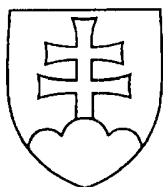


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(11), (21) Číslo dokumentu:

1497-2001

- (22) Dátum podania prihlášky: **19. 4. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **199 17 990.5**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **20. 4. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 6. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP00/03578**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/62781**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**A61K 31/4741,
A61K 31/553,
A61P 9/10,
A61P 9/12,
A61P 25/08,
A61P 1/18,
A61K 31/00,
A61P 25/28,
A61P 1/16,
A61P 1/04,
A61P 11/00,
A61P 43/00,
A61P 17/00,
A61P 3/10**

(71) Prihlasovateľ: **Lang Florian, prof. Dr. med, Tübingen, DE;**

(72) Pôvodca: **Waldegger Siegfried, Hamburg, DE;
Wagner Carsten, Tübingen, DE;
Bröer Stefan, Reutlingen-Ohmenhausen, DE;
Klingel Karin, Rottenburg, DE;**

(74) Zástupca: **Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Liečivá obsahujúce inhibítory bunkovým objemom regulovanej ľudskej kinázy h-sgk**

(57) Anotácia:
Opisujú sa liečivá obsahujúce inhibítory alebo aktivátory bunkovým objemom regulovanej ľudskej kinázy h-sgk. Také liečivá sú vhodné na terapiu patologických stavov, pri ktorých sa vyskytuje zvýšená alebo znížená expresia h-sgk.

SK 1497-2001 A3

Liečivá obsahujúce inhibítory bunkovým objemom regulovanej ľudskej kinázy h-sgk

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka liečiv obsahujúcich inhibítory alebo aktivátory bunkovým objemom regulovanej ľudskej kinázy h-sgk. Také farmaceutiká sú vhodné na terapiu patologických stavov, pri ktorých sa vyskytuje zvýšená alebo znížená expresia h-sgk. h-sgk a postupy na jej prípravu sú už opísané v patente EP-0 861 896 a jeho obsah sa výslovne považuje za súčasť tohto opisu.

Definície pojmov:

h-sgk:	kináza závislá od glukokortikoidov a ľudskeho séra (human serum and glucocorticoid dependent kinase; serín/treonínkináza)
ENaC:	epitelový Na ⁺ kanál
MDEG:	cicavčí degenerín (Waldmann, R., Lazdunski, M. (1998) Current Opinion in Neurobiology 8: 418-424); synonymný termín je „BNC“ (mozgový Na ⁺ kanál; brain Na ⁺ channel)
TGFβ ₁ :	nádorový rastový faktor β ₁
NKCC:	Na ⁺ , K ⁺ , 2Cl ⁻ kotransportér
HEPES:	kyselina [4-(2-hydroxyetyl)piperazino]etánsulfónová
SEM:	smerodajná chyba strednej hodnoty (standard error of mean)
Trans-dominantná inhibičná kináza	h-sgk modifikovaná mutáciou: lyzín v polohe 127 bol nahradený arginínom (K127R); mutácia sa nachádza v katalytickom regióne a potláča katalytickú funkciu kinázy.

Doterajší stav techniky

Zvýšená expresia h-sgk sa často zisťuje pri diabetes mellitus, artérioskleróze, Alzheimerovej chorobe, cirhóze pečene, Crohnovej chorobe, fibrotizujúcej pankreatitíde, fibróze pľúc a chronickej bronchitíde. Zvýšenú

produkciu h-sgk možno vysvetliť stimuláciou expresie zo strany $TGF\beta_1$ (obrázok 1). Fibrotické poruchy spôsobuje zvýšená tvorba a znížené odbúranie proteínov matrixu. V oboch prípadoch ide o efekt $TGF\beta_1$. Zvýšenú expresiu proteínov matrixu vo fibroblastoch možno potlačiť inhibíciou NKCC furosemidom (obrázok 2). Doposiaľ bolo nejasné, či zvýšená expresia h-sgk je len dôsledkom alebo príčinou poruchy.

