CH 694 588 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 694 588 A5

(51) Int. Cl.[7]: C 07 K 014/47
C 07 H 021/00
A 01 K 067/027
A 61 K 031/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 00205/00

(22) Anmeldungsdatum: 02.02.2000

(30) Priorität: 09.02.1999 US 60/119,321

(24) Patent erteilt: 15.04.2005

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.04.2005

(73) Inhaber:
F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124
4070 Basel (CH)

(72) Erfinder:
Paul David Cannon, 825 Somerset Court
San Carlos, CA 94070 (US)
Suryanarayana Sankurati, 719, 31st Avenue
San Mateo, CA 94403 (US)

(54) Menschliche intestinale Npt2B.

(57) Ein neuer menschlicher Natriumphosphat-Co-Transporter, der auf der apikalen Oberfläche von Darmepithelzellen (huNpt2B) exprimiert wird und damit verwandte Polypeptide ebenso wie Nucleinsäurezusammensetzungen, die diesen codieren, werden bereitgestellt. Die vorliegenden Polypeptide und Nucleinsäurezusammensetzungen finden Verwendung für eine Vielzahl von Anwendungen, einschliesslich Forschung, Diagnose und Screening von therapeutischen Mitteln. Es werden auch Methoden bereitgestellt, um die Npt2B-Aktivität bei einem Wirt zu hemmen und Methoden, um Krankheitszustände zu behandeln, die mit der Npt2B-Aktivität in Beziehung stehen.

Beschreibung

Das Gebiet der Erfindung betrifft Ionentransporter, insbesondere Natriumphosphat-Co-Transporter.

Hintergrund der Erfindung

Phosphor spielt eine wichtige Rolle bei der Membranstruktur, dem Transport und der Energiespeicherung. Bei dem normalen physiologischen pH (z.B. pH von 7,4) besteht das anorganische Phosphat (Pi) im Plasma aus einer 4:1-Mischung von HPO_4^{2-} und $H_2PO_4^-$. Von den im Körper vorhandenen 700 g Phosphor sind 0,1% in der extrazellulären Flüssigkeit in frei diffundierbarer Form vorhanden. Der Plasmagehalt an Pi wird durch die Kontrolle der Pi-Absorption im Dünndarm, unter dem Einfluss von Vitamin D, und die Pi-Ausscheidung in der Niere, unter dem Einfluss des Hormons der Nebenschilddrüse, aufrechterhalten.

Die Absorption von Pi erfordert einen transepithelialen Transport. Eine kritische Stufe des transepithelialen Transports von Pi ist die Aufnahme von Pi in Epithelzellen. Die Pi-Aufnahme wird durch Natriumphosphat-Co-Transporter erreicht, die auf der apikalen Oberfläche der geeigneten Epithelzellen, z.B. Epithelzellen des Darms und der Niere, vorhanden sind. Eine Mehrzahl von Natriumphosphat-Co-Transportern wurde bis heute gefunden, einschliesslich: NaPi-1 (Kaninchen); NPT1 (Mensch); Npt1 (Maus); NaPi-2 (Ratte); NaPi-3 (Mensch); NaPi-4 (Opossum); NaPi-5 (Flunder); NaPi-6 (Kaninchen); NaPi-7 (Maus) und NaPi von NBL-1-Zellen (Rind).

Mehrere Krankheitszustände werden mit Störungen des Pi-Metabolismus in Verbindung gebracht, wobei diese Krankheitszustände solche einschliessen, die durch das Vorliegen einer Hypophosphatämie gekennzeichnet sind, z.B. Osteomalazie, Hypokalziurie und Rachitis, und solche, die durch das Vorliegen einer Hyperphosphatämie gekennzeichnet sind, z.B. Hyperparathyreoidismus, Hypokalzämie, Vitamin-D-Mangel, Verkalkung von Weichgewebe oder metastatische Verkalkung und dgl. Insbesondere ist Hyperphosphatämie ein Kennzeichen für Nierenkrankheit und Nierenversagen und ist eine sehr vielen schädlichen Symptomen, die bei solchen Nierenkomplikationen beobachtet werden, zugrunde liegende Ursache.

Es gibt verschiedene Methoden, um Anomalien im Pi-Metabolismus zu behandeln. Z.B. schliessen für Krankheitszustände, die mit dem Vorliegen einer Hypophosphatämie verbunden sind, Behandlungsmethoden ein: Veränderungen der Nahrung, indem phosphorreiche Nahrungsmittel zugefügt werden, Ergänzung durch Phosphorsalze, Verwendung von therapeutischen Mitteln, z.B. Dipyridamol und dgl. Für solche Krankheitszustände, die mit Hyperphosphatämie verbunden sind, kann die Behandlung, falls keine Niereninsuffizienz vorliegt, eine Hydratisierung und/oder die Verwendung von Antacida auf Aluminiumbasis, die Phosphor im Darmlumen binden, einschliessen. Wenn eine Niereninsuffizienz vorliegt, sind Phosphatbindemittel und/oder Nahrungsmodifikationen, um die Phosphoraufnahme zu beschränken, möglicherweise nützlich, aber typischerweise wird eine Dialyse angewendet.

Wegen der grossen Vielzahl von Krankheitszuständen, die durch das Vorliegen eines anormalen Pi-Metabolismus gekennzeichnet sind, besteht ein fortgesetztes Interesse an dem Auffinden von Molekülkomponenten, die für den Pi-Metabolismus verantwortlich sind. Von besonderem Interesse ist das Auffinden der intestinalen Transporter, die für die Absorption und Aufnahme von Pi im Darm verantwortlich sind.

Relevante Literatur

Hilfiker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1998) 95:14564–14569 offenbart die Nucleinsäuresequenz von Npt2B der Maus. Von Interesse ist auch: Feild et al., «Cloning and Characterization of a Sodium Dependent Phosphate Transporter Isoform Expressed in Human Small Intestine and Lung», veröffentlicht am 24. Dezember 1998 unter der GenBank-Zugangsnummer 4071357 und vorgelegt von Smithkline Beecham Pharmaceuticals, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 am 7. Dezember 1998). Literaturstellen, die Natriumphosphat-Co-Transporter offenbaren, schliessen ein: Werner et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1991) 88: 9608–9612; Chong et al., Genomics (1993) 18:355–359; Chong et al., Am. J. Physiol. (1995) 268: F1038–F1045; Magagnin et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1993) 90:5979–5983; Sorribas et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:6615–6621; Werner et al., Am. J. Physiol. (1995) 267:F311–F317; Verri et al., Am. J. Physiol. (1995) 268:F626–F633; Collins et al., FASEB J. (1994) 8:862–868 und Helps et al., Eur. J. Biochem. (1995) 228:927–930.

Von Interesse ist auch WO 98/37198.

Die Literaturstellen, die Hintergrundinformationen zur Rolle von Natriumphosphat-Co-Transportern beim Phosphormetabolismus liefern, schliessen ein: Tenenhouse, J. Bone Min. Res. (1997) 12:159 und Harrison's Principles of Internal Medicine, 14. Ausgabe (1998) Seiten 2259–2263.

Ein neuer menschlicher intestinaler Natriumphosphat-Co-Transporter (d.h. Npt2B) und die damit verwandten Polypeptide ebenso wie Nucleinsäurezusammensetzungen, die ihn codieren, werden bereitgestellt. Das vorliegende Polypeptid und die Nucleinsäurezusammensetzungen finden Nutzen bei einer Vielzahl von Anwendungen, einschliesslich Forschung, Diagnose und Screening von therapeutischen Mitteln ebenso wie für Behandlungstherapien. Es werden auch Methoden zur Behandlung von Krankheitszuständen bereitgestellt, die mit der intestinalen Npt2B-Funktion verbunden sind, d.h. Zustände, die durch anormale Serumphosphatpegel gekennzeichnet sind, z.B. Hypo- und Hyperphosphatämie.

Fig. 1 liefert die Aminosäuresequenz von menschlichem Npt2B.

Fig. 2 liefert die Sequenz einer Nucleinsäure, die menschliches Npt2B codiert.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Ein neuer menschlicher intestinaler Natriumphosphat-Co-Transporter (d.h. Npt2B) und damit verwandte Polypeptide ebenso wie Nucleinsäurezusammensetzungen, die ihn codieren, werden bereitgestellt. Das vorliegende Peptid und/oder die Nucleinsäurezusammensetzungen sind nützlich für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen, einschliesslich Forschung, Diagnose und das Screening, die Entdeckung und die Herstellung von therapeutischen Mitteln. Es werden auch Methoden zur Behandlung von Krankheitszuständen bereitgestellt, die mit der intestinalen Npt2B-Funktion verbunden sind, z.B. Zustände, die durch anormale Serumphosphatpegel entstehen, z.B. Hypo- und Hyperphosphatämie.

Bevor die vorliegende Erfindung weiter beschrieben wird, wird darauf verwiesen, dass die Erfindung nicht durch die speziellen Ausführungsformen der Erfindung, die unten beschrieben werden, beschränkt wird, da Variationen der speziellen Ausführungsformen gemacht werden können und noch im Schutzbereich der beigefügten Ansprüche liegen. Es ist auch selbstverständlich, dass die angewendete Terminologie dem Zweck dient, spezielle Ausführungsformen zu beschreiben und nicht als Beschränkung anzusehen ist. Der Schutzbereich der vorliegenden Erfindung ergibt sich aus den beigefügten Ansprüchen.

In dieser Beschreibung und den beigefügten Ansprüchen schliessen die Singularformen «ein» und «der, die, das», die Pluralformen ein, wenn der Zusammenhang nicht eindeutig dagegen spricht. Wenn nicht anders angegeben, haben alle technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke, die hier verwendet werden, die gleiche Bedeutung, wie sie der Fachmann auf diesem Gebiet, auf dem die Erfindung liegt, allgemein versteht.

Polypeptidzusammensetzungen

Ein neuer menschlicher Natriumphosphat-Co-Transporter, der in Darmepithelzellen exprimiert wird, ebenso wie Polypeptidzusammensetzungen, die damit verwandt sind, werden bereitgestellt. Der Ausdruck Polypeptidzusammensetzung, wie er hier verwendet wird, bezieht sich sowohl auf ein menschliches Protein voller Länge als auch Anteile oder Fragmente davon. Enthalten in diesem Ausdruck sind Variationen des natürlich vorkommenden menschlichen Proteins, wenn solche Variationen homolog sind oder dem natürlich vorkommenden Protein im Wesentlichen gleich sind, wie unten im Detail genauer beschrieben. In der folgenden Beschreibung der vorliegenden Erfindung wird der Ausdruck Npt2B verwendet, um den Wildtyp des menschlichen intestinalen Natriumphosphat-Co-Transporter-Moleküls der vorliegenden Erfindung zu beschreiben.

Das Npt2B-Protein der vorliegenden Erfindung ist ein Membranprotein mit einer Anzahl von Transmembranregionen, wobei die Anzahl der angenommenen Transmembranregionen auf Basis der Aminosäuresequenz 10 ist (vorhergesagt unter Verwendung von TMpred (www.Ch.embnet.org) auf Basis von TMbase (TMbase-A database of membrane spanning protein Segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347, 166)). Npt2B ist ein Natriumphosphat-Co-Transporter vom Typ II. In seiner nativen Umgebung ist Npt2B ein Co-Transporter für Natriumkationen und Phosphatanionen. Npt2B wird unter anderem auch an der Oberfläche von Darmepithelzellen exprimiert, d.h. auf der apikalen oder intestinalen Luminalseite der Epithelzellen und ist daher für den Transport von Natrium- und Phosphationen aus dem Darmlumen in die Darmepithelzellen verantwortlich. Npt2B wird auch in den Alveolen der Lunge vom Typ II exprimiert, wo es am Transport von Phosphat in die Zellen beteiligt ist, um den erhöhten Bedarf für die Mucin-Glycoprotein-Synthese zu erfüllen. Die Aminosäuresequenz von Npt2B hat eine 23%ige Identität mit menschlichen NPT1, wie in Chong et al., «Molecular cloning of the cDNA encoding a human renal sodium phosphate transport protein and its assignment to chromosome 6p21.3-p23», Genomics (1993), 18:355–359 beschrieben, und eine 52,5%ige Identität mit menschlichem Npt2a, wie in Maganin et al., «Expression Cloning of Human and Rat Renal Cortex Na/Pi cotransport», Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993), 90:5979–5983 beschrieben (gemessen mit MegAlign, DNAstar (1998) unter Verwendung eines Cluster-Algorithmus, wie in D.G. Higgins und P.M.Sharp: Fast and Sensitive multiple Sequence Alignments on a Microcomputer (1989) CABIOS, 5:151-153 beschrieben. Die verwendeten Parameter sind ktuple 1, gpa penalty 3, window 5 und diagonals saved 5). Andere Npt2B-Eigenschaften schliessen ein: Potentielle Glycosylierungsstellen an extrazellulären Schlingen.

Npt2B hat die in Fig. 1 gezeigte und mit SEQ ID Nr. 01 bezeichnete Aminosäuresequenz. Npt2B hat ein Molekulargewicht auf Basis der Aminosäuresequenz von etwa 75 kDa und genauer 75598,52 Dalton (bestimmt mit Protean/DNAstar (1997) gemäss H. Nakashima et al., The Folding Type of a pProetin ist Related to the Amino Acid Composition. J. Biochem (Tokio) 99:153–162). Das genaue Molekulargewicht von Npt2B kann variieren aufgrund der Glycosylierung und/oder anderer posttranslationaler Modifikationen. Das tatsächliche Molekulargewicht von Npt2B liegt wahrscheinlich im Bereich von etwa 70 bis 130 kDa.

Npt2B-Homologe oder Proteine (oder Fragmente davon), deren Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz der vorliegenden Erfindung verändert ist, werden auch bereitgestellt. Unter homolog wird ein Protein verstanden mit mindestens etwa 35%, gewöhnlich mindestens etwa 40% und üblicher mindestens etwa 60% Aminosäuresequenzidentität mit dem Npt2B-Protein der vorliegenden Erfindung (unter Verwendung von MegAlign, DNAstar (1998) unter Verwendung des Cluster-Algorithmus, wie von D.G. Higgins und P.M. Sharp: Fast and Sensitive multiple Sequence Alignments on a Microcomputer. (1989) CABIOS, 5:151–153 beschrieben. Die verwendeten Parameter sind: ktuple 1, gpa penalty 3, window 5 und diagonals saved 5).

Es werden auch Npt2B-Proteine bereitgestellt, die im Wesentlichen mit dem menschlichen Npt2B-Protein identisch sind, wobei im Wesentlichen identisch

bedeutet, dass das Protein eine Aminosäuresequenz hat, die mit der Sequenz von Npt2B zu mindestens etwa 60%, gewöhnlich mindestens etwa 65% und üblicher mindestens etwa 70% identisch ist.

