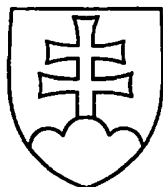


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: 26. 10. 1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 10/305949, 11/27710
11/57207, 11/276225
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 27. 10. 1998
4. 2. 1999, 4. 3. 1999, 29. 9. 1999
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: JP, JP, JP, JP
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 7. 1. 2002
Vestník ÚPV SR č.: 1/2002
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/JP99/05905
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO00/24890

(11), (21) Číslo dokumentu:

550-2001

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

**C12N 15/12,
C07K 14/705,
C07K 16/28,
C12P 21/08,
C12Q 1/68,
A61P 35/00,
A61P 15/06**

(71) Prihlasovateľ: Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka-shi, Osaka, JP;

(72) Pôvodca: Watanabe Takuya, Osaka-shi, Osaka, JP;
Terao Yasuko, Tsukuba-shi, Ibaraki, JP;
Shintani Yasushi, Tsukuba-shi, Ibaraki, JP;
Ohtaki Tetsuya, Tsukuba-shi, Ibaraki, JP;
Kanehashi Kimiko, Toride-shi, Ibaraki, JP;
Kitada Chioko, Sakai-shi, Osaka, JP;

(74) Zástupca: Obertáš Július, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov: Receptorový proteín spojený s G-proteínom, DNA a jej ligand

(57) Anotácia:
Receptorové proteíny spojené s G-proteínom nachádzajú-
cim sa v blízkosti kmeňa krysieho mozgu a ľudského moz-
gu alebo jeho soli, alebo fragmenty jeho peptidu, alebo
amidy, estery alebo soli tohto fragmentu, ligandy, spôsob
testovania/zostava na testovanie zlúčenín schopných meniť
vlastnosti väzby ligandov na receptorové proteíny s
G-proteínom, zlúčeniny alebo ich soli získané uvedeným
testovaním, protilátky proti receptorovým proteínom spoje-
ným s G-proteínom atď.

Receptorový proteín spojený s G proteínom, DNA a jej ligand

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka nového receptorového proteínu spojeného s G proteínom, pochádzajúceho z malého mozgu krysy a z ľudského mozgu, alebo jeho solí a DNA, ktorá ho kóduje, rovnako ako peptidov, ktoré majú ligandovú aktivitu na receptorový proteín spojený s G proteínom alebo jeho amidmi alebo esterami alebo soľami.

Doterajší stav techniky

Rozličné hormóny a neurotransmitéry regulujú funkcie in vivo prostredníctvom špecifických receptorových proteínov umiestnených v bunkovej membráne. Mnoho z týchto receptorových proteínov sprostredkováva prenos intracelulárnych signálov aktiváciou proteínov viažúcich guaninový nukleotid (tu niekedy ďalej označovaný ako G proteíny), s ktorými sa tento receptor spája. Tieto receptorové proteíny majú zvyčajnú štruktúru, t. j. sedem transmembránových domén, a teda sa súhrnne označujú ako receptory spojené s G-proteínom alebo sedem transmembránových receptorov (7TMR).

Receptorové proteíny spojené s G-proteínom existujú na každom funkčnom bunkovom povrchu buniek a vnútorných orgánov žijúceho tela a hrajú veľmi dôležité úlohy ako ciele molekúl, napríklad hormónov, neurotransmitérov, fyziologicky aktívnych látok a podobných, čo sú molekuly, ktoré kontrolujú, regulujú alebo upravujú funkcie buniek a vnútorných orgánov žijúceho tela. Tieto receptorové proteíny sprostredkovávajú transdukciu signálu v bunke nadviazaním na fyziologicky aktívne látky a takto preneseným signálom spôsobujú rôzne reakcie, ako je aktivácia alebo inhibícia buniek.

Na objasnenie vzťahu medzi látkami, ktoré regulujú komplexné funkcie v bunkách a vnútorných orgánoch rozmanitých žijúcich tel a ich špecifických receptorových proteínov, zvlášť receptorových proteínov spojených s G

proteínom, by sa objasnili funkčné mechanizmy buniek a vnútorných orgánov z rôznych žijúcich tel a získali by sa tak veľmi dôležité prostriedky na vývoj nových liečiv, ktoré úzko súvisia s týmito funkčnými mechanizmami.

Napríklad v rôznych orgánoch žijúceho tela sa fyziologické funkcie kontrolujú reguláciou mnohých hormónov, látkami podobajúcimi sa hormónom, neurotransmitérmi alebo fyziologicky aktívnymi látkami. Zvlášť potom fyziologicky aktívne látky prítomné na rôznych miestach žijúceho tela regulujú jeho fyziologické funkcie prostredníctvom zodpovedajúcich receptorových proteínov. Existuje ešte mnoho neznámych hormónov, neurotransmitérov alebo iných fyziologicky aktívnych látok in vivo a iba u niektorých receptorových proteínov sa dosiaľ opísala ich štruktúra. Navyše ešte stále zostáva nejasné, či existujú podtypy známych receptorových proteínov.

Pre vývoj farmaceutických prostriedkov je tiež veľmi dôležité objasniť vzťah medzi látkami, ktoré regulujú komplexné funkcie in vivo, a ich špecifickými receptorovými proteínmi. Ďalej na účinné testovanie agonistov a antagonistov na receptorové proteíny pri vývoji farmaceutických prostriedkov je potom potrebné objasniť funkcie génov receptorových proteínov exprimovaných in vivo a exprimovať tieto gény v príslušnom expresívnom systéme.

V nedávnych rokoch sa aktívne uskutočnila náhodná analýza cDNA sekvencií ako spôsob analyzovania génov exprimovaných in vivo. Takto získané sekvencie cDNA fragmentov sa registrovali a publikovali v databázach ako Expressed Sequence Tag (EST, exprimované sekvenčné tágy). Pretože však väčšina EST obsahuje iba informácie o sekvencii, funkcie je možné predpovedať iba s ťažkosťami.

Látky, ktoré inhibujú nadviazanie proteínov spojených s G proteínom na fyziologicky aktívne látky (t. j. ligandy), a látky, ktoré sa viažu na fyziologicky aktívne látky, tak indikujú signálne transdukcie podobné tým, ktoré sa indukujú fyziologicky aktívnymi látkami (t.j. ligandami), sa používajú pre farmaceutické prostriedky ako antagonisti alebo agonisti špecifické pre receptory na

regulovanie biologických funkcií. Je teda veľmi dôležité objaviť nový receptorový proteín spojený s G proteínom, ktorý je nielen dôležitý pre fyziologickú expresiu in vivo, ale môže byť cieľom na vyvinutie farmaceutických prostriedkov a na klonovanie génov (napr. cDNA) pri hľadaní špecifického ligandu, agonistu a antagonistu nového receptora spojeného s G proteínom.

Avšak nie všetky receptory spojené s G-proteínom boli už objavené. Dokonca i teraz existuje mnoho neznámych receptorov spojených s G proteínom a tých, u ktorých nie sú identifikované zodpovedajúce ligandy, to znamená, orgánové receptory. Je treba teda vážne očakávať, že sa bude skúmať nový receptor spojený s G proteínom a že bude objasnená jeho funkcia.

Receptory spojené s G proteínom sú užitočné na hľadanie novej fyziologicky aktívnej látky (t. j. ligandu) používajúceho signálnu transdukčnú aktivitu ako index a pri vyhľadávaní agonistov a antagonistov tohto receptora. Dokonca i keď sa nenájde žiadny fyziologický ligand, agonisti a antagonisti receptora sa môžu vyrobiť analyzovaním fyziologickej aktivity receptora pomocou pokusov s inaktiviáciou receptora (knockout zvieratá). Očakáva sa, že ligandy, agonisti a antagonisti receptora sa budú používať ako profylaktické/terapeutické a diagnostické liečivá pre ochorenia súvisiace s dysfunkciou receptora spojeného s G proteínom.

Hypofunkcia alebo hyperfunkcia receptora spojeného s G proteínom vďaka genetickej variácii receptora in vivo v mnohých prípadoch spôsobuje niektoré poruchy. V takom prípade sa môže receptor spojený s G proteínom použiť nielen na podávanie antagonistov alebo agonistov receptora, ale tiež na génovú terapiu prenosom receptorového génu do tela (alebo istých špecifických orgánov) alebo prenosom antimediatorovej nukleovej kyseliny do receptorového génu. Pri takejto génovej terapii je informácia o nukleotidovej sekvencii receptorového génu esenciálne potrebná pre vyhľadávanie delécie alebo mutácie v géne. Receptorový gén sa aplikuje tiež ako profylaktické/terapeutické a diagnostické liečivá na choroby súvisiace s dysfunkciou receptora.

Navyše, nájdenie endogenného ligandu na receptor alebo látky s ligandovou aktivitou umožňuje skonštruovať systém na testovanie antagonistov alebo agonistov na tento receptor.

Podstata vynálezu

Predložený vynález poskytuje nový a užitočný receptorový proteín spojený s G proteínom, ako sa opisuje hore. To znamená, že predložený vynález poskytuje nový receptorový proteín spojený s G proteínom, jeho čiastočné peptidy a ich soli rovnako ako polynukleotidy (DNA, RNA a ich deriváty) obsahujúce polynukleotidy (DNA, RNA a ich deriváty) kódujúce receptorový proteín spojený s G proteínom a jeho čiastočné peptidy, rekombinantné vektory obsahujúce polynukleotidy, transformanty nesúce rekombinantné vektory, spôsoby výroby receptorového proteínu spojeného s G proteínom a ich soli, protilátky na receptorový proteín spojený s G proteínom, jeho čiastočné peptidy a ich soli, zlúčeniny, ktoré menia expresnú hladinu uvedeného receptorového proteínu spojeného s G proteínom, spôsoby stanovenia ligandov na receptorový proteín spojený s G proteínom, spôsoby testovania zlúčenín (antagonistov a agonistov) a ich solí, ktoré menia vlastnosti väzby ligandov a receptorového proteínu spojeného s G proteínom, zostavy na použitie pre spôsob testovania, zlúčeniny (antagonisti alebo agonisti) alebo ich soli, ktoré menia vlastnosti väzby ligandov získateľných spôsobom testovania alebo získateľných použitím testovacej zostavy a receptorového proteínu spojeného s G proteínom a farmaceutických prostriedkov obsahujúcich zlúčeniny (antagonisti a agonisti), ktoré menia vlastnosti väzby ligandov na receptorový proteín spojený s G proteínom, alebo zlúčeniny alebo ich soli, ktoré menia hladinu expzie receptorového proteínu spojeného s G proteínom.

Ďalej potom predložený vynález poskytuje peptidy, ktoré majú ligandovú aktivitu voči receptorovému proteínu spojenému s G proteínom.

Autori predloženého vynálezu podnikli rozsiahle štúdie. Výsledkom ich štúdií bolo to, že uspeli pri izolovaní cDNA kódujúcu nový receptorový proteín

spojený s G proteínom pochádzajúceho s malého mozgu krysy a z ľudského mozgu, založenej na EST informácii pripravenej spôsobom degenerovanej PCR, čo viedlo k úspešnej analýze úplnej nukleotidovej sekvencii cDNA. Aminokyselinová sekvencia odvodená od tejto nukleotidovej sekvencie podporila, že prvá až siedma transmembránová doména sa pozorovala pri hydrofóbnej analýze nanesením do grafu, čo potvrdzuje, že proteín kódovaný touto cDNA je transmembránový receptorový proteín spojený s G proteínom prechádzajúci sedemkrát membránou.

Autori predloženého vynálezu ďalej pokračovali s týmito výskumami skúmať peptid, ktorý má aktivitu zvyšujúcu intracelulárnu hladinu vápenatých iónov v bunkách, ktoré exprimujú receptorový proteín spojený s G proteínom použitím nových peptidov nájdených v niektorých známych peptidoch alebo na základe génových údajov. Výsledkom je to, že sa objasnilo, že C-koncový peptid proteínu kódovaný génom KiSS-1 supresora metastázy rakoviny (*Genomics* 1998, 54, 145 až 148.) má aktivitu aktivujúcu tento receptor. KiSS je gén kódujúci proteín. Autori tohto vynálezu upriamili svoju pozornosť na sekvenciu peptidu pozostávajúceho z 54 zvyškov aminokyselín v KiSS-1 a syntetizovali C-koncové čiastočné peptidy. Tento peptid sa získal pre testy reaktivity s receptorom, aby sa potvrdilo, že tento peptid má ligandovú aktivitu.

O peptidoch získaných vyštiepením produktov génu KiSS-1 sa očakáva, že potlačujú metastázy rakoviny, pretože ich gény sú gény supresora metastázy rakoviny. Okrem toho sa u týchto peptidov očakáva, že hrajú dôležitú úlohu v placentе, pričom sa berie do úvahy, že tento gén sa vo veľkej miere exprimuje v placentе a hOT7T175, čo je ľudský typ receptora receptorového proteínu spojeného s G proteínom, a tiež sa vo veľkej miere exprimuje v placentе. Expresia receptora je relatívne veľká v ľudskej slinivke brušnej, takže sa o tomto peptide predpokladá, že vykazuje nejakú fyziologickú funkciu tiež v slinivke brušnej.

Na základe týchto zistení autori predloženého vynálezu podnikli rozsiahle štúdie a ich výsledkom je získanie predloženého vynálezu.

Predložený vynález sa teda týka:

1) proteínu a jeho solí, ktoré obsahujú rovnakú alebo v podstate rovnakú sekvenciu aminokyselín ako je sekvencia aminokyselín uvedená ako je sekv. id. č. 1;

2) proteínu alebo jeho solí podľa bodu 1), v ktorom rovnaká alebo v podstate rovnaká sekvencia aminokyselín znamená sekv. id. č. 5;

3) čiastočného peptidu proteínu podľa bodu 1) alebo jeho esterov alebo jeho amidov alebo jeho solí;

4) polynukleotidu obsahujúceho polynukleotid, ktorý má nukleotidovú sekvenciu kódujúcu proteín podľa bodu 1);

5) polynukleotidu podľa bodu 4), ktorý znamená DNA;

6) polynukleotidu podľa bodu 4), ktorý obsahuje nukleotidovú sekvenciu reprezentovanú sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6;

7) rekombinantného vektora obsahujúceho polynukleotid podľa bodu 4);

8) transformantu transformovaného rekombinantným vektorom podľa bodu 7);

9) spôsobu výroby proteínu alebo jeho solí podľa bodu 1), podľa ktorého sa transformant podľa bodu 8) kultivuje a produkuje a akumuluje sa proteín podľa bodu 1);

10) protilátky na proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) a na čiastočný peptid alebo jeho estery alebo jeho amidy alebo jeho soli podľa bodu 3);

11) protilátky podľa bodu 10), ktoré znamenajú neutralizujúce protilátky na deaktivovanie transdukcie signálu proteínu podľa bodu 1);

12) diagnostického prostriedka, ktorý obsahuje protilátky podľa bodu 10);

13) ligandu na proteín alebo jeho soli podľa bodu 1), ktorý je získateľný použitím proteínu alebo jeho solí podľa bodu 1) alebo použitím čiastočného peptidu, jeho esterov, jeho amidov alebo jeho solí podľa bodu 3);

14) farmaceutického prostriedka, ktorý obsahuje ligand podľa bodu 13);

15) spôsobu stanovenia ligandu na proteín alebo jeho soli podľa bodu 1), podľa ktorého sa používa proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) alebo čiastočný peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 3);

16) spôsobu testovania zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), podľa ktorého sa používa proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) alebo čiastočný peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 3);

17) zostavy na testovanie zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), podľa ktorého sa používa proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) alebo čiastočný peptid alebo jeho estery, jeho amidy alebo jeho soli podľa bodu 3) ;

18) zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), ktorú je možné získať použitím spôsobu testovania podľa bodu 16) alebo testovacej zostavy podľa bodu 17);

19) farmaceutického prostriedka, ktorý obsahuje zlúčeninu alebo jej soli, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), ktorý je možné získať použitím spôsobu testovania podľa bodu 16) alebo testovacej zostavy podľa bodu 17);

20) spôsobu kvantitatívneho vyhodnotenia proteínu podľa bodu 1), ktorý zahŕňa použitie protilátok podľa bodu 10);

21) peptidu, jeho amidov, jeho esterov alebo jeho solí podľa bodu 21), ktorý v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10 obsahuje sekvenciu aminokyselín 47 až 54 od N-konca a obsahuje 8 až 54 zvyškov aminokyselín;

22) peptidu, jeho amidov, jeho esterov alebo jeho solí, ktorý v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10 obsahuje N-koncovú sekvenciu aminokyselín 47 až 54 na C-konci a obsahuje 8 až 15 zvyškov aminokyselín;

23) amidov alebo solí peptidu podľa bodu 21, ktoré obsahujú aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 11, sekv. id. č. 12, sekv. id. č. 13 alebo sekv. id. č. 14;

24) spôsobu testovania podľa bodu 16), podľa ktorého ligand znamená peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 21); a

25) zostavy na testovanie podľa bodu 16), v ktorej ligand znamená peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 21).

Predložený vynález ďalej poskytuje:

26) proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) zahrňujúce: i) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, v ktorej sa jedna, dve alebo viacej aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 9 aminokyselín, najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín) deletujú, ii) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, k nej sa pridá jedna, dve alebo viacej aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín), iii) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, v ktorej sa jedna, dve alebo viacej aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, a najvýhodnejšie niekoľko (jedna

alebo dve) aminokyselín substituuje inými aminokyselinami, a iv) kombináciu hore uvedených aminokyselinových sekvencií;

27) spôsob testovania podľa bodu 16), v ktorom sa uskutočňuje porovnávanie medzi i) prípadom, v ktorom sa proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) alebo čiastočný peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 3) privedú do styku s ligandom, a ii) prípadom, v ktorom sa proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) alebo čiastočný peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 3) privedú do styku s ligandom a testovanou zlúčeninou;

28) spôsob testovania zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), ktorý zahŕňa meranie a porovnávanie i) množstva značeného ligandu nadviazaného na proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) alebo čiastočný peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 3), kde značený ligand sa privedie do styku s proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1) alebo s čiastočným peptidom, jeho amidmi, jeho esterami alebo jeho soľami podľa bodu 3), a ii) množstvo značeného ligandu nadviazaného na proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) alebo čiastočný peptid alebo jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 3), kde značený ligand a testovaná zlúčenina sa privedú do styku s proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1) alebo s čiastočným peptidom, jeho amidmi, jeho esterami alebo jeho soľami podľa bodu 3);

29) spôsob testovania zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), podľa ktorého sa meria a porovnáva i) množstvo značeného ligandu nadviazaného na bunky obsahujúce proteín podľa bodu 1) po uvedení značeného ligandu do kontaktu s bunkami, a ii) množstvo značeného ligandu nadviazaného na bunky po uvedení značeného ligandu a testovanej zlúčeniny do kontaktu s bunkami;

30) spôsob testovania zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), podľa ktorého sa meria a porovnáva i) množstvo značeného ligandu nadviazaného na membránový

frakciu buniek obsahujúcu proteín podľa bodu 1) po uvedení značeného ligandu do kontaktu s membránovou frakciou buniek, a ii) množstvo značeného ligandu nadviazaného na membránovú frakciu buniek po uvedení značeného ligandu a testovanej zlúčeniny do kontaktu s membránovou frakciou buniek;

31) spôsob testovania zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), podľa ktorého sa meria a porovnáva i) množstvo značeného ligandu nadviazaného na proteín exprimovaný v bunkovej membráne uvedeného transformantu z bodu 8) kultivovaním transformantu, kde značený ligand sa privedie do styku s exprimovaným proteínom, a ii) množstvo značeného ligandu nadviazaného na proteín exprimovaný v bunkovej membráne uvedeného transformantu podľa bodu 8) kultivovaním transformantu, kde značený ligand a testovaná zlúčenina sa privedú do styku s exprimovaným proteínom;

32) spôsob testovania zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), podľa ktorého sa meria a porovnáva i) aktivita stimulujúca bunky sprostredkovaná proteínom, pričom zlúčenina, ktorá aktivuje proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) sa uvedú do styku s bunkami obsahujúcimi proteín podľa bodu 1), a ii) aktivita stimulujúca bunky sprostredkovaná proteínom, pričom zlúčenina, ktorá aktivuje proteín alebo jeho soli podľa bodu 1) a testovaná zlúčenina sa uvedú do styku s bunkami obsahujúcimi proteín podľa bodu 1);

33) spôsob testovania zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), podľa ktorého sa meria a porovnáva i) aktivita stimulujúca bunky sprostredkovaná proteínom, pričom zlúčenina, ktorá aktivuje proteín alebo jeho soli podľa bodu 1), sa uvedie do styku s proteínom exprimovaným v bunkovej membráne transformantu podľa bodu 8) kultivovaním tohto transformantu, a ii) aktivita stimulujúca bunky sprostredkovaná proteínom, pričom zlúčenina, ktorá aktivuje proteín alebo jej soli podľa bodu 1) a testovaná zlúčenina sa uvedú do styku s proteínom

exprimovaným v bunkovej membráne transformantu podľa bodu 8) kultivovaním tohto transformantu;

34) spôsob testovania podľa bodu 32) alebo bodu 33), v ktorom zlúčenina, ktorá aktivuje proteín podľa bodu 1) znamená peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa bodu 21);

35) zlúčenina alebo jej soli, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a receptorovým proteínom spojeným s G-proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), ktorú je možné získať spôsobom na testovanie podľa bodu 27) až bodu 34);

36) farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje zlúčeninu alebo jej soli, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), ktorú je možné získať spôsobom testovania podľa bodu 27) až bodu 34);

37) zostavu na testovanie podľa bodu 17), vyznačujúcu sa tým, že obsahuje bunku obsahujúcu proteín podľa bodu 1);

38) zostavu na testovanie podľa bodu 17), vyznačujúcu sa tým, že obsahuje bunkovú membránovú frakciu bunky obsahujúcu proteín podľa bodu 1) ;

39) zostavu na testovanie podľa bodu 17), vyznačujúcu sa tým, že obsahuje proteín exprimovaný v bunkovej membráne transformantu podľa bodu 8) kultivovaním tohto transformantu;

40) zlúčeninu alebo jej soli, ktoré menia vlastnosti medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa bodu 1), ktorú je možné získať použitím zostavy na testovanie podľa bodu 37) až bodu 39);

41) farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje zlúčeninu alebo jej soli, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a receptorovým proteínom alebo jeho

sol'ami podľa bodu 1) spojeným s G proteínom, ktorý je možné získať použitím zostavy na testovanie podľa bodu 37) až bodu 39);

42) spôsob kvantitatívneho stanovenia proteínu alebo jeho solí podľa bodu 1) alebo čiastočného peptidu, jeho amidov, jeho esterov alebo jeho solí podľa bodu 3), vyznačujúci sa tým, že sa protilátky podľa bodu 10) uvedú do styku s proteínom alebo jeho sol'ami podľa bodu 1) alebo čiastočným peptidom, jeho amidmi, jeho esterami alebo sol'ami podľa bodu 3);

43) spôsob kvantitatívneho stanovenia proteínu alebo jeho solí podľa bodu 1) alebo čiastočného peptidu, jeho amidov, jeho esterov alebo jeho solí podľa bodu 3) vo vzorke roztoku, vyznačujúci sa tým, že sa kompetitívne nechajú zreagovať protilátky podľa bodu 10) so vzorkou roztoku a so značeným proteínom alebo jeho sol'ami podľa bodu 1) alebo značeným čiastočným peptidom, jeho amidmi, jeho esterami alebo jeho sol'ami podľa bodu 3) a zmeria sa pomer značeného proteínu alebo jeho solí podľa bodu 1) alebo značeného čiastočného peptidu, jeho amidov, jeho esterov alebo jeho solí podľa bodu 3), ktoré sú nadviazané na protilátky; a

44) spôsob kvantitatívneho stanovenia proteínu alebo jeho solí podľa bodu 1) alebo čiastočného peptidu, jeho amidov, jeho esterov alebo jeho solí podľa bodu 3) vo vzorke roztoku, vyznačujúci sa tým, že sa vzorka roztoku nechá zreagovať súčasne alebo postupne s protilátkami podľa bodu 10) imobilizovanými na nosiči a značenými protilátkami podľa bodu 10) a potom sa zmeria aktivita značeného činidla na imobilizovanom nosiči.

Stručný opis obrázkov

Obrázok 1 ukazuje nukleotidovú sekvenciu DNA kódujúcu receptorový proteín rOT7T175 spojený s G proteínom pochádzajúceho z malého mozgu krysy podľa predloženého vynálezu, ktorý sa získal v príklade 1, a aminokyselinovou sekvenciou odvodenou od tejto DNA sekvencie (pokračovanie na obr. 2).

Obrázok 2 ukazuje nukleotidovú sekvenciu DNA kódujúcu receptorový proteín rOT7T175 spojený s G proteínom pochádzajúceho z malého mozgu krysy podľa predloženého vynálezu, ktorý sa získal v príklade 1, a aminokyselinovou sekvenciou odvodenou od tejto DNA sekvencie (pokračovanie z obr. 1, pokračuje sa na obr. 3).

Obrázok 3 ukazuje nukleotidovú sekvenciu DNA kódujúcu receptorový proteín rOT7T175 spojený s G proteínom pochádzajúceho z malého mozgu krysy podľa predloženého vynálezu, ktorý sa získal v príklade 1, a aminokyselinovou sekvenciou odvodenou od tejto DNA sekvencie (pokračovanie z obr. 2).

Obrázok 4 ukazuje hydrofóbne nanesenie do grafu receptorového proteínu rOT7T175 spojeného s G proteínom pochádzajúceho z malého mozgu krysy podľa predloženého vynálezu vyrobeného na základe aminokyselinovej sekvencie uvedenej na obrázkoch 1 až 3.

Obrázok 5 ukazuje nukleotidovú sekvenciu DNA kódujúcu receptorový proteín hOT7T175 spojený s G proteínom pochádzajúceho z ľudského mozgu podľa predloženého vynálezu, ktorý sa získal v príklade 2, a aminokyselinovou sekvenciou odvodenou od DNA sekvencie (pokračovanie na obr. 6).

Obrázok 6 ukazuje nukleotidovú sekvenciu DNA kódujúcu receptorový proteín hOT7T175 spojený s G proteínom pochádzajúceho z ľudského mozgu podľa predloženého vynálezu, ktorý sa získal v príklade 2, a aminokyselinovou sekvenciou odvodenou od DNA sekvencie (pokračovanie z obr. 5 s pokračovaním na obr. 7).

Obrázok 7 ukazuje nukleotidovú sekvenciu DNA kódujúcu receptorový proteín hOT7T175 spojený s G proteínom pochádzajúceho z ľudského mozgu podľa predloženého vynálezu, ktorý sa získal v príklade 2, a aminokyselinovou sekvenciou odvodenou od DNA sekvencie (pokračovanie z obr. 6).

Obr. 8 ukazuje hydrofóbne nanesenie do grafu receptorového proteínu hOT7T175 spojeného s G proteínom pochádzajúceho z ľudského mozgu podľa predloženého vynálezu vyrobeného na základe aminokyselinovej sekvencie uvedenej na obrázkoch 5 až 7.

Obrázok 9 ukazuje výsledky merania aktivity zvyšujúcej hladinu intracelulárneho Ca iónu testované v príklade 3 (1 až 2).

Najlepší spôsob uskutočnenia vynálezu

Proteín podľa predloženého vynálezu (receptorový proteín; receptorový proteín spojený s G proteínom; tu ďalej často označovaný ako „receptorový proteín podľa predloženého vynálezu“) znamená taký proteín, ktorý má rovnakú alebo v podstate rovnakú aminokyselinovú sekvenciu ako je sekvencia predstavovaná sekv. id. č. 1 (aminokyselinová sekvencia uvedená na obrázkoch 1 až 3).

