACAAGAT TTCTGGGTC ATAGGTGCTG CAGCAAGCTC CGTGTCCATC ATGGTTGCTA ACATTTAAAG
 * * * * * * * * * *
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 * * * * * * * * * *
 ACTTTTAAG ATACCTCAAATCAGCTATGCAATCCACAGCC CCAGAGCTAA GTGATAAACAC CAGGTATGAC TTTTTCTCTC GAGTGGTTCC GCCTGACTCC
 * * * * * * * * * *
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 * * * * * * * * * *
 TACCAAGCCC AAGCCATGGT GGACATUGTG ACAGGACTCTGG GATGGAATTAA TGTTTCGACA CTGGCTCTG AGGGAAACTA TGGTGAGAGC GTGTGGAGG
 * * * * * * * * * *
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 * * * * * * * * * *
 CCTTCACCCA GATTCGAGG GAGATTGGAT GCTCTGGAT TCTCAGTCA AGAAAATCC CACGTGAACC AAGACCTGGA GAATTGAAA AAATTATCAA

Fig. 5A

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 * * * * * * * * * * *
 ACGCTGCTA GAAACACCTA ATGCTCGAGC AGTGATTATG TTGGCAATG AGGTGACAT CAGGAGATA TTGGAGGCAG CAAAAAAACT AAACCAAAGT
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 * * * * * * * * * *
 GGGCATTTC TCTGGATTG CTCAGATAGT TGGGGATCCA AAATAGGCC ACC TGTCTATCAG CAAGAGGAGA TTGGAGAAGG GGCCTGTGACA ATTTCGCCCA
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 * * * * * * * * * *
 AACAGGACATC AATTGATGGAA TTGGATCGAT ACTTTAGAAG CGGAACACTCTT GCCAATAATC GAAGAAATGT GTGGTTTGCA GAATTCTGGGG AGGAGAATT
 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * * * * * *
 TGGCTGCAAG TTAGGATCAC ATGGGAAAAG GAACAGTCAT ATAAGAAAT GCACAGGGCT GGAGCGAATT GCTCGGGATT CATCTTATGA ACAGGAAGGA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 * * * * * * * * * *
 AAGGTCCAAAT TTGTAATTGA TTGCTGTATAI TCCATGGCTT AGCCCTGCA CAATATGCCAC AAAGATCTCT GCCCTGGATA CATTGGGCTT TGTCCACGAA
 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 * * * * * * * * * *
 TGAGTACCAT TGATGGAAA GAGCTACTTG GTTATACTG GGCTGTAAAT TTAATGGCA GTGCTGGCAC TCCGTCACT TTAAATGAAA ACGGAGATGCA
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 * * * * * * * * * *
 TCCTGGACGT TATGATACTT TCCAGTATCA AATAACCAAC AAAAGCACAG AGTACAAAGT CATCGGCCAC TGGACCAATC AGCTTCATCT AAAAGTGGAA
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 * * * * * * * * * *
 GACATGCACT GGGCTCATAG AGAACATACT CACCCGGCTT CTGCTGGAG CCTGCCGTGT AAGCCAGGGG AGAGGAAGAA AACGGTGAAGA GGGGTCCCTT

Fig. 5B

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 * * * * * * * * * * * *
 GCTGCTGGCA CTGTGAACGC TGTTGAAAGTT ACAACTACCA GGTTGGATGAG CTGTCCCTGIG AACTTTGGCC TCTGGATCAG AGACCCAACA TGAACCGCAC
 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 * * * * * * * * * * * *
 AGGCTGCCAG CTTATCCCCA TCATCAAATT GGAGTGGAAT TCTCCCCTGGG CTGTGGTGCCT TGTTTGTGTT GCATAATTGG GAATCATCGC CACCACTTT
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 * * * * * * * * * * * *
 GTGATCGTGA CCTTGTCCG CTATAATGAC ACACCTATCG TGAGGGCTTC AGGACGGAA CCTAGTAAAG TGCTCCCTAAC GGGGATTTTT CTCTGTTATT
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 * * * * * * * * * * * *
 CAATCACGTT TTAAATGATT GCAGCACAG ATACAATCAT ATGCTCCTTC CGACGGGTCT TCCTAGGACT TGGAATGTTGTTT CTCAGCTATG CAGCCCTCT
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 * * * * * * * * * * * *
 GACCAAAACA AACCGTATCC ACCGAATAATT TGAGCAGGGG AAGAAATCTG TCAAGGGGCC CAAGTTCAATT AGTCAGGAT CTCAGCTGGT GATCACCTTC
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 * * * * * * * * * * * *
 AGCCTCACT CGGTCCAGCT CCTGGAGTG TTGTGCTGGT TTGTGTTGGA TCCCCCCCAC ATCATCATG ACTATGGAGA GCAGGGGACA CTAGATCCAG
 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 * * * * * * * * * * * *
 AGAAGGCCAG GGGAGGTGCTC AAGTGTGACA TTTCCTGAICT CTCACTCATT TGTTCACTTG GATACTGAT CCTCTTGAATG GTCACCTGTA CTGTTATGCC
 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 * * * * * * * * * * * *
 CATTAAAACG AGAGGTGTCC CAGAGACTTT CAATGAAGGCC AAACCTTAC GATTTACCAT GTATACCAAC TGCATCATTT GTTGTAGCTTT CATCCCCATC