Die Proteine der vorliegenden Erfindung sind in einer nicht natürlich vorkommenden Umgebung vorhanden, z.B. liegen sie abgetrennt aus ihrer natürlich vorkommenden Umgebung vor. In bestimmten Ausführungsformen sind die vorliegenden Proteine in einer Zusammensetzung vorhanden, die mit dem jeweiligen Protein angereichert ist, verglichen mit der natürlich vorkommenden Umgebung. Z.B. wird gereinigtes Npt2B bereitgestellt, wobei gereinigt bedeutet, dass Npt2B in einer Zusammensetzung vorhanden ist, die im Wesentlichen frei ist von Nicht-Npt2B-Proteinen, wobei im Wesentlichen frei bedeutet, dass weniger als 90%, gewöhnlich weniger als 60% und üblicher weniger als 50% der Zusammensetzung aus Nicht-Npt2B-Proteinen bestehen. Die Proteine der vorliegenden Erfindung können auch als Isolat vorliegen, worunter verstanden wird, dass das Protein im Wesentlichen frei ist von anderen Proteinen und anderen natürlich vorkommenden biologischen Molekülen, z.B. Oligosacchariden, Polynucleotiden und Fragmenten davon, und dgl., wobei der Ausdruck «im Wesentlichen frei» in diesem Fall bedeutet, dass weniger als 70%, üblicher weniger als 60% und noch üblicher weniger als 50% der Zusammensetzung, die das isolierte Protein enthält, aus anderen natürlich vorkommenden biologischen Molekülen besteht. In bestimmten Ausführungsformen sind die Proteine in im Wesentlichen reiner Form vorhanden, wobei unter «im Wesentlichen reiner Form» verstanden wird, dass sie mindestens 95%, gewöhnlich mindestens 97% und üblicher mindestens 99% rein ist.

Zusätzlich zu den natürlich vorkommenden Proteinen werden auch Polypeptide bereitgestellt, die sich von den natürlich vorkommenden Proteinen unterscheiden, z.B. Npt2B-Polypeptide. Unter Npt2B-Polypeptid wird eine Aminosäuresequenz verstanden, die von einem offenen Leserahmen (ORF) des Npt2B codierenden Gens codiert wird, das im Detail unten genauer beschrieben wird, das das Npt2B-Protein vollständiger Länge und Fragmente davon einschliesst, insbesondere biologisch aktive Fragmente und/oder Fragmente, die funktionellen Domänen entsprechen, z.B. der Transmembrandomäne und dgl.; und einschliesslich Fusionen der jeweiligen Polypeptide mit anderen Proteinen oder Teilen davon. Die interessierenden Fragmente haben typischerweise eine Länge von mindestens etwa 10 aa, gewöhnlich mindestens etwa 50 aa und können 300 aa lang sein oder länger, überschreiten gewöhnlich aber eine Länge von etwa 1000 aa nicht, wobei das Fragment einen Strang von Aminosäuren hat, der identisch ist mit dem vorliegenden Protein über mindestens etwa 10 aa und gewöhnlich mindestens etwa 15 aa und in vielen Ausführungen mindestens etwa 50 aa.

Die vorliegenden Proteine und Polypeptide können aus natürlich vorkommenden Quellen erhalten werden oder synthetisch hergestellt werden. Z.B. stammt Npt2B allgemein aus Epithelzellen des Darms, kann aber auch aus anderen Zellarten oder Geweben, in denen eine Expression von Npt2B nachgewiesen wurde, z.B. der Lunge etc., stammen. Die vorliegenden Proteine können auch durch Synthese entstanden sein, z.B. durch Expression eines rekombinanten Gens, das das interessierende Protein in einem geeigneten Wirt codiert, wie unten im Detail genauer beschrieben. Alle üblichen Proteinreinigungsverfahren können angewendet werden, wobei eine geeignete Proteinreinigungsmethodik im Guide to Protein Purrfication (Deuthser ed.) (Academic Press, 1990) beschrieben wird. Z.B. kann ein Lysat aus der ursprünglichen Quelle, z.B. intestinalen Epithelzellen oder dem Expressionswirt, hergestellt werden und unter Verwendung von HPLC, Ausschlusschromatographie, Gelelektrophorese, Affinitätschromatographie und dgl. gereinigt werden.

Nucleinsäurezusammensetzungen

Es werden auch Nucleinsäurezusammensetzungen bereitgestellt, die Npt2B-Proteine oder Fragmente davon codieren, ebenso wie Npt2B-Homologe der vorliegenden Erfindung. Unter einer Npt2B-Nucleinsäurezusammensetzung wird eine Zusammensetzung verstanden, die eine DNA-Sequenz umfasst mit einem offenen Leserahmen, der Npt2B codiert, d.h. ein Npt2B-Gen, und unter geeigneten Bedingungen Npt2B exprimieren kann. In diesem Ausdruck enthalten sind auch Nucleinsäuren, die mit Nucleinsäuren, die Npt2B-Proteine codieren, homolog oder im Wesentlichen gleich oder identisch sind. Somit liefert die vorliegende Erfindung- Gene, die menschliches Npt2B der vorliegenden Erfindung und Homologe davon codieren. Das menschliche Npt2B-Gen hat die in Fig. 2 gezeigte Nucleinsäuresequenz, die als SEQ ID Nr. 02 angegeben ist.

Die Quelle für homologe Gene kann irgendeine Art sein, z.B. eine Primatenart, insbesondere Mensch; Nagetier, z.B. Ratten und Mäuse, Hunde, Katzen, Rinder, Schafe, Pferde, Hefen, Nematoden etc. Zwischen Säugetierarten, z.B. Mensch und Maus, haben Homologe im Wesentlichen Sequenzgleichheit, z.B. mindestens 75% Sequenzidentität, gewöhnlich mindestens 90%, üblicher mindestens 95% zwischen den Nucleotidsequenzen. Die Sequenzgleichheit wird berechnet auf Basis einer Referenzsequenz, die eine Untergruppe einer grösseren Sequenz sein kann, z.B. ein konserviertes Stück, ein codierender Bereich, eine flankierende Region etc. Eine Referenzsequenz hat gewöhnlich eine Länge von mindestens etwa 18 nt, gewöhnlich mindestens etwa 30 nt und kann sich über die vollständige Sequenz, mit der sie verglichen werden soll, erstrecken. Algorithmen zur Sequenzanalyse sind im Stand der Technik bekannt, z.B. BLAST, das von Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10 (Verwendung von Standard-Einstellungen) beschrieben wird. Die hier angegebenen Sequenzen sind wichtig, um Npt2B-verwandte und homologe Proteine und die diese codierenden Nucleinsäuren bei Recherchen in Databanken zu erkennen.

Nucleinsäuren, die das Npt2B-Protein und Npt2B-Polypeptide der vorliegenden Erfindung codieren, können cDNA oder genomische DNA oder ein Fragment davon sein. Der Ausdruck «Npt2B-Gen» soll sowohl den offenen Leserahmen, der spezifische Npt2B-Proteine und Polypeptide und Npt2B-Introns

codiert, ebenso wie 5´- und 3´-benachbarte nicht codierenden Nucleotidsequenzen, die an der Regulation der Expression beteiligt sind, bis zu etwa 20 kb nach der codierenden Region und möglicherweise noch weiter in jeder Richtung, einschliessen. Das Gen kann in einen geeigneten Vektor eingebaut werden für die extrachromosomale Erhaltung oder für die Integration in ein Wirtsgenom.

Der Ausdruck «cDNA», wie er hier verwendet wird, soll alle Nucleinsäure einschliessen, die die Anordnung der Sequenzelemente teilen, die in nativen reifen mRNA-Arten gefunden werden, wobei die Sequenzelemente Exons und 5´- und 3´- nicht codierende Regionen sind. Normalerweise haben mRNA-Moleküle aneinander grenzende Exons, wobei die dazwischen liegenden Introns, falls vorhanden, durch Kern-RNA-Spleissen entfernt werden, um einen kontinuierlichen offenen Leserahmen zu erzeugen, der ein Npt2B-Protein codiert.

Eine interessierende Genomsequenz umfasst die Nucleinsäure, die zwischen dem Startcodon und dem Stopcodon vorhanden ist, wie in den aufgeführten Sequenzen definiert, einschliesslich aller Introns, die normalerweise in einem nativen Chromosom vorhanden sind. Sie kann weiterhin 5´- und 3´-untranslatierte Regionen, die sich in reifer nRNA finden, enthalten. Sie kann weiterhin spezifische Transkriptions- und Translations-Steuersequenzen enthalten, z.B. Promotoren, Enhancer etc., was etwa 1 kb, möglicherweise aber mehr, an flankierender genomischer DNA am 5´- oder 3´-Ende der transkribierten Region einschliesst. Die genomische DNA kann als Fragment mit 100 kbp oder weniger isoliert werden und im Wesentlichen frei von flankierenden chromosomalen Sequenzen sein. Die genomische DNA, die den codierenden Bereich flankiert, sowohl 3´ als auch 5´, oder interne Steuersequenzen, wie sie manchmal in Introns gefunden werden, enthält Sequenzen, die für die richtige gewebe- und stufenspezifische Expression erforderlich sind.

Die Nucleinsäurezusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können das gesamte vorliegende Npt2B-Protein oder einen Teil davon codieren. Doppel- oder einzelsträngige Fragmente können aus der DNA-Sequenz erhalten werden, indem Oligonucleotide nach üblichen Methoden chemisch synthetisiert werden, z.B. durch Verdau mit Restriktionsenzymen, durch PCR-Amplifikation etc. Meistenteils haben die DNA-Fragmente mindestens 15 nt, gewöhnlich mindestens 18 nt oder 25 nt und können mindestens etwa 50 nt aufweisen.

Die Npt2B-Gene werden isoliert und in erheblicher Reinheit erhalten, im Wesentlichen anders als bei einem intakten Chromosom. Gewöhnlich wird die DNA im Wesentlichen frei von anderen Nucleinsäuresequenzen, die keine Npt2B-Sequenz oder ein Fragment davon einschliessen, erhalten, wobei sie mindestens etwa 50%, gewöhnlich mindestens etwa 90% rein sind und typischerweise «rekombinant» ist, d.h. flankiert von einem oder mehreren Nucleotiden, mit denen sie auf einem natürlich vorkommenden Chromosom nicht verbunden ist.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Npt2B-Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die im Wesentlichen mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 01 identisch, insbesondere mindestens zu 90% identisch ist.

Weiterhin ist auch das obige Npt2B-Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 01 bevorzugt.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der Erfindung ist ein Protein oder Polypeptid wie vorher mit einer Natriumphosphat-Co-Transport-Aktivität.

Bevorzugt ist auch ein Fragment des oben beschriebenen Npt2B-Polypeptids.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, die ein Protein oder Polypeptid, wie oben beschrieben, codiert, insbesondere ein solches, bei dem die Nucleinsäure eine Nucleinsäuresequenz hat, die im Wesentlichen identisch ist mit der Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 02. Bevorzugt ist auch ein Fragment dieser Nucleinsäure.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt ist eine isolierte Nucleinsäure oder eine nachahmende Nucleinsäure, die unter stringenten Bedingungen mit der Nucleinsäure, die vorher erwähnt wurde, oder ihrer komplementären Sequenz, hybridisiert.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt ist eine Expressionskassette mit einer Startregion für die Transkription, die in einem Expressionswirt funktionell ist, einer Nucleinsäure mit einer Nucleotidsequenz, die in der vorher beschriebenen Nucleinsäure aufgefunden wird, unter der Transkriptionsregulation der Startregion der Transkription und eine Endregion für die Transkription, die in dem Expressionswirt funktionell ist. Besonders bevorzugt ist eine Zelle mit einer Expressionskassette, wie vorher, als Teil eines extrachromosomalen Elementes oder integriert in das Genom einer Wirtszelle als Ergebnis der Einführung der Expressionskassette in die Wirtszelle. Besonders bevorzugt sind auch die Zellnachkommen der Wirtszelle, wie oben beschrieben.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Npt2B, wobei das Verfahren umfasst, dass man eine Zelle, wie oben beschrieben, züchtet, wobei Npt2B exprimiert wird, und Npt2B im Wesentlichen frei von anderen Proteinen isoliert.

Bevorzugt ist auch ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an Npt2B bindet, insbesondere ein Antikörper, bei dem der Antikörper die Npt2B-Aktivität hemmt und besonders bevorzugt ist der monoklonale Antikörper, bei dem der Antikörper ein humanisierter Antikörper ist.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Modulation von Npt2B bei einem Wirt, wobei das Verfahren umfasst, dass man eine wirksame Menge eines Npt2B-modulierenden Mittels dem Wirt verabreicht, bevorzugt, wenn das modulierende Mittel ein kleines Molekül ist, und insbesondere, wenn das modulierende Mittel ein Antikörper ist.

Bevorzugt ist auch die Verwendung eines Npt2B-modulierenden Mittels zur Herstellung eines Arzneimittels zur Modulation von Npt2B in einem Wirt.

Ein Verfahren zum Screenen, um Npt2B-modulierende Mittel aufzufinden, ist ein weiterer bevorzugter Aspekt, wobei das Verfahren umfasst, dass man

eine Zelle, die funktionelles Npt2B an ihrer Oberfläche exprimiert, mit einem in Betracht kommenden Mittel in Gegenwart von Phosphoranionen in Kontakt bringt und die Menge der Phosphoranionenaufnahme durch die Zelle bestimmt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem das Phosphoranion mit einer nachweisbaren Markierung markiert ist und insbesondere, wenn die Markierung ein Isotop ist.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein nicht menschliches transgenes Tiermodell, das Npt2B-exprimieren kann.

Ausserdem ist die Verwendung eines Proteins oder Polypeptids, wie vorher definiert, zum Screenen von Npt2B-modulierenden Mitteln bevorzugt.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der Erfindung ist die Verwendung eines Npt2B-modulierenden Mittels zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Wirts, der unter einem Krankheitszustand leidet, der mit einer Npt2B-Aktivität verbunden ist.

Bevorzugt ist auch ein Verfahren zur Behandlung eines Wirts, der unter einem Krankheitszustand leidet, der mit der Npt2B-Aktivität verbunden ist, wobei das Verfahren umfasst, dass man dem Wirt ein Npt2B-modulierendes Mittel verabreicht, bevorzugt wenn das Npt2B-modulierende Mittel ein Npt2B-Agonist ist, insbesondere bevorzugt, wenn das Npt2B-modulierende Mittel ein Npt2B-Antagonist ist. Sehr bevorzugt ist das obige Verfahren, wenn der Krankheitszustand durch das Vorliegen einer Hyperphosphatämie gekennzeichnet ist.