Prekvapujúce zistenia teraz dokazujú, že h-sgk aktivuje Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ kotransport (obrázok 3). Na základe toho možno konštatovať, že stimulácia NKCC zo strany h-sgk indukuje fibrózu. Popri Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ kotransporte h-sgk aktivuje aj ENaC (obrázky 4 a 5) a MDEG.

Stimulačný účinok h-sgk na ENaC možno potlačiť kinázovými inhibítormi, napríklad staurosporínom (Sigma, D-82041 Deisenhofen) alebo chelerytrínom (Sigma, loc. cit.) (obrázok 4). Okrem toho účinok h-sgk na ENaC možno potlačiť napríklad trans-dominantnou inhibičnou kinázou (obrázok 5). Inhibítory h-sgk ako staurosporín, chelerytrín alebo iné kinázové inhibítory možno teda použiť pri terapii vyššie uvedených porúch. Všeobecne vhodné na tento účel sú všetky známe kinázové inhibítory. Kinázové inhibítory sú v mnohých prípadoch aj komerčne dostupné, napríklad od firmy Calbiochem – Novabiochem GmbH, Listweg 1, D-65812 Bad Soden (pozrite „1998 General Catalog“). Ďalšie kinázové inhibítory možno získať z ďalších komerčných a nekomerčných zdrojov známych odborníkom.

Expresia h-sgk sa zvyšuje pri epileptickom záchvate. Funkčné dáta, ktoré sme získali, ukazujú, že tieto účinky sú vhodné na zníženie dráždivosti neurónov, pretože aktivácia NKCC vedie k zníženiu v koncentrácii mimobunkového K^+ , po ktorom nasleduje hyperpolarizácia a tým inhibícia aktivity neurónov. Okrem toho inhibícia MDEG by mala inhibovať neurónovú dráždivosť. V súlade s uvedeným by sa kinázové aktivátory, ktoré prechádzajú hematoencefalickou bariérou, mali úspešne využívať pri epileptických záchvatoch. Naopak inhibícia kináz liečivami prechádzajúcimi hematoencefalickou bariérou by mohla zvýšiť pozornosť a schopnosť učenia. Navyše sú odborníkom už dlho známe kinázové aktivátory, medzi ktorými sú osobitne zaujímavé aktivátory proteínkinázy C (pozrite napríklad Calbiochem-Novabiochem 1998 General Catalog, loc. cit.). Ďalšie kinázové

aktivátory možno získať z ďalších komerčných a nekomerčných zdrojov známych odborníkom.

Keďže Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransport a Na^+ kanál sú kľúčové pre renálnu absorpciu Na^+ a zvýšená renálna absorpcia Na^+ je spojená s hypertenziou, treba predpokladať, že zvýšená nadmerná expresia tejto kinázy vedie k hypertenzii a znížená expresia tejto kinázy vedie k hypotenzii.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa teda týka aj použitia inhibítorov h-sgk na výrobu liečiv na liečbu diabetes mellitus, artériosklerózy, Alzheimerovej choroby, cirhózy pečene, Crohnovej choroby, fibrotizujúcej pankreatitídy, fibrózy pľúc, chronickej bronchitídy, radiačnej fibrózy, sklerodermie, cystickej fibrózy a ďalších fibrotizujúcich porúch, a na liečbu esenciálnej hypertenzie. Liečivá obsahujúce inhibítory alebo aktivátory h-sgk možno okrem toho použiť na reguláciu neurónovej dráždivosti. Je osobitne výhodné použiť inhibítory staurosporínu alebo chelerytrínu a ich analógy.

Výsledky

Diabetická oblička:

Expresia h-sgk v normálnej obličke je len nízka. Niekoľko buniek v glomerule, neskorom proximálnom a distálnom tubule vykazuje zreteľnú expresiu h-sgk. Naproti tomu v diabetickej obličke sa akumulujú bunky s masívnou expresiou h-sgk.

Artérioskleróza:

Bunky masívne exprimujúce h-gk sa často nachádzajú v stenách artériosklerotických ciev.