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu môže znamenať akýkoľvek peptid odvodený od akýchkoľvek buniek človeka a iného cicavca (napr. morčat'a, krysy, myši, kráľika, prasaťa, ovce, hovädzieho dobytky, opice atď.), napríklad slezinových buniek, nervových buniek, gliových buniek, β -buniek slinivky brušnej, buniek kostnej drene, mesangiálnych buniek, Langerhansových buniek, epidermálnych buniek, epiteliálnych buniek, endoteliálnych buniek, fibroblastov, fibrocytov, svalových buniek, tukových buniek, imunocyto (napr. makrofágov, T buniek, B buniek, prirodzených zabíjajúcich buniek, žirných buniek, neutrofilov, basofilov, eosinofilov, monocytov atď.), megakaryocyto, synoviálnych buniek, chondrocyto, osteocyto, osteoblastov, osteoklastov, buniek prsnej žľazy, hepatocyto alebo intersticiálnych buniek, alebo prekursorov buniek, kmeňových buniek alebo rakovinových buniek týchto buniek a podobne; buniek hemocytového typu; alebo akýchkoľvek tkanív obsahujúcich takéto bunky, napr. mozgu, rôznych častí mozgu (napr. bulbus olfactorius, mandle, cerebrálne bazálne ganglie, hippocampus, talamus, hypotalamus, nucleus substatilamicus, mozgová kôra, predĺžená miecha, malý mozog, okcipitálny pól, čelový lalok,

spánkový lalok, putamen, nucleus caudatus, korpus callosum, substantia nigra), miechy, podväzku mozgového, žalúdka, slinivky brušnej, ľadvín, pečene, pohlavných žliaz, štítnej žľazy, žlčníka, kostnej drene, žľazy nadľadvíniok, pokožky, svaly, pľúc, tráviaceho traktu (napr. hrubého čreva, tenkého čreva), krvných doštičiek, srdca, brzlíka, sleziny, submandibulárnej žľazy, periférnej krvi, periférnych hemocytov, prostaty, varlata, varlat, vaječníkov, placenty, maternice, kostí, kĺbov, skeletálneho svalstva a podobne, zvlášť potom mozgu a rôznych častí mozgu. Peptid môže znamenať tiež syntetický peptid.

Aminokyselinová sekvencia, ktorá má rovnakú alebo v podstate rovnakú sekvenciu, ako je sekvencia predstavovaná sekvenciou sekv. id. č. 1, zahŕňa aminokyselinovú sekvenciu, ktorá má aspoň asi 50% homológiu, s výhodou aspoň asi 70% homológiu, výhodnejšie aspoň asi 80% homológiu, omnoho výhodnejšie aspoň asi 90% homológiu, najvýhodnejšie aspoň asi 95% homológiu s aminokyselinovou sekvenciou reprezentovanú sekvenciou sekv. id. č. 1.

Medzi špecifické príklady proteínu patrí proteín, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id.č. 5 (aminokyselinová sekvencia uvedená na obrázkoch 5 až 7).

Výhodný príklad proteínu, ktorý má v podstate rovnakú aminokyselinovú sekvenciu, ako je sekvencia predstavovaná sekvenciou sekv. id. č. 1, je proteín, ktorý má v podstate rovnakú aminokyselinovú sekvenciu, ako je sekvencia predstavovaná sekvenciou sekv. id. č. 1, a ktorý má v podstate rovnakú aktivitu ako má aminokyselinová sekvencia predstavovaná sekvenciou sekv. id. č. 1.

Medzi príklady v podstate rovnakej aktivity patrí aktivita nadviazania ligandu, aktivita spočívajúca v transdukcii signálu a podobné. Pojem „v podstate rovnaký“ sa používa v tom význame, že povahy ich aktivít sú navzájom rovnaké. Výhodné je teda to, že i keď aktivita, ako je aktivita nadviazania ligandu alebo aktivita spočívajúca v transdukcii signálu, je rovnaká (napríklad približne 0,01 až 100-násobná, s výhodou 0,5 až 20-násobná, výhodnejšie asi 0,5 až

dvojnásobná), kvantitatívne faktory, ako sú stupne týchto aktivít a molekulová hmotnosť proteínov, sa môžu navzájom odlišovať.

Aktivita, ako je aktivita nadviazania ligandu alebo aktivita spočívajúca v transdukcii signálu, sa môžu stanoviť podľa všeobecne známych spôsobov, napríklad spôsobom stanovovania ligandov alebo spôsobom testovania, ktorý sa bude opisovať neskoršie.

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, ktorý sa môže používať, môže znamenať taký proteín, ktorý obsahuje i) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, v ktorej sa jedna, dve alebo viac aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín) deletuje; ii) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, ku ktorej sa pridá jedna, dve alebo viac aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín); iii) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, v ktorej sa jedna, dve alebo viac aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín) substituujú inými aminokyselinami; a iv) kombináciou hore uvedených aminokyselinových sekvencií.

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, ktorý sa môže používať, môže znamenať taktiež proteín, ktorý obsahuje i) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 5, v ktorej sa jedna, dve alebo viac aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín) deletuje; ii) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 5, ku ktorej sa pridá jedna, dve alebo viac aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín); iii) aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 5, v ktorej sa jedna, dve alebo viac aminokyselín (s výhodou 1 až 30 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín, a najvýhodnejšie niekoľko (jedna

alebo dve) aminokyselín) substituuje inými aminokyselinami; a iv) kombináciou hore uvedených aminokyselinových sekvencií.

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu sa označuje spôsobom opisovania peptidov, ktorý je známy z oblasti techniky. To znamená, že ľavý koniec (aminový koniec) znamená N-koncovú časť a pravý koniec (karboxylový koniec) znamená C-koncovú časť. V receptorovom proteíne podľa predloženého vynálezu obsahujúcom aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. i. č. 1, C-koncová časť znamená normálne karboxylovú skupinu (—COOH) alebo karboxylát (—COO), ale C-koncová časť môže znamenať amid (—CONH_2) alebo ester (—COOR).

Medzi príklady skupiny R v esterovej skupine patria alkylová skupina s 1 až 6 atómami uhlíka, ako je metylová, etylová, propylová, izopropylová, butylová atď. skupina, cykloalkylová skupina s 3 až 8 atómami uhlíka, ako je cyklopentylová, cyklohexylová atď. skupina, arylová skupina so 6 až 12 atómami uhlíka, ako je fenylová, α -naftylová atď. skupina, aralkylová skupina so 7 až 14 atómami uhlíka, ako je fenylalkyl(s 1 až 2 atómami uhlíka)ová skupina, napr. benzylová, fenetylová atď. skupina, α -naftyl-alkyl(s 1 až 2 atómami uhlíka)ová atď. skupina, napr. α -naf-tylmetylová skupina atď. a podobne. Tiež sa môže ďalej používať pivaloyloxymetylová skupina alebo podobná skupina, ktorá sa rozsiahle používa ako ester pri orálnom podávaní.

Ak receptorový proteín podľa predloženého vynálezu obsahuje karboxylovú skupinu (alebo karboxylát) v inej polohe ako je C-koncová časť, môže sa amidovať alebo esterifikovať a takýto amid alebo ester sa taktiež zahrnie pod pojem receptorový proteín podľa predloženého vynálezu. Esterová skupina môže znamenať rovnakú skupinu ako je skupina, ktorá sa opisuje pri hore uvedenej C-koncovovej časti.

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu ďalej zahrňuje deriváty, v ktorých aminová skupina N-koncového metioninového zvyšku hore uvedeného proteínu sa chráni chrániacou skupinou (napr. acylovou skupinou s 1 až 6

atómami uhlíka, ako je formylová skupina, acetylová skupina atď.; tie, v ktorých N-koncová oblasť sa rozštiepi in vivo a vytvorená glutamylová skupina sa pyroglutaminuje; a tie, v ktorých substituent (napr. —OH, —SH, —COOH, aminová skupina, imidazolová skupina, indolová skupina, guanidínová skupina atď.) na bočných reťazcoch aminokyseliny v molekule proteínu sa chráni príslušnou chrániacou skupinou (napr. acylovou skupinou s 1 až 6 atómami uhlíka, ako je alkanoylová skupina s 2 až 6 atómami uhlíka, napr. formylová skupina, acetylová skupina atď.) alebo konjugované proteíny, ako sú glykoproteíny s cukrovými reťazcami na ne napojenými.

Špecifické príklady receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu, ktoré sa môžu používať, zahŕňujú receptorový proteín pochádzajúci z krýs, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, a receptorový proteín pochádzajúci z človeka, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 5.

Čiastočný peptid receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu (tu ďalej sa niekedy označuje ako čiastočný peptid) môže znamenať akýkoľvek čiastočný peptid, taký dlhý, že predstavuje časť peptidových oblastí hore opísaného receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu. Príklady takéhoto čiastočného peptidu zahŕňujú miesto, ktoré je vystavené mimo bunkovej membrány medzi receptorovú proteínovú molekulu podľa predloženého vynálezu a zachováva si aktivitu nadviazania receptora.

Príkladom čiastočného peptidu proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1 je peptid obsahujúci oblasť, ktorá sa analyzuje ako extracelulárna oblasť (hydrofilná oblasť alebo miesto) pri hydrofilnej analýze nanosením do grafu, ako sa uvádza na obr. 4. Ďalším príkladom čiastočného peptidu proteínu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 5 je peptid obsahujúci oblasť, ktorá podľa analýzy znamená extracelulárnu oblasť (hydrofilnú oblasť alebo miesto) pri hydrofóbnej analýze nanosením do grafu, ako sa uvádza na obr. 8. Môže sa použiť tiež taký peptid, ktorý čiastočne obsahuje hydrofóbnu oblasť

alebo miesto. Ďalej sa môže použiť tiež peptid, ktorý nezávisle obsahuje každú doménu, i keď sa môže použiť tiež čiastočný peptid, ktorý obsahuje viacej domén v rovnakom čase.

Počet aminokyselín v čiastočnom peptide podľa predloženého vynálezu je aspoň 20 alebo viacej, s výhodou 50 alebo viacej, výhodnejšie 100 alebo viacej, v pojmoch konštruktívnej aminokyselinovej sekvencie hore opísaného receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu.

V podstate rovnaká aminokyselinová sekvencia znamená takú aminokyselinovú sekvenciu, ktorá má aspoň asi 50% homológiu, s výhodou aspoň asi 70% homológiu, výhodnejšie aspoň asi 80% homológiu, omnoho výhodnejšie aspoň asi 90% homológiu a najvýhodnejšie aspoň asi 95% homológiu.

Pojem „v podstate rovnaká aktivita“, ako sa tu používa, má rovnakú definíciu, ako sa uvádza hore. „V podstate rovnaká aktivita“ sa môže testovať hore opísaným spôsobom.

V čiastočných peptidoch podľa predloženého vynálezu sa môže v hore opísanej aminokyselinovej sekvencii deletovať jedna, dve alebo viacej aminokyselín (s výhodou približne 1 až 10 aminokyselín, výhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín); jedna, dve alebo viacej aminokyselín (s výhodou približne 1 až 20 aminokyselín, výhodnejšie 1 až 10 aminokyselín a najvýhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín sa môže k aminokyselinovej sekvencii pridať; alebo jedna, dve alebo viacej aminokyselín (s výhodou približne 1 až 10 aminokyselín, výhodnejšie niekoľko (jedna alebo dve) aminokyselín) sa môže a v aminokyselinovej sekvencii substituovať inými aminokyselinami.

V čiastočnom peptide podľa predloženého vynálezu C-koncová časť znamená normálne karboxylovú skupinu (—COOH) alebo karboxylát (—COO), ale C-koncová časť môže znamenať amid (—CONH_2) alebo ester (—COOR), ako sa opisovalo pri receptorovom proteíne podľa predloženého vynálezu.

Ako sa v hore opísanom receptorovom proteíne podľa predloženého vynálezu opisuje, môže čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu zahrňovať tiež konjugované peptidy, ako sú tie, v ktorých aminová skupina N-koncového metionínového zvyšku sa chráni chrániacou skupinou, tie, v ktorých N-koncový zvyšok sa štiepi in vivo a vzniknutý Gln sa prevedie na pyroglutamát, tie, v ktorých substituenty v bočných reťazcoch aminokyselín v molekule sa chránia príslušnými chrániacimi skupinami, a tie, na ktoré sú nadviazané cukrové reťazce, to znamená glykopeptidy.

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho čiastočný proteín sa môžu používať vo forme solí s fyziologicky prijateľnými zásadami alebo kyselinami, s výhodou vo forme ich fyziologicky prijateľných adičných solí s kyselinami. Príklady takýchto solí sú soli s anorganickými kyselinami (napr. kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou fosforečnou, kyselinou bromovodíkovou a kyselinou sírovou), soli s organickými kyselinami (napr. kyselinou octovou, kyselinou mravčou, kyselinou propionovou, kyselinou fumarovou, kyselinou maleínovou, kyselinou jantárovou, kyselinou vínou, kyselinou citrónovou, kyselinou jablčnou, kyselinou šťaveľovou, kyselinou benzoovou, kyselinou metánsulfónovou a kyselinou benzénsulfónovou) a podobne.

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli sa môžu vyrábať podľa všeobecne známeho spôsobu čistenia receptorového proteínu z hore opísaných ľudských alebo iných cicavčích buniek alebo tkanív. Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli sa môžu tiež vyrábať kultivovaním transformantu obsahujúceho DNA, ktorá kóduje receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, ako sa tu bude ďalej opisovať. Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli sa môžu ďalej vyrábať tiež spôsobmi syntetizovania proteínov, ktoré sa tu budú tiež ďalej opisovať, alebo modifikovanými spôsobmi.

Keď sa vyrába receptorový proteín alebo jeho soli z ľudských alebo cicavčích tkanív alebo buniek, ľudské alebo cicavčie bunky alebo tkanivá sa homogenizujú, potom sa extrahujú kyselinou alebo podobne a extrakt sa izoluje a

vyčistí kombináciou chromatografických techník, ako je chromatografia na obrátených fázach, chromatografia na ionomeniči a podobne.

Pri syntetizovaní receptorového proteínu, čiastočného peptidu alebo jeho solí alebo amidov podľa predloženého vynálezu sa môžu použiť komerčne dostupné živice, ktoré sa používajú na syntézu proteínov. Medzi príklady takýchto živíc patria chrómetylvá živica, hydroxymetylová živica, benzhydylaminová živica, aminometylová živica, 4-benzoyloxybenzylalkoholová živica, 4-metylbenzhydylaminová živica, živica PAM, 4-hydroxymetylmetylfenyl-acetamodiometylvá živica, polyakrylamidová živica, 4-(2',4'-dimetoxifyenylhydroxymetyl)fenoxý-živica a 4-(2',4'-dimetoxifyenyl-Fmoc-aminoetyl)fenoxý-živica. Použitím týchto živíc sa aminokyseliny, v ktorých sa α -aminové skupiny a funkčné skupiny v bočných reťazcoch patrične chránia, skondenzujú na živicu v poradí sekvencie príslušného proteínu podľa rôznych spôsobov kondenzácie všeobecne známych v oblasti techniky. Na konci reakcie sa proteín vyštipne zo živice a v rovnakom čase sa odstráni chrániace skupiny. Potom sa uskutoční vo vysoko zriedenom roztoku reakcia, pri ktorej sa vytvorí intramolekulová disulfidová väzba, aby sa získal príslušný proteín alebo jeho amidy.

Na kondenzáciu hore opísaných chránených aminokyselín sa môžu na proteínovú syntézu použiť rôzne aktivačné reakčné činidlá, ale zvlášť výhodne sa používajú karbodiimidy. Medzi príklady takýchto karbodiimidov patria DCC, N,N'-diizopropylkarbodiimid a N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid. Na aktivovanie týmito reakčnými činidlami sa chránené aminokyseliny v kombinácii s inhibítorom racemizácie (napr. HOBt, HOObt) pridajú priamo k živici alebo sa chránené aminokyseliny vopred aktivujú vo forme symetrických anhydridov kyselín, HOBt esterov alebo HOObt esterov, potom nasleduje pridanie takto aktivovaných chránených aminokyselín k živici.

Rozpúšťadlá, ktoré sú vhodné na použitie pri aktivovaní chránených aminokyselín alebo pri kondenzácii so živcou, sa môžu vybrať z rozpúšťadiel, o ktorých je známe, že sa môžu používať pre kondenzačné reakcie proteínov. Príklady takýchto rozpúšťadiel sú amidy kyselín, ako je N,N-dimetylformamid,

N,N-dimetylacetamid a N-metylpyrolidón; halogenované uhľovodíky, ako je metylénchlorid a chloroform, alkoholy, ako je trifluóretanol; sulfoxidy, ako je dimetylsulfoxid; étery, ako je pyridín, dioxán a tetrahydrofurán; nitrily, ako je acetonitril a propionitril; estery, ako je metylacetát a etylacetát; a príslušné zmesi týchto rozpúšťadiel. Reakčná teplota sa príslušne vyberie z rozsahu, o ktorom je známe, že je ho možné použiť pre väzbové reakcie proteínov a zvyčajne sa vyberie v rozmedzí približne $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aktivované aminokyselinové deriváty sa všeobecne používajú v 1,5-násobnom až štvornásobnom prebytku. Kondenzácia sa sleduje ninhydrínovou reakciou. Ak je kondenzácia nedostatočná, kondenzáciu je možno skončiť zopakovaním kondenzačnej reakcie bez odstránenia chrániacich skupín. Ak kondenzácia ešte nie je dostatočná, dokonca ešte po zopakovaní reakcie, nezreagované aminokyseliny sa acetylujú anhydridom kyseliny octovej alebo acetylimidazolom, aby sa zrušil akýkoľvek možný nepriaznivý vplyv na nasledujúcu reakciu.

Medzi príklady chrániacich skupín, ktoré sa použijú na chránenie východiskových aminových skupín, patria Z, Boc, terc.pentyloxykarbonylová, izobornyloxykarbonylová a 4-metoxybenzyloxykarbonylová skupina, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxykarbonylová, trifluóracetylová, ftaloylová, formylová, 2-nitrofenyl-sulfenylová a difenylfosfínioylová skupina a Fmoc.

Karboxylová skupina sa môže chrániť napr. alkylovou esterifikáciou (vo forme lineárnych, rozvetvených alebo cyklických alkylestero alkylových skupín, ako je metylová, etylová, propylová, butylová, terc.butylová, cyklopentylová, cyklohexylová, cykloheptylová, cyklooktylová a 2-adamantylová skupina), aralkylovou esterifikáciou (napr. benzylester, 4-nitrobenzylester, 4-metoxybenzylester, 4-chlórbenzylester a benzylyldylester), fenacylovou esterifikáciou, benzyloxykarbonylovou hydrazidáciou, terc.butoxykarbonylovou hydrazidáciou a tritylovou hydrazidáciou.

Hydroxylová skupina serínu sa môže chrániť napríklad jeho esterifikáciou alebo eterifikáciou. Medzi príklady skupín, ktoré sa príslušne používajú na esterifikáciu, patria nižšia alkanoylová skupina, ako je acetylová skupina, aroylová

skupina, ako je benzoylová skupina, a skupina odvodená od kyseliny uhličitej, ako je benzyloxykarbonylová skupina a etoxykarbonylová skupina. Medzi príklady skupín, ktoré sa príslušne používajú na esterifikáciu, patria benzylová skupina, tetrahydropyranylová skupina a terc.butylová skupina.

Medzi príklady skupín na chránenie fenolickej hydroxylovej skupiny tyrozínu patria Bzl, Cl₂-Bzl, 2-nitrobenzylová skupina, Br-Z a terc.butylová skupina.

Medzi príklady skupín používaných na chránenie amidazolovej časti histidínu patria Tos, 4-metoxy-2,3,6-trimetylbenzénsulfonylová skupina, DNP, benzyloxymetylová skupina a skupina Bum, Boc, Trt a Fmoc.

Medzi príklady aktivovaných karboxylových skupín vo východiskových aminokyselinách patria zodpovedajúce anhydridy kyselín, azidy kyselín a aktivované estery kyselín (estery s alkoholmi, napr. pentachlórphenolom, 2,4,5-trichlórphenolom, 2,4-dinitrophenolom, kyanmetylalkoholom, p-nitrophenolom, HONB, N-hydroxysukcínimidom, N-hydroxyftalimidom a HOBt). Ako aktivované aminokyseliny, v ktorých sa aminové skupiny vo východiskovom materiáli aktivujú, sa používajú zodpovedajúce amidy kyseliny fosforečnej.

Na odstránenie (odštiepenie) chrániacich skupín sa používa katalytická redukcia pod prietokom plynného vodíka v prítomnosti takého katalyzátora, ako je paládiová čierna alebo Pd na uhlí, kyslé spracovanie s bezvodým fluorovodíkom, metánsulfónovou kyselinou, trifluórmotánsulfónovou kyselinou alebo kyselinou trifluóroctovou alebo zmesou roztoku týchto kyselín, spracovanie so zásadou, ako je diizopropyletylamín, trietylamín, piperidín alebo piperazín, a redukcia sodíkom v kvapalnom amoniaku. Hore opísaná eliminačná reakcia chrániacej skupiny spracovaním s kyselinou sa uskutočňuje všeobecne pri teplote približne -20 °C až 40 °C. Pri kyslom spracovaní je účinné pridať vychytávač katiónov, ako je anizol, fenol, tioanizol, m-krezol, p-krezol, dimetylsulfid, 1,4-butánditiol alebo 1,2-etánditiol. Ďalej potom 2,4-dinitrofenylová skupina, ktorá je známa ako chrániaca skupina pre imidiazolovú časť histidínu, sa odstraňuje reakciou s tiofenolom.

Formylová skupina, ktorá sa použije ako chrániaca skupina indolovej časti tryptofánu, sa odstraňuje hore uvedeným spracovaním s kyselinou v prítomnosti 1,2-etánditiolu alebo 1,4-butánditiolu rovnako ako spracovaním s alkáliami, ako je zriedený roztok hydroxidu sodného a zriedený amoniak.

Chránenie funkčných skupín, ktoré by sa nemali zahrnúť v reakcii východiskových materiálov, chrániace skupiny, odstraňovanie chrániacich skupín a aktivácia funkčných skupín, ktoré sa zahrňujú v reakcii, sa môže príslušne vybrať zo všeobecne známych skupín a všeobecne známych prostriedkov.

V inom spôsobe získavania amidovaných proteínov sa napríklad α -karboxylová skupina aminovej kyseliny s koncovým karboxylom najprv chráni amidáciou a peptidový reťazec (proteínový reťazec) sa potom predĺži na strane aminovej skupiny na požadovanú dĺžku. Potom sa vyrobí proteín, v ktorom sa z peptidu odstráni iba chrániaca skupina N-koncovej α -aminoskupiny, a proteín, v ktorom sa odstráni iba chrániaca skupina C-koncovej karboxylovej skupiny. Tieto dva proteíny sa skondenzujú v zmesi hore opísaných rozpúšťadiel. Podrobnosti kondenzačnej reakcie sú rovnaké ako sa opisuje hore. Potom, čo sa chránený proteín, ktorý sa získal kondenzáciou vyčistí, odstráni sa hore opísaným spôsobom všetky chrániace skupiny. Získa sa tak požadovaný surový proteín. Tento surový proteín sa vyčistí rôznymi známymi prostriedkami čistenia. Lyofilizácia hlavnej frakcie poskytuje amid požadovaného proteínu.

Pri výrobe esterifikovaného proteínu sa napríklad α -karboxylová skupina na karboxylovom konci aminokyseliny skondenzuje s požadovaným alkoholom. Vyrobí sa ester aminokyseliny, ktorý sa spracuje podobným spôsobom ako pri príprave hore uvedeného amidovaného proteínu. Získa sa tak požadovaný esterifikovaný proteín.

Čiastočný peptid receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu sa môže vyrábať všeobecne známymi spôsobmi syntézy peptidov alebo štiepením receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu príslušnou peptidázou. Pre spôsoby syntézy peptidov sa môže použiť napríklad buď syntéza v pevnej fáze

alebo syntéza v kvapalnej fáze. To znamená, že čiastočný peptid alebo aminokyseliny, ktoré môžu poskytovať konštrukciu receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu, sa skondenzujú so zvyšujúcou časťou receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu. Ak produkt obsahuje chrániace skupiny, tieto chrániace skupiny sa odstraňujú a získava sa tak požadovaný peptid. Všeobecne známe spôsoby kondenzácie a eliminácie chrániacich skupín sa opisujú nižšie pod ad 1) až 5).

1) Bodanszky M. a Ondetti M. A.: *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York 1966.

2) Schroeder a Luebke: *The Peptide*, Academic Press, New York 1965.

3) Izumiya Nobuo a spol.: *Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and Experiments of Peptide Synthesis)*, publikované firmou Maruzen Co., 1975.

4) Yajima Haruaki a Sakakibara Shunpei: *Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins)* 1977, IV, 205.

5) Yajima Haruaki (red.): *Zoku Iyakuhiin no Kaihatsu (A Sequel to Development of Pharmaceuticals)*, diel 14, Peptide Synthesis, publikované Hirokawa Shoten.

Po skončení reakcie sa produkt môže vyčistiť a izolovať kombináciou konvenčných spôsobov čistenia, ako je extrakcia rozpúšťadlom, destilácia, chromatografia na kolóne, kvapalinová chromatografia a rekryštalizácia. Získa sa tak čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu. Ak čiastočný peptid, ktorý sa získa hore uvedeným spôsobom existuje vo voľnej forme, môže sa tento peptid premeniť na príslušnú soľ všeobecne známym spôsobom. Ak sa proteín získa vo forme soli, môže sa premeniť na voľnú formu všeobecne známym spôsobom.

Polynukleotid kódujúci receptorový proteín podľa predloženého vynálezu môže znamenať akýkoľvek polynukleotid, pokiaľ tento obsahuje nukleotidovú sekvenciu (DNA alebo RNA, s výhodou DNA) kódujúci hore opísaný receptorový proteín podľa predloženého vynálezu. Takýmto polynukleotidom môže byť DNA a RNA vrátane mRNA, ktorá kóduje receptorový proteín podľa predloženého vynálezu. Polynukleotid môže byť buď dvojvláknový alebo jednovláknový. Ak je polynukleotid dvojvláknový, môže znamenať dvojvláknovú DNA alebo hybrid DNA-RNA. Ak je polynukleotid jednovláknový, môže znamenať negatívne vlákno (t. j. kódujúce vlákno) alebo pozitívne vlákno (t. j. nekódujúce vlákno).

Použitím polynukleotidu kódujúceho receptorový proteín podľa predloženého vynálezu môže sa mRNA receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu kvantitatívne vyhodnotiť napríklad spôsobom publikovaným v špeciálnej časti *Jikken Igaku (Experimental Medical Science)* „New PCR and its application“, 1997, 15(7), alebo modifikáciou tohto spôsobu.

DNA kódujúca receptorový proteín podľa predloženého vynálezu môže znamenať akúkoľvek genomovú DNA, genomovú DNA knižnicu, cDNA pochádzajúcu z hore opísaných buniek a tkanív, cDNA knižnicu pochádzajúcu z hore opísaných buniek a tkanív a syntetickú DNA. Vektor, ktorý sa používa pre knižnicu, môže znamenať akýkoľvek vektor z bakteriofágu, plazmidu, kozmidu a fagemidu. DNA sa môže priamo aplikovať reverznou transkriptázovou polymerázovou reťazovou reakciou (tu ďalej skracovaná ako RT-PCR) použitím celkovej RNA alebo mRNA frakcie pripravenej z hore opísaných buniek a tkanív.

Špecificky, DNA kódujúca čiastočný peptid receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu môže znamenať akúkoľvek DNA, pokiaľ má napríklad DNA majúcu aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6 alebo má nukleotidovú sekvenciu hybridizovateľnú na nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6 pri vysoko selektívnych podmienkach a kóduje proteín, ktorý má v podstate rovnaké aktivity (t. j. aktivitu viažúcu ligand, signálnu transdukčnú aktivitu a podobne), ako sú aktivity receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu.