Herstellung von Npt2B-Polypeptiden

Zusätzlich zu der Vielzahl von Anwendungen, die genauer in den folgenden Abschnitten beschrieben werden, finden die vorliegenden Nucleinsäurezusammensetzungen Anwendung zur Herstellung der vollständigen Npt2B-Polypeptide oder eines Teils davon, wie oben beschrieben. Zur Expression kann eine Expressionskassette angewendet werden. Der Expressionsvektor liefert eine Startregion für Transkription und Translation, die induzierbar oder konstitutiv sein kann, wobei die codierende Region operativ verbunden ist. unter der Transkriptionskontrolle der Transkriptionsstartregion und einer Transkriptions- und Translationsendregion. Diese Kontrollregionen können nativ zu dem Npt2B-Gen gehören oder können aus exogenen Quellen stammen.

Expressionsvektoren haben im Allgemeinen übliche Restriktionsstellen, die in der Nähe der Promotorsequenz angeordnet sind, zum Einsetzen der Nucleinsäuresequenzen, die heterologe Proteine codieren. Ein selektierbarer Marker, der in dem Expressionswirt wirksam ist, kann vorhanden sein. Expressionsvektoren können zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden, wobei das exogene Fusionspeptid weitere Funktionalität liefern kann, z.B. erhöhte Proteinsynthese, Stabilität Reaktivität mit definierten Antiserien, einen Enzymmarker, z.B. β-Galactosidase etc.

Expressionskassetten können hergestellt werden mit einer Transkriptionsstartregion, dem Gen oder einem Fragment davon und einer Transkriptionsendregion. Von besonderem Interesse ist die Verwendung von Sequenzen, die die Expression funktioneller Epitope oder Domänen zulassen, die gewöhnlich eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren, üblicher mindestens etwa 15 Aminosäuren bis etwa 25 Aminosäuren und bis zum vollständigen offenen Leserahmen des Gens haben. Nach Einführung der DNA können Zellen, die das Konstrukt enthalten, mit Hilfe selektierbarer Marker selektiert werden, die Zellen expandiert werden und dann zur Expression verwendet werden.

Npt2B-Proteine und Polypeptide können in Prokaryoten oder Eukaryoten auf konventionelle Weise exprimiert werden, abhängig vom Zweck der Expression. Für eine Produktion des Proteins in grossem Massstab können einzellige Organismen, z.B. E. coli, B. subtilis, S. cerevisiae, Insektenzellen in Kombination mit Baculovirusvektoren oder Zellen höherer Organismen, z.B. Wirbeltiere, insbesondere Säugetiere, z.B. COS-7-Zellen, HEK 293, CHO, Xenopus Oocytes etc. als Wirtszellen für die Expression verwendet werden. In einigen Situationen ist es wünschenswert, das Npt2B-Gen in eukaryotischen Zellen zu exprimieren, wo das Npt2B-Protein die native Faltung und die posttranslationalen Modifikationen erfährt. Kleine Peptide können auch im Labor synthetisiert werden. Polypeptide, die Unterabschnitte der vollständigen Npt2B-Sequenz sind, können verwendet werden, um Teile des Proteins, die wichtig für seine Funktion sind, festzustellen und zu untersuchen.

Verwendung des vorliegenden Npt2B-Polypeptids und der Nucleinsäurezusammensetzungen

Das vorliegende Polypeptid und die Nucleinsäurezusammensetzungen finden für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen Nutzen, einschliesslich Forschung, Diagnose und das Screenen, das Auffinden und die Herstellung von therapeutischen Mitteln, ebenso wie in therapeutischen Zusammensetzungen und Verfahren zur Anwendung derselben.

Forschungsanwendungen

Die vorliegenden Nucleinsäurezusammensetzungen sind nützlich für eine Vielzahl von Forschungsanwendungen. Forschungsanwendungen von Interesse schliessen ein: die Identifizierung von Npt2B-Homologen, als Quelle neuer Promotorelemente, die Identifizierung von die Npt2B-Expression regulierenden Faktoren, als Sonden und Primer in Hybridisierungsanwendungen, z.B. PCR; die Identifikation von Expressionsmustern in biologischen Proben, die Herstellung von Zell- oder Tiermodellen für die Npt2B-Funktion, die Herstellung von in-vitro-Modellen für die Npt2B-Funktion etc.

Homologe von Npt2B werden mit einer Anzahl von Methoden nachgewiesen. Ein Fragment der bereitgestellten cDNA kann als Hybridisierungssonde für eine cDNA-Bibliothek des interessierenden Zielorganismus verwendet werden, wobei niedrigstringente Bedingungen verwendet werden. Die Sonde kann ein grosses Fragment sein oder es können ein oder mehrere kurze degenerierte Primer sein. Nucleinsäuren mit einer Sequenzähnlichkeit werden durch Hybridisierung unter wenig stringenten Bedingungen nachgewiesen, z.B. über 50°C und 6 × SSC (0,9 M

Natriumchlorid/0,09 M Natriumnitrat) und bleiben gebunden, wenn sie einem Waschen bei 55°C in 1 × SSC (0,15 M Natriumchlorid/0,015 M Natriumnitrat) unterzogen werden.

Die Sequenzidentität kann durch Hybridisierung unter stringenten Bedingungen bestimmt werden, z.B. bei 50°C oder mehr und 0,1 × SSC (15 mM Natriumchlorid/0,15 mM Natriumcitrat). Nucleinsäuren mit einem Bereich, der im Wesentlichen identisch ist mit den bereitgestellten Npt2B-Sequenzen, z.B. allele Varianten, genetisch veränderte Versionen des Gens etc., binden an die bereitgestellten Npt2B-Sequenzen unter stringenten Hybridisierungsbedingungen. Unter Verwendung von Sonden, insbesondere markierten Sonden von DNA-Sequenzen, kann man homologe oder verwandte Gene isolieren.

Die Sequenz 5'-flankierenden Region kann für Promotorelemente einschliesslich Enhancerbindungsstellen, verwendet werden, die für die Entwicklungssteuerung in Geweben sorgen, wo Npt2B exprimiert wird. Die gewebespezifische Expression ist nützlich, um das Expressionsmuster zu bestimmen und um Promotoren bereitzustellen, die das native Expressionsmuster nachahmen. Natürlich vorkommende Polymorphismen im Promotorbereich sind nützlich, um natürliche Variationen der Expression zu bestimmen, insbesondere solche, die mit einer Krankheit verbunden sind.

Alternativ können Mutationen in dem Promotorbereich erzeugt werden, um die Wirkung der Veränderung der Expression in experimentell definierten Systemen zu bestimmen. Methoden zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte, die an der Bildung von Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, sind im Stand der Technik bekannt, z.B. Sequenzgleichheit mit bekannten Bindungsabschnitten, Gelverzögerungsuntersuchungen etc. Siehe z.B. Blackwell et al. (1995), Mol. Med. 1:194-205; Mortlock et al. (1996), Genome Res. 6:327-33 und Joulin und Richard-Foy (1995), Eur. J. Biochem. 232:620-626.

Die regulatorischen Sequenzen können verwendet werden, um cis-wirkende Sequenzen nachzuweisen, die für die transkriptionale oder translationale Regulation der Npt2B-Genexpression erforderlich sind, insbesondere in verschiedenen Geweben oder Entwicklungsstufen, und um cis-wirkende Sequenzen und trans-wirkende Faktoren nachzuweisen, die die Npt2B-Expression steuern oder vermitteln. Solche die Transkription oder die Translation kontrollierenden Regionen können operativ verbunden sein mit einem Npt2B-Gen, um die Expression von Wildtyp- oder verändertem Npt2B oder anderen interessierenden Proteinen in Kulturzellen oder in Embryo-, fötalen oder ausgewachsenen Geweben und für die Gentherapie zu fördern.

Kleine DNA-Fragmente sind geeignet als Primer für die PCR, als Hybridisierungs-Screeningsonden etc. Grössere DNA-Fragmente, d.h. mit mehr als 100 nt sind geeignet zur Herstellung des codierten Polypeptids, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Zur Verwendung für geometrische Amplifikationsreaktionen, z.B. geometrische PCR, wird ein Paar von Primern verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Primersequenzen ist nicht kritisch für die Erfindung, aber für die meisten Anwendungen hybridisieren die Primer mit der vorliegenden Sequenz unter stringenten Bedingungen, wie im Stand der Technik bekannt. Es ist bevorzugt, ein Paar von Primern auszuwählen, die ein Amplifikationsprodukt mit mindestens etwa 50 nt, bevorzugt mindestens etwa 100 nt erzeugen. Algorithmen zur Auswahl von Primersequenzen sind allgemein bekannt und in kommerziell erhältlichen Softwarepaketen verfügbar. Amplifikationsprimer hybridisieren mit komplementären Strängen von DNA und primen sich gegenseitig.

Die DNA kann auch verwendet werden, um die Expression des Gens in einer biologischen Probe nachzuweisen. Die Art und Weise, in der Zellen auf die Gegenwart spezieller Nucleotidsequenzen untersucht werden, z.B. genomische DNA oder RNA, ist in der Literatur gut beschrieben. Kurz gesagt wird DNA oder mRNA aus einer Zellprobe isoliert. Die mRNA kann mit RT-PCR amplifiziert werden, unter Verwendung von reverser Transkriptase, um einen komplementären DNA-Strang zu bilden, gefolgt von einer Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von Primern, die für die jeweilige DNA-Sequenz spezifisch sind. Alternativ wird die mRNA-Probe durch Gelelektrophorese abgetrennt, auf einen geeigneten Träger überführt z.B. Nitrocellulose, Nylon etc., und dann mit einem Fragment der jeweiligen DNA als Sonde untersucht. Andere Techniken, z.B. Oligonucleotidligierungsassays, in-situ-Hybridisierungen und die Hybridisierung mit DNA-Sonden, die auf einem festen Chip angeordnet sind, finden auch Anwendung.

Der Nachweis von mRNA, die mit der jeweiligen Sequenz hybridisiert, auf eine Npt2B-Genexpression in der Probe hin.

Die Sequenz eines Npt2B-Gens einschliesslich der flankierenden Promotorregionen und der codierenden Regionen kann auf verschiedenen Wegen mutiert werden, wie es im Stand der Technik bekannt ist, um vorgegebene Veränderungen der Promotorstärke, der Sequenz des codierten Proteins etc. zu erzeugen. Die DNA-Sequenz oder das Proteinprodukt einer solchen Mutation wird gewöhnlich den hier bereitgestellten Sequenzen im Wesentlichen gleich sein, d.h. unterscheidet sich durch mindestens ein Nucleotid bzw. eine Aminosäure und kann sich um mindestens zwei aber nicht mehr als etwa zehn Nucleotide oder Aminosäuren unterscheiden. Die Sequenzveränderungen können Substitutionen, Insertionen, Deletionen oder eine Kombination davon sein. Deletionen können weiterhin grössere Veränderungen einschliessen, z.B. Deletionen einer Domäne oder eines Exons. Andere interessierende Modifikationen schliessen eine Epitopmarkierung, z.B. mit dem FLAG-System, HA etc. ein. Für Untersuchungen von subzellulären Lokalisationen können Fusionsproteine mit grün fluoreszierenden Proteinen (GFP) verwendet werden.

Techniken zur in-vitro-Mutagenese von klonierten Genen sind bekannt. Beispiele für Protokolle für eine punktspezifische Mutagenese finden sich in Gustin et al. (1993), Biotechniques 14:22; Barany (1985), Gene 37:111-23; Colicelli et al. (1985), Mol. Gen. Genet. 199:537-9 und Prentki et al. (1984), Gene 29:303-13. Methoden zur punktspezifischen Mutation finden sich in Sambrook et al., Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, CSH Press 1989, Seiten 15.3–15.108; Weiner et al. (1993), Gene 126:35-41; Sayers et al. (1992), Biotechniques 13:592-6; Jones und Winistorfer (1992), Biotechniques 12:528-30; Barton et al. (1990), Nucleic Acids Res. 18:7349-55; Marotti und Tomich (1989), Gene Anal. Tech. 6:67-70 und Zhu (1989), Anal. Biochem. 177:120-4. Solche mutierten Gene können verwendet werden, um Beziehungen zwischen Struktur und Funktion von Npt2B zu untersuchen oder die Eigenschaften des Proteins zu verändern, die die Funktion oder Regulation beeinflussen.

Die vorliegenden Nucleinsäuren können verwendet werden, um transgene, nicht menschliche Tiere zu erzeugen oder punktspezifische Genmodifikationen in Zelllinien. Transgene Tiere können durch homologe Rekombination erzeugt werden, wobei der endogene Npt2B-Locus verändert wird. Alternativ kann ein Nucleinsäurekonstrukt statistisch in das Genom integriert werden. Vektoren für eine stabile Integration schliessen Plasmide, Retroviren und andere Tierviren, YACs und dgl. ein.

Die modifizierten Zellen oder Tiere sind geeignet zur Untersuchung der Npt2B-Funktion und der Regulation. Von Interesse ist die Verwendung von Npt2B-Genen, um transgene Tiermodelle für mit Npt2B in Beziehung stehenden Krankheitszustände zu entwickeln, z.B. Hyper- oder Hypophosphatämie. So schliessen transgene Tiermodelle der vorliegenden Erfindung endogene Npt2B-Knockouts, bei denen die Expression von endogenem Npt2B zumindest vermindert ist, wenn nicht ganz ausgeschaltet ist, ein, wobei diese Tiere typischerweise auch ein Npt2B-Peptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, z.B. das Npt2B-Protein der vorliegenden Erfindung oder ein Fragment davon. Wenn eine Nucleinsäure mit einer Sequenz, wie sie im menschlichen Npt2B-Gen gefunden wird, eingeführt wird, kann die eingeführte Nucleinsäure entweder eine vollständige oder teilweise Sequenz des Npt2B-Gens sein. Ein nachweisbarer Marker, z.B. lac Z kann in den Npt2B-Ort eingeführt werden, wobei die verstärkte Regulation der Npt2B-Expression zu einer leicht nachweisbaren Veränderung des Phänotyps führt. Es kann auch für die Expression des Npt2B-Gens oder von Varianten davon in Zellen oder Geweben gesorgt werden, wo dieses Gen normalerweise nicht exprimiert wird, in Anteilen, die normalerweise in solchen Zellen oder Geweben nicht vorhanden sind.

DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination umfassen mindestens einen Teil des Npt2B-Gens der vorliegenden Erfindung, wobei das Gen die gewünschte genetische Modifikation/die gewünschten genetischen Modifikationen aufweist und Regionen mit Homologie zu dem Ziellocus aufweist. DNA-Konstrukte für eine statistische Integration müssen keine Homologiebereiche enthalten, um eine Rekombination zu ermöglichen. Geeigneterweise sind Marker für positive und negative Selektion enthalten. Methoden, um Zellen mit gezielten Genmodifikationen durch homologe Rekombination zu erzeugen, sind im Stand der Technik bekannt. Bezüglich verschiedener Techniken zur Transfektion von Säugetierzellen siehe Keown et al. (1990), Meth. Enzymol. 185:527-537.