Alzheimerova choroba:

V normálnom mozgu sa nachádza len niekoľko buniek exprimujúcich h-sgk. Tieto bunky sú pravdepodobne oligodendrogliaálnymi bunkami. Počet buniek

exprimujúcich h-sgk je v mozgoch s Alzheimerovou chorobou signifikantne zvýšený.

Cirhóza pečene:

V normálnej pečeni exprimujú h-sgk len Copperove bunky. Avšak pri cirhóze pečene je tkanivo dotované bunkami exprimujúcimi h-sgk.

Crohnova choroba:

V normálnom tkanive sa h-sgk exprimuje výlučne v enterocytoch. Avšak pri Crohnovej chorobe sa kináza nachádza aj v spojivovom tkanive.

Fibrotizujúca pankreatitída:

V normálnom pankrease sa h-sgk nachádza v sekrečných bunkách a v kanálikových bunkách. Niekoľko jednojadrových buniek exprimujúcich h-sgk sa nachádza okolo pankreasových kanálikov. Pri fibrotizujúcej pankreatitíde existuje výrazné zvýšenie v expresii kinázy.

Fibróza pľúc a chronická bronchitída:

Pri fibróze pľúc a chronickej bronchitíde sa pozoruje masívna expresia h-sgk.

Stimulácia expresie h-sgk zo strany $TGF\beta_1$:

Expresia h-sgk je stimulovaná $TGF\beta_1$ (obrázok 1). Keďže $TGF\beta_1$ sa produkuje vo fibrotickom alebo zapálenom tkanive, toto zistenie vysvetľuje zvýšenú expresiu h-sgk v zapálenom tkanive.

$TGF\beta_1$ stimuluje expresiu matrixového proteínu biglykánu, čo je účinok, ktorý potláča inhibítor NKCC furosemid:

$TGF\beta_1$ stimuluje expresiu biglykánu. Za prítomnosti inhibítora NKCC furosemidu sa účinok $TGF\beta_1$ na expresiu biglykánu úplne potláča. Aktivácia NKCC je teda podmienkou fibrotického účinku $TGF\beta_1$ (obrázok 2).

Stimulácia NKCC pomocou h-sgk:

Význam zvýšenej expresie kinázy vo fibrotickom tkanive by mohol byť mnohonásobný a nemusí byť náhodne spojený s fibrózou. Experimenty s dvojelektródovou napäťovou svorkou však ukázali, že aktivita NKCC je masívne stimulovaná zo strany h-sgk (obrázok 3). Vzhľadom na furosemidovú citlivosť syntézy biglykánu toto zistenie jednoznačne demonštruje kauzálnu úlohu h-sgk vo fibróze.

Stimulácia ENaC pomocou h-sgk:

Tento účinok možno potlačiť kinázovými inhibítormi staurosporínom a chelerytrínom. Ako ukazuje obrázok 4, existuje masívny nárast prúdu s ENaC cez koexpresiu s h-sgk. Kináza teda stimuluje ENaC. Kinázové inhibítory staurosporín a chelerytrín sú schopné úplne potlačiť aktiváciu ENaC zo strany h-sgk.

Stimuláciu epitelového ENaC zo strany h-sgk možno obrátiť koexpresiou trans-dominantnej inhibičnej kinázy h-sgk:

Ako ukazuje obrázok 5, stimulačný efekt koexpresie h-sgk na tok Na^+ sprostredkovaný pomocou ENaC možno potlačiť koexpresiou trans-dominantnej inhibičnej kinázy. Táto trans-dominantná inhibičná kináza (porovnajte s „definíciou pojmov“) je modifikovaná na katalytickej jednotke takým spôsobom, že už ďalej nemôže vykazovať svoju funkciu. Keďže sa však viaže na substrát, vytesňuje aktívnu kinázu a tým potláča jej účinky. Trans-dominantná inhibičná kináza nielen potláča zvýšenie aktivity ENaC v dôsledku exogénnej h-sgk, ale evidentne potláča aj stimuláciu endogénnou h-sgk.