Príklady DNA, ktorá sa hybridizuje s nukleotidovou sekvenciou predstavovanou sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6 zahrňujú DNA, ktorá má aspoň asi 70% homológiu, s výhodou aspoň asi 80% homológiu, výhodnejšie aspoň asi 90% homológiu, najvýhodnejšie aspoň asi 95% homológiu s aminokyselinovou sekvenciou predstavovanou sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6.

Hybridizácia sa môže uskutočňovať všeobecne známymi spôsobmi alebo ich modifikáciami, napríklad podľa spôsobu, ktorý sa opisuje v *Molecular Cloning*, druhé vydanie, J. Sambrook a spol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Taktiež sa môže použiť komerčne dostupná knižnica a to podľa pokynov pripojeného protokolu výrobcu. Hybridizácia sa môže uskutočňovať s výhodou pri vysoko selektívnych podmienkach.

Vysokoselektívne podmienky, ktoré sa používajú podľa vynálezu sú napríklad podmienky spočívajúce v koncentrácii sodíka asi 19 mM až asi 40 mM, s výhodou asi 19 mM až asi 20 mM a teplote od asi 50 °C do asi 70 °C, s výhodou od asi 60 °C do asi 65 °C. Konkrétne - najvýhodnejšie hybridizačné podmienky spočívajú v koncentrácii sodíka asi 19 mM a teplote asi 65 °C.

Konkrétnejšie, pre DNA kódujúcu proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu reprezentovanú sekvenciou sekv. id. č. 1, sa môže použiť DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 2, a DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 6 sa môže použiť pre DNA kódujúci proteín s aminokyselinovou sekvenciou predstavovanou sekvenciou sekv. id. č. 5.

Polynukleotid, ktorý obsahuje časť nukleotidovej sekvencie DNA kódujúcu receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo časť nukleotidovej sekvencie doplnkovej k tejto DNA, považuje sa za polynukleotid, ktorý zahrňuje nielen DNA kódujúci čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu, ktorý sa opisuje nižšie, ale tiež RNA.

Podľa predloženého vynálezu antimediatorové polynukleotidy (nukleové kyseliny), ktoré môžu inhibovať replikáciu alebo expresiu génu receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu, sa môžu navrhnúť a syntetizovať na základe informácie o klonovanej alebo stanovenej nukleotidovej sekvencii DNA kódujúcu receptorový proteín. Takéto polynukleotidy (nukleové kyseliny) sa môžu hybridizovať s RNA génu proteínu a inhibovať RNA syntézu alebo funkciu RNA alebo môžu regulovať/kontrolovať expresiu génu receptorového proteínu prostredníctvom interakcie s RNA-sami asociovanými s receptorovým proteínom. Polynukleotidy doplnkové k špecifikovaným sekvenciám RNA asociované s receptorovým proteínom a polynukleotidmi, ktoré môžu špecificky hybridizovať s RNA asociovanú s receptorovým proteínom, sú užitočné na regulovanie a kontrolovanie exprese génu receptorového proteínu in vivo a in vitro. Tieto polynukleotidy sú tiež užitočné na liečenie a diagnostikovanie ochorení. Pojem „zodpovedá“ sa použije pri odkaze na homologný alebo doplnkový pri špecifickej sekvencii nukleotidov, nukleotidových sekvencií alebo nukleových kyselín vrátane géna. Ako pri nukleotidoch, nukleotidových sekvenciách alebo nukleových kyselinách a peptidoch (proteínov) pojem „zodpovedá“ zvyčajne označuje aminokyseliny peptidu (proteínu), o ktorých sa uvádza, že sú odvodené od sekvencie nukleotidov (nukleových kyselín) alebo ich doplnkov. Ako výhodné cieľové oblasti sa môžu vybrať 5' koniec vlásenkového uzla, 5' koniec opakovania so 6 párami nukleotidov, 5' koniec neprekladanej oblasti, iniciačný kodón polypeptidovej translácie, oblasť kódujúci proteín, iniciačný kodón ORF translácie, 3' neprekladaná oblasť, 3' koniec palindromovej oblasti a 3' koniec vlásenkovej slučky géna receptorového proteínu, i keď cieľom v génoch receptorového proteínu môže byť akákoľvek oblasť.

Vzájomný vzťah medzi cieľovými nukleovými kyselinami a polynukleotidmi doplnkovými k aspoň časti cieľa, špecifický vzájomný vzťah medzi cieľom a polynukleotidmi hybridizovateľnými na cieľ, sa označuje ako „antimediatorový“. Antimediatorové polynukleotidy môžu znamenať polydeoxynukleotidy obsahujúce 2-deoxy-D-ribózu, polydeoxynukleotidy obsahujúce D-ribózu, akékoľvek iné typy polynukleotidov, ktorú sú N-glykozidy purínovej alebo pyrimidínovej zásady, alebo iné polyméry obsahujúce nenukleotidové základné skelety (napr. proteínové

nukleové kyseliny a komerčne dostupné špecifické polyméry nukleových kyselín so syntetickými sekvenciami) alebo iné polyméry obsahujúce neštandardné väzby (za predpokladu, že polyméry obsahujú nukleotidy s takou konfiguráciou, ktorá umožňuje párovanie nukleotidov alebo stohovanie nukleotidov, ako sa nachádza v DNA a RNA). Antimediátorové polynukleotidy môžu znamenať dvojvláknovú DNA, jednovláknovú DNA, jednovláknovú RNA alebo hybrid DNA:RNA, a ďalej zahŕňujú nemodifikované polynukleotidy (alebo nemodifikované oligonukleotidy), tie, ktoré majú všeobecne známe typy modifikácií, napríklad tie, ktoré majú značky známe v oblasti techniky, tie, ktoré majú ukončenie (čiapočky), metylované polynukleotidy, tie, ktoré majú substitúciu jedného alebo viacej prirodzene sa vyskytujúcich nukleotidov ich analógom, tie, ktoré majú intramolekulovú modifikáciu nukleotidov, ako sú tie, ktoré majú nenabité väzby (napr. metylsulfonáty, fosfotriestery, fosforamidáty, karbamáty atď.), a tie, ktoré majú nabitú väzbu alebo väzby obsahujúce atóm síry (napr. fosfortioáty, fosforditioáty atď.), tie, ktoré majú skupiny bočných reťazcov, akosú proteíny (vrátane nukleáz, inhibítorov nukleáz, toxínov, protilátok, signálnych peptidov, poly-L-lyzínu atď.) a sacharidy (napr. monosacharidy atď.), tie, ktoré sú s interkalátormi (napr. akridín, psoralén atď.), tie, ktoré obsahujú chelatačné činidlá (napr. kovy, rádioaktívne kovy, bór, oxidačné kovy atď.), tie, ktoré obsahujú alkylačné činidlá, a tie, ktoré majú modifikované väzby (napr. α -anomerné nukleové kyseliny atď.). Pojmy „nukleozid“, „nukleotid“ a „nukleová kyselina“ sa tu používajú na označenie častí, ktoré obsahujú nielen purínové a pyrimidínové zásady, ale tiež iné heterocyklické zásady, ktoré sa môžu modifikovať. Medzi tieto modifikácie patria metylované puríny a pyrimidíny, acylované puríny a pyrimidíny a ďalšie heterocyklické kruhy. Medzi modifikované nukleozidy alebo nukleotidy patria tiež modifikácie na cukrovej časti, napríklad tie, v ktorých jedna alebo viacej hydroxylových skupín sa môže nahradiť atómom halogénu alebo alifatickými skupinami, alebo ktoré sa môžu premeniť na zodpovedajúce funkčné skupiny, ako sú étery, amíny alebo podobné.

Antimediátorový polynukleotid (nukleová kyselina) podľa predloženého vynálezu znamená RNA, DNA modifikovanú nukleovú kyselinu (RNA, DNA). Špecifickými príkladmi modifikovanej nukleovej kyseliny sú, ale bez obmedzenia

na ne, sulfurované a tiofosfátové deriváty nukleových kyselín a tie, ktoré sú odolné voči degradácii polynukleozidových alebo oligonukleozidových amidov. Antimediátorové nukleové kyseliny podľa predloženého vynálezu sa môžu s výhodou modifikovať na základe nasledujúceho návrhu, to znamená zvýšením intracelulárnej stability antimediátorovej nukleovej kyseliny, zvýšením bunkovej priepustnosti antimediátorovej nukleovej kyseliny, zvýšením afinity nukleovej kyseliny na cieľové negatívne vlákno na vyššiu úroveň alebo minimalizovaním toxicity antimediátorovej nukleovej kyseliny, ak nejaká existuje.

Mnohé takéto modifikácie sú známe v oblasti techniky, ako sa opisuje v J. Kawakami a spol.: *Pharm. Tech. Japan* **1992**, 8, 247; *Pharm. Tech. Japan* **1992**, 8, 395; S. T. Crooke a spol. (red.): *Antisense Research and Applications*, CRC Press, **1993** atď.

Antimediátorová nukleová kyselina podľa predloženého vynálezu môže obsahovať zmenené alebo modifikované cukry, nukleotidy alebo väzby. Antimediátorová nukleová kyselina sa môže získavať tiež v špecializovanej forme ako lipozómy, mikroguličky alebo sa môže aplikovať na génovú terapiu alebo sa môže získavať v kombinácii s napojenými časticami. Medzi tieto napojené častice patria polykatióny, ako je polylyzín, ktoré pôsobia ako neutralizátory náboja fosfátového základného skeletu, alebo hydrofóbne častice, ako sú lipidy (napr. fosfolipidy, cholesteroly atď.), ktoré zvyšujú interakciu s bunkovými membránami alebo zvyšujú príjem nukleovej kyseliny. Výhodnými príkladmi lipidov, ktoré sa napojujú, sú cholesteroly alebo ich deriváty (napr. cholesteryl-chlórmravčan, kyselina cholová atď.). Tieto častice sa môžu napojiť na 3' alebo 5' koniec nukleovej kyseliny a môžu sa napojiť tiež prostredníctvom nukleotidu, cukru alebo intramolekulovej nukleozidovej väzby. Ďalšími časticami môžu byť koniec uzatvárajúce častice, ktoré sa špecificky umiestnia na 3' alebo 5' koncoch nukleovej kyseliny, aby sa zamedzilo degradácii nukleázou, ako je exonukleáza, RNA-áza atď. Medzi tieto koniec uzatvárajúce skupiny patria, ale bez obmedzenia na ne, chrániace skupiny hydroxylovej skupiny známej v oblasti techniky, medzi ktoré patria glykoly, ako je polyetylén glykol, tetraetylén glykol a podobne.

Inhibičná aktivita antimediatorovej nukleovej kyseliny sa môže skúmať použitím transformantu podľa predloženého vynálezu, génového expresného systému podľa predloženého vynálezu in vitro a in vivo, alebo translačného systému receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu in vitro a in vivo. Nukleová kyselina sa môže do buniek aplikovať rôznymi všeobecne známymi spôsobmi.

DNA kódujúca čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu môže znamenať akúkoľvek DNA, pokiaľ obsahuje nukleotidovú sekvenciu kódujúcu hore opísaný čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu. DNA môže znamenať tiež akúkoľvek genomovú DNA, genomovú DNA knižnicu, cDNA pochádzajúcu z hore opísaných buniek a tkanív, cDNA knižnicu pochádzajúcu z hore opísaných buniek a tkanív a syntetickú DNA. Vektor, ktorý sa používa pre knižnicu, môže znamenať akýkoľvek vektor z bakteriofágu, plazmidu, kozmidu a fagemidu. DNA sa môže priamo amplifikovať reverznou transkriptázovou polymerázovou reťazovou reakciou (tu ďalej jednoducho označovanú ako RT-PCR) použitím mRNA frakcie pripravenej z hore opísaných buniek a tkanív.

Medzi špecifické príklady DNA kódujúcu čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu patria 1) DNA, ktorá má časť nukleotidovej sekvencie DNA obsahujúcu nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6, a 2) DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu hybridizovateľnú na nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6 pri vysoko selektívnych podmienkach a obsahujúcu časť nukleotidovej sekvencie DNA kódujúcu receptorový proteín, ktorý má v podstate rovnaké aktivity (t. j. aktivitu viažúcu ligand, signálnu transdukčnú aktivitu a podobne), ako sú aktivity receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu.

Príklady DNA, ktorá je hybridizovateľná s nukleotidovou sekvenciou predstavovanou sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6, zahrňujú DNA obsahujúcu nukleotidovú sekvenciu, ktorá má aspoň asi 70% homológiu, s výhodou aspoň asi 80% homológiu, výhodnejšie aspoň asi 90% homológiu,

najvýhodnejšie aspoň asi 95% homológiu s nukleotidovou sekvenciou predstavovanou sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6.

Na klonovanie DNA, ktorá kompletne kóduje receptorový proteín alebo jeho čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu (tu ďalej niekedy označovaný ako receptorový proteín podľa predloženého vynálezu) sa DNA môže buď amplifikovať PCR použitím syntetických DNA primérov obsahujúcich časť nukleotidovej sekvencie receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu, alebo DNA vložená do príslušného vektora sa môže vybrať hybridizáciou s označeným DNA fragmentom alebo syntetickou DNA, ktorá kóduje časť alebo celú oblasť receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu. Hybridizácia sa môže uskutočniť napríklad podľa spôsobu opísaného v *Molecular Cloning*, druhé vydanie, J. Sambrook a spol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Hybridizácia sa môže uskutočniť tiež použitím komerčne dostupnej knižnice v súlade s protokolom opísaným v pripojených pokynoch.

Konverzia nukleotidovej sekvencie DNA sa môže uskutočniť podľa všeobecne známych spôsobov, ako je Guppedov duplexný spôsob alebo Kunkelého spôsob alebo jeho modifikácia, použitím všeobecne známych zostáv dostupných ako MutanTM-G alebo MutanTM-K (obidve vyrábané firmou Takara Shuzo Co., Ltd., obchodná značka).

Klonovaná DNA kódujúca receptorový proteín podľa predloženého vynálezu sa môže používať ako taká, čo závisí na účele, alebo, ak sa to požaduje, po rozštípení restriktčným enzýmom alebo po pridaní linkera. DNA môže obsahovať ATG ako iniciačný kodón translácie na jej 5' konci a TAA, TGA alebo TAG ako terminačný kodón translácie na jej 3' konci. Tieto iniciačné a terminačné kodóny translácie sa môžu pridávať použitím príslušného syntetického DNA adaptéra.

Expresný vektor receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu sa môže vyrábať napríklad a) vyštípením požadovaného DNA fragmentu z DNA kódujúcu receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, a b) nasledujúcou

ligáciou DNA fragmentu s príslušným expresným vektorom v smere vlákna promótoru vo vektore.

Medzi príklady vektora, ktorý sa môže použiť, patria plazmidy odvodené od *E. coli* (napr. pBR322, pBR325, pUC12 a pUC13), plazmidy odvodené od *Bacillus subtilis* (napr. pUB110, pTP5 a pC194), plazmidy odvodené od kvasiniek (napr. pSH19 a pSH15), bakteriofágy, ako je λ fág atď., živočíšne víry, ako je retrovírus, vírus vakcínie, baculovírus atď., a tiež pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA/Neo atď.

Promótor používaný v predloženom vynáleze môže znamenať akýkoľvek promótor, ak sa dobre zhoduje s hostiteľom, ktorý sa používa na génovú expresiu. V prípade, že sa ako hostiteľ používajú živočíšne bunky, medzi príklady promótoru patria SR α promótor, SV40 promótor, LTR promótor, CMV promótor, HSV-TK promótor atď. Z nich sa s výhodou používa promótor SR α .

Ak sa ako hostiteľ používa baktéria rodu *Escherichia*, medzi výhodné príklady promótoru patria trp promótor, lac promótor, recA promótor, λ PL promótor, lpp promótor atď. V prípade, že sa ako hostiteľ používa baktéria rodu *Bacillus*, výhodnými príkladmi promótorov sú SPO1 promótor, SPO2 promótor a penP promótor. V prípade, že sa ako hostiteľ používajú kvasinky, výhodnými príkladmi promótorov sú PHO5 promótor, PGK promótor, GAP promótor a ADH promótor. V prípade, že sa ako hostiteľ používajú bunky hmyzu, medzi výhodné príklady promótoru patria polyhedrinový promótor a p10 promótor.

Vedľa predchádzajúcich príkladov môže expresný vektor ďalej prípadne obsahovať zosilňovač, nastavujúci signál, poly A adičný signál, selekčný marker, začiatok replikácie SV40 (tu niekedy skrátene označovaný ako SV40ori) atď. Medzi príklady selekčného markera patria dihydrofolát-reduktázový (tu ďalej niekedy skrátovaný ako dhfr) gén [rezistencia na metotrexát (MTX)], gén rezistencie na ampicilín (tu ďalej niekedy skrátene označovaný ako Amp^r), gén rezistencie na neomycín (tu ďalej niekedy skrátene označovaný ako neo, G418

rezistencie) atď. Podrobne, ak sa používa bunka CHO (dhfr⁻) spoločne s dhfr génom ako selekčným markerom, môže sa selekcia uskutočniť tiež použitím média, ktoré neobsahuje tymidín.

Ak je to nevyhnutné a sa to požaduje, signálna sekvencia, ktorá sa zhoduje s hostiteľom, sa pridá na N-koniec receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu. Príklady signálnej sekvencie, ktorá sa môže použiť, sú PhO A signálne sekvencie, OmpA signálne sekvencie atď. v prípade, že sa ako hostiteľ použije baktéria z rodu *Escherichia*, α -amylázová signálna sekvencia, subtilyzínová signálna sekvencia atď. v prípade, ak sa ako hostiteľ použije baktéria z rodu *Bacillus*, MF α signálna sekvencia, SUC2 signálna sekvencia atď. v prípade, ak sa ako hostiteľ používajú kvasinky, a inzulínová signálna sekvencia, α -interferonová signálna sekvencia, signálna sekvencia molekuly protilátky atď., ak sa ako hostiteľ používajú živočíšne bunky.

Transformanty sa môžu vyrobiť použitím vektora, ktorý obsahuje DNA kódujúcu takto skonštruovaný receptorový proteín podľa predloženého vynálezu.

Príklady hostiteľov, ktorí sa môžu použiť, sú baktérie patriace do rodu *Escherichia*, baktérie patriace do rodu *Bacillus*, kvasinky, bunky hmyzu, hmyz a živočíšne bunky atď.

Medzi špecifické príklady baktérií, ktoré patria do rodu *Escherichia*, patria *Escherichia coli* K12DH1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, 60, 160.), JM103 (*Nucleic Acids Research* **1981**, 9, 309.), JA221 (*Journal of Molecular Biology* **1978**, 120, 517.), HB101 (*Journal of Molecular Biology* **1969**, 41, 459.), C600 (*Genetics* **1954**, 39, 440.) atď.

Medzi príklady, ktoré patria do rodu *Bacillus*, patrí *Bacillus subtilis* MI114 (*Gene* **1983**, 24, 255.), 207-21 (*Journal of Biochemistry* **1984**, 95, 87.) atď.

Medzi príklady kvasiniek patria *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R', NA87-11A, DKD-5D a 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913 a NCYC2036, *Pichia pastoris* atď.

Medzi príklady buniek hmyzu patria pre vírus AcNPV bunka *Spodoptera frugiperda* (Sf bunka), bunka MG1 pochádzajúca zo strednej časti čreva *Trichoplusia ni*, bunka High Five™ pochádzajúca z vajíčka *Trichoplusia ni*, bunky pochádzajúce z *Mamestra brassicae*, bunky pochádzajúce z *Estigmena acrea* atď., a pre vírus BmNPV bunka *Bombyx mori* N (BmM bunka) atď. Medzi príklady buniek Sf, ktoré sa môžu používať, patrí bunka Sf9 (ATCC CRL1711) a bunka Sf21 (obidve bunky sa opisujú vo Vaughn J. L. a spol.: *In vivo* **1977**, 13, 213 až 217.

Ako hmyz sa môže použiť napríklad larva *Bombyx mori* (Maeda a spol.: *Nature* **1985**, 315, 592).

Medzi príklady živočíšnych buniek patria opičia bunka COS-7, Vero, bunka čínskeho škrečka CHO (tu ďalej označovaná ako bunka CHO), bunka čínskeho škrečka CHO deficitná na gén dhfr (tu ďalej označovaná ako bunka CHO(dhfr')), myšia L bunka, myšia AFT-20, myšia myelomová bunka, krysia GH 3, ľudská FL bunka atď.

Baktérie patriace do rodu *Escherichia* sa môže transformovať napríklad podľa spôsobu opísaného v *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, 69, 2110 alebo v *Gene* **1982**, 17, 107.

Baktéria patriaca do rodu *Bacillus* sa môže transformovať napríklad podľa spôsobu opísaného v *Molecular and General Genetics* **1979**, 168, 111.

Kvasinka sa môže transformovať napríklad podľa spôsobu opísaného v *Methods in Enzymology* **1991**, 194, 182 až 187 alebo v *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 1929.

Bunky hmyzu alebo hmyz sa môžu transformovať napríklad podľa spôsobu opísaného v *Bio/Technology* **1988**, 6, 47 až 55.

Živočíšne bunky sa môžu transformovať napríklad podľa spôsobu opísaného v *Saibo Kogaku (Cell Engineering)*, zvláštne vydanie 8, *Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol (New Cell Engineering Experimental Protocol)* **1995**, 262 až 267, publikované Shujunsha, alebo vo *Virology* **1973**, 52, 456.

Môže sa teda získať transformant transformovaný expresným vektorom obsahujúcim DNA kódujúci receptorový proteín alebo čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu.

Ak je hostiteľom baktéria patriaca do rodu *Escherichia* alebo rodu *Bacillus*, transformant sa môže príslušne inkubovať v kvapalnom médiu, ktoré obsahuje materiály potrebné na rast transformantu, ako sú zdroje uhlíka, zdroje dusíka, anorganické materiály atď. Medzi príklady zdrojov uhlíka patrí glukóza, dextrín, rozpustný škrob, sacharóza atď. Medzi príklady zdrojov dusíka patria anorganické alebo organické materiály, ako sú amonné soli, dusičnanové soli, kukuričný extrakt, peptón, kazeín, mäsový extrakt, sójový koláč, zemiakový extrakt atď. Príklady anorganických materiálov sú chlorid vápenatý, dihydrogénfosforečnan sodný, chlorid horečnatý atď. K médiu sa ďalej môžu pridať tiež kvasinky, vitamíny, faktory regulujúce rast atď. Hodnota pH média sa s výhodou upraví na asi 5 až asi 8.

Výhodným príkladom média na inkubáciu baktérie patriacej do rodu *Escherichia* je médium M9 doplnené o glukózu a Casaminokyseliny (Miller: *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, str. 431 až 433, New York 1972). Ak je to nevyhnutné a sa to požaduje, môže sa k médiu pridať chemikálie, ako je 3β-indolylakrylová kyselina, čím sa účinne aktivuje promótor.

Ak sa ako hostiteľ používa baktéria, ktorá patrí do rodu *Escherichia*, transformant sa zvyčajne kultivuje pri asi 15 °C až asi 43 °C v priebehu asi 3 hodín až asi 24 hodín. Ak je to nevyhnutné a sa to požaduje, kultúra sa môže prevzdušňovať alebo miešať.

Ak sa ako hostiteľ používa baktéria, ktorá patrí do rodu *Bacillus*, transformant sa kultivuje všeobecne pri asi 30 °C až asi 40 °C počas 6 hodín až asi 24 hodín. Ak je to nevyhnutné a sa to požaduje, kultúra sa môže prevzdušňovať alebo miešať.

Ak sa ako hostiteľ používajú kvasinky, transformant sa kultivuje napríklad v Burkholderovom minimálnom médiu (Bostian K. L. a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 4505.), alebo v SD médiu doplnenom 0,5 % kasamino-kyselín (Bitter G. A. a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5330.). Hodnota pH sa s výhodou upraví na asi 5 až asi 8. Všeobecne sa transformant kultivuje pri asi 20 °C až asi 35 °C počas asi 24 hodín až asi 72 hodín. Ak je to nevyhnutné a sa to vyžaduje, kultúra sa môže prevzdušňovať alebo miešať.

Ak sa ako hostiteľ používajú bunky hmyzu alebo hmyz, transformant sa kultivuje napríklad v Graceho hmyzom médiu (Grace T. C. C.: *Nature*, **1962**, *195*, 788.), ku ktorému sa pridá príslušná prísada, napríklad sa pridá imobilizované 10% hovädzie sérum. S výhodou sa pH média upraví na asi 6,2 až asi 6,4. Normálne sa transformant kultivuje pri asi 27 °C počas asi 3 dní až asi 5 dní, a, ak je to nevyhnutné a sa to vyžaduje, kultúra sa môže prevzdušňovať alebo miešať.

Ak sa ako hostiteľ používajú zvieracie bunky, transformant sa kultivuje napríklad v MEM médiu obsahujúcom asi 5 % až asi 20 % plodového hovädzieho séra (*Science* **1952**, *122*, 501.), DMEM médiu (*Virology* **1959**, *8*, 396.), RPMI 1640 médiu (*The Journal of the American Medical Association* **1967**, *199*, 519.), 199 médiu (*Proceeding of the Society for the Biological Medicine* **1950**, *73*, 1.) atď. S výhodou sa pH média upraví na asi 6 až asi 8. Transformant sa zvyčajne kultivuje

pri asi 30 °C až asi 40 °C počas asi 15 hodín až asi 60 hodín a, ak je to nevyhnutné a sa to vyžaduje, kultúra sa môže prevzdušňovať alebo miešať.

Ako sa opisovalo hore, receptorový proteín alebo jeho čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu sa môže vyrábať v bunkovej membráne transformantu.

Receptorový proteín alebo čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu sa môže z hore opísanej kultúry oddeliť a vyčistiť podľa nasledujúcich postupov.

Ak sa receptorový proteín alebo čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu extrahuje z kultúry alebo buniek po kultivácii, transformant alebo bunka sa izoluje všeobecne známym spôsobom a suspenduje sa v príslušnom tlmivom roztoku. Transformant alebo bunka sa potom rozbije všeobecne známymi spôsobmi, ako je pôsobenie ultrazvuku, spracovanie s lysozymom a/alebo opakujúcim sa cyklom zmrazenia/roztopenia, nasleduje odstredovanie, filtrácia atď. Môže sa teda získať surový extrakt receptorového proteínu alebo jeho čiastočného peptidu podľa predloženého vynálezu. Tlmivý roztok, ktorý sa používa na tieto postupy, môže obsahovať modifikátor proteínu, ako je močovina alebo hydrochlorid guanidínu, alebo povrchovo aktívne činidlo, ako je Triton X-100™ atď. Ak sa receptorový proteín alebo jeho čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu sekretuje v kultivačnom živnom prostredí, supernatant sa po skončení kultivácie môže oddeliť od transformantu alebo buniek, takže sa všeobecne známymi spôsobmi izoluje supernatant.

Supernatant alebo receptorový proteín alebo jeho čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu nachádzajúci sa v takto získanom extrakte sa môže vyčistiť príslušným kombinovaním všeobecne známych spôsobov delenia a čistenia. Medzi tieto všeobecne známe spôsoby delenia a čistenia patrí spôsob využívajúci rozdiel v rozpustnosti, ako je vyizolovanie, zrážanie rozpúšťadlom atď., spôsob využívajúci najmä rozdiely v molekulovej hmotnosti, ako je dialýza, ultrafiltrácia, gélová filtrácia, elektroforéza na SDS-polyakrylamidovom géli atď., spôsob využívajúci rozdiel v elektrickom náboji, ako je chromatografia na ionexu atď., spôsob využívajúci rozdiel v špecifickej afinite, ako je afinitná chromatografia

atď., spôsob využívajúci rozdiel v hydrofóbnosti, ako je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach atď., spôsob využívajúci rozdiel v izoelektrickom bode, ako je izoelektrofokusačná elektroforéza, a podobne.

Ak takto získaný receptorový proteín alebo jeho čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu existuje vo voľnej forme, môže sa premeniť na soľ všeobecne známymi spôsobmi alebo ich modifikáciami. Na druhej strane, ak sa receptorový proteín získava vo forme soli, môže sa premeniť na voľnú formu alebo na formu inej soli všeobecne známymi spôsobmi alebo ich modifikáciami.