Für Embryostamm-(ES)-Zellen kann eine ES-Zelllinie angewendet werden oder Embryonenzellen können frisch von einem Wirt, z.B. Maus, Ratte, Meerschweinchen etc. erhalten werden. Solche Zellen werden in einer geeigneten Fibroblast-Feeder-Schicht gezüchtet oder in Gegenwart von Leukämie-hemmendem Faktor (LIF) gezüchtet. Wenn ES- oder Embryonenzellen transformiert wurden, können sie verwendet werden, um transgene Tiere zu erzeugen. Nach der Transformation werden die Zellen auf einer Feeder-Schicht in einem geeigneten Medium ausplattiert. Zellen, die das Konstrukt enthalten, können unter Anwendung eines selektiven Mediums nachgewiesen werden. Nach einem Zeitraum, der ausreicht, damit Kolonien wachsen können, werden sie abgenommen und auf das Auftreten einer homologen Rekombination oder einer Integration des Konstrukts untersucht. Solche Kolonien, die positiv sind, können dann für die Embryomanipulation und die Blastozysten-Injektion verwendet werden. Blastozysten werden von 4 bis 6 Wochen alten weiblichen Mäusen mit Superovulation erhalten. Die ES-Zellen werden trypsinisiert und die modifizierten Zellen werden in das Blastozoel des Blastozysten injiziert. Nach der Injektion werden die Blastozysten in das Uterushorn von pseudoschwangeren weiblichen Tieren eingeführt. Man lässt dann die weiblichen Tiere bis zum Termin kommen und der entstehende Nachwuchs wird auf das Konstrukt gescreent. Indem ein anderer Phänotyp des Blastozysten und der genetisch veränderten Zellen vorgesehen wird, können die chimären Nachkommen leicht nachgewiesen werden.

Die chimären Tiere werden auf die Gegenwart des modifizierten Gens gescreent und männliche und weibliche Tiere mit der Modifikation werden zu Paarungspartnern gemacht, um homozygote Nachkommen zu erzeugen. Wenn die Genveränderungen zu irgendeinem Entwicklungszeitpunkt Letalität verursachen, können Gewebe, oder Organe als allogene oder kongene Transplantate oder in in-vitro-Kultur aufrechterhalten werden. Die transgenen Tiere können irgendwelche nicht menschlichen Säugetiere sein, z.B. Labortiere, Haustiere etc. Die transgenen Tiere können für funktionelle Untersuchungen, Arzneimittelscreening etc. verwendet werden, um die Wirkung eines vorgesehenen Arzneimittels auf die Npt2B-Aktivität zu untersuchen.

Diagnostische Anwendungen

Es werden auch Methoden zur Diagnose von Krankheitszuständen bereitgestellt, die auf beobachteten Werten für Npt2B oder dem Ausmass der Expression des Npt2B-Gens in einer interessierenden biologischen Probe basieren. Proben, wie sie hier verwendet werden, schliessen biologische Flüssigkeiten, wie Blut, Cerebrospinalflüssigkeit, Tränen, Speichel, Lymphe, Dialyseflüssigkeit, Samen und dgl.; von Organ- oder Gewebekultur abgeleitete Flüssigkeiten und Flüssigkeiten, die aus physiologischen Geweben extrahiert wurden, ein. In dem Ausdruck enthalten sind auch Derivate und Fraktionen solcher Flüssigkeiten. Die Zellen können abgetrennt sein, im Fall von festen Geweben, oder es können Gewebeabschnitte untersucht werden. Alternativ kann ein Lysat der Zellen hergestellt werden.

Es sind eine Anzahl von Methoden zur Bestimmung des Expressionsausmasses eines Gens oder eines Proteins in einer speziellen Probe verfügbar. Die Diagnose kann mit einer Anzahl von Methoden durchgeführt werden, um die Abwesenheit oder Gegenwart oder veränderte Menge von normalem oder anormalem Npt2B einer Patientenprobe zu bestimmen. Z.B. kann für den Nachweis ein Anfärben von Zellen oder histologischen Abschnitten mit markierten Antikörpern, das nach üblichen Methoden durchgeführt wird, verwendet werden. Die Zellen werden permeabilisiert, um cytoplasmatische Moleküle zu färben. Die Antikörper von Interesse werden der Zellprobe zugegeben und über einen Zeitraum inkubiert, der ausreicht, damit sie an das Epitop binden können, gewöhnlich mindestens etwa 10 Minuten. Der Antikörper kann mit Radioisotopen, Enzymen, fluoreszierenden, chemilumineszierenden oder anderen Markierungen für den direkten Nachweis markiert sein. Alternativ wird in einer zweiten Stufe ein Antikörper oder Reagenz verwendet, um das Signal zu verstärken. Solche Reagenzien sind im Stand der Technik wohlbekannt. Z.B. kann der erste Antikörper mit Biotin konjugiert sein, wobei mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Avidin als Reagenz der zweiten Stufe zugegeben wird. Alternativ kann der zweite Antikörper an eine fluoreszierende Verbindung, z.B. Fluorescein, Rhodamin, Texas-Rot etc. konjugiert sein. Für den endgültigen Nachweis wird ein Substrat verwendet, das bei Gegenwart von Peroxidase eine Farbänderung durchmacht. Die Abwesenheit oder Anwesenheit von Antikörperbindung kann mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, einschliesslich Durchflusscytometrie von dissoziierten Zellen, Mikroskopie, Radiographie, Szintillationszählung etc.

Alternativ kann man sich auf die Expression von Npt2B konzentrieren. Biochemische Untersuchungen können durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob ein Sequenzpolymorphismus in einer Npt2B-codierenden Region oder in Kontrollregionen mit der Krankheit verbunden ist. Mit der Krankheit verbundene Polymorphismen können eine Deletion oder Trunkierung des Gens, Mutationen, die das Expressionsausmass verändern, die die Aktivität des Proteins verändern etc., einschliessen.

Veränderungen bei der Promotor- oder Enhancersequenz, die das Expressionsausmass von Npt2B beeinflussen können, können mit dem Expressionsausmass des normalen Allels mit verschiedenen im Stand der Technik bekannten Methoden verglichen werden. Methoden zur Bestimmung der Promotor- oder Enhancerstärke schliessen unter anderem die quantitative Auswertung des exprimierten natürlichen Proteins; die Insertion des variierenden Kontrollelements in einen Vektor mit einem Reportergen, wie β-Galactosidase, Luciferase, Chloramphenicolacetyltransferase etc. ein, das für eine geeignete quantitative Auswertung sorgt.

Eine Anzahl von Methoden sind verfügbar, um Nucleinsäuren auf die Gegenwart einer spezifischen Sequenz zu analysieren, z.B. einen mit einer Krankheit verbundenen Polymorphismus. Wenn grosse Mengen an DNA verfügbar sind, wird die genomische DNA direkt verwendet. Alternativ wird die interessierende Region in einen geeigneten Vektor kloniert und in ausreichender Menge zur Analyse gezüchtet. Zellen, die Npt2B exprimieren, können als Quelle für mRNA verwendet werden, die direkt untersucht werden kann oder in cDNA zur Analyse umgeschrieben werden kann. Die Nucleinsäure kann mit üblichen Techniken amplifiziert werden, z.B. mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), was genügende Mengen zur Analyse liefert. Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion wird in Saiki et al. (1985), Science 239:487 beschrieben und ein Überblick über diese Techniken findet sich in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, Seiten 14.2-14.33. Alternativ sind verschiedene Methoden im Stand der Technik bekannt, bei denen die Ligierung von Oligonucleotiden als Mittel zum Nachweis deines Polymorphismus verwendet wird, siehe z.B. Riley et al. (1990), Nucl. Acids Res. 18:2887-2890 und Delahunty et al. (1996), Am. J. Hum. Genet. 58:1239-1246.

Eine nachweisbare Markierung kann an einer Amplifikationsreaktion beteiligt sein. Geeignete Markierungen schliessen Fluorochrome, z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Rhodamin, Texas-Rot, Phycoerythrin, Allophycocyanin, 6-Carboxyfluorescein (6-FAM), 2´,7´-Dimethoxy-4´,5´-dichlor-6-carboxyfluorescein (JOE), 6-Carboxy-X-rhodamin (ROX), 6-Carboxy-2´,4´,7´,4,7-hexachlorfluorescein (HEX), 5-Carboxyfluorescein (5-FAM) oder N,N,N´,N´-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin (TAMRA), radioaktive Markierungen, z.B. ^{32}P, ^{35}S, ^{3}H etc. ein. Die Markierung kann ein zweistufiges System sein, wobei die amplifizierte DNA mit Biotin, Haptenen etc. konjugiert ist, mit einer hohen Affinität für einen Bindungspartner, z.B. Avidin, spezifische Antikörper etc., wobei der Bindungspartner mit einer nachweisbaren Markierung konjugiert ist. Die Markierung kann mit einem oder beiden Primern konjugiert sein. Alternativ wird der Nucleotidpool, der für die Amplifikation verwendet wird, markiert, damit die Markierung in das Amplifikationsprodukt eingebaut wird.

Die Probennucleinsäure, z.B. ein amplifiziertes oder kloniertes Fragment, wird mit einer der im Stand der Technik bekannten Methoden analysiert. Die Nucleinsäure kann mit Didesoxy- oder anderen Methoden sequenziert werden und die Basensequenz mit einer Wildtyp-Npt2B-Gensequenz verglichen werden. Die Hybridisierung mit der Sequenzvariante kann auch verwendet werden, um ihre Gegenwart zu bestimmen, z.B. mit Southern Blot, Dot Blot etc. Das Hybridisierungsmuster einer Kontrolle und einer Sequenzvariante mit einer Anordnung von Oligonucleotidsonden, die auf einem festen Träger immobilisiert sind, wie in US 5 445 934 oder in WO 95/35505 beschrieben, kann auch als Mittel zum Nachweis der Gegenwart von Sequenzvarianten verwendet werden. Die Einzelstrangkonformations-Polymorphismus-(SSCP)-Analyse, denaturierende Gradienten-Gelelektrophores (DGGE) und Heteroduplexanalyse in Gelmatrices werden verwendet, um Konformationsveränderungen, die durch Variationen der DNA-Sequenz, z.B. Veränderungen der elektrophoretischen Beweglichkeit, erzeugt werden, nachzuweisen. Alternativ wird die Probe, wenn ein Polymorphismus eine Erkennungsstelle für eine Restriktions-

endonuclease erzeugt oder zerstört, mit der Endonuclease verdaut und die Produkte der Grösse nach fraktioniert, um zu bestimmen, ob das Fragment verdaut wurde. Die Fraktionierung wird mit Gel- oder Kapillarelektrophorese, insbesondere auf Acrylamid- oder Agarosegelen durchgeführt.

Das Screenen auf Mutationen von Npt2B kann auf den funktionellen oder antigenen Eigenschaften des Proteins basieren. Proteintrunkierungsassays sind nützlich, um Deletionen nachzuweisen, die die biologische Aktivität des Proteins beeinflussen können. Verschiedene Immunoassays, die dazu entwickelt wurden, um Polymorphismen in Npt2B-Proteinen nachzuweisen, können zum Screening verwendet werden. Wenn viele verschiedene genetische Mutationen zu einem speziellen Krankheitsphänotyp führen, haben sich funktionelle Proteinassays als wirksame Screeningwerkzeuge erwiesen. Die Aktivität des codierten Npt2B-Proteins kann durch Vergleich mit dem Wildtyp-Protein bestimmt werden.

Diagnosemethoden der vorliegenden Erfindung, bei denen der Anteil der Npt2B-Genexpression von Interesse ist, beinhalten typischerweise einen Vergleich der Npt2B-Nucleinsäurehäufigkeit in einer interessierenden Probe mit dem Kontrollwert um relative Unterschiede zu bestimmen, wobei der Unterschied qualitativ und/oder quantitativ gemessen werden kann, wobei die Unterschiede dann mit der Gegenwart oder Abwesenheit eines anormalen Npt2B-Genexpressionsmusters in Beziehung gebracht werden. Eine Mehrzahl verschiedener Methoden zur Bestimmung der Nucleinsäurehäufigkeit in einer Probe sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt, wobei spezielle Methoden von Interesse solche einschliessen, die in den folgenden Literaturstellen beschrieben sind: Pietu et al., Genome Res. (Juni 1996), 6:492-503; Zhao et al., Gene (24. April 1995), 156:207-213; Soares, Curr. Opin. Biotechnol. (Oktober 1997), 8:542-546.; Raval, J. Pharmacol. Toxicol. Methods (November 1994), 32:125-127; Chalifour et al., Anal. Biochem. (1. Februar 1994), 216:299-304; Stolz & Tuan, Mol. Biotechnol. (Dezember 1996), 6:225-230; Hong et al., Bioscience Reports (1982), 2:907 und McGraw, Anal. Biochem. (1984), 143:298. Von Interesse sind auch die in WO 97/27317 offenbarten Methoden, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen wird.

Screeningassays

Die vorliegenden Npt2B-Polypeptide finden Verwendung für verschiedene Screeningassays, die dazu entwickelt wurden, um therapeutische Mittel aufzufinden. So kann man ein Zellmodell, wie eine Wirtszelle, z.B. CHO, HEK293, COS7, Xenopus Oocyten etc. verwenden, die in einer Art und Weise transfiziert wurden, die ausreicht, um Npt2B an der Oberfläche zu exprimieren. Man kann dann die Zelle mit einem Medium, das Natrium- und Phosphationen enthält, in Kontakt bringen und die Menge an Phosphationen messen, die von der Zelle aufgenommen wird, wobei die Messungen sowohl in einer Kontrollumgebung als auch einer Testumgebung durchgeführt werden, z.B. in Gegenwart einer in Betracht gezogenen Npt2B-Modulatorverbindung, z.B. eines Npt2B-Agonisten oder eines Npt2B-Antagonisten oder Inhibitors. Um den Nachweis der Pi-Aufnahme zu erleichtern, ist markierter Phosphor im Medium vorhanden, wobei jede geeignete Markierung angewendet werden kann, z.B. eine isotopische Markierung, z.B. ^{32}P oder ^{33}P. Alternativ können Strommessungen unter Verwendung wohlbekannter elektrophysiologischer Methoden (siehe z.B. Electrophysiology, A practical Approach (IRL Press) (1993)) durchgeführt werden, aus denen die Pi-Aufnahme bestimmt werden kann. Beispiele für Assays zur Messung der Pi-Aufnahme sind enthalten in: Maganin et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (Juli 1993), 90:5979-5983 und Helps et al., Eur. J. Biochem. (1995), 228:927-930.