MDEG je úplne blokovaný koexpresiou s h-sgk:

Ako ukazuje obrázok 6, expresia MDEG v oocytoch indukuje silný prúd Na^+ , ktorý sa aktivuje znížením mimobunkového pH. Tento kanál je úplne blokovaný koexpresiou s h-sgk. Na základe toho treba konštatovať, že h-sgk inhibuje neurónovú dráždivosť.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: Stimulácia expresie h-sgk zo strany $TGF\beta_1$:

Expresia h-sgk je stimulovaná $TGF\beta_1$. Zobrazený je účinok $TGF\beta_1$ po 0,5 až 6 h (hore). Forbol ester PDB (4-alfa-forbol 12,13-didekanoát; stimuluje proteínkinázu C) a Ca^{++} ionofor ionomycín (Sigma, loc. cit; zvyšuje koncentráciu vnútrobunkového Ca^{++}) podobne stimuluje expresiu h-sgk (nižšie).

Obrázok 2: Stimulácia expresie biglykánu zo strany $TGF\beta_1$:

Expresia biglykánu (B) je stimulovaná osmotickým napučením buniek (hypo = h, vľavo hore) a pomocou $TGF\beta_1$ (vpravo hore). Efekt $TGF\beta_1$ na expresiu biglykánu je takmer úplne potlačený za prítomnosti inhibítora NKCC bumetanidu (b) (kontrola = c).

Obrázok 3: Stimulácia NKCC pomocou h-sgk:

Absorpcia $^{22}Na^+$ v oocytoch, ktorú možno inhibovať furosemidom, [absorpcia (nmol/20 min/oocyt) = u], ktoré oocyty exprimujú NKCC, je masívne stimulovaná zo strany h-sgk. Oocyty s injektovaným NKCC nevykazujú vyšší prítok Na^+ ako neinjektované oocyty (n.i.). Tento prítok Na^+ nie je inhibovaný inhibítormi NKCC furosemidom (= F) (hore). Expresia h-sgk samotná nevedie k stimulácii prítoku Na^+ . Koexpresia h-sgk s NKCC vedie k veľkému zvýšeniu prítoku Na^+ a toto zvýšenie je úplne potlačené furosemidom (nižšie).

Obrázok 4: Stimulácia ENaC pomocou h-sgk:

Prúd cez ENaC (I) stúpa masívne cez koexpresiu s h-sgk. Ošetrenie oocytov kinázovými inhibítormi staurosporínom (S) alebo chelerytrínom (C) potláča aktiváciu Na^+ kanála zo strany h-sgk.

Obrázok 5: Stimuláciu ENaC zo strany h-sgk možno obrátiť koexpresiou trans-dominantnej inhibičnej kinázy:

Oocyty exprimujúce ENaC a h-sgk simultánne vykazujú oveľa vyššie prúdy (I) ako oocyty exprimujúce len ENaC. Koexpresia trans-dominantnej inhibičnej kinázy potláča stimuláciu ENaC zo strany h-sgk.

Obrázok 6: Inhibícia MDEG pomocou h-sgk:

Prúd cez MDEG (I) stúpa s trvaním inkubácie [deň (T) 1 – 4]. Tento prúd je úplne potlačený koexpresiou s h-sgk (špička = p; plató = pl).

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: In situ hybridizácia

Tkanivo z normálneho pankreasu, pečene, ciev, mozgu, pľúc, obličky a čreva a tkanivo s diabetickou nefropatiou, artériosklerózou, Alzheimerovou chorobou, cirhózou pečene, Crohnovou chorobou, fibrotizujúcou pankreatitídou a fibrózou pľúc sa obalilo parafínom v 4 % paraformaldehyde/0,1 M tlmivom roztoku fosforečnanu sodného (pH 7,2) na 4 hodiny. Rezy tkaniva sa odvoskovali a hybridizovali podľa publikovaného postupu (Kandolf, R., D. Ameis, P. Kirschner, A. Canu, P. H. Hofschneider, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6272-6276, 1987; Hohenadi, C., K. Klingel, J. Mertsching, P. H. Hofschneider, R. Kandolf, Mol. Cell. Probes 5: 11-20, 1991; Klingel, K., C. Hohenadi, A. Canu, M. Albrecht, M. Seemann, G. Mall, R. Kandolf, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 314-318, 1992).