Receptorový proteín alebo jeho čiastočný peptid podľa predloženého vynálezu, ktorý sa vyrobí rekombinantom, sa môže spracovať pred alebo po jeho čistení s príslušným enzýmom modifikujúcim proteín tak, že proteín alebo čiastočný peptid sa môže príslušne modifikovať, aby sa odstránil polypeptid. Medzi príklady enzýmov modifikujúcich proteín patria trypsín, chymotrypsín, arginyl-endorpeptidáza, proteín-kináza, glykozidáza a podobné.

Aktivita takto vyrobeného receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu alebo jeho solí, čiastočného peptidu alebo jeho esterov, amidov alebo solí podľa predloženého vynálezu sa môže stanoviť testom nadviazania na značený ligand a enzýmovým imunotestom použitím špecifickej protilátky.

Protilátky na receptorový proteín alebo jeho soli, čiastočný peptid alebo jeho estery, amidy alebo soli podľa predloženého vynálezu (tu ďalej sa niekedy súhrnne označuje ako receptorový proteín alebo podobné zlúčeniny podľa predloženého vynálezu) alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu (ktorý sa opíše neskôršie) môžu znamenať akékoľvek polyklonálne a monoklonálne protilátky, pokiaľ sú schopné rozpoznávať receptorový proteín alebo podobné zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu.

Protilátka na receptorový proteín alebo podobné zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa

môže vyrábať všeobecne známymi spôsobmi výroby protilátok alebo protisér použitím receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu ako antigénu.

Príprava monoklonálnej protilátky

a) Príprava buniek produkujúcich monoklonálnu protilátku

Receptorový proteín alebo podobné zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa podávajú cicavcovi buď samostatne alebo spolu s nosičmi alebo riedidlami do miesta, ktoré môže produkovať protilátku po ich podaní. Aby sa zvýšila produktivita protilátky, môže sa podávať úplné Freundovo adjuvans alebo neúplné Freundovo adjuvans. Podávanie sa uskutočňuje zvyčajne raz za dva týždne až každých 6 týždňov a celkom približne dvakrát až desaťkrát. Medzi cicavce, ktoré sa vyberú, patria opica, králik, pes, morča, myš, krysa, ovca, koza a podobné s tým, že výhodnými sú myš a krysa.

Pri príprave buniek produkujúcich monoklonálne protilátky sa živočích, v ktorom sa zaznamená protilátkový titer, vyberie z teplokrvných živočíchov imunizovaných antigénmi, napr. myšou, potom sa po dvoch až piatich dňoch po konečnej imunizácii odoberie slezina alebo lymfatická žľaza a bunky produkujúce protilátku, ktoré sa v nich nachádzajú, sa napoja na myelomové bunky, takže sa získajú hybridomy produkujúce monoklonálnu protilátku. Môže sa stanoviť protilátkový titer v antisére, napríklad reakciou značeného receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu, alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu, ktorý sa bude opisovať neskôr, s antisérom a nasledujúcim meraním väzbovej aktivity značiaceho činidla nadviazaného na protilátku. Napojenie sa môže uskutočniť napríklad podľa spôsobu opísaného Koehlerom a Milsteinom (*Nature* 1975, 256, 495.). Príklady urýchľovačov

napojenia sú polyetylén glykol (PEG), Sendai vírus atď. S výhodou sa používa PEG.

Medzi príklady myelomových buniek patria NS-1, P3U1 a SP2/0 s tým, že P3U1 sú výhodné. Pomer počtu buniek produkujúcich protilátku (slezinových buniek) k počtu myelomových buniek, ktoré sa používajú, je s výhodou asi 1:1 až asi 20:1. PEG (s výhodou PEG 1000 až PEG 6000) sa pridáva v koncentrácii asi 10 % až asi 80 %. Napojenie buniek sa môže účelne uskutočňovať inkubovaním obidvoch buniek pri asi 20 °C až asi 40 °C, s výhodou asi 30 °C až asi 37 °C počas asi 1 minúty až asi 10 minút.

Na testovanie hybridomu produkujúceho monoklonálnu protilátku sa môžu používať rôzne spôsoby. Medzi príklady takýchto spôsobov patrí spôsob, ktorý zahrňuje pridanie supernatantu hybridomu k pevnej fáze (napr. mikrodoske) s adsorbovaným receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, alebo ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu ako antigénom priamo alebo spoločne s nosičom, pridanie anti-imunoglobulínovej protilátky (ak sa používajú na napojenie buniek myšej bunky, používa sa antimýšia imunoglobulínová protilátka) značenej rádioaktívnou látkou alebo enzýmom alebo Proteínom A a detekovanie monoklonálnej protilátky nadviazanej na pevnú fázu, a spôsob, ktorý zahrňuje pridanie supernatantu hybridomu k pevnej fáze s adsorbovanou anti-imunoglobulínovou protilátkou alebo Proteínom A, pridanie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu značeného rádioaktívnou látkou alebo enzýmom a detekovanie monoklonálnej protilátky nachádzajúcej sa v pevnej fáze.

Monoklonálna protilátka sa môže vybrať podľa všeobecne známych spôsobov alebo ich modifikácií. Všeobecne sa výber môže uskutočniť v médiu pre živočíšne bunky doplnenom HAT (hypoxantín, aminopterín a tymidín). Môže sa použiť akékoľvek selekčné a rastové médium, pokiaľ v ňom hybridom môže rásť. Pre selekčné a rastové médium sa môže použiť napríklad RPMI 1640 médium obsahujúce 1 % až 20 %, s výhodou 10 % až 20 % plodového hovädzieho séra,

GIT médium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) obsahujúce 1 % až 10 % plodového hovädzieho séra, médium bez séra na kultiváciu hybridomu (SFM-101, Nissui Seiyaku Co., Ltd.) a podobne. Kultivácia sa uskutočňuje všeobecne pri 20 °C až 40 °C, s výhodou pri 37 °C, počas asi 5 dní až asi 3 týždňov, s výhodou 1 až 2 týždne, normálne v 5 % CO₂. Protilátkový titer supernatantu kultúry hybridomu sa môže stanoviť ako pri hore opísanom stanovení protilátkového titra v antisére.

b) Čistenie monoklonálnej protilátky

Delenie a čistenie monoklonálnej protilátky sa môže uskutočňovať podľa rovnakého spôsobu, aký sa aplikoval na konvenčné delenie a čistenie polyklonálnych protilátok, ako je delenie a čistenie imunoglobulínov (napríklad vysol'ovaním, vyzrážanie alkoholom, vyzrážanie pri izoelektrickom bode, elektroforéza, adsorpcia a desorpcia na ionexoch (napr. DEAE), ultraodstreďovanie, gélová filtrácia alebo špecifický spôsob čistenia, ktorý zahŕňa izolovanie iba protilátky s aktivovaným adsorbentom, ako je pevná fáza viažúca antigén, proteín A alebo proteín G a disociácia väzby tak, že sa získa protilátka.

Príprava polyklonálnej protilátky

Polyklonálna protilátka podľa predloženého vynálezu sa môže vyrábať všeobecne známymi spôsobmi alebo ich modifikáciami. Napríklad sa vytvorí komplex imunogénu (antigén receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny) a nosného proteínu a cicavec sa imunizuje týmto komplexom podobným spôsobom, ako sa opisuje hore spôsob na výrobu monoklonálnej protilátky. Produkt, ktorý obsahuje protilátku na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu, sa z imunizovaného živočícha izoluje, nasleduje delenie a vyčistenie protilátky.

Pri komplexe imunogén a nosný proteín na imunizovanie cicavcov typ nosného proteínu a pomer miešania nosiča k hapténu môžu znamenať akýkoľvek typ a akýkoľvek pomer, pokiaľ protilátka sa účinne produkuje na haptén

imunizovaný zosieťovaním na nosič. Napríklad hovädzí sérový albumín, hovädzí tyroglobulín alebo keyhole limpet hemocyanin (KLC) sa nadviaže na haptén s hmotnostným pomerom nosič k hapténu približne 0,1 až 20, s výhodou 1 až 5.

Na nadviazanie nosiča na haptén sa môžu používať rôzne kondenzačné činidlá. Na nadviazanie sa používajú glutaraldehyd, karbodiimid, maleinimidom aktivovaný ester a aktivované esterové reakčné činidlá obsahujúce tiolovú skupinu alebo ditiopyridylovú skupinu.

Kondenzačné produkty sa podávajú teplokrvným živočíchom buď samostatne alebo spoločne s nosičmi či riedidlami do miesta, ktoré môže po podaní produkovať protilátku. Aby sa zosilnila produktivita protilátky po podaní, môže sa podávať úplné Freundovo adjuvans alebo neúplné adjuvans. Podávanie sa uskutočňuje zvyčajne raz za 2 týždne až každých 6 týždňov a celkom trikrát až desaťkrát.

Polyklonálna protilátka sa môže izolovať z krvi, ascitov atď., s výhodou z krvi cicavcov imunizovaných hore opísaným spôsobom.

Titer polyklonálnej protilátky v antisére sa môže stanoviť rovnakým postupom ako hore opísaný postup pri titre protilátky v sére. Polyklonálna protilátka sa môže oddeliť a vyčistiť podľa rovnakého spôsobu delenia a čistenia imunoglobulínu, aký sa použil pre hore opísanú monoklonálnu protilátku.

Receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli, čiastočný peptid alebo jeho estery, amidy alebo ich soli a DNA, ktorá ich kóduje, sa môžu používať: 1) na stanovenie ligandu (agonista) na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli, 2) ako činidlo na predchádzanie a/alebo liečenie ochorenia súvisiaceho s dysfunkciou receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu, 3) ako genetické diagnostické činidlo, 4) na kvantitatívne stanovenie ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, 5) na testovanie zlúčeniny (agonista, antagonistu atď.), ktorá mení vlastnosť väzby medzi receptorovým proteínom podľa predloženého vynálezu a

ligandom, 6) ako činidlo na predchádzanie a/alebo liečenie rôznych ochorení, ktoré obsahuje zlúčeninu (agonista, antagonista atď.), ktorá mení vlastnosti väzby medzi receptorovým proteínom podľa predloženého vynálezu a ligandom, 7) na kvantitatívne hodnotenie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu, 8) na neutralizovanie protilátok na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu a 9) na prípravu živočícha, ktorým nie je človek, ktorý nesie DNA kódujúci receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu.

Podrobne, zlúčenina (napr. agonista, antagonista atď.), ktorá mení väzbové vlastnosti medzi ligandom a receptorovým proteínom podľa predloženého vynálezu špecifickým pre človeka alebo iného cicavca, sa môže analyzovať použitím testovacieho systému nadviazania ligand-receptor, ktorý sa tu opisuje neskôr, jeho aplikovaním na expresný systém rekombinantného receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu. Agonista alebo antagonista sa môže použiť ako profylaktické/terapeutické činidlo pre rôzne ochorenia, ktoré sa opíšu neskôr.

Ďalej sa tu špecificky opisujú spoločne s ich použitím receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu, DNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu (tu ďalej niekedy tiež súhrnne označovaná ako DNA podľa predloženého vynálezu) a protilátky na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu (tu ďalej niekedy označovaná ako protilátka podľa predloženého vynálezu).

- 1) Stanovenie ligandu (agonistu) na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu

Receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu je užitočný ako reakčné činidlo na vyhľadávanie a stanovenie ligandu (agonistu) na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu a jeho soli.

To znamená, že predložený vynález poskytuje spôsob stanovenia ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli, vyznačujúci sa tým, že sa receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli privedú do styku s testovanou zlúčeninou.

Medzi príklady zlúčenín, ktoré sa testujú, patria všeobecne známe ligandy (napr. angiotenzín, bombesín, kanavinoid, cholecystokinín, glutamin, serotonin, melatonin, neuropeptid Y, opioid, puríny, vasopresin, oxytocín PACAP, sekretín, glukagon, kalcitonín, adrenomedulín, somatostatín, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, vazoaktívny intestinálny a príbuzný polypeptid (VIP), somatostatín, dopamin, motilin, amylin, bradykinin, peptid súvisiaci s génom kalcitonínu (CGRP), leukotrieny, pankreastatin, prostaglandíny, tromboxan, adenoín, adrenalín, α - a β -chemokiny (napr. IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES atď.), endotelin, enterogastrin, histamín, neurotensín, TRH, pankreatický polypeptid, galanin atď.) rovnako ako ďalšie látky, napríklad tkanivové extrakty a supernatanty bunkových kultúr z ľudí a cicavcov (napr. myši, krýs, sviň, hovädzieho dobytku, ovci a opíc). Napríklad tkanivový extrakt alebo supernatant bunkovej kultúry (špecificky príslušné fragmenty KiSS-1 opísané vo Welch D. R.: *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1731 (napr. peptid pozostávajúci z 8 až 54 zvyškov aminokyselín a obsahujúci sekvencie 47 až 54 aminokyselín z N-konca aminokyselinovej sekvencie predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10, alebo jeho amidy, estery alebo soli) sa pridá k receptorovému proteínu alebo podobnej zlúčenine podľa predloženého vynálezu a frakcionuje sa, pričom sa testujú aktivity stimulujúce bunky, takže sa napokon získa jediný ligand.

Podrobnejšie, tento spôsob stanovenia ligandu podľa predloženého vynálezu obsahuje stanovenie zlúčenín (napr. peptidov, proteínov, nepeptidových zlúčenín, syntetických zlúčenín, fermentačných produktov) alebo ich solí, ktoré sa nadviažu na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, takže sa získajú aktivity stimulujúce bunky (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie

acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolfosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH), použitím receptora alebo podobných zlúčenín podľa predloženého vynálezu alebo použitím skonštruovaného expresného systému rekombinantného receptorového proteínu v teste nadviazania receptora.

Spôsob stanovenia ligandu podľa predloženého vynálezu sa vyznačuje napríklad meraním množstva testovanej zlúčeniny nadviazanej na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo aktivity stimulujúcej bunky, ak sa testovaná zlúčenina uvedie do kontaktu s receptorom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu.

Podrobnejšie, predložený vynález poskytuje nasledovné:

1) spôsob stanovenia ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu a jeho soli, vyznačujúci sa tým, že sa značená testovaná zlúčenina uvedie do kontaktu s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu a zmeria sa množstvo značenej testovanej zlúčeniny nadviazanej na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu;

2) spôsob stanovenia ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu a jeho soli, vyznačujúci sa tým, že sa značená testovaná zlúčenina uvedie do kontaktu s bunkou obsahujúcou receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo s membránovou frakciou bunky a zmeria sa množstvo značenej testovanej zlúčeniny nadviazanej na bunky alebo membránovú frakciu;

3) spôsob stanovenia ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu a jeho soli, vyznačujúci sa tým, že sa kultivuje transformant obsahujúci DNA kódujúci receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, značená testovaná zlúčenina sa uvedie do kontaktu s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou exprimovanou na bunkovej membráne

uvedenou kultiváciou a zmeria sa množstvo značenej testovanej zlúčeniny nadviazanej na exprimovaný proteín alebo podobnú zlúčeninu.

4) spôsob stanovenia ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu a jeho soli, vyznačujúci sa tým, že sa testovaná zlúčenina uvedie do kontaktu s bunkami obsahujúcimi receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu a zmerajú sa receptorovým proteínom vyvolané aktivity stimulujúce bunky (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolfosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH), a

5) spôsob stanovenia ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu a jeho soli, vyznačujúci sa tým, že sa kultivuje transformant obsahujúci DNA kódujúci receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, značená testovaná zlúčenina sa uvedie do kontaktu s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou exprimovanou na bunkovej membráne uvedenou kultiváciou a zmerajú sa receptorovým proteínom vyvolané aktivity stimulujúce bunku (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolfosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH).

Zvlášť je výhodné uskutočňovať spôsoby 1) až 3), čím sa potvrdí, že testovaná zlúčenina sa môže nadviazať na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, načo sa uskutočnia spôsoby 4) a 5).

Akýkoľvek proteín, ktorý sa uvádza ako použiteľný receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu, sa môže použiť pre spôsob podľa predloženého vynálezu na stanovenie ligandov. Avšak receptorový

proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu, ktorá sa početne exprimuje použitím buniek zvierat, je príslušná podľa predloženého vynálezu.

Receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu sa môže vyrábať hore opísaným spôsobom expresie, s výhodou exprimovaním DNA kódujúcu receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu v bunkách cicavcov alebo hmyzu. Medzi DNA fragmenty kódujúce požadovanú časť proteínu patrí, ale bez obmedzenia na ňu, doplnková DNA. Môžu sa použiť napríklad fragmenty génov alebo syntetická DNA. Na zavedenie DNA fragmentu kódujúceho receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu do hostiteľskej živočíšnej bunky a pre jej účinné experimentovanie je výhodné vložiť DNA fragment v smere vlákna polyhedrinového promótoru jadrového polyhedrosis víru (NPV), ktorý znamená hmyzieho hostiteľa s baculovírom, od SV-40 odvodený promótor, promótor retovíra, promótor metalotioneínu, ľudský promótor tepelného šoku, promótor cytomegalovíru, SR α promótor alebo podobné. Množstvo a kvalita exprimovaného receptora sa môže stanoviť všeobecne známym spôsobom. Napríklad sa toto stanovenie môže uskutočňovať spôsobom, ktorý sa opisuje v literatúre (Nambi P. a spol.: *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 19555 až 19559.).

Podľa toho teda subjekt, ktorý obsahuje receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu spôsobom podľa predloženého vynálezu na stanovenie ligandu, môže znamenať receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu vyčistenú všeobecne známym spôsobom, bunky obsahujúce receptorový proteín alebo membránovú frakciu takýchto buniek.

Ak sa bunky, ktoré obsahujú receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, používajú pre spôsob podľa predloženého vynálezu na stanovenie ligandov, bunky sa môžu fixovať použitím glutaraldehydu, formalínu atď. Fixácia sa môže uskutočňovať všeobecne známym spôsobom.

Bunky obsahujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu znamenajú hostiteľské bunky, ktoré exprimujú receptorový

proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, pričom medzi tieto bunky patrí *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, kvasinky, bunky hmyzu a živočíšne bunky.

Bunková membránová frakcia znamená frakciu vo veľkej miere sa vyskytujúcu v bunkovej membráne získanú rozbitím buniek a nasledujúcou frakcionáciou všeobecne známym spôsobom. Medzi užitočné spôsoby rozbitia buniek patrí rozmačkanie buniek použitím Potter-Elvehjemovho homogenizátora, rozbitie použitím Waringovho miešača alebo zariadenie Polytron (vyrába firma Kinematica Inc.), rozbitie pôsobením ultrazvuku a rozbitie rozprašovaním buniek tenkou tryskou pri zvýšenom tlaku použitím francúzskeho lisu alebo podobného zariadenia. Bunková membránová frakcionácia sa uskutočňuje hlavne frakcionáciou použitím odstredivej sily, ako je odstreďovanie pre frakcionáciu a odstreďovanie s hustotným gradientom. Napríklad kvapalina z rozbitých buniek sa odstreďuje pri nízkej rýchlosti (500 až 3000 otáčok za minútu) krátku dobu (normálne asi 1 až 10 minút), výsledný supernatant sa potom odstreďuje pri vyššej rýchlosti (15 000 až 30 000 otáčok za minútu) normálne v priebehu 30 minút až 2 hodín. Takto získaná zrazenina sa použije ako membránová frakcia. Membránová frakcia je bohatá na exprimovaný receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu a membránové zložky, ako sú fosfolipidy a membránové proteíny pochádzajúce z buniek.

Množstvo receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny v bunkách obsahujúcich receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu v membránovej frakcii je s výhodou 10^3 až 10^8 molekúl na bunku, výhodnejšie 10^5 až 10^7 molekúl na bunku. Ako sa zvyšuje množstvo exprese, aktivita viažúca ligand na jednotku membránovej frakcie (špecifická aktivita) sa zvyšuje tak, že je možné skonštruovať nielen veľmi citlivý testovací systém, ale tiež je možné rovnakým spôsobom testovať veľké množstvá vzoriek.

Po uskutočnení spôsobov 1) až 3) na stanovenie ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli je potrebná príslušná receptorová frakcia a značená testovaná zlúčenina.

Receptorová proteínová frakcia s výhodou znamená frakciu prirodzene sa vyskytujúceho receptorového proteínu alebo frakciu rekombinovaného proteínu s aktivitou ekvivalentnou aktivite prírodného proteínu. Pojem „ekvivalentná aktivita“ sa tu používa na označenie väzbovej aktivity ligandu alebo signálnej transdukčnej aktivity, čo je ekvivalentné s tými, ktoré existujú v prirodzene sa vyskytujúcich receptorových proteínoch.

Medzi výhodné príklady značených testovaných zlúčenín patria angiotenzín, bombesin, kanavinoid, cholecystokinín, glutamín, sérotonín, melatonin, neuropeptid Y, opioid, puríny, vasopresín, oxytocín, PACAP, sekretín, glukagon, kalcitonín, adrenomedulín, somatostatín, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, vasoaktívny intestinálny polypeptid (VIP), somatostatín, dopamin, motilín, amylín, bradykinín, peptid súvisiaci s génom kalcitonínu (CGRP), leukotrieny, pankreastatín, prostaglandíny, tromboxan, adenosin, adrenalín, α - a β -chemokíny (napr. IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES atď.), endotelín, enterogastrín, histamín, neurotensín, TRH, pankreatický polypeptid, galanin atď.) rovnako ako príslušné peptidové fragmenty KiSS-1, ktoré sa opisujú vo Welch D. R.: *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1731 (napr. peptid 8 až 54 aminokyselinových zvyškov obsahujúcich aminokyselinovú sekvenciu 47 až 54 z N-konca v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10, alebo jeho amidy, estery alebo soli), ktoré sa označujú [^3H], [^{125}I], [^{14}C], [^{35}S] atď.

Podrobnejšie, ligand na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu sa stanovuje nasledujúcimi spôsobmi. Najprv sa pripraví štandardný receptorový prípravok suspendovaním buniek obsahujúcich receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo jeho membránovú frakciu v príslušnom tlmivom roztoku vhodnom na použitie pre stanovenie. Je možné použiť akýkoľvek tlmivý roztok, pokiaľ tento tlmivý roztok neinterferuje s väzbou ligand-receptor. Medzi takého tlmivé roztoky patria fosforečnanový tlmivý roztok alebo Tris-HCl tlmivý roztok, ktorý má pH asi 4 až 10 (s výhodou pH asi 6 až 8). Pre účel minimalizovania nešpecifickej väzby sa

prípadne môže pridať k tlmivému roztoku povrchovo aktívne činidlo, ako je CHAPS, Tween-80TM (vyrába firma Kao-Atlas Inc.), digitonin alebo deoxycholát, a rôzne proteíny, ako je hovädzí sérový albumín alebo želatína. Ďalej sa kvôli potlačeniu degradácie receptora alebo ligandu proteázou môže tiež pridať inhibítor proteázy, ako je PMSF, leupeptin, E-64 (vyrába Peptide Institute, Inc.) a pepstatin. Dané množstvo (5000 až 500 000 impulzov za minútu) testovanej zlúčeniny označenej [³H], [¹²⁵I], [¹⁴C], [³⁵S] alebo ináč, sa pridá k 0,01 až 10 ml roztoku receptora. Na stanovenie množstva nešpecifického nadviazania (NSB) sa použije tiež reakčná skúmavka obsahujúca vo veľkom prebytku neznačenú testovanú zlúčeninu. Reakcia sa uskutočňuje približne pri 0 až 50 °C, s výhodou pri 4 až 37 °C v priebehu asi 20 minút až 24 hodín, s výhodou asi 30 minút až 3 hodiny. Po skončení reakcie sa reakčná zmes sfiltruje filtračným papierom zo skleneného vlákna atď. a premyje sa príslušným množstvom rovnakého tlmivého roztoku. Zvyšujúca rádioaktivita na filtračnom papieri zo skleneného vlákna sa potom zmeria pomocou kvapalinového scintilačného počítača alebo γ-počítača. Testovaná zlúčenina prevyšujúca 0 počet impulzov za minútu získaných odpočítaním nešpecifického nadviazania (NSB) od celkového nadviazania (B) (B mínus NSB) sa môže vybrať ako ligand (agonista) na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli.

Hore uvedený spôsob 4) alebo 5) stanovenia ligandu na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo jeho soli je možné uskutočniť nasledujúcim postupom. Aktivity stimulujúcej bunky vyvolané receptorovým proteínom (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca²⁺, produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolfosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH) sa môžu stanoviť všeobecne známym spôsobom alebo použitím komerčne dostupnej testovacej zostavy. Konkrétne, bunky, ktoré obsahujú receptorový proteín, sa najprv kultivujú na doske s mnohými jamkami atď. Pred stanovením ligandu sa médium nahradí čerstvým médiom alebo príslušným netoxickým tlmivým roztokom, nasleduje inkubácia po daný čas v prítomnosti testovanej zlúčeniny atď. Následne sa bunky

extrahujú alebo sa supernatant izoluje a príslušnými spôsobmi sa kvantitatívne vyhodnotí výsledný produkt. Ak sú ťažkosti detekovať produkciu danej látky pre aktivitu stimulujúcej bunky (napr. arachidonovej kyseliny) vďaka degradujúcemu enzýmu nachádzajúcemu sa v bunkách, môže sa pred testom pridať inhibítor proti takémuto degradujúcemu enzýmu. Pri detekovaní aktivít, ako je aktivita potlačenia produkcie cAMP, základná produkcia v bunkách sa zvýši forskolínom alebo podobnou zlúčeninou a potom je možné detekovať potlačujúci účinok na zvýšenú základnú produkciu.

Zostava podľa predloženého vynálezu na stanovenie ligandu, ktorý sa nadviaže na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, obsahuje receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, bunky obsahujúci receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo membránovú frakciu buniek obsahujúcu receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu.

Príklady zostavy na stanovenie ligandu podľa predloženého vynálezu sa uvádzajú nižšie.

1. Reakčné činidlá na stanovenie ligandov

1) Tlmivé roztoky na test a premývanie

Hankov vyrovnaný soľný roztok (vyrába firma Gibco Co.) doplnený o 0,05 % hovädzieho sérového albumínu (Sigma Co.

Tento roztok sa sterilizuje filtráciou 0,45µm filtrom a skladuje sa pri 4 °C. Tento roztok sa môže pripraviť tiež pri použití.

2) Štandardný receptorový proteín

Bunky CHO, na ktorých sa exprimuje receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, sa podrobí pasážovaniu kultúry na doske s 12 jamkami hustoty $5 \cdot 10^5$ buniek na jamku, nasleduje kultivovanie pri 37 °C pod 5 % oxidu uhličitého a 95 % vzduchu počas dvoch dní.

3) Značené testované zlúčeniny

Zlúčeniny sú označené komerčne dostupným [^3H], [^{125}I], [^{14}C] alebo [^{35}S] alebo sa zlúčeniny označia príslušnými spôsobmi.

Vodný roztok zlúčeniny sa skladuje pri 4 °C alebo -20 °C. Tento roztok sa zriedi na 1 µM testovaným tlmivým roztokom pre použitie. Testovaná zlúčenina, ktorá je vo vode zle rozpustná, sa rozpustí v dimetylformamide, DMSO alebo metanole.

4) Neznačené zlúčeniny

Neznačená forma rovnakej zlúčeniny ako je značená zlúčenina sa pripraví v koncentrácii 100-krát až 1000-krát vyššej ako je koncentrácia značenej zlúčeniny.

2. Spôsob testovania

1) Bunky CHO exprimujúce receptorový proteín podľa predloženého vynálezu sa kultivujú na kultivačnej doske s 12 jamkami. Po dvojitoť premýaní 1 ml testovacieho tlmivého roztoku sa do každej jamky pridá 490 µl testovacieho tlmivého roztoku.