Von Interesse für Screeningassays sind auch nicht menschliche transgene Tiere, die funktionelles Npt2B exprimieren, wobei solche Tiere oben beschrieben wurden. In vielen Ausführungsformen fehlt den Tieren endogenes Npt2B. Bei Verwendung solcher Tiere für Screeninganwendungen wird eine Testverbindung/werden Testverbindungen dem Tier verabreicht und die entstehenden Veränderungen im Phänotyp/z.B. der Serum-Pi-Pegel, falls vorhanden, werden mit einer Kontrolle verglichen.

Alternativ können in-vitro-Modelle erstellt und angewendet werden. Z.B. kann die Npt2B-Bindungsaktivität in einer in-vitro-Umgebung gemessen werden, in der Bindungsereignisse zwischen Npt2B und vorgesehenen Npt2B-modulierenden Mitteln überwacht werden. In anderen in-vitro-Modellen werden synthetische Lipid-Bilayers, die den vorgesehenen Npt2B-Co-Transporter beinhalten, hergestellt und eine Pi-Passage von einer Seite der Lipid-Bilayer zur anderen gemessen. Beispiele für solche synthetischen Lipid-Bilayer-Assays finden sich in: Brutyan et al., Biochimica et Biophysica Acta (1995), 1236:339-344; Wonderlin et al., Biophys. J. (1990), 58:289-297 und Suarez-Isla et al., Biochemistry (1983), 22:2319-2323.

Eine Vielzahl anderer Reagenzien kann in dem Screeningassay enthalten sein. Diese schliessen Reagenzien wie Salze neutrale Proteine, z.B. Albumin, Detergenzien etc. ein, die verwendet werden, um eine optimale Protein-Protein-Bindung zu erleichtern und/oder nichtspezifische oder Hintergrundwechselwirkungen zu reduzieren. Reagenzien, die die Wirksamkeit des Assays verbessern, z.B. Proteaseinhibitoren, Nucleaseinhibitoren, antimikrobielle Mittel etc., können verwendet werden.

Eine Vielzahl verschiedener vorgesehener therapeutischer Mittel, die entweder als Ntp2B-Agonisten oder -Antagonisten dienen, können mit den obigen Methoden gescreent werden. Vorgesehene oder in Betracht gezogene Mittel umfassen zahlreiche chemische Klassen, obwohl es typischerweise organische Moleküle, bevorzugt kleine organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 50 und weniger als etwa 2500 Dalton sind. Vorgesehene Mittel umfassen funktionelle Gruppen, die für die strukturelle Wechselwirkung mit Proteinen notwendig sind, insbesondere Wasserstoffbindung, und enthalten typischerweise mindestens eine Amin-, Carbonyl-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppe, bevorzugt mindestens zwei funktionelle chemische Gruppen. Die in

Betracht gezogenen Mittel umfassen häufig cyclische Kohlenstoff- oder heterocyclische Strukturen und/oder aromatische oder polyaromatische Strukturen, die mit einer oder mehreren der obigen funktionellen Gruppen substituiert sind. In Betracht gezogene Mittel finden sich auch unter den biologischen Molekülen einschliesslich Peptiden, Sacchariden, Fettsäuren, Steroiden, Purinen, Pyrimidinen, Derivaten, Strukturanalogen oder Kombinationen davon.

Vorgesehene Mittel werden aus einer Vielzahl von Quellen erhalten, einschliesslich Bibliotheken für synthetische oder natürliche Verbindungen. Z.B. sind zahlreiche Mittel verfügbar für eine statistische oder gerichtete Synthese einer grossen Vielzahl organischer Verbindungen und biologischer Moleküle, einschliesslich der Expression von randomisierten Oligonucleotiden und Oligopeptiden. Alternativ sind Bibliotheken von natürlichen Verbindungen in Form von Bakterien-, Pilz-, Pflanzen- und Tierextrakten verfügbar oder können leicht hergestellt werden. Zusätzlich werden natürliche oder synthetisch hergestellte Bibliotheken und Verbindungen leicht modifiziert durch übliche chemische, physikalische und biochemische Mittel und können verwendet werden, um kombinatorische Bibliotheken zu erzeugen. Bekannte pharmakologische Mittel können direkten oder zufälligen chemischen Modifikationen unterzogen werden, z.B. Acylierung, Alkylierung, Veresterung, Amidifizierung etc., um Strukturanaloge zu erzeugen.

Von speziellem Interesse für viele Ausführungsformen sind Screeningmethoden, die Mittel auffinden, die selektiv das vorliegende Npt2B und nicht andere Natriumphosphat-Co-Transporter, wie Nieren-Natriumphosphat-Co-Transporter, z.B. Npt1, modulieren, d.h. hemmen. Um solche Mittel aufzufinden, kann ein mehrstufiges Screeningprotokoll durchgeführt werden, wobei Mittel, die Npt2B in einem ersten Assay hemmen, dann auf ihre Fähigkeit untersucht werden, Nicht-Npt2B-Transporter zu hemmen. Jeder geeignete Assay kann für diesen Assay der zweiten Stufe angewendet werden, z.B. solche, die von Maganin et al. in Proc. Nat'l Acad. Sci USA (Juli 1993), 90:5979-5983 und Helps et al., Eur. J. Biochem. (1995), 228: 927-930 offenbart werden.

Npt2E-Nucleinsäure und therapeutische Polypeptidzusammensetzungen

Die Nucleinsäurezusammensetzungen der vorliegenden Erfindung finden auch Verwendung als therapeutische Mittel in Fällen, in denen man die Npt2B-Aktivität bei einem Wirt verbessern möchte, z.B. Krankheitszustände, die mit Hypophosphatämie verbunden sind. Die Npt2B-Gene, Genfragmente oder die codierten Npt2B-Proteine oder Proteinfragmente sind für die Gentherapie nützlich, um Störungen zu behandeln, die mit Npt2B-Mangel verbunden sind. Expressionsvektoren können verwendet werden, um das Npt2B-Gen in eine Zelle einzuführen. Solche Vektoren haben im Allgemeinen geeignete Restriktionsstellen, die in der Nähe der Promotorsequenz angeordnet sind, für die Insertion von Nucleinsäuresequenzen. Transkriptionskassetten können hergestellt werden, die eine Transkriptionsstartregion, das Zielgen oder Fragment und eine Transkriptionsendregion umfassen. Die Transkriptionskassetten können in eine Vielzahl von Vektoren eingeführt werden, z.B. Plasmide; Retroviren z.B. Lentivirus; Adenovirus und dgl., wobei die Vektoren vorübergehend oder stabil in den Zellen erhalten bleiben, gewöhnlich über einen Zeitraum von mindestens einem Tag, üblicher über einen Zeitraum von mindestens etwa mehreren Tagen bis mehreren Wochen.

Das Gen oder Npt2B-Protein kann in Gewebe oder Wirtszellen auf irgendeinem Weg eingeführt werden, einschliesslich viraler Infektion, Mikroinjektion oder Fusion von Vesikeln. Eine Sprühinjektion kann auch für die intramuskuläre Verabreichung verwendet werden, wie von Furth et al. (1992) in Anal. Biochem. 205:365-368 beschrieben. Die DNA kann auf Goldmikroteilchen aufgetragen sein und intradermal zugeführt werden durch eine Teilchenbombardierungsvorrichtung oder «Genkanone», wie in der Literatur beschrieben (siehe z.B. Tang et al. (1992), Nature 356:152-154), wo Goldmikroprojektile mit der DNA beschichtet werden und dann in die Hautzellen geschossen werden.

Methoden zur Modulation der Npt2B-Aktivität

Die vorliegende Erfindung liefert Methoden, um die Npt2B-Aktivität in einer Zelle zu modulieren, einschliesslich Methoden zur Erhöhung der Npt2B-Aktivität (z.B. Methoden zur Verbesserung des Pi-Transports), ebenso wie Methoden zur Verminderung oder Hemmung der Npt2B-Aktivität, z.B. Methoden, um den Pi-Transport zu stoppen oder zu begrenzen. Bei solchen Methoden wird eine wirksame Menge eines Npt2B-modulierenden Mittels mit der Zelle in Kontakt gebracht.

Es werden auch Methoden zur Modulation der Npt2B-Aktivität in einem Wirt bereitgestellt, einschliesslich solchen zur Verbesserung und zur Hemmung. Bei solchen Methoden wird eine wirksame Menge eines aktiven Mittels, das die Aktivität von Npt2B in vivo moduliert, z.B. gewöhnlich die Npt2B-Aktivität verbessert oder hemmt, dem Wirt verabreicht. Das aktive Mittel kann in Form einer Vielzahl verschiedener Verbindungen vorliegen, einschliesslich einer natürlich vorkommenden oder synthetischen kleinen Molekülverbindung, einem Antikörper, Fragment oder Derivat davon, einer Antisense-Zusammensetzung und dgl.

Von besonderem Interesse in speziellen Ausführungsformen sind Mittel, die die Npt2B-Aktivität, z.B. den Pi-Transport, um mindestens das etwa 10-fache, gewöhnlich mindestens etwa 20-fache und üblicher mindestens etwa 25-fache, vermindern, was durch den Oocytentransport-Assay, wie von Magagnin oben beschrieben, gemessen wird. Bei vielen Ausführungsformen ist die Verwendung von Verbindungen von speziellem Interesse, die die Npt2B-Aktivität, verglichen mit einer Kontrolle, um mindestens das 100-fache vermindern.

Von Interesse ist auch die Verwendung von Mitteln, die, obwohl sie für eine verminderte Npt2B-Aktivität sorgen, die Aktivität anderer Natriumphosphat-Co-Transporter, z.B. Npt1 etc., nicht wesentlich, wenn überhaupt, vermindern. Somit sind die Mittel in dieser Ausführungsform selektive Inhibitoren von

Npt2B. Ein Mittel wird dann als selektiv angesehen, wenn es für die obige verminderte Npt2B-Aktivität sorgt, aber im Wesentlichen keine verminderte Aktivität mindestens einer anderen Art von Natriumphosphat-Co-Transporter erzeugt, wobei «im Wesentlichen keine» weniger als eine 10-fache Verminderung, gewöhnlich weniger als eine 5-fache Verminderung und in vielen Fällen weniger als eine 1-fache Verminderung bedeutet, wobei die Aktivität, wie bei Magagnin oben beschrieben, gemessen wird.

Natürlich vorkommende oder synthetische kleine Molekülverbindungen von Interesse schliessen zahlreiche chemische Klassen ein obwohl es typischerweise organische Moleküle sind, bevorzugt kleine organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 50 und weniger als etwa 2500 Dalton. In Betracht kommende Mittel umfassen funktionelle Gruppen, die für die strukturelle Wechselwirkung mit Proteinen notwendig sind, insbesondere Wasserstoffbindung, und schliessen typischerweise mindestens eine Amin-, Carbonyl-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppe ein, bevorzugt mindestens zwei funktionelle chemische Gruppen. Die vorgesehenen Mittel umfassen häufig cyclische Kohlenstoff- oder heterocyclische Strukturen und/oder aromatische oder polyaromatische Strukturen, die mit einer oder mehreren der obigen funktionellen Gruppen substituiert sind. In Betracht kommende Mittel finden sich auch bei den biologischen Molekülen einschliesslich Peptiden, Sacchariden, Fettsäuren, Steroiden, Purinen, Pyrimidinen, Derivaten, Strukturanalogen oder Kombinationen davon.

Von Interesse als aktives Mittel sind auch Antikörper, die gezielt die Npt2B-Aktivität in einem Wirt zumindest vermindern, wenn nicht gar hemmen. Geeignete Antikörper werden erhalten, indem ein Wirtstier mit Peptiden immunisiert wird, die einen Teil oder das vollständige Zielprotein, z.B. Npt2B, umfassen. Geeignete Wirtstiere schliessen Mäuse, Ratten, Schafe, Ziegen, Hamster, Kaninchen etc. ein. Der Ursprung des Proteinimmunogens kann Maus, Mensch, Ratte, Affe etc. sein. Das Wirtstier ist im Allgemeinen von einer anderen Art als das Immunogen, z.B. wird menschliches Npt2B verwendet, um Mäuse zu immunisieren etc.

Das Immunogen kann das vollständige Protein oder Fragmente und Derivate davon umfassen. Bevorzugte Immunogene umfassen das gesamte Npt2B oder einen Teil davon, wobei diese Reste die Posttranslationsmodifikationen aufweisen, z.B. eine Glycosylierung, die auch das native Zielprotein aufweist. Immunogene, die die extrazelluläre Domäne umfassen, werden auf einer Vielzahl von Wegen erzeugt, die im Stand der Technik bekannt sind, z.B. Expression klonierter Gene unter Verwendung üblicher rekombinanter Methoden, Isolierung aus HEC etc.

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern ist die erste Stufe die Immunisierung des Wirtstiers mit dem Zielprotein, wobei das Zielprotein bevorzugt in im Wesentlichen reiner Form vorliegt, und weniger als etwa 1% Verunreinigungen enthält. Das Immunogen kann das vollständige Zielprotein, Fragmente oder Derivate davon umfassen. Um die Immunantwort des Wirtstiers zu verstärken, kann das Zielprotein mit einem Adjuvans vereinigt werden, wobei geeignete Adjuvantien Alaun, Dextran, Sulfat, grosse polymere Anionen, Öl- und Wasser-Emulsionen, z.B. Freund's Adjuvans, Freund's vollständiges Adjuvans und dgl. einschliessen. Das Zielprotein kann auch mit einem synthetischen Trägerprotein oder synthetischen Antigenen konjugiert sein. Eine Vielzahl von Wirten kann immunisiert werden, um polyklonale Antikörper zu erzeugen. Solche Wirte schliessen Kaninchen, Meerschweinchen, Nagetiere, z.B. Mäuse, Ratten, Schafe, Ziegen und dgl. ein. Das Zielprotein wird dem Wirt verabreicht, gewöhnlich intradermal, wobei sich an eine Anfangsdosis eine oder mehrere, gewöhnlich mindestens zwei, zusätzliche Booster-Dosierungen anschliessen. Nach der Immunisierung wird Blut von dem Wirt gesammelt und anschliessend das Serum von den Blutzellen getrennt. Das im entstehenden Antiserum vorhandene Ig kann weiter fraktioniert werden unter Verwendung bekannter Methoden, z.B. Ammoniumsalzfraktionierung, DEAE-Chromatographie und dgl.

Monoklonale Antikörper werden mit üblichen Techniken erzeugt. Im Allgemeinen liefern die Milz und/oder die Lymphknoten eines immunisierten Wirtstiers eine Quelle für Plasmazellen. Die Plasmazellen werden durch Fusion mit Myelomazellen immortalisiert, um Hybridomazellen herzustellen. Kulturüberstände von einzelnen Hybridomas werden gescreent unter Verwendung von Standardtechniken, um solche zu identifizieren, die Antikörper mit der gewünschten Spezifität erzeugen. Geeignete Tiere zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das menschliche Protein schliessen Mäuse, Ratten, Hamster etc. ein. Um Antikörper gegen das Mäuseprotein zu züchten, ist das Tier im Allgemeinen ein Hamster, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen etc. Der Antikörper kann von den Hybridomazellüberständen oder der Ascitesflüssigkeit mit üblichen Techniken gereinigt werden, z.B. mit Affinitätschromatographie unter Verwendung von Npt2B, das an einen unlöslichen Träger, Protein-A-Sepharose etc., gebunden ist.