Hybridizačná zmes obsahovala buď sense RNA označenú pomocou ³⁵S kódujúcu h-sgk alebo antisense RNA označenú pomocou ³⁵S komplementárnu k uvedenej RNA (po 500 ng/ml) v 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 50 % (objem/objem) deionizovaného formamidu; 600 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,2 % polyvinylpyrolidónu; 0,02 % Ficoll; 0,05 % teľacieho sérového albumínu; 10 % dextrán sulfátu; 10 mM ditiotreitolu; 200 µg/ml denaturovanej DNA sonikovanej lososej spermy DNA a 100 µg/ml tRNA z kráľičej pečene.

Hybridizácia RNA sondami sa uskutočnila pri 42 °C v priebehu 18 hodín. Platničky sa premyli podľa publikovaného postupu (Hohenadi et al., 1991; Klingel et al., 1992) a potom sa inkubovali v 2x štandardnom citráte sodnom pri 55 °C v priebehu 1 hodiny. Nehybridizované jednovláknové RNA sondy sa štiepili RNázou A (20 µg/ml) v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0/0,5 M NaCl pri 37 °C počas 30 min. Vzorky tkanív sa potom autorádiografovali tri týždne (Klingel et al., 1992) a vyfarbili sa hematoxylínom/eozínom.

Príklad 2: Transkripčná regulácia biglykánu a h-sgk

Bunky sa kultivovali v RPMI/5 % CO₂/10 mM glukózy pri 37 °C, pH 7,4, suplementovanom 10 % (objem/objem) fetálneho teľacieho séra (FCS). Bunky sa kultivovali do 90 % splnutia a potom sa homogenizovali v prípravku TRIZOL (GIBCO/BRL) (asi 0,4 x 10⁶ na jednu vzorku). Celková RNA sa pripravila podľa návodu výrobcu. Northern blots sa frakcionovali elektroforézou cez 10 g/l agarózové gély s 15 alebo 20 µg celkovej RNA s osobitnou kontrolou za prítomnosti 2,4 mol/l formaldehydu. RNA sa preniesla vákuom (Appligene Oncor Trans DNA Express Vacuum Blotter, Appligene, Heidelberg, Germany) na kladne nabitú nylonovú membránu (Boehringer Mannheim, Germany) a zosieťovala sa pod ultrafialovým svetlom (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg, Germany). Hybridizácia sa uskutočnila cez noc pomocou DIG-Easy-Hyb (Boehringer Mannheim) pri koncentrácii sondy 25 µg/l pri 50 °C. Digoxigenínom (DIG) označené sondy sa pripravili pomocou PCR podľa publikovaného podrobného postupu (Waldegger et al. (1997) PNAS 94: 4440-4445). Pri autorádiografii sa filtre exponovali na RTG film (Kodak) priemerne na 5 min.

Príklad 3: Experimenty s dvojelektrodovou napäťovou svorkou a tokom indikátorov

Oddeľovanie tkanív *Xenopus laevis* a získanie a ošetrovanie oocytov už bolo podrobne opísané (Busch et al. 1992). Oocyty sa injektovali 1 ng cRNA z NKCC, ENaC alebo MDEG so súčasnou injekciou h-sgk alebo bez nej. Experimenty s dvojelektrodovou napäťovou a prúdovou svorkou bolo možné uskutočniť 2 – 8 dní po injekcii. Prísun Na⁺ do oocytov, ktorý mohol byť inhibovaný furosemidom cez NKCC, bol meraný pomocou absorpcie ²²Na⁺, ktorá sa určila scintilačným počítačom. Prúdy Na⁺ (ENaC) sa filtrovali pri 10 Hz a zaznamenali sa pomocou