2) Pridá sa 5 µl značenej testovanej zlúčeniny a výsledná zmes sa inkubuje jednu hodinu pri teplote miestnosti. Na stanovenie nešpecifického nadviazania sa k systému pridá 5 µl neznačenej zlúčeniny.

Reakčná zmes sa odstráni a jamky sa premyjú trikrát 1 ml premývacieho tlmivého roztoku. Značená testovaná zlúčenina nadviazaná na bunky sa rozpustí v 0,2N NaOH - 1% SDS a potom sa zmieša so 4 ml kvapalného scintilátora A (vyrába Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

4) Použitím kvapalinovej scintilačnej sondy (vyrába Beckman Co.) sa zmeria rádioaktivita.

Medzi ligandy, ktoré sa nadviažu na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, patria látky špecificky prítomné v mozgu,

podväzku mozgovom a slinivke brušnej. Príklady týchto ligandov sú angiotenzín, bombesin, kanavinoid, cholecystokinín, glutamín, serotonín, melatonín, neuropeptid Y, opioidy, puríny, vasopresin, oxytocin, PACAP, sekretín, glukagon, kalcitonín, adrenomedulín, somatostatín, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, vasoaktívny intestinálny polypeptid (VIP), somatostatín, dopamin, motilín, amylín, bradykinín, peptid súvisiaci s génom kalcitonínu (CGRP), leukotrieny, pankreastatín, prostaglandíny, tromboxan, adenosín, adrenalín, α - a β -chemokiny (napr. IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES atď.), endotelín, enterogastrín, histamín, neurotensín, TRH, pankreatický polypeptid a galanín) rovnako ako príslušné peptidové fragmenty KiSS-1 opísané vo Welch D. R.: *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1731 (napr. peptid pozostávajúci z 8 až 54 aminokyselinových zvyškov obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu 47 až 54 z N-konca v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10, alebo jeho amidy, estery alebo soli).

Podrobne, ako sa bude neskôr opisovať v príklade 3, príslušné peptidové fragmenty KiSS-1 opísané vo Welch D. R.: *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1731 (napr. peptid pozostávajúci z 8 až 54 aminokyselinových zvyškov obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu 47 až 54 z N-konca v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10, alebo jeho amidy, estery alebo soli) sú príklady ligandu, ktorý sa nadviaže na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu.

Pojem „peptid pozostávajúci z 8 až 54 aminokyselinových zvyškov a obsahujúci sekvenciu 47 až 54 z N-konca v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10“ označuje akýkoľvek peptid taký dlhý, že znamená peptid pozostávajúci z 8 až 54 aminokyselinových zvyškov a obsahujúci sekvenciu aminokyselín 47 až 54 z N-konca v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10. Takéto peptidy majú v podstate rovnaké peptidové aktivity ako sú aktivity receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu (napr. vlastnosť nadviazania

ligand-receptor, bunky stimulujúce aktivitu bunky exprimujúcej receptor indukovanú ligandom).

Výhodným príkladom ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu je peptid pozostávajúci z 8 až 15 aminokyselinových zvyškov, ktorý obsahuje sekvenciu aminokyselín 47 až 54 počítané z N-konca na C-konci v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10.

Výhodnejšie - ligandový peptid podľa predloženého vynálezu zahŕňa peptid (zvlášť jeho amidy) predstavovaný sekvenciou sekv. id. č. 11, 12, 13 alebo 14.

Výhodnejšie - ligandový peptid podľa predloženého vynálezu zahŕňa peptid, v ktorom sa karboxylová skupina na C-konci aminovej kyseliny amидуje.

Čo sa týka amidov alebo esterov týchto peptidov a ich solí, aplikuje sa rovnaký opis ako pri soliach receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu a amidov a esterov peptidových fragmentov.

Pri nukleotide kódujúceho ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže použiť akýkoľvek polynukleotid taký dlhý, že obsahuje nukleotidovú sekvenciu (DNA alebo RNA, s výhodou DNA) kódujúcu ligandový peptid podľa predloženého vynálezu. Takýto polynukleotid môže znamenať DNA a RNA vrátane mRNA kódujúcu ligandový peptid podľa predloženého vynálezu. Polynukleotid môže byť dvojvláknový alebo jednovláknový. Ak je polynukleotid dvojvláknový, môže znamenať dvojvláknovú DNA alebo hybrid DNA:RNA. Ak je polynukleotid jednovláknový, môže znamenať negatívne vlákno (t. j. kódujúce vlákno) alebo pozitívne vlákno (t. j. nekódujúce vlákno).

DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu môže znamenať akúkoľvek genomovú DNA, genomovú DNA knižnicu, cDNA pochádzajúcu z hore opísaných buniek a tkanív, cDNA knižnicu pochádzajúcu z hore opísaných buniek a tkanív asyntetickú DNA. Vektor, ktorý sa používa pre knižnicu, môže znamenať bakteriofág, plazmid, kozmid a fagemid. DNA sa môže

tiež priamo amplifikovať reverznou transkriptázovou polymerázovou reťazovou reakciou (RT-PCR) použitím celkovej RNA alebo mRNA frakcie pripravenej z hore opísaných buniek a tkanív.

Špecificky, DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu môže znamenať akúkoľvek DNA takú dlhú, že má sekvenciu aminokyselín 47 až 54 počítané od N-konca v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10 a obsahuje DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu kódujúcu peptid pozostávajúci z 8 až 54 aminokyselinových zvyškov.

Medzi špecifickejšie príklady DNA kódujúcu ligandový peptid podľa predloženého vynálezu patrí DNA obsahujúca DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu kódujúcu peptid, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu 47 až 54 z N-konca na C-konci aminokyselinovej sekvencie predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10 a obsahuje 8 až 15 aminokyselinových zvyškov. Podrobnejšie, DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu zahŕňa DNA obsahujúca DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu kódujúcu peptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciami sekv. id. č. 11, 12, 13 alebo 14 a obsahuje 8 až 15 aminokyselinových zvyškov.

DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu znamená napríklad DNA obsahujúca nukleotidovú sekvenciu 139 až 162 z 5' konca v nukleotidovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 15 a obsahujúca 24 až 162 nukleotidov alebo podobne. Podrobnejšie, DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu zahŕňa DNA obsahujúcu nukleotidovú sekvenciu 139 až 162 z 5' konca na 3' koniec nukleotidovej sekvencie predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 15 a obsahujúcu 25 až 45 nukleotidov.

Typické príklady DNA kódujúcu ligandový peptid podľa predloženého vynálezu zahŕňujú DNA, ktorá obsahuje DNA nesúcu príslušné nukleotidové sekvencie predstavované sekvenciami sekv. id. č. 16, 17, 18 a 19.

Špecifické príklady DNA kódujúce každú sekvenciu zodpovedajúcu sekvencii sekv. id. č. sú:

1) pre DNA, ktorá kóduje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 10, DNA obsahujúca DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 15,

2) pre DNA, ktorá kóduje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 11, DNA obsahujúca DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 16,

3) pre DNA, ktorá kóduje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 12, DNA obsahujúca DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 17,

4) pre DNA, ktorá kóduje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 13, DNA obsahujúca DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 18, a

5) pre DNA, ktorá kóduje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 14, DNA obsahujúca DNA, ktorá má nukleotidovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 19.

Ligandový peptid podľa predloženého vynálezu alebo jeho estery, amidy alebo soli rovnako ako polynukleotid kódujúci ligandový peptid sa môže vyrobiť podobným spôsobom, ako sú spôsoby výroby receptorového proteínu alebo podobné zlúčeniny podľa predloženého vynálezu a polynukleotidu kódujúceho to isté.

Ligandový peptid podľa predloženého vynálezu alebo jeho estery, amidy alebo soli (tu ďalej niekedy označovaný ako ligandový peptid alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu) rovnako ako polynukleotid kódujúci ligandový peptid sú užitočné ako bezpečné a nízкотoxické liečivo v závislosti na ligandovej aktivite.

Ligandový peptid alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu a DNA kódujúca to isté, majú aktivitu potlačujúcu metastázy rakoviny a sú teda užitočné pre profylaktické alebo terapeutické liečivo všetkých rakovín (napr. rakoviny pľúc, rakoviny žalúdka, rakoviny pečene, rakoviny slinivky brušnej, rakoviny hrubého čreva, rakoviny konečníka, rakoviny zažívacieho traktu, rakoviny prostaty, rakoviny vaječníkov, rakoviny maternicového hrdla, rakoviny prsníka atď.).

Ligandový peptid alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu a DNA kódujúca to isté majú tiež aktivitu spočívajúcu v regulácii funkcie placenty a sú teda užitočné pre profylaktické alebo terapeutické liečivo rakoviny cílie, sneti hroznovej, invazívnej sneti, spontánneho potratu, fetálnej hypoplazie, dysbolizmu cukrov, dysbolizmu tukov alebo indukcie pôrodu.

Ak sa ligandový peptid alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu používa tak, ako sa hore opisuje profylaktické/terapeutické liečivo, ligandový peptid alebo podobná zlúčenina sa môžu vyrábať vo forme farmaceutického prípravku všeobecne známym spôsobom.

Ak sa DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu (tu niekedy ďalej označovaná ako ligandová DNA podľa predloženého vynálezu) používa tak, ako sa hore opisuje profylaktické/terapeutické činidlo, ligandová DNA podľa predloženého vynálezu sa môže používať samotná alebo po jej vložení do príslušného vektora, ako je vektor retrovíru, vektor adenovíru a/alebo vektor súvisiaci s adenovírom s nasledujúcim podávaním liečiva konvenčnými prostriedkami. Ligandová DNA podľa predloženého vynálezu sa môže podávať taktiež ako nahá DNA alebo s adjuvans, aby sa napomohlo jej prijatiu génovou puškou alebo katétrom, ako je katéter s hydrogélom.

Napríklad 1) ligandový peptid alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu, alebo 2) DNA kódujúca ligandový peptid sa môžu používať orálne vo forme tabliet, ktoré sa môžu potiahnuť cukrom, ak je to

nevyhnutné a sa to požaduje, toboliek, elixírov, mikrotoboliek atď. alebo parenterálne vo forme injektovateľných prípravkov, ako je sterilný roztok a suspenzia vo vode alebo s inou farmaceuticky prijateľnou kvapalinou. Tieto prípravky je možné vyrábať zmiešaním 1) ligandového peptidu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu, alebo 2) DNA kódujúca ligandový peptid s fyziologicky prijateľným známym nosičom, ochucovacím činidlom, riedidlom, vehikulom, antiseptickým činidlom, stabilizačným činidlom, pojivom atď. v požadovanej jednotkovej dávkovej forme všeobecne prijateľným spôsobom aplikovaným na výrobu farmaceutických prostriedkov. Účinná zložka v prípravku sa reguluje na takú dávku, aby sa príslušná dávka získala v danom špecifickom rozmedzí.

Medzi prísady miešateľné s tabletami, tobolkami atď. patrí väzbové činidlo, ako je želatína, kukuričný škrob, tragant a arabská guma, excipients, ako je kryštalická celulóza, napučiavacie činidlo, ako je kukuričný škrob, želatína a kyselina alginová, mazadlo, ako stearát horečnatý, sladiace činidlo, ako je sacharóza, laktóza a sacharín, a ochucovacie činidlo, ako je máta peperná, akamonový olej a višňový extrakt. Ak je jednotková dávka vo forme toboliek, môžu sa ďalej použiť kvapalné nosiče, ako sú oleje a tuky, spoločne s hore opísanými prísadami. Sterilný prostriedok pre injekcie sa môže zostaviť podľa konvenčného spôsobu používaného na výrobu farmaceutických prostriedkov, napr. rozpustením alebo suspendovaním účinných zložiek v riedidle, ako je voda pre injekcie s prirodzene sa vyskytujúcim rastlinným olejom, ako je sésamový olej a kokosový olej atď., takže sa vyrobí farmaceutický prostriedok. Medzi príklady vodného média pre injekcie patria fyziologický solný roztok a izotonický roztok obsahujúci glukózu a ďalšie pomocné činidlá (napr. D-sorbitol, D-manitol a chlorid sodný) a môže sa používať v kombinácii s príslušnými činidlami napomáhajúcimi rozpustenie, ako je alkohol (napr. etanol), polyalkohol (napr. propylénglykol a polyetylénglykol), neiónové povrchovo aktívne činidlo (napr. polysorbát 80TM a HCO-50) atď. Ako olejové médium sa môže používať napríklad sésamový olej a sójový olej, ktoré sa môžu používať v kombinácii s činidlom napomáhajúcim rozpustenie, ako je benzyľbenzoát a benzyľalkohol.

Ďalej sa môžu hore opísané profylaktické/terapeutické činidlá zostavovať tiež spolu s tlmivým roztokom (napr. fosforečnanovým tlmivým roztokom a tlmivým roztokom octanu sodného), ukludňujúcim činidlom (napr. benzalkoniumchloridom a hydrochloridom prokaínu), stabilizátorom (napr. ľudským sérovým albumínom a polyetylén glykolom), ochranným činidlom (napr. benzylalkoholom a fenolom), antioxidačným činidlom atď. Takto vyrobená kvapalina pre injekcie sa normálne naplní do príslušnej ampuly.

Pretože takto získaný farmaceutický prostriedok je bezpečný a nízko toxický, môže sa tento prostriedok podávať človeku alebo cicavcom (napr. kryse, myši, králikovi, ovci, prasaťu, hovädziemu dobytku, mačke, psovi, opici atď.).

Dávka ligandového peptidu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu sa mení podľa subjektu, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď. Pri orálnom podávaní je dávka normálne asi 0,1 až asi 100 mg, s výhodou asi 1,0 až asi 50 mg, výhodnejšie asi 1,0 až asi 20 mg na deň pre pacienta s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri paranterálnom podávaní sa jednotlivá dávka mení podľa subjektu, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď., ale je výhodné podávať účinnú zložku intravenózne v dennej dávke asi 0,01 až asi 30 mg, s výhodou asi 0,1 až asi 20 mg, výhodnejšie asi 0,1 až asi 10 mg pacientovi s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Iným živočíšnym druhom sa môže podávať zodpovedajúca dávka, čo je taká dávka, ktorá sa získa prevodom na 60 kg hmotnosti.

Dávka ligandovej DNA podľa predloženého vynálezu sa mení v závislosti na subjekte, ktorému sa podáva, na cieľovom orgáne, na príznaku, ceste podávania atď., pri orálnom podávaní je táto dávka normálne asi 0,1 až asi 100 mg, s výhodou asi 1,0 až asi 50 mg, výhodnejšie asi 1,0 až asi 20 mg na deň pre pacienta s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri paranterálnom podávaní sa jednotlivá dávka mení podľa subjektu, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď., ale je výhodné podávať účinnú zložku intravenózne v dennej dávke asi 0,01 až asi 30 mg, s výhodou asi 0,1 až asi 20

mg, výhodnejšie asi 0,1 až asi 10 mg pacientovi s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Iným živočíšnym druhom sa môže podávať zodpovedajúca dávka, čo je taká dávka, ktorá sa získa prevodom na 60 kg hmotnosti.

2) Profylaktické a/alebo terapeutické činidlá pre ochorenia súvisiace s dysfunkciou receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu

Receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu alebo DNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu sa môžu použiť ako profylaktické a/alebo terapeutické činidlá pre ochorenia súvisiace s dysfunkciou ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu.

Napríklad, ak sa nemôže očakávať akákoľvek fyziologická aktivita receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu vďaka zníženej hladine receptorového proteínu u pacienta (deficit receptorového proteínu), ligandová aktivita sa môže dosiahnuť nasledujúcimi spôsobmi: 1) receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu sa podáva pacientovi na doplnenie množstva receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny, alebo 2) množstvo receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu sa pre pacienta zvýši: a) podaním DNA kódujúcu receptorový proteín podľa predloženého vynálezu pacientovi na expresiu, alebo b) inzerciou DNA kódujúcu receptorový proteín podľa predloženého vynálezu do cieľových buniek na expresiu a bunky takto exprimované sa potom transplantujú do pacienta. Množstvo receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu môže sa teda pre pacienta zvýšiť, pričom ligandová aktivita sa môže dostatočne vykazovať. Receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu alebo DNA kódujúca receptorový proteín podľa predloženého vynálezu je teda užitočná ako bezpečné a nízko toxické profylaktické a/alebo terapeutické liečivo pre ochorenia súvisiace s dysfunkciou receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu.

Receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu a DNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu vykazujú aktivitu potlačovania metastáz rakoviny a sú

teda užitočné pre profylaktické alebo terapeutické liečivo všetkých rakovín (napr. rakoviny pľúc, rakoviny žalúdka, rakoviny pečene, rakoviny slinivky brušnej, rakoviny hrubého čreva, rakoviny konečníka, rakoviny tračníka, rakoviny prostaty, rakoviny vaječníkov, rakoviny maternicového hrdla, rakoviny prsníka atď.).

Receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu a DNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu tiež vykazujú aktivitu spočívajúcu v regulácii funkcie placenty a sú teda užitočné pre profylaktické alebo terapeutické liečivo rakoviny cílie, sneti hroznovej, invazívnej sneti, spontánneho potratu, fetálnej hypoplazie, dysbolizmu cukrov, dysbolizmu tukov alebo indukcie pôrodu.

Ak sa receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu používa ako profylaktické/terapeutické liečivo, ako sa opisuje hore, receptorový proteín alebo podobná zlúčenina sa môžu vyrábať vo forme farmaceutického prípravku podľa všeobecne známych spôsobov.

Ak sa DNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu (tu niekedy ďalej označovaná ako DNA podľa predloženého vynálezu) používa ako profylaktické/terapeutické činidlo, ako sa opisuje hore, DNA podľa predloženého vynálezu sa môže používať samotná alebo po jej vložení do príslušného vektora, ako je vektor adenovíru alebo vektor víru súvisiaci s adenovírom s nasledujúcim podávaním liečiva konvenčnými prostriedkami. DNA podľa predloženého vynálezu sa môže podávať taktiež ako nahá DNA alebo s adjuvans, aby sa napomohlo jej prijatiu génovou puškou alebo katétrom, ako je katéter s hydrogélom.

Napríklad 1) receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu, alebo 2) DNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu sa môžu používať orálne vo forme tabliet, ktoré sa môžu potiahnuť cukrom, ak je to nevyhnutné a sa to požaduje, toboliek, elixírov, mikrotoboliek atď. alebo parenterálne vo forme injektovateľných prípravkov, ako je

sterilný roztok a suspenzia vo vode alebo s inou farmaceuticky prijateľnou kvapalinou. Tieto prípravky je možné vyrábať zmiešaním 1) receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu, alebo 2) DNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu s fyziologicky prijateľným známym nosičom, ochucovacím činidlom, riedidlom, vehikulom, antiseptickým činidlom, stabilizačným činidlom, pojivom atď. v požadovanej jednotkovej dávkovej forme všeobecne prijateľným spôsobom aplikovaným na výrobu farmaceutických prípravkov. Účinná zložka v prípravku sa reguluje na takú dávku, že sa príslušná dávka získa v danom špecifickom rozmedzí.

Medzi prísady miešateľné s tabletami, tobolkami atď. patrí väzbové činidlo, ako je želatína, kukuričný škrob, tragant a arabská guma, excipients, ako je kryštalická celulóza, napučiavacie činidlo, ako je kukuričný škrob, želatína a kyselina alginová, mazadlo, ako stearát horečnatý, sladiace činidlo, ako je sacharóza, laktóza a sacharín, a ochucovacie činidlo, ako je mäta peperná, akamonový olej a višňový extrakt. Ak jednotková dávka existuje vo forme toboliek, môžu sa ďalej použiť kvapalné nosiče, ako sú oleje a tuky, spoločne s hore opísanými prísadami. Sterilný prostriedok pre injekcie sa môže zostaviť podľa konvenčného spôsobu používaného na výrobu farmaceutických prostriedkov, napr. rozpustením alebo suspendovaním účinných zložiek v riedidle, ako je voda pre injekcie s prirodzene sa vyskytujúcim rastlinným olejom, ako je sésamový olej a kokosový olej atď., takže sa vyrobí farmaceutický prostriedok. Medzi príklady vodného média pre injekcie patria fyziologický solný roztok a izotonický roztok obsahujúci glukózu a ďalšie pomocné činidlá (napr. D-sorbitol, D-manitol a chlorid sodný) a môže sa používať v kombinácii s príslušnými činidlami napomáhajúcimi rozpustenie, ako je alkohol (napr. etanol), polyalkohol (napr. propylénglykol a polyetylénglykol), neiónové povrchovo aktívne činidlo (napr. polysorbát 80TM a HCO-50) atď. Ako olejové médium sa môže používať napríklad sésamový olej a sójový olej, ktoré sa môžu používať v kombinácii s činidlom napomáhajúcim rozpustenie, ako je benzylbenzoát a benzylalkohol.

Ďalej sa môžu zostavovať tiež hore opísané profylaktické/terapeutické činidlá spolu s tlmivým roztokom (napr. fosforečnanovým tlmivým roztokom a

tlmivým roztokom octanu sodného), ukludňujúcim činidlom (napr. benzalkoniumchloridom a hydrochloridom prokaínu), stabilizátorom (napr. ľudským sérovým albumínom a polyetylénglykolom), ochranným činidlom (napr. benzylalkoholom a fenolom), antioxidačným činidlom atď. Takto vyrobená kvapalina pre injekcie sa normálne naplní do príslušnej ampuly.

Pretože takto získaný farmaceutický prostriedok je bezpečný a nízкотoxický, môže sa tento prostriedok podávať človeku alebo cicavcom (napr. kryse, myši, králikovi, ovci, prasaťu, hovädziemu dobytku, mačke, psovi, opici atď.).

Dávka receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu sa mení podľa subjektu, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď. Pri orálnom podávaní je dávka normálne asi 0,1 až asi 100 mg, s výhodou asi 1,0 až asi 50 mg, výhodnejšie asi 1,0 až asi 20 mg na deň pre pacienta s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri paranterálnom podávaní sa jednotlivá dávka mení podľa subjektu, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď., ale je výhodné podávať účinnú zložku intravenózne v dennej dávke asi 0,01 až asi 30 mg, s výhodou asi 0,1 až asi 20 mg, výhodnejšie asi 0,1 až asi 10 mg pacientovi s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Iným živočíšnym druhom sa môže podávať zodpovedajúca dávka, čo je taká dávka, ktorá sa získa prevodom na 60 kg hmotnosti.

Dávka DNA kódujúca receptorový proteín podľa predloženého vynálezu sa mení v závislosti na subjekte, ktorému sa podáva, na cieľovom orgáne, na príznaku, ceste podávania atď. Pri orálnom podávaní je táto dávka normálne asi 0,1 až asi 100 mg, s výhodou asi 1,0 až asi 50 mg, výhodnejšie asi 1,0 až asi 20 mg na deň pre pacienta s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri paranterálnom podávaní sa jednotlivá dávka mení v závislosti subjekte, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď., ale je výhodné podávať účinnú zložku intravenózne v dennej dávke asi 0,01 až asi 30 mg, s výhodou asi 0,1 až asi 20 mg, výhodnejšie asi 0,1 až asi 10 mg pacientovi s rakovinou (s

hmotnosťou 60 kg). Iným živočíšnym druhom sa môže podávať zodpovedajúca dávka, čo je taká dávka, ktorá sa získa prevodom na 60 kg hmotnosti.

3) Génové diagnostické činidlo

Použitím sondy DNA kódujúca receptorový proteín podľa predloženého vynálezu alebo DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže detekovať abnormalita (génová abnormalita) DNA alebo mRNA kódujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu u človeka alebo cicavca (napr. krysy, myši, kráľika, ovci, prasat'a, hovädzieho dobytku, psa, opici atď.). DNA podľa predloženého vynálezu je teda užitočná ako génové diagnostické činidlo pre poškodenie DNA alebo mRNA, ich mutáciu alebo ich zníženú expresiu alebo zvýšenú expresiu alebo nadexpresiu DNA alebo mRNA.

Hore opísaná génová diagnóza použitím DNA kódujúca receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, alebo DNA kódujúca ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže uskutočňovať napríklad všeobecne známym Northernovým hybridizačným testom alebo PCR-SSCP testom (*Genomics* 1989, 5, 874 až 879); *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86, 2766 až 2770.).

4) Kvantitatívne hodnotenie ligandu na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu

Pretože receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu má vlastnosti väzby na ligand, ligandová aktivita sa môže kvantitatívne vyhodnotiť in vivo s vysokou citlivosťou.

Spôsob kvantitatívneho hodnotenia podľa predloženého vynálezu sa môže uskutočňovať napríklad v kombinácii s kompetitívnym spôsobom. Vzorka, ktorá sa má stanoviť, sa privedie do styku s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, pričom sa môže stanoviť koncentrácia

ligandu vo vzorke. Konkrétne, kvantitatívne vyhodnotenie sa môže uskutočňovať podľa nasledujúceho nižšie uvedeného spôsobu 1) alebo 2) alebo podľa jeho modifikácie.

1) Hiroshi Irie (red.): „*Radioimmunoassay*“, publikované Kodansha, Japonsko, 1974, a

2) Hiroshi Irie (red.): „*Radioimmunoassay, Second Series*“, publikované Kodansha, Japonsko, 1979.

5) Spôsob testovania zlúčeniny (agonistu, antagonistu atď.), ktorá mení vlastnosti väzby medzi receptorovým proteínom, jeho solami a ligandom podľa predloženého vynálezu (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu

Použitím receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu alebo jeho solí alebo skonštruovaním expresného systému rekombinantného receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny a použitím systému testovania nadviazania receptora na expresný systém, je možné uskutočniť účinné testovanie zlúčeniny (napr. peptidu, proteínu, nepeptidovej zlúčeniny, syntetickej zlúčeniny, fermentačného produktu atď.) alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu.

Medzi príklady hore uvedených zlúčenín patrí a) zlúčenina, ktorá vykazuje aktivity stimulovania bunky sprostredkované receptorom spojeným s G proteínom (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolfosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH) (takzvaní agonisti receptorového proteínu alebo podobné zlúčeniny podľa predloženého vynálezu), b) zlúčenina, ktorá nevykazuje aktivitu stimulovania buniek (takzvaní antagonisti

receptorového proteínu alebo podobné zlúčeniny podľa predloženého vynálezu), alebo c) zlúčenina, ktorá znižuje vlastnosť nadviazania medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu (zlúčenina ad a)) sa testuje s výhodou spôsobom stanovenia hore opísaného ligandu.

Predložený vynález poskytuje tiež spôsob testovania zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosti väzby medzi receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu a ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu), ktorý zahŕňa porovnanie dvoch nasledujúcich prípadov: i) prípadu, v ktorom sa receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu uvedie do styku s ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a ii) prípadu, v ktorom sa receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého spôsobu uvedie do styku s ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a testovanou zlúčeninou.

Pri spôsobe testovania podľa predloženého vynálezu sa uskutočňuje porovnanie medzi prípadmi i) a ii) v pojmach napr. množstvo ligandu (ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu), ktorý sa nadviaže na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu, alebo aktivít stimulujúcich bunku.

Podrobnejšie, predložený vynález poskytuje nasledujúce spôsoby.

1) Spôsob testovania zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, vyznačujúci sa tým, že sa meria množstvo značeného ligandu (ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu) nadviazaného na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu v tom prípade, kedy značený ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) sa uvedie do styku s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, a v prípade, kedy sa značený ligand (ligandový peptid

podľa predloženého vynálezu) a testovaná zlúčenina uvedú do styku s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou, a porovná sa nadviazané množstvo značeného ligandu v týchto dvoch prípadoch.

2) Spôsob testovania zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, vyznačujúci sa tým, že sa meria množstvo značeného ligandu (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) nadviazaného na bunky obsahujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, alebo jeho bunkovou frakciou v prípade, kedy sa značený ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) uvedie do styku s bunkami obsahujúcimi receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, alebo bunkovú membránu, a v prípade, kedy sa značený ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) a testovaná zlúčenina uvedú do styku s bunkami obsahujúcimi receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu alebo bunkovú membránu, a porovná sa nadviazané množstvo značeného ligandu v týchto dvoch prípadoch.