Der Antikörper kann als einzelne Kette anstatt der normalen multimeren Struktur erzeugt werden. Einzelkettige Antikörper werden von Jost et al. (1994), J.B.C. 269:26267-73 und anderen beschrieben. DNA-Sequenzen, die die variable Region der schweren Kette und die variable Region der leichten Kette codieren, werden mit einem Spacer ligiert, der mindestens etwa vier Aminosäuren von kleinen neutralen Aminosäuren, einschliesslich Glycin und/oder Serin, codiert. Das durch diese Fusion codierte Protein lässt den Zusammenbau einer funktionellen variablen Region, die die Spezifität und Affinität des ursprünglichen Antikörpers behält, zu.

Für die in-vivo-Verwendung, insbesondere für die Injektion in Menschen, ist es wünschenswert, die Antigenizität des Antikörpers zu vermindern. Eine Immunantwort eines Empfängers gegen das Blockierungsmittel vermindert möglicherweise den Zeitraum, über den die Therapie wirksam ist. Methoden der Humanisierung von Antikörpern sind im Stand der Technik bekannt. Der humanisierte Antikörper kann das Produkt eines Tiers mit transgenen menschlichen Immunoglobulingenen der konstanten Region sein (siehe z.B. die internationalen Patentanmeldun-

gen WO 90/10 077 und WO 90/04 036). Alternativ kann der interessierende Antikörper mit rekombinanten DNA-Techniken erstellt werden, um CH1-, CH2-, CH3-, Gelenkdomäne und/oder die Rahmendomäne durch die entsprechende menschliche Sequenz zu ersetzen (siehe WO 92/02 190).

Die Verwendung von Ig cDNA zur Konstruktion von chimären Immunoglobulingenen ist im Stand der Technik bekannt (Liu et al. (1987), P.N.A.S., 84:3439 und (1987), J. Immunol. 139:3521). mRNA wird aus einem Hybridom oder einer anderen Zelle, die den Antikörper produziert, isoliert und verwendet, um cDNA zu erzeugen. Die interessierende cDNA kann mit der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden unter Verwendung spezifischer Primer (U. S.-Patente Nr. 4 683 195 und 4 683 202). Alternativ wird eine Bibliothek erstellt und gescreent, um die interessierende Sequenz zu isolieren. Die DNA-Sequenz, die die variable Region des Antikörpers codiert, wird dann mit menschlichen Sequenzen für die konstante Region fusioniert. Die Sequenzen für menschliche Gene für konstante Regionen finden sich bei Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. Veröffentlichung Nr. 91-3242. Gene der menschlichen C-Region sind leicht erhältlich aus diesen Klonen. Die Auswahl des Isotyps wird geleitet von den gewünschten Effektorfunktionen, z.B. Komplementfixierung oder Aktivität bei Antikörper-abhängiger Zellcytotoxizität. Bevorzugte Isotypen sind IgG1, IgG3 und IgG4. Eine der menschlichen konstanten Regionen der leichten Kette, kappa oder lambda, kann verwendet werden. Der chimäre humanisierte Antikörper wird dann mit üblichen Methoden exprimiert.

Antikörperfragmente, wie Fv, $F(ab')_2$ und Fab können hergestellt werden durch Spaltung des intakten Proteins, z.B. mit Protease oder chemischer Spaltung. Alternativ wird ein trunkiertes Gen entwickelt. Z.B. würde ein chimäres Gen, das einen Teil des $F(ab')_2$-Fragmentes codiert, DNA-Sequenzen enthalten, die die CH1-Domäne und die Gelenkregion der H-Kette codieren, gefolgt von einem Translationsstopcodon, was das trunkierte Molekül liefert.

Konsensus-Sequenzen der Regionen H und LJ können verwendet werden, um Oligonucleotide zur Verwendung als Primer zu entwickeln, um geeignete Restriktionsstellen in die J-Region einzuführen für eine nachfolgende Verbindung von Segmenten der V-Region mit menschlichen Segmenten der C-Region. cDNA der C-Region kann modifiziert werden durch punktgerichtete Mutagenese, um eine Restriktionsstelle an analoger Position in der menschlichen Sequenz zu platzieren.

Expressionsvektoren schliessen Plasmide, Retroviren, YACs, von EBV abgeleitete Episomen und dgl. ein. Ein geeigneter Vektor ist einer, der eine funktionell vollständige menschliche CH- oder CL-Immunglobulinsequenz codiert mit geeigneten Restriktionsstellen, die so vorgesehen werden, dass irgendeine VH-oder VL-Sequenz leicht insertiert und exprimiert werden kann. In solchen Vektoren tritt ein Spleissen gewöhnlich zwischen der Spleiss-Donor-Stelle in der insertierten J-Region und der Spleiss-Akzeptor-Stelle der vorhergehenden humanen C-Region auf und es treten auch Spleiss-Bereiche auf innerhalb der menschlichen CH-Exons. Eine Polyadenylierung und das Transkriptionsende erfolgen an nativen Chromosomenstellen stromabwärts der codierenden Bereiche. Der entstehende chimäre Antikörper kann mit irgendeinem starken Promotor verbunden werden, einschliesslich retroviralen LTRs, z.B. der frühe Promotor von SV-40 (Okayama et al. (1983), Mol. Cell. Bio., 3:280), Rous-Sarkoma-Virus-LTR (Gorman et al. (1982), P.N.A.S. 79:6777) und Moloney-Mäuse-Leukämievirus-LTR (Grosschedl et al. (1985), Cell 41:885); native Ig-Promotoren etc.

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung ist das aktive Mittel ein Mittel, das die Expression des Gens, das das Zielprotein in dem Wirt codiert, moduliert und im Allgemeinen verringert oder nach unten reguliert. Z.B. können Antisense-Moleküle verwendet werden, um die Expression von Npt2B in Zellen herunterzufahren. Das Antisense-Reagenz können Antisense-Oligonucleotide (ODN), insbesondere synthetische ODN mit chemischen Modifikationen aus nativen Nucleinsäuren oder Nucleinsäurekonstrukte sein, die solche Antisense-Moleküle exprimieren, z.B. RNA. Die Antisense-Sequenz ist komplementär zu der mRNA des Zielgens und hemmt die Expression der in Betracht gezogenen Genprodukte. Antisense-Moleküle hemmen die Genexpression über verschiedene Mechanismen, z.B. indem sie die Menge an mRNA, die für die Translation verfügbar ist, reduzieren, durch Aktivierung von RNAse H oder sterische Hinderung. Ein Antisense-Molekül oder eine Kombination von Antisense-Molekülen kann verabreicht werden, wobei eine Kombination mehrere verschiedene Sequenzen umfassen kann.

Antisense-Moleküle können durch Expression eines Teils oder der gesamten Zielgensequenz oder eines Teils davon in einem geeigneten Vektor erzeugt werden, wobei der Transkriptionsstart so orientiert ist, dass ein Antisense-Strang als RNA-Molekül erzeugt wird. Alternativ ist das Antisense-Molekül ein synthetisches Oligonucleotid. Antisense-Oligonucleotide sind im Allgemeinen mindstens etwa 7, gewöhnlich mindestens etwa 12, üblicher mindestens etwa 20 Nucleotide lang und nicht länger als etwa 500, gewöhnlich nicht länger als etwa 50, üblicher nicht länger als etwa 35 Nucleotide, wobei die Länge durch die Effizienz der Hemmung, die Spezifität, einschliesslich der Abwesenheit einer Kreuzreaktivität, und dgl. bestimmt wird. Es wurde gefunden, dass kurze Oligonucleotide mit einer Länge von 7 bis 8 Basen starke und selektive Inhibitoren der Genexpression sein können (siehe Wagner et al. (1996), Nature Biotechnol., 14:840-844).

Eine spezifische Region oder Regionen der endogenen Sense-Strang-mRNA-Sequenz werden ausgewählt, um durch die Antisense-Sequenz vervollständigt zu werden. Die Auswahl einer spezifischen Sequenz für das Oligonucleotid kann durch Verwendung einer empirischen Methode erfolgen, wobei verschiedene in Betracht, kommende Sequenzen auf die Hemmung der Expression des Zielgens in einem in-vitro-Modell oder einem Tiermodell untersucht werden. Eine Kombination von Sequenzen kann auch verwendet werden, wenn verschiedene Regionen der mRNA-Sequenz für die Antisense-Ergänzung ausgewählt werden.

Antisense-Oligonucleotide können chemisch synthetisiert werden mit Methoden, die im Stand der Technik bekannt sind (siehe Wagner et al. (1993), oben, und Milligan et al., oben). Bevorzugte Oligonucleotide sind chemisch modifiziert gegenüber der nativen Phosphodiesterstruktur, um ihre intrazelluläre Stabilität und Bindungsaffinität zu erhöhen. Eine Anzahl solcher Modifikationen, die die Chemie des Gerüstes der Zucker oder der heterocyclischen Basen verändern, wurde in der Literatur beschrieben.

Zu den nützlichen Veränderungen der Gerüstchemie gehören Phosphorthioate; Phosphordithioate, bei denen beide nicht verbrückenden Sauerstoffe durch Schwefel ersetzt sind; Phosphoramidite; Alkylphosphotriester und Boranophosphate. Achirale Phosphatderivate schliessen 3′-0′-5′-S-Phosphorthioat, 3′-S-5′-O-Phosphorthioat, 3′-CH_2-5′-O-Phosphonat und 3′-NH-5′-O-Phosphoramidat ein. Peptidnucleinsäuren ersetzen das gesamte Ribosephosphodiestergerüst durch eine Peptidbindung. Zuckermodifikationen werden auch verwendet, um die Stabilität und Affinität zu verbessern. Das Γ-Anomer der Desoxyribose kann verwendet werden, wenn die Base im Hinblick auf das natürliche Γ-Anomer invertiert ist. Die 2′-OH-Gruppe des Ribosezuckers kann unter Bildung von 2′-O-Methyl- oder 2′-0-Allylzuckern verändert werden, was eine Beständigkeit gegenüber einem Abbau liefert, ohne die Affinität zu beeinflussen. Die Modifikation der heterocyclischen Basen muss die richtige Basenpaarung erhalten. Einige nützliche Substitutionen schliessen Desoxyuridin statt Desoxythymidin, 5-Methyl-2′-desoxycytidin und 5-Brom-2′-desoxycytidin statt Desoxycytidin ein. 5-Propinyl-2′-desoxyuridin und 5-Propinyl-2′-desoxycytidin zeigten eine erhöhte Affinität und biologische Aktivität, wenn sie Desoxythymidin bzw. Desoxycytidin ersetzten.

Als Alternative zu Antisense-Inhibitoren können katalytische Nucleinsäureverbindungen, z.B. Ribozyme, Antisense-Konjugate etc. verwendet werden, um die Genexpression zu hemmen. Ribozyme können in vitro synthetisiert werden und dem Patienten verabreicht werden oder können in einem Expressionsvektor codiert werden, aus dem das Ribozym in der in Betracht gezogenen Zelle synthetisiert wird (siehe z.B. internationale Patentanmeldung WO 9 523 225 und Beigelman et al. (1995), Nucl. Acids Res., 23:4434-42). Beispiele für Oligonucleotide mit katalytischer Aktivität werden in WO 9 506 764 beschrieben. Konjugate von Antisense-ODN mit einem Metallkomplex, z.B. TerpyridylCu(II), die die mRNA-Hydrolyse vermitteln können, werden von Bashkin et al. (1995), Appl. Biochem. Biotechnol., 54:43-56 beschrieben.

Wie oben erwähnt, wird eine wirksame Menge des aktiven Mittels dem Wirt verabreicht, wobei «wirksame Menge» eine Dosierung bedeutet, die ausreicht, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen. Im Allgemeinen ist das erwünschte Ergebnis die Verstärkung oder Verminderung der intestinalen Phosphatanionenabsorption, die durch Plasma-Pi-Pegel im Vergleich mit einer Kontrolle gemessen wird.

Bei den vorliegenden Methoden kann das aktive Mittel/die aktiven Mittel an den Wirt verabreicht werden unter Verwendung irgendeiner geeigneten Einrichtung, die die gewünschte Modulation der Npt2B-Aktivität liefern kann, z.B. die gewünschte Reduktion der Pi-Absorption und der Plasma-Pi-Gehalte. Somit kann das Mittel in eine Vielzahl von Präparaten für die therapeutische Verabreichung eingearbeitet werden. Genauer können die Mittel der vorliegenden Erfindung zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden durch Kombination mit geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Trägern oder Verdünnungsmitteln und können zu Präparaten in fester, halbfester, flüssiger oder Gasform formuliert werden, z.B. Tabletten, Kapseln, Pulver, Körnchen, Salben, Lösungen, Zäpfchen, Injektionen Inhalationsmitteln und Aerosolen.

Die Verabreichung der Mittel kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden, einschliesslich einer oralen, buccalen, rektalen, parenteralen, intraperitonealen, intradermalen, transdermalen, intrachealen etc. Verabreichung.

Bei pharmazeutischen Dosierungsformen können die Mittel in Form ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze verabreicht werden oder sie können alleine verwendet werden oder in geeigneter Zusammensetzung, ebenso wie in Kombination mit anderen pharmazeutisch aktiven Verbindungen. Die folgenden Methoden und Hilfsstoffe sind nur beispielhaft und in keiner Weise beschränkend.

Für orale Präparate können die Mittel allein oder in Kombination mit geeigneten Additiven verwendet werden, um Tabletten, Pulver, Körnchen oder Kapseln herzustellen, z.B. mit üblichen Additiven, wie Lactose, Mannit, Maisstärke oder Kartoffelstärke; mit Bindemitteln, wie kristalliner Cellulose, Cellulosederivaten, Gummi arabicum, Maisstärke oder Gelatine; mit Sprengmitteln, wie Maisstärke, Kartoffelstärke oder Natriumcarboxymethylcellulose; mit Gleitmitteln, wie Talkum oder Magnesiumstearat und, falls erwünscht, mit Verdünnungsmitteln, Puffermitteln, Feuchthaltemitteln, Konservierungsmitteln und aromatisierenden Mitteln.

Die Mittel können zu Präparaten zur Injektion formuliert werden, indem sie in einem wässrigen oder nichtwässrigen Lösungsmittel gelöst, suspendiert oder emulgiert werden, z.B. pflanzlichen oder anderen ähnlichen Ölen, synthetischen aliphatischen Säureglyceriden, Estern von höheren aliphatischen Säuren oder von Propylenglycol und, falls erwünscht, mit üblichen Additiven, wie Solubilisatoren, isotonischen Mitteln, Suspensionsmitteln, Emulsionsmitteln, Stabilisatoren und Konservierungsmitteln.