zapisovača. Tieto experimenty sa bežne uskutočňovali na druhý deň po injekcii cRNA. Roztok kúpeľa obsahoval: 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ a 5 mM HEPES pri pH 7,5 a zádržový potenciál bol -50 mV. Pri všetkých experimentoch sa pH upravovalo titráciou pomocou HCl alebo NaOH. Prietok kvapaliny kúpeľa bol nastavený na 20 ml/min, čo zabezpečovalo úplnú výmenu roztoku v meracej komore v priebehu 10 – 15 s. Všetky dáta sú uvedené vo forme aritmetických stredných hodnôt ± SEM.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Liečivo, vyznačujúce sa tým, že obsahuje inhibítor ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk na terapiu hypertenzie s potlačením stimulačného účinku hsgk na epitelový sodíkový kanál (ENaC).
2. Liečivo podľa nároku 1, vyznačujúce sa tým, že ako inhibítor obsahuje chelerytrín.
3. Liečivo, vyznačujúce sa tým, že zahrňuje inhibítor ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk na terapiu aspoň jednej z porúch zo skupiny tvorenej nasledujúcimi: cirhóza pečene, fibrotizujúca pankreatitída, fibróza pľúc, radiačná fibróza, sklerodermia, cystická fibróza a chronická bronchitída s potlačením stimulácie hsgk v epitelovom sodíkovom kanáli (ENaC) a/alebo v Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransportéri (NKCC).
4. Liečivo podľa nároku 3, vyznačujúce sa tým, že ako inhibítor obsahuje staurosporín alebo chelerytrín.
5. Liečivo, vyznačujúce sa tým, že zahrňuje aktivátor ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk na liečbu epilepsie so stimuláciou Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransportéra (NKCC) a/alebo s blokovaním mozgovo špecifického sodíkového kanála MDEG.
6. Použitie inhibítora ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk na výrobu liečiva na liečbu hypertenzie s potlačením stimulačného účinku hsgk na epitelový sodíkový kanál (ENaC).
7. Použitie chelerytrínu ako inhibítora podľa nároku 6.
8. Použitie inhibítora ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk na výrobu liečiva na liečbu aspoň jednej z porúch zo skupiny tvorenej nasledujúcimi: cirhóza pečene, fibrotizujúca pankreatitída, fibróza pľúc, radiačná fibróza, sklerodermia, cystická fibróza a chronická bronchitída

s potlačením stimulácie hsgk v epitelovom sodíkovom kanáli (ENaC) a/alebo v Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransportéri (NKCC).

9. Použitie staurosporínu alebo chelerytrínu ako inhibítora podľa nároku 8.
10. Použitie aktivátora ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk na výrobu liečiva na liečbu epilepsie so stimuláciou Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransportéra (NKCC) a/alebo s blokovaním mozgovo špecifického sodíkového kanála (MDEG).
11. Použitie inhibítorov epitelového sodíkového kanála (ENaC) alebo Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransportéra (NKCC) alebo ich zmesi na výrobu liečiva na liečbu hypertenzie a/alebo aspoň jednej z porúch zo skupiny tvorenej nasledujúcimi: cirhóza pečene, fibrotizujúca pankreatitída, fibróza pľúc, radiačná fibróza, sklerodermia, cystická fibróza a chronická bronchitída.
12. Použitie kvantitatívnej detekcie ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk na diagnostikovanie hypertenzie/hypotenzie alebo aspoň jednej z porúch zo skupiny tvorenej nasledujúcimi: fibrotizujúca pankreatitída, radiačná fibróza, sklerodermia, cystická fibróza, chronická bronchitída a epilepsia.
13. Kit na uskutočnenie kvantitatívnej detekcie ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk podľa nároku 12.
14. Spôsob identifikácie inhibítorov ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk, vyznačujúci sa tým, že sa meria modulácia aktivity epitelového sodíkového kanála (ENaC) a/alebo mozgovo špecifického sodíkového kanála (MDEG) a/alebo modulácia aktivity Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransportéra (NKCC).
15. Inhibítor ľudskej, bunkovým objemom regulovanej kinázy hsgk, ktorý možno identifikovať spôsobom podľa nároku 14.