3) Spôsob testovania zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, vyznačujúci sa tým, že sa meria množstvo značeného ligandu (ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu) nadviazaného na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu v prípade, kedy sa značený ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) uvedie do styku s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou exprimovaniu v bunkovej membráne kultivovaním transformantu obsahujúceho DNA podľa predloženého vynálezu, a v prípade, kedy sa značený ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) a testovaná zlúčenina uvedú do styku s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou exprimovanou v bunkovej membráne kultivovaním transformantu obsahujúceho DNA podľa

predloženého vynálezu, a porovná sa množstvo nadviazaného značeného ligandu v týchto dvoch prípadoch.

4) Spôsob testovania zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, vyznačujúci sa tým, že sa merajú receptorom sprostredkované aktivity stimulujúce bunky (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolofosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH) v prípade, kedy zlúčenina (napr. ligand na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu), ktorá aktivuje receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, sa uvedie do styku s bunkami obsahujúcimi receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu a v prípade, kedy sa uvedená zlúčenina, ktorá aktivuje receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu a testovaná zlúčenina uvedú do styku s bunkami obsahujúcimi receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, a porovnajú sa aktivity stimulácie buniek v týchto dvoch prípadoch.

5) Spôsob testovania zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, vyznačujúci sa tým, že sa merajú receptorom sprostredkované aktivity stimulujúce bunky (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolofosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH) v prípade, kedy zlúčenina, ktorá aktivuje ligandový peptid alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu (napr. ligand (ligand podľa predloženého vynálezu) na

receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu), sa uvedie do styku s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu exprimovaným v bunkovej membráne kultivovaním transformantu obsahujúceho DNA podľa predloženého vynálezu, a v prípade, kedy sa uvedená zlúčenina, ktorá aktivuje receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu a testovaná zlúčenina uvedú do styku s receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu exprimovanou v bunkovej membráne kultivovaním transformantu obsahujúceho DNA podľa predloženého vynálezu, a porovnajú sa aktivity stimulácie buniek v týchto dvoch prípadoch.

Predtým, ako sa získa receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu, by sa malo uskutočniť testovanie agonistu alebo antagonistu receptora spojeného s G proteínom, pokiaľ ide o to, či by kandidátna zlúčenina inhibovala alebo neinhibovala nadviazanie medzi receptorovými proteínmi spojenými s G proteínom a ligandami, použitím buniek, tkanív alebo frakcií bunkovej membrány obsahujúcej receptorové proteíny spojené s G proteínom. Ak sa bunky, tkanivá alebo frakcie bunkovej membrány používajú ako také, nevyhnutne však existujú tiež iné receptorové proteíny. Bolo by teda obtiažne testovať agonistu alebo antagonistu na požadované receptorové proteíny.

Použitie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu umožňuje účinne testovať zlúčeninu, ktorá inhibuje nadviazanie medzi ligandom a receptorovým proteínom spojeným s G proteínom. Okrem toho sa môže jednoducho vyhodnotiť to, či testovaná zlúčenina je agonista alebo antagonist.

Ďalej sa tu bude podrobnejšie opisovať spôsob testovania podľa predloženého vynálezu.

Po prvé, receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu, ktorá sa používa pri spôsobe testovania podľa predloženého vynálezu,

môže znamenať akýkoľvek proteín, pokiaľ obsahuje hore opísaný receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, i keď sa s výhodou používa membránová frakcia cicavčích orgánov. Na testovanie, ktoré vyžaduje väčšie množstvo receptorového proteínu, je výhodné použiť receptorové proteíny hojne exprimované rekombinantom.

Pri výrobe receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu sa môžu používať hore opísané spôsoby, i keď DNA podľa predloženého vynálezu sa s výhodou exprimuje v cicavčích bunkách alebo v bunkách hmyzu. Ako DNA fragment kódujúci oblasť cieľového proteínu sa môže použiť doplnková DNA, ale bez obmedzenia na ňu. Ako DNA fragment sa napríklad môžu použiť tiež génové fragmenty alebo syntetická DNA. Aby sa zaviedol DNA fragment kódujúci receptorový proteín podľa predloženého vynálezu do hostiteľských živočíšnych buniek a aby sa účinne exprimoval, s výhodou sa DNA fragment zahrnie do polyhedronového promotora jadrového polyhedrosis víru (NPV) patriaceho k baculovíru, promotora odvodeného od SV-40, promotora retrovíru, promotora metalotioneínu, ľudského promotora tepelného šoku, promotora cytomegalovíru, SR α promotora atď. v smere ich vlákna. Množstvo a kvalita takto exprimovaných receptorov sa môže skúmať všeobecne známym spôsobom, napríklad spôsobom opísaným v Nambi P. a spol.: *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 19555 až 19559.

V spôsobe testovania podľa predloženého vynálezu môže teda látka obsahujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu znamenať receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu, ktorá sa vyčistí všeobecne známymi spôsobmi. Taktiež sa môžu použiť bunky obsahujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, alebo frakcie bunkovej membrány buniek obsahujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu.

Ak sa pri spôsobe testovania podľa predloženého vynálezu používajú bunky obsahujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa

predloženého vynálezu, tieto bunky sa môžu fixovať glutaraldehydom, formalínom atď. Fixácia sa môže uskutočňovať všeobecne známymi spôsobmi.

Bunky obsahujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu znamenajú hostiteľské bunky exprimujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu. Medzi príklady takýchto hostiteľských buniek patria *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, kvasinky, bunky hmyzu a živočíšne bunky.

Bunková membránová frakcia znamená takú frakciu, ktorá hojne obsahuje bunkové membrány pripravené všeobecne známym spôsobom po rozbití buniek. Medzi príklady rozbitia bunky patria rozdrtenie buniek použitím Potter-Elvehjemovho homogenizátora, rozbitie použitím Waringovho miešača alebo zariadenia Polytron (vyrába firma Kinematica Inc.), rozbitie pôsobením ultrazvuku a rozbitie rozprašovaním buniek tenkou tryskou za zvýšeného tlaku použitím francúzskeho lisu alebo podobného zariadenia. Bunková membránová frakcionácia sa uskutočňuje hlavne frakcionáciou za použitia odstredivej sily, ako je odstreďovanie pre frakcionáciu a odstreďovanie s hustotným gradientom. Napríklad kvapalina z rozbitých buniek sa odstreďuje pri nízkej rýchlosti (500 až 3000 otáčok za minútu) krátku dobu (normálne asi 1 až 10 minút), výsledný supernatant sa potom odstreďuje pri vyššej rýchlosti (15 000 až 30 000 otáčok za minútu) normálne v priebehu 30 minút až 2 hodín. Takto získaná zrazenina sa použije ako membránová frakcia. Membránová frakcia je bohatá na exprimovaný receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu a membránové zložky, ako sú fosfolipidy a membránové proteíny pochádzajúce z bunky.

Množstvo receptorového proteínu nachádzajúceho sa v bunkách obsahujúcich receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu v membránovej frakcii je s výhodou 10^3 až 10^8 molekúl na bunku, výhodnejšie 10^5 až 10^7 molekúl na bunku. Ako sa zvyšuje množstvo exprese, aktivita viažúca ligand na jednotku membránovej frakcie (špecifická aktivita) sa zvyšuje, takže je možné skontrolovať nielen vysoko citlivý testovací systém, ale tiež je možné rovnakým systémom testovať veľké množstvá vzoriek.

Na zavedenie spôsobov 1) až 3) na testovanie zlúčeniny, ktorá mení vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu je potrebná príslušná frakcia receptorového proteínu a značený ligand.

Receptorová proteinová frakcia s výhodou znamená frakciu prirodzene sa vyskytujúceho receptorového proteínu alebo frakciu rekombinantného receptorového proteínu s aktivitou ekvivalentnou aktivite prirodzene sa vyskytujúceho proteínu. Pod pojmom „ekvivalentná aktivita“ sa tu myslí, že znamená väzbovú aktivitu ligandu alebo signálnu transdukčnú aktivitu, čo je ekvivalentné s tými, ktoré existujú v prirodzene sa vyskytujúcich receptorových proteínoch.

Medzi príklady značených ligandov patria ligandy, ktoré sú značené [^3H], [^{125}I], [^{14}C] alebo [^{35}S].

Podrobnejšie, zlúčenina, ktorá mení vlastnosť väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, sa stanovuje nasledujúcimi spôsobmi. Najskôr sa suspendovaním buniek obsahujúcich receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo jeho membránovú frakciu v príslušnom tlmivom roztoku pre použitie pri spôsobe stanovenia pripraví štandardný receptorový prípravok. Môže sa použiť akýkoľvek tlmivý roztok, pokiaľ tento tlmivý roztok neinterferuje s väzbou ligand-receptor. Príklady takýchto tlmivých roztokov sú fosforečnanový tlmivý roztok alebo Tris-HCl tlmivý roztok s hodnotou pH asi 4 až 10 (s výhodou pH asi 6 až 8). Na účel minimalizovania nešpecifickej väzby sa prípadne môže pridať k tlmivým roztokom povrchovo aktívne činidlo, ako je CHAPS, Tween-80TM (vyrába firma Kao-Atlas Inc.), digitonin alebo deoxycholát. Ďalej sa na účel potlačenia degradácie receptora alebo ligandu (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) proteázou môže tiež pridať inhibítor proteázy, ako je PMSF, leupeptín, E-64 (vyrába Peptide Institute, Inc.) a pepstatín. Dané množstvo (5000 až 500 000 impulzov za minútu) značeného ligandu (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) sa pridá k

0,01 až 10 ml roztoku receptora, v ktorom je súčasne prítomné 10^{-4} M až 10^{-10} M testovanej zlúčeniny. Na stanovenie množstva nešpecifického nadviazania (NSB) sa použije tiež reakčná skúmavka obsahujúca vo veľkom prebytku neznačený ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu). Reakcia sa uskutočňuje približne pri 0 až 50 °C, s výhodou pri 4 až 37 °C v priebehu asi 20 minút až 24 hodín, s výhodou asi 30 minút až 3 hodiny. Po skončení reakcie sa reakčná zmes sfiltruje filtračným papierom zo skleneného vlákna atď. a premyje sa príslušným množstvom rovnakého tlmivého roztoku. Zvyšujúca rádioaktivita na filtračnom papieri zo skleneného vlákna sa potom zmeria pomocou kvapalinovej scintilačnej sondy alebo γ -počítacza. Ak sa nešpecifické nadviazanie (NSB) odpočíta od počtu impulzov (B_0), keď nie je prítomná žiadna antagonizujúca látka a výsledný počet impulzov (B_0 mínus NBS) tvorí 100 %, testovaná zlúčenina vykazujúca špecifické väzbové množstvo (B mínus NBS), napr. 50 alebo menej %, sa môže vybrať ako kandidát na zlúčeninu.

Hore uvedený spôsob 4) alebo 5) testovanej^{ia} zlúčeniny, ktorá mení vlastnosť väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu, sa môže uskutočniť nasledujúcim spôsobom. V jednom uskutočnení sa aktivity stimulujúce bunky vyvolané receptorovým proteínom (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inosilfosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH) sa môžu stanoviť všeobecne známym spôsobom alebo použitím komerčne dostupnej testovacej zostavy.

Konkrétne, bunky, ktoré obsahujú receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, sa najprv kultivujú na doske s mnohými jamkami atď. Pred testovaním sa médium nahradí čerstvým médiom alebo príslušným netoxickým tlmivým roztokom, nasleduje inkubácia po danú dobu v prítomnosti testovanej zlúčeniny atď. Následne sa bunky extrahujú alebo sa supernatant izoluje a príslušnými spôsobmi sa kvantitatívne vyhodnotí výsledný

produkt. Ak je ťažko detekovať produkciu látky s indexom aktivity stimulujúcim bunky (napr. arachidonovú kyselinu) vďaka degradačnému enzýmu nachádzajúcemu sa v bunkách, môže sa pred testom pridať inhibítor proti takémuto degradujúcemu enzýmu. Na detekovanie aktivít, ako je aktivita potláčania produkcie cAMP, sa základná produkcia v bunkách zvýši forskolínom alebo podobným spôsobom a potom je možné detekovať potlačujúci účinok na zvýšenú základnú produkciu.

Na testovanie počas merania aktivít stimulujúcich bunky sú potrebné bunky, v ktorých sa exprimuje príslušný receptorový proteín. Výhodné bunky, v ktorých sa receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu exprimuje, sú prirodzene sa vyskytujúca bunková línia obsahujúca receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu a hore uvedená bunková línia, v ktorej sa exprimuje rekombinantný typ receptorového proteínu alebo podobné zlúčeniny.

Medzi príklady testovanej zlúčeniny patria peptidy, proteíny, nepeptidové zlúčeniny, syntetické zlúčeniny, fermentačné produkty, bunkové extrakty, rastlinné extrakty a živočíšne tkanivové extrakty. Tieto testované zlúčeniny môžu byť nové alebo môžu byť všeobecne známe.

Zostava na testovanie zlúčeniny alebo jej soli, ktorá mení vlastnosť väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu obsahuje receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, bunky obsahujúce receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo membránovú frakciu buniek obsahujúcu receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu.

Príklady testovacej zostavy obsahujúcej nasledujúce zložky.

1. Reakčné činidlo na testovanie

1) Tlmivé roztoky na test a premývanie

Hankov vyrovnaný solný roztok (vyrába firma Gibco) doplnený o 0,05 % hovädzieho sérového albumínu (vyrába firma Sigma).

Tieto tlmivé roztoky sa môžu sterilizovať filtráciou membránovým filtrom s veľkosťou pórov 0,45 μm a skladujú sa pri 4 °C alebo sa môžu tiež pripraviť počas použitia.

2) Prípravok receptorového proteínu spojeného s G proteínom

Bunky CHO, v ktorých sa exprimuje receptorový proteín podľa predloženého vynálezu, sa predkultivujú v množstve $5 \cdot 10^5$ buniek na jamku na doske s 12 jamkami, nasleduje kultivovanie pri 37 °C pod 5 % oxidu uhličitého a 95 % vzduchu počas dvoch dní.

3) Značený ligand

Ligand, ktorý je značený a je komerčne dostupný, obsahuje [^3H], [^{125}I], [^{14}C], [^{35}S] atď.

Produkt vo forme vodného roztoku sa skladuje pri 4 °C alebo -20 °C a riedi sa na 1 μM tlmivým roztokom na test pri použití.

4) Štandardný ligandový roztok

Ligand sa rozpustí v PBS obsahujúcom 0,1 % hovädzieho sérového albumínu (vyrába firma Sigma), aby sa tak vyrobil 1 mM roztok a ten sa skladuje pri -20 °C.

2. Spôsob testovania

1) Bunky CHO exprimujúce receptorový proteín podľa predloženého vynálezu sa kultivujú na kultivačnej doske s 12 jamkami. Po dvojitoť premytí CHO-buniek exprimujúcich receptorový proteín 1 ml tlmivého roztoku na každý test sa do každej jamky pridá 490 μ l rovnakého tlmivého roztoku.

2) Pridá sa 5 μ l roztoku testovanej zlúčeniny v množstve 10^{-3} M až 10^{-10} M. K systému sa pridá 5 μ l značeného ligandu a nasleduje inkubácia pri teplote miestnosti počas jednej hodiny. Na stanovenie množstva nešpecifickej väzby sa k systému namiesto testovanej zlúčeniny pridá 5 μ l ligandu v množstve 10^{-3} M.

3) Reakčná zmes sa z jamky odstráni a trikrát sa premyje 1 ml tlmivého roztoku na test. Značený ligand nadviazaný na bunky sa rozpustí v 0,2N NaOH - 1 % SDS a potom sa zmieša so 4 ml kvapalného scintilátora A (vyrába Wako Pure Chemical, Japonsko).

4) Kvapalinovou scintilačnou sondou (vyrába Beckmann) sa zmeria rádioaktivita a podľa nasledujúcej rovnice sa vypočíta PMB (percento maximálneho nadviazania):

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \cdot 100$$

kde: PMB znamená percento maximálnej väzby,
 B znamená hodnotu, keď sa pridá vzorka,
 NSB znamená nešpecifickú väzbu a
 B₀ znamená maximálnu väzbu.

Zlúčenina alebo jej sol', ktorá sa môže získať spôsobom testovania alebo pomocou testovacej zostavy podľa predloženého vynálezu, znamená zlúčeninu, ktorá funguje pre zmenenú vlastnosť väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom alebo

podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu. Podrobnejšie - táto zlúčenina zahŕňa a) zlúčeninu vykazujúcu aktivity stimulujúce bunky sprostredkované receptorom spojeným s G proteínom (napr. aktivity, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolofosfátu, zmenu membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH) (tzv. agonisti na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu), b) zlúčeniny, ktoré nemajú túto aktivitu stimulácie bunky (tzv. antagonisti na receptorový proteín podľa predloženého vynálezu), a c) zlúčeniny, ktoré znižujú vlastnosti väzby medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom podľa predloženého vynálezu.

Medzi príklady takýchto zlúčenín patria peptidy, proteíny, nepeptidové zlúčeniny, syntetické zlúčeniny a fermentačné produkty. Tieto zlúčeniny môžu byť buď nové alebo sú všeobecne známe.

Agonista na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu má rovnakú fyziologickú aktivitu ako má ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu. Preto je agonista užitočný ako bezpečný a nízкотoxický farmaceutický prípravok podľa ligandovej aktivity.

Podrobnejšie, agonista na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu má aktivitu potlačujúcu metastázy rakoviny a je teda užitočný na profylaxiu alebo terapiu všetkých rakovín (napr. rakoviny pľúc, rakoviny žalúdka, rakoviny pečene, rakoviny slinivky brušnej, rakoviny hrubého čreva, rakoviny konečníka, rakoviny tračníka, rakoviny prostaty, rakoviny vaječníkov, rakoviny maternicového hrdla, rakoviny prsníka atď.).

Agonista na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu má tiež aktivitu spočívajúcu v regulácii funkcie placenty a

je teda užitočný pre profylaktické alebo terapeutické liečivo rakoviny cílie, sneti hroznovej, invazívnej sneti, spontánneho potratu, fetálnej hypoplazie, dysbolizmu cukrov, dysbolizmu tukov alebo indukcie pôrodu.

Antagonista receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu môže potlačiť fyziologickú aktivitu, ktorú má ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu. Antagonista je teda užitočný ako bezpečný a nízko toxický farmaceutický prostriedok na potlačovanie ligandovej aktivity.

Zlúčenina, ktorá znižuje väzbu medzi ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu) a receptorovým proteínom podľa predloženého vynálezu, je užitočná ako bezpečný a nízko toxický farmaceutický prípravok na zníženie fyziologickej aktivity, ktorú má ligand (ligandový peptid podľa predloženého vynálezu) na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu.

Ak sa zlúčenina alebo jej sol', ktoré je možné získať spôsobom testovania alebo testovacou zostavou podľa predloženého vynálezu, používa ako hore opísaný farmaceutický prípravok, na výrobu tohto prostriedka sa používajú konvenčné zariadenia. Napríklad sa môže zlúčenina alebo jej sol' vyrobiť vo forme tabliet, toboliek, elixírov, mikrotoboliek, sterilných roztokov, suspenzií atď.

Pretože takto získaný prípravok je bezpečný a nízko toxický, môže sa podávať človeku alebo cicavcom (napr. kryse, myši, králikovi, ovci, prasat'u, hovädziemu dobytku, mačke, psovi, opici atď.).

Dávka zlúčeniny alebo jej soli (v prípade agonistu) sa mení v závislosti na subjekte, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď. Pri orálnom podávaní je dávka normálne asi 0,1 až asi 100 mg, s výhodou asi 1,0 až asi 50 mg, výhodnejšie asi 1,0 až asi 20 mg na deň pacientovi s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri parenterálnom podávaní jediná dávka sa mení podľa

závislosti na subjekte, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, spôsobu podávania atď., ale je výhodné podávať účinnú zložku intravenózne v dennej dávke asi 0,01 až asi 30 mg, s výhodou asi 0,1 až asi 20 mg, výhodnejšie asi 0,1 až asi 10 mg pacientovi s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri iných živočíšnych druhoch je zodpovedajúca podávaná dávka taká dávka, ktorá sa získa prevodom na 60 kg hmotnosti.

- 6) Prostriedok na profylaxiu a/alebo terapiu rôznych ochorení zahrňujúcich zlúčeninu (agonistu, antagonistu), ktorá mení väzbové vlastnosti medzi receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu a ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu)

Ako sa uviedlo hore, receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu hrá dôležitú úlohu in vivo, ako je aktivita potlačujúca metastázy rakoviny. Zlúčenina (agonista, antagonistu), ktorá mení vlastnosť väzby medzi receptorovým proteínom alebo podobnou zlúčeninou podľa predloženého vynálezu a ligandom (ligandovým peptidom podľa predloženého vynálezu), sa môže používať pre profylaktické a/alebo terapeutické činidlo ochorení súvisiacich s dysfunkciou receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu.

Ak sa hore uvedená zlúčenina používa ako farmaceutický prostriedok na prevenciu a/alebo liečenie ochorení súvisiacich s dysfunkciou receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu, môžu sa na výrobu prostriedka použiť konvenčné zariadenia.

Napríklad zlúčenina sa môže vyrábať vo forme tabliet potiahnutých cukrom, toboliek, elixírov alebo mikrotoboliek pre orálne podávanie a pre parenterálne podávanie vo forme injektovateľných prípravkov, ako je sterilný roztok a suspenzia vo vode alebo s inou farmaceuticky prijateľnou kvapalinou. Tieto prípravky je možné vyrábať zmiešaním zlúčeniny s fyziologicky prijateľným známym nosičom, ochuťovacím činidlom, riedidlom, vehikulom, antispetickým činidlom, stabilizačným činidlom, pojivom atď. v požadovanej jednotkovej dávkovej

forma všeobecne prijateľným spôsobom na výrobu farmaceutických prípravkov. Účinná zložka v prípravku sa reguluje na takú dávku, že sa príslušná dávka získa v danom špecifikovanom rozmedzí.

Medzi prísady miešateľné s tabletami, tobolkami patrí väzbové činidlo, ako je želatína, kukuričný škrob, tragant a arabská guma, excipiens, ako je kryštalická celulóza, napučiavacie činidlo, ako je kukuričný škrob, želatína a kyselina alginová, mazadlo, ako stearát horečnatý, sladiace činidlo, ako je sacharóza, laktóza a sacharín, a ochucovacie činidlo, ako je mäta peperná, akamonový olej a višňový extrakt. Ak je jednotková dávka vo forme toboliek, môžu sa ďalej použiť kvapalné nosiče, ako sú oleje a tuky, spoločne s hore opísanými prísadami. Sterilný prostriedok pre injekcie sa môže zostaviť všeobecne známym spôsobom používaným pri výrobe farmaceutických prostriedkov, napr. rozpustením alebo suspendovaním účinných zložiek v riedidle, ako je voda pre injekcie s prirodzene sa vyskytujúcim rastlinným olejom, ako je sésamový olej a kokosový olej atď., takže sa vyrobí farmaceutický prostriedok. Medzi príklady vodného média pre injekcie patria fyziologický sol'ný roztok a izotonický roztok obsahujúci glukózu a ďalšie pomocné činidlá (napr. D-sorbitol, D-manitol a chlorid sodný) a môžu sa používať v kombinácii s príslušnými činidlami napomáhajúcimi rozpustenie, ako je alkohol (napr. etanol), polyalkohol (napr. propylénglykol a polyetylénglykol), neiónovým povrchovo aktívnym činidlom (napr. polysorbát 80TM a HCO-50) atď. Ako olejové médium sa môže používať napríklad sésamový olej a sójový olej, ktoré sa môžu používať v kombinácii s činidlom napomáhajúcim rozpustenie, ako je benzylbenzoát a benzylalkohol.

Ďalej sa môže zostavovať tiež hore opísané profylaktické/terapeutické činidlo spolu s tlmivým roztokom (napr. fosforečnanovým tlmivým roztokom a tlmivým roztokom octanu sodného), upokojujúcim činidlom (napr. benzalkoniumchloridom a hydrochloridom prokaínu), stabilizátorom (napr. ľudským sérovým albumínom a polyetylénglykolom), ochranným činidlom (napr. benzylalkoholom a fenolom), antioxidačným činidlom atď. Takto vyrobená kvapalina pre injekcie sa normálne naplní do príslušnej ampuly.

Pretože takto získaný prostriedok je bezpečný a nízko toxický, môže sa podávať človeku alebo cicavcom (napr. kryse, myši, králikovi, ovci, prasäťu, hovädzemu dobytku, mačke, psovi, opici atď.).

Dávka zlúčeniny alebo jej soli (v prípade agonistu) sa mení podľa subjektu, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, cesty podávania atď. Pri orálnom podávaní je dávka normálne asi 0,1 až asi 100 mg, s výhodou asi 1,0 až asi 50 mg, výhodnejšie asi 1,0 až asi 20 mg na deň pre pacienta s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri paranterálnom podávaní sa jednotlivá dávka mení podľa subjektu, ktorému sa podáva, podľa cieľového orgánu, príznaku, spôsobu podávania atď., ale je výhodné podávať účinnú zložku intravenózne v dennej dávke asi 0,01 až asi 30 mg, s výhodou asi 0,1 až asi 20 mg, výhodnejšie asi 0,1 až asi 10 mg pacientovi s rakovinou (s hmotnosťou 60 kg). Pri iných živočíšnych druhoch je zodpovedajúca podávaná dávka taká dávka, ktorá sa získa prevodom na 60 kg hmotnosti.

- 7) Kvantitatívne vyhodnotenie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu

Protilátka na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo na ligandový peptid podľa predloženého vynálezu je schopná špecificky rozoznávať receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu a teda sa môže používať na kvantitatívne vyhodnotenie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu v roztoku testovanej vzorky, zvlášť pri kvantitatívnom hodnotení sendvičovým imunotestom. Predložený vynález teda poskytuje napríklad nasledujúce spôsoby kvantitatívneho hodnotenia:

- i) spôsob kvantitatívneho hodnotenia receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu

podľa predloženého vynálezu v testovanej kvapalnej vzorke, ktorá obsahuje kompetitívne reagujúcu látku na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu, testovanú kvapalnú vzorku a značený receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo značený ligandový peptid podľa predloženého vynálezu, a meranie značeného receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo značeného ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu nadviazaného na uvedenú protilátku, a

ii) spôsob kvantitatívneho hodnotenia receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu v testovanej kvapalnej vzorke, ktorá obsahuje súčasne alebo kontinuálne reagujúcu testovanú kvapalnú vzorku s protilátkou na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu imobilizovaný na nerozpustnom nosiči a značenú protilátku na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu, a meranie aktivity značeného činidla na nerozpustnom nosiči.

V hore opísanom spôsobe ii) je výhodné, aby jedna protilátka bola schopná rozoznávať N-koncovú oblasť receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu, zatiaľ čo iná protilátka je schopná rozoznávať C-koncovú oblasť receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu.

Monoklonálna protilátka na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu (tu ďalej niekedy nazývaný ako monoklonálna protilátka podľa predloženého vynálezu) sa môže používať na testovanie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu. Navyše receptorový proteín alebo podobná

zlúčenina podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže detekovať tiež pomocou vyfarbovania tkanív. Pre tieto účely sa môže použiť tiež molekula protilátky ako taká alebo $F(ab')_2$, Fab' alebo Fab frakcia molekuly protilátky. Neexistuje žiadne zvláštne obmedzenie spôsobu testovania používajúceho protilátku na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu; je možné použiť akýkoľvek spôsob, pokiaľ sa týka spôsobu, v ktorom sa môže množstvo protilátky, antigénu alebo komplexu protilátka-antigén detekovať chemickými alebo fyzikálnymi prostriedkami, pričom závisí na/alebo zodpovedá množstvu antigénu (napr. množstvo receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu) v testovanej kvapalnej vzorke, ktorá sa má testovať. Potom sa vypočíta použitím štandardnej krivky pripravenej štandardným roztokom, ktorý obsahuje známe množstvá antigénu. S výhodou sa používa napríklad nefrometria, kompetitívny spôsob, imunometrický spôsob a sendvičový spôsob; v pojmoch citlivosti a špecifčnosti je zvlášť výhodný sendvičový spôsob, ktorý sa bude opisovať neskôr.