Die Mittel können in Aerosolform verwendet werden, die durch Inhalation verabreicht wird. Die erfindungsgemässen Verbindungen können mit unter Druck gesetzten annehmbaren Treibmitteln formuliert werden, z.B. Dichlordifluormethan, Propan, Stickstoff und dgl.

Weiterhin können die Mittel zu Zäpfchen verarbeitet werden, indem sie mit einer Vielzahl von Basen, z.B. emulgierenden Basen oder wasserlöslichen Basen, gemischt werden. Die erfindungsgemässen Verbindungen können rektal über ein Zäpfchen verabreicht werden. Das Zäpfchen kann Träger enthalten, wie Kakaobutter, Carbowachse und Polyethylenglycole, die bei Körpertemperatur schmelzen, sich aber bei Raumtemperatur verfestigen.

Einheitsdosierungsformen für die orale oder rektale Verabreichung, z.B. Sirupe, Elixiere und Suspensionen können vorgesehen werden, wobei jede Dosierungseinheit, z.B. ein Teelöffel, ein Esslöffel, eine Tablette oder ein Zäpfchen, eine vorbestimmte Menge der Zusammensetzung enthält, die einen oder mehrere Inhibitoren enthält. In ähnlicher Weise können Einheitsdosierungsformen für die Injektion oder intravenöse Verabreichung den Inhibitor/die Inhibitoren in einer Zusammensetzung als Lösung in sterilem Wasser, normaler Kochsalzlösung oder einem anderen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthalten.

Der Ausdruck «Einheitsdosierungsform», wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf physikalisch diskrete Einheiten, die als Einheitsdosierungen für menschliche und tierische Patienten geeignet sind, wobei jede Einheit eine vorbestimmte Menge der erfindungsgemässen Verbindungen enthält, die so berechnet ist, dass die Menge ausreicht, um die gewünschte Wirkung zu erzielen, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel, Träger oder Trägermittel. Die genauen Angaben für die neuen Einheitsdosierungsformen der vorliegenden Erfindung hängen von der jeweiligen angewendeten Verbindung und zu erreichenden Wirkung ab und von den pharmakodynamischen Eigenschaften, die jede Verbindung in dem Wirt liefert.

Die pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoffe, wie Träger, Adjuvantien, Trägermittel oder Verdünnungsmittel sind für die Öffentlichkeit leicht verfügbar. Ausserdem sind pharmazeutisch annehmbare Hilfssubstanzen, wie pH-einstellende und puffernde Mittel, die Tonizität einstellende Mittel, Stabilisatoren, Benetzungsmittel und dgl. für die Öffentlichkeit leicht verfügbar.

Wenn das Mittel ein Polypeptid, Polynucleotid, Analog oder eine nachahmende Verbindung davon ist, z.B. eine Antisense-Zusammensetzung, kann sie in Gewebe oder Wirtszellen auf einer Vielzahl von Wegen eingeführt werden, einschliesslich einer Vireninfektion, Mikroinjektion oder Fusion von Vesikeln. Eine Sprühinjektion kann auch für die intramuskuläre Verabreichung verwendet werden, wie von Furth et al. (1992), Anal. Biochem., 205:365-368 beschrieben. Die DNA kann auf Goldmikroteilchen aufgetragen werden und intradermal mit einer Teilchenbombardierungsvorrichtung oder «Genkanone», wie in der Literatur beschrieben, zugeführt werden (siehe z.B. Tang et al. (1992), Nature, 356:152-154), wo Goldmikroprojektile mit der therapeutischen DNA beschichtet werden und dann in Hautzellen geschossen werden.

Der Fachmann auf diesem Gebiet erkennt leicht, dass Dosishöhen variieren können als Funktion der spezifischen Verbindung, der Schwere der Symptome und der Empfindlichkeit des Patienten für Nebenwirkungen. Bevorzugte Dosierungen für eine gegebene Verbindung können leicht bestimmt werden von einem Fachmann auf diesem Gebiet mit einer Vielzahl von Mitteln.

Die vorliegenden Methoden finden Anwendung zur Behandlung einer Vielzahl von verschiedenen Krankheitszuständen, an denen die Npt2B-Aktivität beteiligt ist. Die Krankheitszustände, die mit den vorliegenden Methoden behandelt werden können, schliessen Krankheiten ein, die durch eine abnorm hohe Pi-Absorption gekennzeichnet sind, und Krankheitszustände, die durch eine abnorm niedrige Pi-Absorption gekennzeichnet sind. Kranheitszustände, die durch eine anormal niedrige Npt2B-Aktivität entstehen, sind solche, die durch das Vorliegen einer Hypophosphatämie gekennzeichnet sind und schliessen Osteomalazie, Hypokalziurie, Rachitis und dgl. ein. Krankheitszustände, die durch eine anormal hohe Npt2B-Aktivität gekennzeichnet sind, sind solche, die durch das Vorliegen einer Hyperphosphatämie gekennzeichnet sind und schliessen Hyperparathyreoidismus, Hypokalzämie, Vitamin-D-Mangel, Verkalkung von Weichgewebe oder metastatische Verkalkung und dgl. ein. Von besonderem Interesse ist die Verwendung der vorliegenden Methoden, um Hyperphosphatämie zu behandeln, die durch Niereninsuffizienz entsteht, die z.B. durch eine Nierenkrankheit verursacht wird, die zu einer mindestens eingeschränkten Nierenfunktion führt, und dgl.

Unter Behandlung wird mindestens eine Verbesserung der mit dem pathologischen Zustand, der den Wirt befallen hat, verbundenen Symptome verstanden, wobei eine Verbesserung in einem breiten Sinn verwendet wird und sich mindestens auf eine Verminderung der Grösse eines Parameters, z.B. eines Symptoms, das mit dem zu behandelnden pathologischen Zustand verbunden ist, bezieht, z.B. Hyperphosphatämie. Eine solche Behandlung schliesst auch Situationen ein, bei denen der pathologische Zustand oder zumindest die Symptome, die damit verbunden sind, vollständig gehemmt wird, d.h. nicht mehr auftritt oder gestoppt wird, d.h. beendet wird, so dass der Wirt nicht mehr unter dem pathologischen Zustand leidet oder zumindest nicht unter den Symptomen, die den pathologischen Zustand kennzeichnen.

Eine Vielzahl von Wirten können mit den vorliegenden Methoden behandelt werden. Im Allgemeinen sind solche Wirte «Säugetiere», wobei dieser Ausdruck breit verwendet wird, um Organismen zu beschreiben, die zu der Klasse der Säugetiere gehören, einschliesslich der Ordnungen Raubtiere (z.B. Hunde und Katzen), Nagetiere (z.B. Mäuse, Meerschweinchen und Ratten) und Primaten (z.B. Menschen, Schimpansen und Affen). In vielen Ausführungsformen sind die Wirte Menschen.

Kits mit Einheitsdosierungen des aktiven Mittels, gewöhnlich in oraler oder injizierbarer Dosis, werden bereitgestellt. Solche Kits enthalten zusätzlich zu Behältern, die die Einheitsdosierung enthalten, eine Packungsbeilage zur Information, die die Verwendung und die damit erreichten Vorteile der Arzneimittel bei der Behandlung des interessierenden pathologischen Zustandes beschreibt. Bevorzugte Verbindungen und Einheitsdosen sind die hier beschriebenen.

Die folgenden Beispiele dienen nur der Erläuterung. Es ist für den Fachmann leicht erkennbar, dass die Präparate, Dosierungen, Verabreichungsmethoden und anderen Parameter der Erfindung weiter modifiziert oder auf verschiedenen Wegen ersetzt werden können, ohne vom Sinn und Zweck der Erfindung abzuweichen.

Versuche

A. Identifizierung der Npt2B-Sequenz

Ein Vergleich von Natriumphosphat-Co-Transporterproteinsequenzen vom Typ II aus verschiedenen Arten, die in öffentlichen Datenbanken erhältlich sind, ergab, dass während die meisten sehr eng verwandt waren, die Sequenzen von Rind und Flunder eine getrennte Unterfamilie zu bilden schienen. Die Incyte LifeSeq Datenbank wurde daher auf Npt2-artige Klone untersucht, die der Rindersequenz näher kamen als der menschlichen. Eine Anzahl von Klonen wurde identifiziert und drei davon wurden erhalten und die DNA-Sequenz der gesamten Inserts bestimmt. Die DNA-Sequenzierung wurde mit einem Sequenzautomaten (PE/Applied Biosystems, Modell 373A, Foster City, CA) durchgeführt unter Verwendung des Farbstoff-Dides-oxyabbruch-Sequenzierkits des Anbieters. Ein Vergleich der Sequenzen zeigte, dass sie die gleiche cDNA wiedergaben und dass die längste nur ein Teilklon war, dem ungefähr 150 Aminosäuren vom N-Ende fehlten, auf Basis der Homologie mit dem Rinderprotein. Die Konsensussequenz wurde verwendet, um die LifeSeq Datenbank weiter zu screenen und eine grosse Anzahl von Klonen wurde aufgefunden, einschliesslich einem, der die codierende Sequenz voller Länge zu enthalten schien. Letztere wurde von Incyte erhalten und sequenziert. Diese zeigte die Gegenwart eines offenen Leserahmens mit 689 Aminosäuren, der ein menschliches Mitglied der Rinder/Flunder-Typ-II-Co-Transporter-Unterfamilie zu sein schien. Die Mehrzahl der in der LifeSeq Datenbank identifizierten Klone stammte von Bibliotheken, die von aus der Lunge stammenden Gewebeproben abgeleitet waren, jedoch stammten einige der Klone aus Bibliotheken des Dünndarms und aus dem Eierstock. Dies deutete darauf hin, dass diese cDNA ein Kandidat für den menschlichen Natriumphosphat-Co-Transporter des Darms sein könnte. Versuche unter Verwendung von RT-PCR bestätigten die Expression dieses Gens in cDNA, die aus menschlichen Dünndarmproben stammte (erhalten von Clontech Corporation, Palo Alto, CA). Anschliessend wurde die Zuordnung dieser Sequenz als menschlicher Darmtransporter verstärkt durch einen hohen Grad an Homologie mit veröffentlichten Sequenzen für intestinale Transporter von Xenopus (A. Ishizuya-Oka et al. (1997), Temporal and Spatial Expression of an Intestinal Na^+/PO_4^{3-}Cotransporter Correlates With Epithelial Transformation During Thyroid Hormone-Dependent Frog Metamorphosis. Development Genetics 20:53-66) und Maus (H. Hilfiker et al., Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. PNAS 1998, 95:14564-14569).

B. Expression in Säugetierzellen und Assayprotokoll für Na/Pi-Transporter

Menschliche Npt2B-cDNA wird in einen geeigneten konstitutiven Säugetierexpressionsvektor, wie pcDNA3.1 oder pREP9 (beide von Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) kloniert. Falls erforderlich, wird die cDNA in einen induzierbaren Vektor, wie pLK-neo, einen mit Glucocorticoid induzierbaren Vektor (von Prof. Nicholas Fasel, Institute of Biochemistry, Universität von Lausanne, Schweiz, wie in Gene, 111, 199-206 (1992) beschrieben) kloniert. Eine Anzahl von Säugetierzelllinien, z.B. HEK 293, CHO, MDCK, BHK und NIH 3T3 werden mit den Expressionskonstrukten transfiziert und auf eine stabile Expression der rekombinanten Transporter gescreent unter Verwendung einer Version des unten beschriebenen Assays.

Zellen, die den Transporter exprimieren, werden in 96-Napf-Gewebekulturplatten mit 50 000 bis 100 000 Zellen pro Napf in 200 µl geeigneten Medien plattiert und 3 bis 16 Stunden lang anhaften gelassen. Direkt vor dem Test werden die Zellen dreimal mit natrium- und phosphatfreiem Waschpuffer (137 mM N-Methyl-D-glucamin, 5,4 mM KCl, 2,8 mM $CaCl_2$, 1,2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH eingestellt auf 7,4 mit HCl) gewaschen. Die folgenden Komponenten werden dann zugegeben: (1) 50 µl Reaktionspuffer (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2,8 mM $CaCl_2$, 1,2 mM $MgCl_2$, 0,1 mM KH_2PO_4, 10 mM HEPES, pH eingestellt auf 7,4 mit KOH), (2) 40 µl Testverbindungen verdünnt in Reaktionspuffer und (3) 10 ml einer 10X Phosphatlösung (Endkonzentration Phosphat ist 100 µM), die entweder ^{32}P (0,25 µCi) oder ^{33}P (0,5 µCi) als Tracer enthält. Die Platten werden bei Raumtemperatur 20 bis 30 Minuten lang inkubiert und die Reaktion gestoppt, indem die Aufnahmelösung entfernt wird und die Zellen dreimal mit eiskalter Stopplösung (137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) gewaschen werden. Die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität wird bestimmt, indem nach Zugabe von 150 µl Szintillationscocktail gezählt wird. Kontrollen bestehen aus Zellen, die ohne Testverbindung (Träger allein) inkubiert wurden und Zellen, die mit N-Methyl-D-glucamin in Reaktionspuffer anstelle von Natrium inkubiert wurden. Die hemmende Wirkung wird ausgedrückt als Prozentanteil Hemmung der natriumabhängigen Aufnahme des Tracers. Unter Verwendung des obigen Protokolls werden in Betracht gezogene therapeutische Mittel auf ihre Npt2B-modulierende Aktivität gescreent.

Es ist aus den obigen Ergebnissen und der Diskussion offensichtlich, dass ein neuer menschlicher intestinaler Natriumphosphat-Co-Transporter ebenso wie Polypeptide, die damit verwandt sind und Nucleinsäurezusammensetzungen, die ihn codieren, durch die vorliegende Erfindung bereitgestellt werden. Diese Polypeptid- und Nucleinsäurezusammensetzung finden Verwendung in einer Vielzahl verschiedener Anwendungen, einschliesslich Forschung, Diagnose, Screening und therapeutische Anwendungen. Es werden auch neue Methoden zur Behandlung von Krankheiten bereitgestellt, die mit Anormalitäten beim Plasmaphosphatpegel verbunden sind, da die Identifikation des vorliegenden Natriumphosphat-Co-Transporters ein weiteres Ziel für therapeutische Mittel für solche Krankheiten liefert. Somit liefert die vorliegende Erfindung einen wesentlichen Beitrag auf diesem Gebiet.