Fig. 5C

2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TTTTTGGTA CAGCCAGTC AGCAGAAAAG ATGTACATCC AGACAAACAC ACTTACTGTC TCCATGAGTT TAAGTGTCTTC AGTAATCTCTG GGCATGCTCT									
2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ATAATGCCAA GGTTTAATT ATTAAATTTC ATCCAGAACAA GAATGTTCAA AAACCGAAAGA GGAGCTTCAA GGCTGTGGTG ACASCTGCCA CCATGCCAAAG									
2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CAAACGTAC CAAAAGGAA ATGACAGACC AAATGGCAG GTGAAAAGTG AACTCTGTGA GAGTCTTGA ACCAACAGTA AGTCATCIGT AGAGTTCCG									
2710	2720	*							
ATGGTCAAGA GCGGGAGCAC TTCC									

Fig. 5D

FIG. 6A.

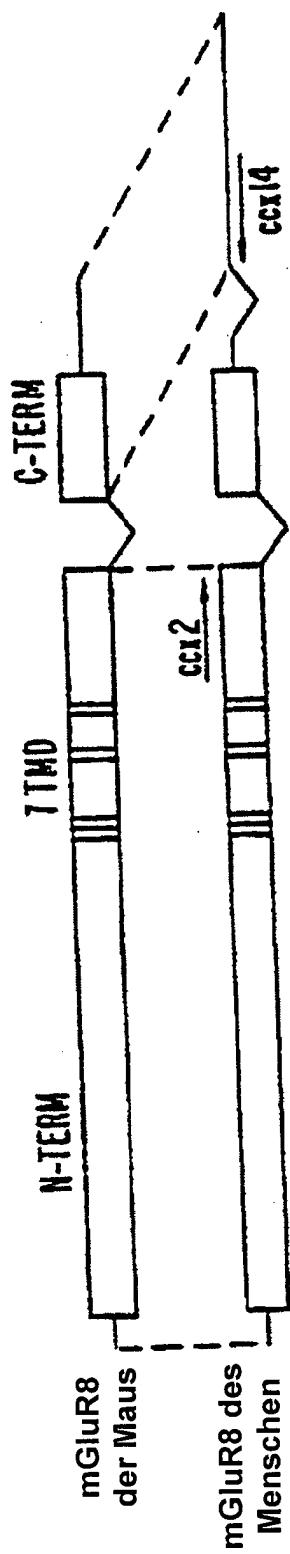
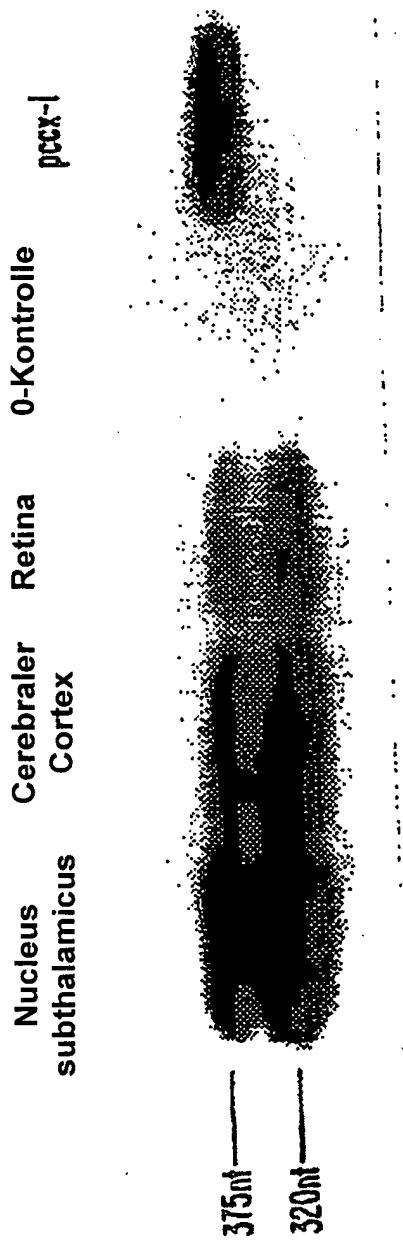


FIG. 6B.



Figur 7

SOLL NICHT IN BETRACHT GEZOGEN WERDEN (PCT ART. 14(2), 2. SATZ).