Príklady značiaceho činidla používaného v spôsobe testovania použitím značiacej látky sú rádioizotopy, enzýmy, fluorescenčné látky, luminiscenčné látky atď. Príklady rádioizotopov sú $[^3H]$, $[^{125}I]$, $[^{131}I]$, $[^{13}C]$ atď. Výhodnými príkladmi enzýmov sú tie enzýmy, ktoré sú stabilné a ktoré majú vysokú špecifickú aktivitu, medzi ktoré patria β galaktozidáza, β -glukozidáza, alkalická fosfatáza, peroxidáza a jablčnanová dehydrogenáza. Príklady fluorescenčnej látky sú fluoreskamin, izotiokyanát fluoresceínu atď. Príklady luminiscenčných látok sú luminol, luminolový derivát, luciferin, lucigenin atď. Ďalej sa môže na naviazanie protilátky alebo antigénu na značiace činidlo použiť tiež biotín-avidínový systém.

Pri imobilizácii antigénov alebo protilátok sa môže použiť fyzikálna adsorpcia. Rovnako sa môže použiť tiež chemická väzba, ktorá sa konvenčne používa na imobilizáciu proteínov alebo enzýmov. Medzi príklady nosiča patria nerozpustné polysacharidy, ako sú agaróza, dextrán a celulóza, syntetické živice, ako je polystyrén, polyakrylamid a silikón, sklo atď.

Pri sendvičovom spôsobe sa testovaná kvapalná vzorka nechá zreagovať s imobilizovanou monoklonálnou protilátkou podľa predloženého vynálezu (prvá reakcia), potom sa nechá zreagovať so značenou monoklonálnou protilátkou podľa predloženého vynálezu (druhá reakcia) a testuje sa aktivita značiaceho činidla na nerozpustnom nosiči, pričom sa stanoví množstvo receptorového proteínu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu v testovanej kvapalnej vzorke. Prvá a druhá reakcia sa môžu uskutočňovať v opačnom poradí, súčasne alebo postupne s časovým intervalom. Typ značiaceho činidla a spôsob imobilizácie môžu byť rovnaké ako sú tie, ktoré sa opisovali vyššie.

Pri imunoteste sendvičovým spôsobom nie je vždy nevyhnutné, aby protilátka, ktorá sa použila pre značenú protilátku a pre pevnú fázu musela byť jedného typu alebo jedného druhu, ale kvôli zlepšeniu citlivosti merania atď. je možné použiť zmes dvoch alebo viacej protilátok.

Pri spôsobe testovania receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu sendvičovým spôsobom podľa predloženého vynálezu výhodné monoklonálne protilátky podľa predloženého vynálezu, ktoré sa použili pre prvú a druhú reakciu sú protilátky, ktorých väzbové miesta na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu sú navzájom rôzne. Protilátky, ktoré sa použili v prvej a druhej reakcii sú teda tie protilátky, v ktorých protilátka, ktorá sa použila v druhej reakcii rozoznáva C-koncovú oblasť receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny, protilátka rozoznávajúca iné miesto než sú C-koncové oblasti, napr. rozoznávajúca N-koncovú oblasť, sa s výhodou používa v prvej reakcii.

Monoklonálna protilátka na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže použiť v inom testovacom systéme ako je sendvičový spôsob, ako je kompetitívny spôsob, imunometrický spôsob a nefrometria. Pri kompetitívnom spôsobe sa antigén v testovanom roztoku a značený antigén nechajú kompetitívne zreagovať s protilátkou, potom sa nezreagovaný značený

antigén (F) a značený antigén nadviazaný na protilátku (B) oddelí (t. j. rozdelenie B/F) a zmeria sa značené množstvo buď B alebo F, aby sa stanovilo množstvo antigénu v testovanom roztoku. Pri reakciách tohto spôsobu existuje spôsob kvapalnej fázy, pri ktorom sa ako protilátka používa rozpustná protilátka a rozdelenie B/F sa uskutoňuje polyetylén glykolom, pričom sa používa druhá protilátka na protilátku, a spôsob pevnej fázy, v ktorom sa imobilizovaná protilátka používa ako prvá protilátka alebo sa rozpustná protilátka použije ako prvá protilátka a imobilizovaná protilátka sa používa ako druhá protilátka.

Pri imunometrickom spôsobe sa antigén v testovanom roztoku a imobilizovaný antigén nechajú kompetitívne zreagovať s daným množstvom značenej protilátky a nasleduje oddelenie pevnej fázy od kvapalnej fázy; alebo sa nechá zreagovať antigén v testovanom roztoku a nadbytočné množstvo značenej protilátky, potom sa pridá imobilizovaný antigén, aby sa nadviazala nezreagovaná protilátka na pevnú fázu a pevná fáza sa oddelí od kvapalnej fázy. Potom sa zmeria značené množstvo akejkoľvek fázy, aby sa stanovilo množstvo antigénu v testovanom roztoku.

Pri nefrometrii sa meria množstvo nerozpustného sedimentu, ktorý sa vyrobí ako výsledok reakcie antigén-antigén v géli alebo v roztoku. I keď je množstvo antigénu v testovanom roztoku malé a získa sa iba malé množstvo sedimentu, vhodne sa môže použiť laserová nefrometria používajúca laserový rozptyl.

Pri aplikovaní každého z týchto imunotestov na spôsob testovania podľa predloženého vynálezu sa nevyžadujú žiadne zvláštne podmienky alebo pracovné postupy. Testovací systém pre receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu môže sa skonštruovať vedľa podmienok alebo pracovných postupov konvenčne používaných pre každý z týchto spôsobov, pričom sa vezmú do úvahy technické úvahy zručného odborníka z oblasti techniky. Pre podrobnosti takýchto konvenčných technických prostriedkov je možné odkázať na rozmanité súhrnné články, knihy a odkazy atď. (napríklad Hiroshi Irie (red.): „Radioimmunoassay“

(publikované Kodansha, 1974), Hiroshi Irie (red.): „*Radioimmunoassay; Second Series*“ (publikované Kodansha, 1979); Eiji Ishikawa a spol. (red.): „*Enzyme Immunoassay*“ (publikované Igaku Shoin, 1978); Eiji Ishikawa a spol. (red.): „*Enzyme Immunoassay*“ (druhé vydanie) (publikované Igaku Shoin, 1982); Eiji Ishikawa a spol. (red.): „*Enzyme Immunoassay*“ (tretie vydanie) (publikované Igaku Shoin, 1987); „*Methods in Enzymology*“, diel 70 (Immunochemical Techniques (časť A)); tamtiež, diel 73 (Immunochemical Techniques (časť B)); tamtiež, diel 74 (Immunochemical Techniques (časť C)); tamtiež, diel 84 (Immunochemical Techniques (časť D: Selected Immunoassays)); tamtiež, diel 92 (Immunochemical Techniques (časť E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)); tamtiež diel 121 (Immunochemical Techniques (časť I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (publikované Academic Press) atď.).

Ako sa opisovalo hore, receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže kvantitatívne stanoviť s vysokou citlivosťou použitím protilátky podľa predloženého vynálezu.

Ďalej potom receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže kvantitatívne stanoviť s vysokou citlivosťou použitím protilátky podľa predloženého vynálezu tak, že diagnostikuje rôzne ochorenia súvisiace s dysfunkciou receptorového proteínu podľa predloženého vynálezu.

Protilátka na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu sa môže používať na špecifické detekovanie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu, ktoré môžu byť prítomné v roztoku testovanej vzorky, ako je telesná kvapalina, tkanivo atď. Protilátka sa môže tiež použiť na prípravu kolóny s protilátkou na vyčistenie receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu alebo ligandového peptidu podľa

predloženého vynálezu, detekciu receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu vo frakciách po vyčistení a analýze chovania na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu v bunkách, ktoré sa skúmajú.

- 8) Neutralizácia protilátkou na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu

Aktivita protilátky na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid podľa predloženého vynálezu, ktorá neutralizuje receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu alebo ligandový peptid predstavuje aktivitu deaktivovania funkcie signálnej transdukcie, ktorej sa zúčastňuje receptorový proteín alebo podobná zlúčenina alebo ligandový peptid. Preto ak má protilátka neutralizujúcu aktivitu, môže táto protilátka deaktivovať signálnu transdukciiu, ktorej sa zúčastňuje receptorový proteín alebo podobná zlúčenina alebo ligandový peptid, napríklad aktivity stimulujúce bunky sprostredkované receptorovým proteínom (napr. aktivít, ktoré podporujú alebo potláčajú uvoľňovanie arachidonovej kyseliny, uvoľňovanie acetylcholínu, uvoľňovanie intracelulárneho Ca^{2+} , produkciu intracelulárneho cAMP, produkciu intracelulárneho cGMP, produkciu inositolfosfátu, zmeny membránového potenciálu bunky, fosforyláciu intracelulárnych proteínov, aktiváciu c-fos a zníženie pH). Protilátka sa teda môže používať na prevenciu a/alebo liečenie ochorení spôsobených nadexpresiou proteínu alebo ligandového peptidu.

- 9) Príprava živočíchov obsahujúcich DNA, ktorá kóduje receptorový proteín podľa predloženého vynálezu

Použitím DNA podľa predloženého vynálezu sa môžu pripraviť transgénne živočíchy, ktoré exprimujú receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu. Príklady týchto živočíchov, ktoré sa môžu použiť, sú

cicavci (napr. krysa, myš, králik, ovca, prasa, hovädzí dobytok, mačka, pes, opica atď.). Zvlášť výhodnými sú myši a králiky.

Na prenos DNA podľa predloženého vynálezu do cieľového živočícha sa všeobecne s výhodou použije DNA v génovej konštrukcii ligovanej v smere vlákna promótoru schopného exprimovať DNA v živočíšnej bunke. Napríklad, ak DNA pochádzajúca z králika podľa predloženého vynálezu sa prenáša napríklad génovou konštrukciou, v ktorej sa DNA liguje v smere vlákna promótoru, ktorý môže exprimovať DNA podľa predloženého vynálezu pochádzajúcu zo živočícha, ktorá je vysoko homologná s DNA podľa predloženého vynálezu, mikroinjekčne sa podá do králičieho oplodneného vajíčka. Môže sa teda pripraviť živočích s prenesenou DNA, ktorý je schopný produkovať vysokú hladinu receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu. Príklady promótoru, ktoré sa môžu použiť, sú promótor odvodený od víru a všadeprítomný expresný promótor, ako je metalotionein, ale s výhodou sa používajú NGF génový promótor a enolasový génový promótor, ktoré sa špecificky exprimujú v mozgu.

Prenos DNA podľa predloženého vynálezu v štádiu oplodnenej bunky vajíčka zabezpečuje prítomnosť DNA vo všetkých zárodkových a somatických bunkách u cieľového živočícha. Prítomnosť receptorového proteínu alebo podobnej zlúčeniny podľa predloženého vynálezu v zárodkových bunkách v živočíchovi s prenesenou DNA znamená, že všetky zárodkové a somatické bunky obsahujú receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu pri všetkých potomkoch tohto živočícha. Potomkovia tohto živočícha, ktorí preberajú gén, obsahujú receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu vo všetkých zárodkových a somatických bunkách.

Transgenný živočích, do ktorého sa DNA podľa predloženého vynálezu prenesie, môže sa podrobiť spáreniu a rozmnoženiu na generácie za zvyčajných podmienok množenia ako živočích nesúci DNA, po potvrdení, že sa gén môže stabilne zachovať. Navyše, samčí a samičí živočíchovia, ktorí majú požadovanú DNA, sa spária tak, že poskytujú homozygota, ktorý má transdukovaný gén v oboch homológnych chromozómoch a potom sa samčí a samičí živočíchovia

spária tak, že je možné takto množením vytvoriť generácie, ktorých potomkovia obsahujú túto DNA.

Transgenný živočích, do ktorého sa preniesie DNA podľa predloženého vynálezu, je užitočný ako živočích na testovanie agonistu alebo antagonistu na receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, pretože receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu sa hojne exprimuje.

Transgenný živočích, do ktorého sa preniesie DNA podľa predloženého vynálezu, môže sa použiť tiež ako bunkový zdroj pre tkanivovú kultúru. Receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu sa môže analyzovať napríklad priamou analýzou DNA alebo RNA v tkanivách myši s prenesenou DNA podľa predloženého vynálezu alebo analyzovaním tkanív obsahujúcich receptorový proteín exprimovaný z génu. Bunky z tkanív, ktoré obsahujú receptorový proteín alebo podobnú zlúčeninu podľa predloženého vynálezu, sa kultivujú technikou štandardnej tkanivovej kultúry. Použitím týchto buniek je možné študovať funkciu buniek z tkanív, ktoré je zvyčajne obtiažne kultivovať, napríklad buniek pochádzajúcich z mozgu a periférnych tkanív. Použitím týchto buniek je možné vybrať také farmaceutické činidlá, ktoré napríklad zvyšujú funkcie rôznych tkanív. Keď je dostupná bunková línia s vysokou expresiou, môže sa z tejto bunkovej línie izolovať a vyčistiť receptorový proteín alebo podobná zlúčenina podľa predloženého vynálezu.

V opise a obrázkoch sa uvádzajú kódy nukleotidov a aminokyselín v zhode s IUPAC-IUB komisiou pre biochemickú nomenklatúru zvyčajnými kódmi z oblasti techniky, ktorých príklady sa uvádzajú nižšie. Pri aminokyselinách, ktoré môžu mať optický izomér, je prítomná L forma, pokiaľ sa neuvádza ináč.

DNA: deoxyribonukleová kyselina

cDNA: komplementárna deoxyribonukleová kyselina

A:	adenín
T:	tymín
G:	guanín
C:	cytozín
RNA:	ribonukleová kyselina
mRNA:	mesengerová ribonukleová kyselina
dATP:	deoxyadenozín-trifosfát
dTTP:	deoxytymidín-trifosfát
dGTP:	deoxyguanozín-trifosfát
dCTP:	deoxycytidín-trifosfát
ATP:	adenozín-trifosfát
EDTA:	kyselina etyléndiamintetraoctová
SDS:	dodecylsulfát sodný
Gly:	glycín
Ala:	alanín
Val:	valín
Leu:	leucín
Ile:	izoleucín
Ser:	serín
Thr:	treonín
Cys:	cysteín
Met:	metionín
Glu:	kyselina glutamová
Asp:	kyselina aspartová
Lys:	lyzín
Arg:	arginín
His:	histidín
Phe:	fenylalanín
Tyr:	tyrozín
Trp:	tryptofán
Pro:	prolín
Asn:	Asparagín

Gln:	glutamin
pGlu:	pyroglutamová kyselina
Me:	metylová skupina
Et:	etylová skupina
Bu:	butylová skupina
Ph:	fenylová skupina
TC:	tiazolidín-4(R)-karboxamidová skupina

Substituenty, chrániace skupiny a reakčné činidlá zvyčajne používané v tomto spise sa označujú nižšie uvedenými kódmi.

Tos:	p-toluénsulfonyl
CHO:	formyl
Bzl:	benzyl
Cl ₂ Bzl:	2,6-dichlórbenzyl
Bom:	benzyloxymetyl
Z:	benzyloxykarbonyl
Cl-Z:	2-chlórbenzyloxykarbonyl
Br-Z:	2-brómbenzyloxykarbonyl
Boc:	terc.butoxykarbonyl
DNP:	dinitrofenol
Trt:	trityl
Bum:	terc.butoxymetyl
Fmoc:	N-9-fluórfenylmetoxykarbonyl
HOBt:	1-hydroxybenztriazol
HOObt:	3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazín
HONB:	1-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximid
DCC:	N,N'-dichlórhexylkarbodiimid
BHA:	benzhydrlamin
MeBzl:	4-metylbenzyl
OcHex:	cyklohexylester

NMP: N-metylpyrolidón
TFA: trifluóroctová kyselina

Čísla identifikujúce sekvencie (sekv. id. č.) v zozname sekvencií tohto spisu znamenajú nasledujúce sekvencie.

Sekv. id. č. 1

Aminokyselinová sekvencia receptorového proteínu spojeného s G proteínom rOT7T175 podľa predloženého vynálezu pochádzajúceho z krysieho malého mozgu.

Sekv. id. č. 2

Nukleotidová sekvencia cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom rOT7T175 podľa predloženého vynálezu z krysieho malého mozgu obsahujúca aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 1.

Sekv. id. č. 3

Nukleotidová sekvencia priméru 1, ktorá sa použila na klonovanie cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom rOT7T175 podľa predloženého vynálezu z krysieho malého mozgu.

Sekv. id. č. 4

Nukleotidová sekvencia priméru 2, ktorá sa použila na klonovanie cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom hOT7T175 podľa predloženého vynálezu z krysieho malého mozgu.

Sekv. id. č. 5

Aminokyselinová sekvencia receptorového proteínu spojeného s G proteínom hOT7T175 podľa predloženého vynálezu z ľudského mozgu.

Sekv. id. č. 6

Nukleotidová sekvencia cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom hOT7T175 podľa predloženého vynálezu z ľudského mozgu

obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 5.

Sekv. id. č. 7

Nukleotidová sekvencia sondy, ktorá sa použila na klonovanie cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom hOT7T175 podľa predloženého vynálezu z ľudského mozgu.

Sekv. id. č. 8

Nukleotidová sekvencia priméru 1, ktorý sa použil na klonovanie cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom hOT7T175 podľa predloženého vynálezu z ľudského mozgu.

Sekv. id. č. 9

Nukleotidová sekvencia priméru 2, ktorý sa použil na klonovanie cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom hOT7T175 podľa predloženého vynálezu z ľudského mozgu.

Sekv. id. č. 10

Aminokyselinová sekvencia peptidu (1 až 54), ktorá sa opísala v príklade 3.

Sekv. id. č. 11

Aminokyselinová sekvencia peptidu (40 až 54), ktorá sa opísala v príklade 3.

Sekv. id. č. 12

Aminokyselinová sekvencia peptidu (45 až 54), ktorá sa opísala v príklade 3.

Sekv. id. č. 13

Aminokyselinová sekvencia peptidu (46 až 54), ktorá sa opísala v príklade 3.

Sekv. id. č. 14

Aminokyselinová sekvencia peptidu (47 až 54), ktorá sa opísala v príklade 3.

Sekv. id. č. 15

Nukleotidová sekvencia DNA kódujúca aminokyselinovú sekvenciu uvedená ako sekvencia sekv. id. č. 10.

Sekv. id. č. 16

Nukleotidová sekvencia DNA kódujúca aminokyselinovú sekvenciu uvedená ako sekvencia sekv. id. č. 11

Sekv. id. č. 17

Nukleotidová sekvencia DNA kódujúca aminokyselinovú sekvenciu uvedená ako sekvencia sekv. id. č. 12.

Sekv. id. č. 18

Nukleotidová sekvencia DNA kódujúca aminokyselinovú sekvenciu uvedená ako sekvencia sekv. id. č. 13.

Sekv. id. č. 19

Nukleotidová sekvencia DNA kódujúca aminokyselinovú sekvenciu uvedená ako sekvencia sekv. id. č. 14.

Sekv. id. č. 20

Aminokyselinová sekvencia produktu KiSS-1, ktorá sa opisuje v príklade 3.

Sekv. id. č. 21

Aminokyselinová sekvencia peptidu (48 až 54), ktorá sa opisuje v príklade 3.

Sekv. id. č. 22

Nukleotidová sekvencia DNA kódujúca aminokyselinovú sekvenciu uvedená ako sekvencia sekv. id. č. 21.

Escherichia coli transformant DG10B/pAK-rOT175, ktorý sa získal v nižšie opísanom príklade 1 sa uložil na Ministerstve pre medzinárodný obchod a priemysel, Agentúry pre priemyselnú vedu a technológiu, Národného ústavu pre biovedy a ľudskú technológiu (Ministry of International Trade and Industry, Agency for Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBNH) pod prístupovým číslom FERM BP-6553 21. októbra 1998 a v Ústave pre fermentáciu, Osaka (Institute for Fermentation, Osaka; IFO) pod prístupovým číslom IFO 16 209 1. októbra 1998.

Escherichia coli transformant DG10B/pCMV-hOT175, ktorý sa získal v nižšie opísanom príklade 2 sa uložil na Ministerstve pre medzinárodný obchod a priemysel, Agentúry pre priemyselnú vedu a technológiu, Národného ústavu pre biovedy a ľudskú technológiu (Ministry of International Trade and Industry, Agency for Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBNH) pod prístupovým číslom FERM BP-6648 21. februára 1999 a v Ústave pre fermentáciu, Osaka (Institute for Fermentation, Osaka; IFO) pod prístupovým číslom IFO 16 258 9. februára 1999.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Predložený vynález sa nižšie podrobne opisuje pomocou príkladov, ale bez úmyslu obmedziť na ne rozsah predloženého vynálezu. Spôsoby génovej manipulácie používajúce *Escherichia coli* sa uskutočňovali podľa spôsobov opísaných v Molekulovom klonovaní.

Príklad 1

Klonovanie cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom pochádzajúceho z krysieho malého mozgu a stanovenie nukleotidovej sekvencie

Použitím cDNA krysieho malého mozgu ako templátu a dvoch primérov, konkrétne priméru 1 (sekv. id. č. 3) a priméru 2 (sekv. id. č. 4) sa uskutoční PCR.

Reakčný roztok v hore uvedenej reakcii pozostával z 1/10 objemu cDNA pre templát, 1/50 objemu zmesi Advantage cDNA Polymerázy Mix (Clontec Inc.), 0,2 μ M priméru 1 (sekv. id. č. 3), 0,2 μ M priméru 2 (sekv. id. č. 4), 200 μ M dNTP a tlmivého roztoku, ktorý sa pridal k enzýmu tak, aby konečný objem bol 50 μ M. Pri PCR reakcii 1) reakčný roztok sa zohrieva 2 minúty na 94 °C, 2) cyklus zohrievania na 94 °C počas 30 sekúnd s nasledujúcimi 2 minútami pri 72 °C sa trikrát zopakuje, 3) cyklus zohrievania na 94 °C počas 30 sekúnd s nasledujúcimi 2 minútami pri 68 °C sa trikrát zopakuje, 4) cyklus zohrievania na 94 °C počas 30 sekúnd s nasledujúcimi 30 sekundami pri 64 °C a 2 minútami pri 68 °C sa zopakuje tridsaťkrát a 5) konečne sa uskutoční predlžovacia reakcia 8 minút pri 68 °C. Po skončení PCR reakcie sa produkt subklonuje do plazmidového vektora pCR2.1 (Invitrogen Inc.) podľa inštrukcií pripojených k zostave TA cloning kit (Invitrogen Inc.), ktorý sa potom zavedie do *Escherichia coli* DH5 α a uskutoční sa selekcia klonov obsahujúcich cDNA na LB agarových platniach obsahujúcich ampicilín. Sekvencia každého klonu sa analyzuje na získanie cDNA sekvencie (sekv. id. č. 2) kódujúca nový receptorový proteín spojený s G proteínom. Nový receptorový proteín spojený s G proteínom obsahujúci aminokyselinocú sekvenciu (sekv. id. č. 1) odvodenú od cDNA sa označil rOT7T175.

Plazmid pAK-rOT7T175, v ktorom sa subklonovala cDNA (sekv. id. č. 2) kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom rOT7T175 podľa predloženého vynálezu z krysieho malého mozgu sa zaviedol do *Escherichia coli* DH10B podľa všeobecne známeho spôsobu. Získal sa transformant *Escherichia coli* DH10B/pAK-rOT175.

Príklad 2

Klonovanie cDNA kódujúca receptorový proteín spojený s G proteínom pochádzajúceho z ľudského mozgu a stanovenie nukleotidovej sekvencie

Klonovanie cDNA sa uskutočnilo podľa protokolu GENE TRAPPER (Life Technologies, Inc.). Po biotinyllácii sondy (sekv. id. č. 7) sa sonda hybridizovala jednovláknovou ľudskou mozgovou cDNA knižnicou (Superscript cDNA Library,

Life Technologies, Inc.). Takto získaný jednovláknový gén sa premenil na dvojvlákno použitím priméru 1 (sekv. id. č. 8). Potom, čo sa tento gén zaviedol elektroporáciou do *Escherichia coli* DH10B, sa tento gén nechal rásť na selekčnej platni doplnenej o ampicilín, aby sa získali transformanty. Elektroporácia sa uskutočnila pri napätí 1,8 kV použitím zariadenia E. coli pulser (BIORAD, Inc.). Takto získané transformanty sa podrobili selekcii kolóniou PCR použitím sondy (sekv. id. č. 7) a priméru 2 (sekv. id. č. 9). Získal sa transformant *E. coli* DH10B/pCMF-hOT175. Nový receptorový proteín spojený s G proteínom obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu (sekv. id. č. 5) odvodený od cDNA sa označil hOT7T175. Pri PCR kolónii reakčný roztok pozostával z 1/50 objemu zmesi Advantage cDNA Polymerázy Mix (Clontec Inc.), 0,2 µM priméru 1 sekv. id. č. 7), 0,2 µM priméru 2 (sekv. id. č. 9), 200 µM dNTP, 1/25 objemu DMSO a tlmivého roztoku pridaného k enzýmu tak, aby bol konečný objem 10 µl. Pri PCR reakcii 1) reakčný roztok sa zohrieva 10 minút na 94 °C a 2) cyklus zohrievania na 94 °C počas 10 sekúnd s nasledujúcimi 10 sekundami pri 60 °C a 1 minútu pri 68 °C sa zopakuje dvadsaťpäť-krát. Po skončení PCR reakcie sa produkt subklonuje do plazmidového vektora pCR2.1 (Invitrogen Inc.) podľa inštrukcií pripojených k zostave TA cloning kit (Invitrogen Inc.), ktorý sa potom zavedie do *Escheria coli* DH10B. Potom sa uskutoční selekcia klonov obsahujúcich cDNA na LB agarovom médiu obsahujúcom ampicilín. Sekvencia každého klonu sa analyzuje na získanie cDNA sekvencie (sekv. id. č. 6) kódujúcu nový receptorový proteín spojený s G proteínom. Nový receptorový proteín spojený s G proteínom obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu (sekv. id. č. 5) odvodený od cDNA sa označil hOT175.

Príklad 3

Testovanie peptidu aktivujúceho rOT175 (osirotený receptor)

1-1 Syntéza peptidu

Peptid, ktorý má sekvenciu (sekv. id. č. 10) 54 aminokyselinových zvyškov od 68 (Gly) do 121 (Phe) v produkte génu potláčajúceho metastázy rakoviny

(KiSS-1), nájdený v génovej databáze sa môže syntetizovať nasledujúcim spôsobom (pričom peptid sa tu ďalej označuje ako peptid (1 až 54).

Navyše sa nasledujúcim postupom syntetizovali C-koncové peptidy peptidu (1 až 54) (sekv. id. č. 10), konkrétne peptid (40 až 54) (sekv. id. č. 11), peptid (45 až 54) (sekv. id. č. 12), peptid (46 až 54) (sekv. id. č. 13), peptid (47 až 54) (sekv. id. č. 14), a peptid (48 až 54) (sekv. id. č. 21).