Alle Veröffentlichungen und Patentanmeldungen, die in dieser Beschreibung zitiert werden, werden hier durch Bezugnahme mit eingeschlossen, als

wenn jede einzelne Veröffentlichung oder Patentanmeldung spezifisch und einzeln hier angegeben würde. Die Nennung irgendeiner Veröffentlichung erfolgt aufgrund ihrer Offenbarung vor dem Anmeldedatum und sollte nicht als Zugeständnis ausgelegt werden, dass die vorliegende Erfindung nicht berechtigt ist, vordatiert zu werden aufgrund einer früheren Erfindung.

Obwohl die vorliegende Erfindung im Detail durch Erläuterung und Beispiele beschrieben wurde, um das Verständnis zu erleichtern, ist es für den Fachmann auf diesem Gebiet im Lichte der Lehren der Erfindung offensichtlich, dass bestimmte Veränderungen und Modifikationen gemacht werden können, ohne vom Schutzbereich der beigefügten Ansprüche abzuweichen.

Patentansprüche

1. Npt2B-Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 01 umfasst.
2. Protein oder Polypeptid nach Anspruch 1, mit einer Aktivität als Natriumphosphat-Co-Transporter.
3. Nucleinsäure, die ein Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 oder 2 codiert.
4. Nucleinsäure nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure eine Nucleinsäuresequenz aufweist, die identisch ist mit der Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 02.
5. Expressionskassette umfassend eine Transkriptionsstartregion, die in einem Expressionswirt funktionell ist, eine Nucleinsäure mit einer Nucleotidsequenz, die in der Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 3 oder 4 vorhanden ist unter der Transkriptionsregulation der Transkriptionsstartregion, und eine Transkriptionsendregion, die in dem Expressionswirt funktionell ist.
6. Wirtszelle umfassend eine Expressionskassette nach Anspruch 5 als Teil eines extrachromosomalen Elements oder integriert in das Genom einer Wirtszelle als Ergebnis der Einführung der Expressionskassette in die Wirtszelle.
7. Zellnachkommen der Wirtszelle nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung von Npt2B, wobei das Verfahren umfasst, dass man eine Zelle nach Anspruch 6 oder 7 züchtet, wodurch Npt2B exprimiert wird, und Npt2B mit weniger als 90% anderen Proteinen isoliert.
9. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch an Npt2B bindet.
10. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper die Npt2B-Aktivität hemmt.
11. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 9, oder Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein humanisierter Antikörper ist.
12. Verfahren zum Screenen, um Npt2B-modulierende Mittel aufzufinden, wobei das Verfahren umfasst, dass man eine Zelle, die funktionelles Npt2B an ihrer Oberfläche exprimiert, mit einem in Betracht gezogenen Mittel in Gegenwart von Phosphoranionen in Kontakt bringt und die Menge an Phosphoranionen, die von der Zelle aufgenommen wird, bestimmt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Phosphoranion mit einer nachweisbaren Markierung markiert ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, oder dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung ein Isotop ist.
15. Nicht menschliches transgenes Tiermodell, das Npt2B exprimieren kann.
16. Verwendung eines Proteins oder Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 oder 2, um Npt2B-modulierende Mittel zu screenen.

FIGUR 1

```
  1  MAPWPELGDA QPNPDKYLEG AAGQQPTAPD KSKETNKNNT EAPVTKIELL
 51  PSYSTATLID EPTEVDDPWN LPTLQDSGIK WSERDTKGKI LCFFQGIGRL
101  ILLLGFLYFF VCSLDILSSA FQLVGGKMAG QFFSNSSIMS NPLLGLVIGV
151  LVTVLVQSSS TSTSIVVSMV SSSLLTVRAA IPIIMGANIG TSITNTIVAL
201  MQVGDRSEFR RAFAGATVHD FFNWLSVLVL LPVEVATHYL EIITQLIVES
251  FHFKNGEDAP DLLKVITKPF TKLIVQLDKK VISQIAMNDE KAKNKSLVKI
301  WCKTFTNKTQ INVTVPSTAN CTSPSLCWTD GIQNWTMKNV TYKENIAKCQ
351  HIFVNFHLPD LAVGTILLIL SLLVLCGCLI MIVKILGSVL KGQVATVIKK
401  TINTDFPFPF AWLTGYLAIL VGAGMTFIVQ SSSVFTSALT PLIGIGVITI
451  ERAYPLTLGS NIGTTTTAIL AALASPGNAL RSSLQIALCH FFFNISGILL
501  WYPIPFTRLP IRMAKGLGNI SAKYRWFAVF YLIIFFFLIP LTVFGLSLAG
551  WRVLVGVGVP VVFIIILVLC LRLLQSRCPR VLPKKLQNWN FLPLWMRSLK
601  PWDAVVSKFT GCFQMRCCCC CRVCCRACCL LCGCPKCCRC SKCCEDLEEA
651  QEGQDVPVKA PETFDNITIS REAQGEVPAS DSKTECTAL*    (SEQ ID NO:01)
```

FIGUR. 2

```
   1 CTGACGTAGG CCCAGCACCT GCGGAGGGAG CGCTGACCAT GGCTCCCTGG
  51 CCTGAATTGG GAGATGCCCA GCCCAACCCC GATAAGTACC TCGAAGGGGC
 101 CGCAGGTCAG CAGCCCACTG CCCCTGATAA AAGCAAAGAG ACCAACAAAA
 151 ATAACACTGA GGCACCTGTA ACCAAGATTG AACTTCTGCC GTCCTACTCC
 201 ACGGCTACAC TGATAGATGA GCCCACTGAG GTGGATGACC CCTGGAACCT
 251 ACCCACTCTT CAGGACTCGG GGATCAAGTG GTCAGAGAGA GACACCAAAG
 301 GGAAGATTCT CTGTTTCTTC CAAGGGATTG GGAGATTGAT TTTACTTCTC
 351 GGATTTCTCT ACTTTTTCGT GTGCTCCCTG GATATTCTTA GTAGCGCCTT
 401 CCAGCTGGTT GGAGGAAAAA TGGCAGGACA GTTCTTCAGC AACAGCTCTA
 451 TTATGTCCAA CCCTTTGTTG GGGCTGGTGA TCGGGGTGCT GGTGACCGTC
 501 TTGGTGCAGA GCTCCAGCAC CTCAACGTCC ATCGTTGTCA GCATGGTGTC
 551 CTCTTCATTG CTCACTGTTC GGGCTGCCAT CCCCATTATC ATGGGGGCCA
 601 ACATTGGAAC GTCAATCACC AACACTATTG TTGCGCTCAT GCAGGTGGGA
 651 GATCGGAGTG AGTTCAGAAG AGCTTTTGCA GGAGCCACTG TCCATGACTT
 701 CTTCAACTGG CTGTCCGTGT TGGTGCTCTT GCCCGTGGAG GTGGCCACCC
 751 ATTACCTCGA GATCATAACC CAGCTTATAG TGGAGAGCTT CCACTTCAAG
 801 AATGGAGAAG ATGCCCCAGA TCTTCTGAAA GTCATCACTA AGCCCTTCAC
 851 AAAGCTCACT GTCCAGCTGG ATAAAAAAGT TATCAGCCAA ATTGCAATGA
 901 ACGATGAAAA AGCGAAAAAC AAGAGTCTTG TCAAGATTTG GTGCAAAACT
 951 TTTACCAACA AGACCCAGAT TAACGTCACT GTTCCCTCGA CTGCTAACTG
1001 CACCTCCCCT TCCCTCTGTT GGACGGATGG CATCCAAAAC TGGACCATGA
1051 AGAATGTGAC CTACAAGGAG AACATCGCCA AATGCCAGCA TATCTTTGTG
1101 AATTTCCACC TCCCGGATCT TGCTGTGGGC ACCATCTTGC TCATACTCTC
1151 CCTGCTGGTC CTCTGTGGTT GCCTGATCAT GATTGTCAAG ATCCTGGGCT
1201 CTGTGCTCAA GGGGCAGGTC GCCACTGTCA TCAAGAAGAC CATCAACACT
1251 GATTTCCCCT TTCCCTTTGC ATGGTTGACT GGCTACCTGG CCATCCTCGT
1301 CGGGGCAGGC ATGACCTTCA TCGTACAGAG CAGCTCTGTG TTCACGTCGG
1351 CCTTGACCCC CCTGATTGGA ATCGGCGTGA TAACCATTGA GAGGGCTTAT
1401 CCACTCACGC TGGGCTCCAA CATCGGCACC ACCACCACCG CCATCCTGGC
1451 CGCCTTAGCC AGCCCTGGCA ATGCATTGAG GAGTTCACTC CAGATCGCCC
1501 TGTGCCACTT TTTCTTCAAC ATCTCCGGCA TCTTGCTGTG GTACCCGATC
1551 CCGTTCACTC GCCTGCCCAT CCGCATGGCC AAGGGGCTGG GCAACATCTC
1601 TGCCAAGTAT CGCTGGTTCG CCGTCTTCTA CCTGATCATC TTCTTCTTCC
1651 TGATCCCGCT GACGGTGTTT GGCCTCTCGC TGGCCGGCTG GCGGGTGCTG
1701 GTTGGTGTCG GGGTTCCCGT CGTCTTCATC ATCATCCTGG TACTGTGCCT
1751 CCGACTCCTG CAGTCTCGCT GCCCACGCGT CCTGCCGAAG AAACTCCAGA
1801 ACTGGAACTT CCTGCCGCTG TGGATGCGCT CGCTGAAGCC CTGGGATGCC
1851 GTCGTCTCCA AGTTCACCGG CTGCTTCCAG ATGCGCTGCT GCTGCTGCTG
1901 CCGCGTGTGC TGCCGCCCGT GCTGCTTGCT GTGTGGCTGC CCCAAGTGCT
1951 GCCGCTGCAG CAAGTGCTGC GAGGACTTGG AGGAGGCGCA GGAGGGGCAG
2001 GATGTCCCTG TCAAGGCTCC TGAGACCTTT GATAACATAA CCATTAGCAG
2051 AGAGGCTCAG GGTGAGGTCC CTGCCTCGGA CTCAAAGACC GAATGCACGG
2101 CCTTGTAGGG GACGCCCCAG ATTGTCAGGG ATGGGGGGAT GGTCCTTGAG
2151 TTTTGCATGC TCTCCTCCCT CCCACTTCTG CACCCTTTCA CCACCTCGAG
2201 GAGATTTGCT CCCCATTAGC GAATGAAATT GATGCAGTCC TACCTAACTC
2251 GATTCCCTTT GGCTTGGTGG GTAGGCCTGC AGGGCACTTT TATTCCAACC
2301 CCTGGTCACT CAGTAATCTT TTACTCCAGG AAGGCACAGG ATGGTACCTA
2351 AAGAGAATTA GAGAATGAAC CTGGCGGGAC GGATGTCTAA TCCTGCACCT
2401 AGCTGGGTTG GTCAGTAGAA CCTATTTTCA GACTCAAAAA CCATCTTCAG
2451 AAAGAAAAGG CCCAGGGAAG GAATGTATGA GAGGCTCTCC CAGATGAGGA
2501 AGTGTACTCT CTATGACTAT CAAGCTCAGG CCTCTCCCTT TTTTTAAACC
2551 AAAGTCTGGC AACCAAGAGC AGCAGCTCCA TGGCCTCCTT GCCCCAGATC
2601 AGCCTGGGTC AGGGGACATA GTGTCATTGT TTGGAAACTG CAGACCACAA
```

FIGUR 2 (Forts.)

```
2651 GGTGTGGGTC TATCCCACTT CCTAGTGCTC CCCACATTCC CCATCAGGGC
2701 TTCCTCACGT GGACAGGTGT GCTAGTCCAG GCAGTTCACT TGCAGTTTCC
2751 TTGTCCTCAT GCTTCGGGGA TGGGAGCCAC GCCTGAACTA GAGTTCAGGC
2801 TGGATACATG TGCTCACCTG CTGCTCTTGT CTTCCTAAGA GACAGAGAGT
2851 GGGGCAGATG GAGGAGAAGA AAGTGAGGAA TGAGTAGCAT AGCATTCTGC
2901 CAAAAGGGCC CCAGATTCTT AATTTAGCAA ACTAAGAAGC CCAATTCAAA
2951 AGCATTGTGG CCAAAGTCTA ACGCTCCTCT CTTGGTCAGA TAACAAAAGC
3001 CCTCCCTGTT GGATCTTTTG AAATAAAACG TGCAAGTTAT CCAGGCTCGT
3051 AGCCTGCATG CTGCCACCTT GAATCCCAGG GAGTATCTGC ACCTGGAATA
3101 GCTCTCCACC CCTCTCTGCC TCCTTACTTT CTGTGCAAGA TGACTTCCTG
3151 GGTTAACTTC CTTCTTTCCA TCCACCCACC CACTGGAATC TCTTTCCAAA
3201 CATTTTTCCA TTTTCCCACA GATGGGCTTT GATTAGCTGT CCTCTCTCCA
3251 TGCCTGCAAA GCTCCAGATT TTTGGGGAAA GCTGTACCCA ACTGGACTGC
3301 CCAGTGAACT GGGATCATTG AGTACAGTCG AGCACACGTG TGTGCATGGG
3351 TCAAAGGGGT GTGTTCCTTC TCATCCTAGA TGCCTTCTCT GTGCCTTCCA
3401 CAGCCTCCTG CCTGATTACA CCACTGCCCC CGCCCCACCC TCAGCCATCC
3451 CAATTCTTCC TGGCCAGTGC GCTCCAGCCT TATCTAGGAA AGGAGGAGTG
3501 GGTGTAGCCG TGCAGCAAGA TTGGGGCCTC CCCCATCCCA GCTTCTCCAC
3551 CATCCCAGCA AGTCAGGATA TCAGACAGTC CTCCCCTGAC CCTCCCCCTT
3601 GTAGATATCA ATTCCCAAAC AGAGCCAAAT ACTCTATATC TATAGTCACA
3651 GCCCTGTACA GCATTTTTCA TAAGTTATAT AGTAAATGGT CTTCTAGTGC
3701 TCTCATTTGG AAATGAGGCA GGCTTCTTCT ATGAAATGTA AAGAAAGAAA
3751 CCACTTTGTA TATTTTGTAA TACCACCTCT GTGGCCATGC CTGCCCCGCC
3801 CACTCTGTAT ATATGTAAGT TAAACCCGGG CAGGGGCTGT GGCCGTCTTT
3851 GTACTCTGGT GATTTTTAGA AATTGAATCT TTGTACTTGC ATTGATTGTA
3901 TAATAATTTT GAGACCAGGT CTCGCTGTGT TGCTCAGGCT GGTCTCAAAC
3951 TCCTGAGATC AAGCAATCCG CCCACCTCAG CCTCCCAAAG TGCTGAGATC
4001 ACAGGCGTGA GCCACCACCA GGCCTGATTG TAATTTTTTT TTTTTTTTTT
4051 TTTACTGGTT ATGGGAAGGG AGAAATAAAA TCATCAAACC CAAAAAAAAA
4101 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA  (SEQ ID NO:02)
```