1) Príprava peptidu (40 až 54)

Komerčne dostupná živica p-metyl-BHA (0,77 mmólu/g živice) sa naplnila do reakčnej nádrže syntetizátora peptidov ABI 430A. Potom sa do živice v tomto poradí podľa Boc-stratégie (NMP-HOBt) syntézy peptidov zaviedli Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO), Boc-Asn, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Aso(OcHex) a Boc-Lys(Cl-Z), aby sa získala požadovaná chránená peptidová živica. Táto živica, 0,12 g, sa miešala 60 minút pri 0 °C v 10 ml bezvodého fluorovodíka, ktorý obsahoval 1 ml p-krezolu a 1,2 ml 1,4-butándiolu. Potom sa fluorovodík vákuovo oddestiloval. K zvyšku sa pridal dietyléter a zrazenina sa odfiltrovala. K zrazenine sa po extrakcii pridal 50% vodný roztok kyseliny octovej a nerozpustné materiály sa odstránili. Keď sa extrakt dostatočne skoncentroval, koncentrát sa naniesol na kolónu (2,0 krát 80 cm) so Sephadexom (obchodný názov) G-25 naplnenou 50% vodným roztokom kyseliny octovej. Nasledovalo vyvíjanie rovnakým rozpúšťadlom. Hlavné frakcie sa spojili a lyofilizovali. Získa sa 40 mg bielych práškov. Polovica objemu týchto práškov sa naniesla na chromatografickú kolónu s obrátenými fázami (2,6 krát 60 cm) naplnenú LiChroprepom (obchodný názov) RP-18 s nasledujúcim premytím 200 ml vody, ktorá obsahuje 0,1% TFA. Potom sa uskutočnila elúcia lineárnym hustotným gradientom s 300 ml 0,1% TFA a 300 ml 0,1% TFA obsahujúcim 33 % acetonitrilu. Hlavné frakcie sa spojili a lyofilizovali. Získa sa tak 4,1 mg požadovaného peptidu. Hmotnostné spektrum (M+H)⁺ 1869,9 (vypočítané 1969,9). Elučná doba na HPLC: 18,6 minúty. Podmienky na kolóne: kolóna: Wakosil 5C18T, 4,6 krát 100 mm, eluent: elúcia lineárnym hustotným

gradientom s eluentami A/B od 95/5 do 45/55 s použitím vodnej 0,1% TFA ako eluentu A a acetonitrilu obsahujúceho 0,1% TFA (25 minút). Prietok: 1,0 ml/min.

2) Príprava peptidu (45 až 54)

Komerčne dostupná živica p-metyl-BHA (0,77 mmólu/g živice) sa naplnila do reakčnej nádrže syntetizátora peptidov ABI 430A. Potom sa do živice v tomto poradí podľa Boc-stratégie (NMP-HOBt) syntézy peptidov zaviedli Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO), Boc-Asn a Boc-Tyr(Br-Z), aby sa získala požadovaná chránená peptidová živica. Táto živica, 0,11 g, sa spracovala podobným spôsobom ako v hore uvedenom spôsobe ad 1) na odstraňovanie chrániacich skupín. Získa sa tak 2,2 mg požadovaného peptidu. Hmotnostné spektrum $(M+H)^+$ 1302,5 (vypočítané 1302,6). Elučná doba na HPLC: 18,7 minúty. Podmienky na kolóne: kolóna: Wakosil 5C18T, 4,6 krát 100 mm, eluent: elúcia lineárnym hustotným gradientom s eluentami A/B od 95/5 do 45/55 s použitím vodnej 0,1% TFA ako eluentu A a acetonitrilu obsahujúceho 0,1% TFA (25 minút). Prietok: 1,0 ml/min.

3) Príprava peptidu (46 až 54)

Komerčne dostupná živica p-metyl-BHA (0,77 mmólu/g živice) sa naplnila do reakčnej nádrže syntetizátora peptidov ABI 430A. Potom sa do živice v tomto poradí podľa Boc-stratégie (NMP-HOBt) syntézy peptidov zaviedli Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO) a Boc-Asn, aby sa získala požadovaná chránená peptidová živica. Táto živica, 0,11 g, sa spracovala podobným spôsobom ako v hore uvedenom spôsobe ad 1) na odstraňovanie chrániacich skupín. Získa sa tak 3,4 mg požadovaného peptidu. Hmotnostné spektrum $(M+H)^+$ 1139,6 (vypočítané 1139,6). Elučná doba na HPLC: 18,1 minúty. Podmienky na kolóne: kolóna: Wakosil 5C18T, 4,6 krát 100 mm, eluent: elúcia lineárnym hustotným gradientom s eluentami A/B od 95/5 do 45/55 s použitím vodnej 0,1% TFA ako eluentu A a acetonitrilu obsahujúceho 0,1% TFA (25 minút). Prietok: 1,0 ml/min.

4) Príprava peptidu (47 až 54)

Komerčne dostupná živica p-metyl-BHA (0,77 mmólu/g živice) sa naplnila do reakčnej nádrže syntetizátora peptidov ABI 430A. Potom sa do živice v tomto poradí podľa Boc-stratégie (NMP-HOBt) syntézy peptidov zaviedli Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn a Boc-Trp(CHO), aby sa získala požadovaná chránená peptidová živica. Táto živica, 0,12 g, sa spracovala podobným spôsobom ako v hore uvedenom spôsobe ad 1) na odstránenie chrániacich skupín. Získa sa tak 13,0 mg požadovaného peptidu. Hmotnostné spektrum $(M+H)^+$ 1025,5 (vypočítané 1025,5). Elučná doba na HPLC: 17,6 minúty. Podmienky na kolóne: kolóna: Wakosil 5C18T, 4,6 krát 100 mm, eluent: elúcia lineárnym hustotným gradientom s eluentami A/B od 95/5 do 45/55 s použitím vodnej 0,1% TFA ako eluentu A a acetonitrilu obsahujúceho 0,1% TFA (25 minút). Prietok: 1,0 ml/min.

5) Príprava peptidu (48 až 54)

Komerčne dostupná živica p-metyl-BHA (0,77 mmólu/g živice) sa naplnila do reakčnej nádrže syntetizátora peptidov ABI 430A. Potom sa do živice v tomto poradí podľa Boc-stratégie (NMP-HOBt) syntézy peptidov zaviedli Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl) a Boc-Asn, aby sa získala požadovaná chránená peptidová živica. Táto živica, 0,16 g, sa miešala v 10 ml bezvodého fluorovodíka spolu s 1 ml p-krezolu 60 minút pri 0 °C. Reakčná zmes sa potom spracovala podobným spôsobom ako v hore uvedenom spôsobe ad 1). Získa sa tak 29,0 mg požadovaného peptidu. Hmotnostné spektrum $(M+H)^+$ 839,5 (vypočítané 839,5). Elučná doba na HPLC: 15,6 minúty. Podmienky na kolóne: kolóna: Wakosil 5C18T, 4,6 krát 100 mm, eluent: elúcia lineárnym hustotným gradientom s eluentami A/B od 95/5 do 45/55 s použitím vodnej 0,1% TFA ako eluentu A a acetonitrilu obsahujúceho 0,1% TFA (25 minút). Prietok: 1,0 ml/min.

6) Príprava peptidu (1 až 54)

Peptid (1 až 54) sa môže pripraviť tak, že sa komerčne dostupná živica p-metyl-BHA (0,77 mmólu/g živice) naplní do reakčnej nádrže syntetizátora peptidov ABI 430A. Potom sa v nasledujúcom poradí zavedú: Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(CHO), Boc-Asn, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asp(OcHex), Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Glu(OcHex), Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Val, Boc-Leu, Boc-Val, Boc-Ala, Boc-Gly, Boc-Gln, Boc-Pro, Boc-Ala, Boc-Pro, Boc-Ile, Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl), Boc-His(Bom), Boc-Pro, Boc-Ala, Boc-Ser(Bzl), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Pro, Boc-Gln, Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl), Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Bzl), Boc-Glu(OcHex), Boc-Pro, Boc-Pro, Boc-Pro, Boc-Ser(Bzl), Boc-Leu, Boc-Ser(Bzol), Boc-Thr(Bzl) a Boc-Gly, aby sa získala požadovaná chránená peptidová živica. Potom sa z chránenej peptidovej živice odstráni chrániaca skupina rovnako ako v ad 1) hore uvedeného spôsobu výroby peptidu (40 až 54).

1-2) Meranie aktivity zvyšujúcej koncentráciu intracelulárneho Ca iónu použitím FLIPR

Stabilná expresná bunková línia rOT7T175 sa získala transdukciou expresného plazmidu pAK-rOT175 pre živočíšnu bunku do bunky CHO/dhfr^r použitím zostavy CellPfect Transfection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.). Najprv sa 240 ml tlmivého roztoku (pripojený k zostave CellPfect Transfection Kit) pridá k 9,6 mg plazmidovej DNA rozpustenej v 240 ml destilovanej vody. Zmes sa potom mieša. Potom, čo sa zmes nechá 10 minút usadzovať, sa k zmesi pridá 480 ml tlmivého roztoku B (pripojený k zostave CellPfect Transfection Kit). Zmes sa intenzívne mieša. Vytvoria sa lipozómy obsahujúce DNA. Potom sa na 60mm Petriho misku naočkuje $4 \cdot 10^5$ buniek CHO/dhfr^r (získané od ATCC). Po kultivovaní buniek v Hamovom F-12 médiu (Nissui Seyaku Co., Ltd.) doplnenom 10%

plodovým hovädzím sérom (Bio Whittaker, Inc.) 2 dni pri 37 °C v 5 % plyného oxidu uhličitého sa k bunkám v Petriho miske prikvapká 480 ml lipozómov. Po 6 hodinách kultivácie buniek pri 37 °C v 5 % plyného oxidu uhličitého sa bunky dvakrát premyjú Hamovým F-12 médiom bez séra. K bunkám v Petriho miske sa pridá 15% glycerol a nasleduje spracovanie počas 2 minút. Bunky sa opäť dvakrát premyjú Hamovým F-12 médiom bez séra. Nasleduje inkubácia v Hamovom F-12 médiu doplnenom 10 % plodového hovädzieho séra v priebehu 15 hodín pri 37 °C v 5 % plyného oxidu uhličitého. Bunky sa dispergujú spracovaním s trypsínom, aby sa izolovali z Petriho misky. Izolované bunky sa naočkujú na dosku so šiestimi jamkami v množstve $1,25 \cdot 10^4$ buniek/jamku a začne sa s inkubáciou počas 15 hodín pri 37 °C v Dullbeccom modifikovanom Eagleho médiu (DMEM) (Nissui Seiyaku Co., Ltd.) obsahujúcom 10 % dialyzovaného plodového hovädzieho séra (JRH Bioscience, Inc.) v 5 % plyného oxidu uhličitého. Plazmidom transdukované transformanty CHO buniek rástli v médiu, ale netransdukované bunky postupne zomreli. Médium sa vymenilo prvý a druhý deň, aby sa odstránili mŕtve bunky. Sledovalo sa približne 20 kolónií transformantov CHO buniek, ktoré si udržali rast ôsmy až desiaty deň po inkubácii. Zo selektovaných buniek sa izolovala DNA použitím komerčne dostupnej zostavy na izoláciu RNA. Aplikovaním všeobecne známeho spôsobu RT-PCR na nasledujúce stupne sa vybral 23. klon rOT7T175 exprimujúci CHO bunky (tu ďalej skracovaný ako rOT7T175-23), ktorý exprimuje receptorový gén rOT7T175 vo vysokej hladine.

Na kontrolu sa použil 24. klon CHO buniek exprimujúci ETA (tu ďalej skracovaný ako ETA24; pozri *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1996, 279, 675 až 685).

Stanovila sa aktivita zvyšujúca koncentráciu intracelulárneho Ca iónu syntetických peptidov získaných v ad 1-1) opísaná hore v rOT7T175-23 a ETA-24 použitím FLIPR (Molecular Devices, Inc.).

Ako rOT7T175-23 tak aj ETA24 bunky sa použili po subkultivovaní týchto buniek v DMEM doplnenom 10 % dialyzovaného plodového hovädzieho séra (tu

ďalej skracovaný ako dFBS). Bunky rOT7T175-23 a ETA24 sa suspendovali v médiu (10% dFBS-DME) v množstve $15 \cdot 10^4$ buniek/ml. Každých 200 μ l ($3,0 \cdot 10^4$ buniek/200 μ l) suspenzie sa naočkovalo na dosku s 96 jamkami pre FLIPR (čierna doska s čírym dnom, Coster, Inc.) dodávacím zariadením. Nasleduje inkubácia cez noc pri 37 °C v inkubátore s 5 % CO₂. Použili sa takto inkubované bunky (tu ďalej označované ako bunky z dosky). Potom sa zmiešalo 21 ml HANKS/HBSS (9,8 g Hankovho média, 0,35 g hydrogénuhličitanu sodného, 20 ml 1M HEPES média; po upravení na pH 7,4 1N hydroxidom sodným sa zmes sterilizovala filtrom, 210 μ l 250mM Probenecidu a 210 μ l plodového hovädzieho séra (FBS) (HANKS/HBSS-Probenecid-FBS). Ďalej sa dve ampulky Fluo-3-AM (50 μ g/ampulku) rozpustia v 42 μ l dimetylsulfoxidu a 42 μ l 20% pluronovej kyseliny. Výsledný roztok sa pridá k 20 ml hore opísaného HANKS/HBSS-Probenecid-FBS a zmes sa premieša. Keď sa odstráni kultivačný roztok, k bunkám z dosky sa pridá 100 μ l tejto zmesi na každú jamku použitím použitím osmistrannej pipety. Nasleduje jednohodinová inkubácia pri 37 °C v inkubátore s 5 % CO₂ (pigmentová náplň). Peptid sa rozpustí v dimetylsulfoxide na koncentráciu $1 \cdot 10^{-3}$ M. K 0,002 ml ($1 \cdot 10^{-3}$ M) tohto peptidového roztoku v dimetylsulfoxide sa po zriedení (konečná koncentrácia $1 \cdot 10^{-5}$ M na test aktivity) pridá 0,066 ml HANK/HBSS obsahujúceho 2,5mM Probenecid a 0,2% BSA. Potom sa po zriedení pridá 0,009 ml dimetylsulfoxidu I 0,001 ml ($1 \cdot 10^{-3}$ M) peptidového roztoku v dimetylsulfoxide. Po dodaní 0,002 ml tohto riedenia sa k systému pre riedenie pridá 0,066 ml HANK/HBSS obsahujúceho 2,5M Probenecid a 0,2% BSA (konečná koncentrácia $1 \cdot 10^{-6}$ M). Podobne sa v riedení pokračuje až na konečnú koncentráciu $1 \cdot 10^{-10}$ M a potom sa toto riedenie preniesie na dosku s 96 jamkami pre FLIPR (doska s dnom v tvare V, Coster, Inc.) (tu ďalej označovaný ako vzorka z dosky). Po skončení pigmentového naplnenia na bunky z dosky sa bunky z dosky štyrikrát premyjú premývacím tlmivým roztokom, ktorý sa získal pridaním 2,5 mM Probenecidu k HANK/HBSS použitím premývača dosiek, aby po premývaní zostalo 100 μ l premývacieho tlmivého roztoku. Bunky z dosiek a vzorka z dosiek sa nastaví do FLIPRu. 0,05 ml vzorky zo vzorky z dosiek sa automaticky preniesie k bunkám z dosiek zariadením FLIPR, aby sa podporila

odpoveď buniek. Zmeny koncentrácie intracelulárneho iónu vápnika sa merali počas 180 sekúnd.

Výsledky ukázali, že peptidy syntetizované v hore opísanej časti 1-1) indukovali zvýšenie koncentrácie intracelulárneho iónu vápnika špecificky pri rOT7T175 exprimujúcich buniek. Z porovnania kriviek závislosti odpovede na dávke (obr. 9) je jasné, že peptid (40 až 54) a peptid (45 až 54) vykazujú najvyššiu aktivitu.

Priemyselná použiteľnosť

Receptorový proteín spojený s G proteínom podľa predloženého vynálezu, jeho čiastočný peptid alebo jeho soli rovnako ako polynukleotid kódujúci to isté (napr. DNA, RNA a ich deriváty) sa môžu použiť: 1) na stanovenie ligandu (ligandového peptidu podľa predloženého vynálezu) (agonista), 2) na prípravu protilátok a antisér pre ne, 3) na konštrukciu expresného systému rekombinantného receptorového proteínu, 4) na vyvinutie testovacieho systému väzby receptora použitím expresného systému a testovaním farmaceutickej zlúčeniny, ktorá prichádza do úvahy, 5) na navrhnutie liečiva na základe porovnania so štruktúrne podobným ligandom-receptorom, 6) ako reakčné činidlo na prípravu sondy alebo PCR priméra v génovej diagnostike, 7) na prípravu transgenných živočíchov alebo 8) ako profylaktické/terapeutické činidlo v génovej terapii.

Výpis sekvencí

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Nový receptorový protein spojený s G proteinem, DNA a jeho ligand

<130> 2562W00P

<150> JP 10-305949

<151> 1998-10-27

<150> JP 11-027710

<151> 1999-02-04

<150> JP 11-057207

<151> 1999-03-04

<150> JP 11-276225

<151> 1999-09-29

<160> 22

<210> 1

<211> 396

<212> PRT

<213> Rat

<400> 1

Met Ala Ala Glu Ala Thr Leu Gly Pro Asn Val Ser Trp Trp Ala Pro

5

10

15

Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Gly

20

25

30

Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe

35

40

45

Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile

50

55

60

Phe Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr

65 70 75 80

Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val

85 90 95

Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Asp

100 105 110

Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala

115 120 125

Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr

130

Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu

145 150 155 160

Thr Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro

165

Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser

180 185 190

Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn

195

Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr

210 215 220

Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro

225 230 235 240

Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala

245

Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe

260 265 270

Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu

275

280

285

Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu

290

295

300

Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro

305

310

315

320

Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg

325

330

335

Val Cys Pro Cys Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala

340

345

350

His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala

355

360

365

His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg

370

375

380

Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu

385

390

395 396

<210> 2

<211> 1191

<212> DNA

<213> Rat

<400> 2

ATGCGCCGAG AGCGGACGTT GGGTCCGAAC GTGAGCTGGT GGGCTCCGTC CAACGCTTCG 60

GGATGCCCCG GCTGCGGTGT CAATGCCTCG GATGGCCCAG GCTCCGCGCC AAGGCCCTG 120

GATGCCTGGC TGGTGGCCCT GTTTTTCGCT GCCCTAATGT TGCTGGGGCT AGTCGGGAAC 180

TCACTGGTCA TCTTCGTTAT CTGCCGCCAC AAGCACATGC AGACCGTCAC CAATTTCTAC 240

ATCGCTAACC TGGCGGCCAC AGATGTCACT TTCCTTCTGT GCTGCGTACC CTTACCGCG 300

CTCCTCTATC CGCTGCCCAC CTGGGTGCTG GGAGACTTCA TGTGCAAATT CGTCAACTAC 360
 ATCCAGCAGG TCTCGGTGCA AGCCACATGT GCCACTTTGA CAGCCATGAG TGTGGACCGC 420
 TGGTACGTGA CTGTGTTCCC GCTGCGTGCA CTTACCCGCC GCACTCCGCG CCTGGCCCTG 480
 ACTGTCAGCC TTAGCATCTG GGTGGGTTCC GCAGCTGTTT CCGCCCCGGT GCTGGCTCTG 540
 CACCGCCTGT CGCCCGGGCC TCACACCTAC TGCAGTGAGG CGTTTCCCAG CCGTGCCCTG 600
 GAGCGCGCTT TCGCGCTCTA CAACCTGCTG GCCCTATACC TGCTGCCGCT GCTCGCCACC 660
 TGGCGCTGCT ACGGTGCCAT GCTGCGCCAC CTGGGCGCG CCGCTGTACG CCGCGACCC 720
 ACTGATGGCG CCCTGCAGGG GCAGCTGCTA GCACAGCGCG CTGGAGCAGT GCGCACCAAG 780
 GTCTCCCGGC TGGTGGCCGC TGTCGTCTCG CTCTTCGCGG CCTGCTGGGG CCCGATCCAG 840
 CTGTTCTTGG TGCTTCAAGC CCTGGGCCCC TCGGGGGCCT GGCACCCTCG AAGCTATGCC 900
 GCCTACGCGC TCAAGATCTG GGCTCACTGC ATGTCCTACA GCAATTCTGC GCTCAACCCG 960
 CTGCTCTATG CCTTCCTGGG TTCCCACTTC AGACAGGCCT TCTGCCGCGT GTGCCCCTGC 1020
 GGCCCGCAAC GCCAGCGTCG GCGCCACGCG TCAGCGCACT CGGACCGAGC CGCACCCCAT 1080
 AGTGTGCCGC ACAGCCGGGC TGCGCACCT GTCCGGGTCA GGACCCCGA GCCTGGGAAC 1140
 CCTGTGGTGC GCTCGCCCTC TGTTCAGGAT GAACACACTG CCCCACTCTG A 1191

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> umelá sekvencia :

<220>

<223>

<400> 3

GTCGACATGG CCGCAGAGGC GACGTTGGGT

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 4

ACTAGTTCAG AGTGGGGCAG TGTGTTTCATC

30

<210> 5

<211> 398

<212> PRT

<213> ľudská

<400> 5

Met His Thr Val Ala Thr Ser Gly Pro Asn Ala Ser Trp Gly Ala Pro

5

10

15

Ala Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Ala Asn Ala Ser Asp Gly

20

25

30

Pro Val Pro Ser Pro Arg Ala Val Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe

35

40

45

Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile

50

55

60

Tyr Val Ile Cys Arg His Lys Pro Met Arg Thr Val Thr Asn Phe Tyr

65

70

75

80

Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val

85

90

95

Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Trp Val Leu Gly Asp

100

105

110

Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala

115

120

125

Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr

130

135

140

Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu

145

150

155

160

Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro

165

170

175

Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ala Tyr Cys Ser

180

185

190

Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn

195

200

205

Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr

210

215

220

Ala Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Val Ala Val Arg Pro Ala Pro

225

230

235

240

Ala Asp Ser Ala Leu Gln Gly Gln Val Leu Ala Glu Arg Ala Gly Ala

245

250

255

Val Arg Ala Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe

260

265

270

Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu

275

280

285

Gly Pro Ala Gly Ser Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu

290

295

300

Lys Thr Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro

305

310

315

320

Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Arg Arg

325

330

335

Val Cys Pro Cys Ala Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly

340

345

350

Pro Ser Asp Pro Ala Ala Pro His Ala Glu Leu His Arg Leu Gly Ser

355

360

365

His Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Lys Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ala

370

375

380

Ala Arg Gly Leu Cys Val Leu Gly Glu Asp Asn Ala Pro Leu

385

390

395

398

<210> 6

<211> 1197

<212> DNA

<213> Pudská

<400> 6

ATGCACACCG TGGCTACGTC CGGACCCAAC GCGTCCTGGG GGGCACCGGC CAACGCCTCC	60
GGCTGCCCCG GCTGTGGCGC CAACGCCTCG GACGGCCCAG TCCCTTCGCC GCGGGCCGTG	120
GACGCCTGGC TCGTGCCGCT CTCTTCGCG GCGCTGATGC TGCTGGGCCT GGTGGGGAAC	180
TCGCTGGTCA TCTACGTCAT CTGCCGCCAC AAGCCGATGC GGACCGTGAC CAACTTCTAC	240
ATCGCCAACC TGGCGGCCAC GGACGTGACC TTCCTCCTGT GCTGCGTCCC CTTCACGGCC	300
CTGCTGTACC CGCTGCCCCG CTGGGTGCTG GCGGACTTCA TGTGCAAGTT CGTCAACTAC	360
ATCCAGCAGG TCTCGGTGCA GGCCACGTGT GCCACTCTGA CCGCCATGAG TGTGGACCGC	420
TGGTACGTGA CGGTGTTCCC GTTGCGCGCC CTGCACCGCC GCACGCCCCG CCTGGCGCTG	480
GCTGTCAGCC TCAGCATCTG GGTAGGCTCT GCGGCGGTGT CTGCGCCGGT GCTCGCCCTG	540
CACCGCCTGT CACCCGGGCC GCGCGCCTAC TGCAGTGAGG CCTTCCCCAG CCGCGCCCTG	600
GAGCGCGCCT TCGCACTGTA CAACCTGCTG GCGCTGTACC TGCTGCCGCT GCTCGCCACC	660
TGCGCCTGCT ATGCGGCCAT GCTGCGCCAC CTGGGCCGGG TCGCCGTGCG CCGCGGCCCC	720
CCCGATAGCG CCCTGCAGGG GCAGGTGCTG GCAGAGCGCG CAGGCGCCGT GCGGGCCAAG	780

GTCTCGCGGC TGGTGGCGGC CGTGGTCCTG CTCTTCGCCG CCTGCTGGGG CCCCATCCAG 840
CTGTTCTCTGG TGCTGCAGGC GCTGGGCCCC GCGGGCTCCT GGCACCCACG CAGCTACGCC 900
GCCTACGCGC TTAAGACCTG GGCTCACTGC ATGTCCTACA GCAACTCCGC GCTGAACCCG 960
CTGCTCTACG CCTTCCTGGG CTCGCACTTC CGACAGGCCT TCCGCCGCGT CTGCCCCTGC 1020
GCGCCGCGCC GCGCCCGCCG CCGCCGCGCG CCCGGACCCT CGGACCCCGC AGCCCCACAC 1080
GCGGAGCTGC ACCGCCTGGG GTCCCACCCG GCGCCCGCCA GGGCGCAGAA GCCAGGGAGC 1140
AGTGGGCTGG CCGCGCGCGG GCTGTGCGTC CTGGGGGAGG ACAACGCCCC TCTCTGA 1197

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 7

GACCGTGACC AACTTCTACA TCGCCA 26

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 8

ATGCACACCG TGGCTACGTC CG 22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 9

CCTGTCGGAA GTGCGAGCCC A

21

<210> 10

<211> 54

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> C-koniec polypeptidu je amidová forma ($-\text{CONH}_2$)

<400> 10

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50 54

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> C-koniec polypeptidu je amidová forma ($-\text{CONH}_2$)

10/14

<400> 11

Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

10

15

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> C-koniec polypeptidu je amidová forma (-CONH₂)

<400> 12

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> C-koniec polypeptidu je amidová forma (-CONH₂)

<400> 13

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

9

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> C-koniec polypeptidu je amidová forma ($-\text{CONH}_2$)

<400> 14

Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 8

<210> 15

<211> 162

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 15

```

GGGACCTCGC TGTCCCCGCC CCCCAGAGAGC TCCGGGAGCC GCCAGCAGCC GGGCCTGTCC      60
GGCCCCCACA GCCGCCAGAT CCCCACACCC CAGGGCGCGG TGCTGGTGCA GCGGGAGAAG      120
GACCTGCCGA ACTACAACCTG GAACTCCTTC GGCCTGCGCT TC                        162

```

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 16

```

AAGGACCTGC CGAACTACAA CTGGAATCC TTCGGCCTGC GCTTC                        45

```

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 17

TACAACTGGA ACTCCTTCGG CCTGCGCTTC

30

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 18

AACTGGAACT CCTTCGGCCT GCGCTTC

27

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 19

TGGAACCTCCT TCGGCCTGCG CTTC

24

<210> 20

<211> 145

<212> PRT

<213> ľudská

<400> 20

Met Asn Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu Phe Leu Cys Ala Thr

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

Gln

145

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> C-koniec polypeptidu je amidová forma (-CONH₂)

<400> 21

Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 7

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223>

<400> 22

AACTCCTTCG GCCTGCGCTT C

21

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Proteín a jeho soli, ktoré obsahujú rovnakú alebo v podstate rovnakú sekvenciu aminokyselín ako je sekvencia aminokyselín uvedená ako sekvencia sekv. id. č. 1.
2. Proteín a jeho soli podľa nároku 1, v ktorom rovnaká alebo v podstate rovnaká sekvencia aminokyselín znamená sekvenciu sekv. id. č. 5.
3. Čiastočný peptid proteínu podľa nároku 1 alebo jeho estry alebo jeho amidy alebo jeho soli.
4. Polynukleotid obsahujúci polynukleotid, ktorý má sekvenciu zásad kódujúcu proteín podľa nároku 1.
5. Polynukleotid podľa nároku 4, ktorý znamená DNA.
6. Polynukleotid podľa nároku 4, ktorý obsahuje sekvenciu zásad reprezentovanú sekvenciou sekv. id. č. 2 alebo sekv. id. č. 6.
7. Rekombinantný vektor obsahujúci polynukleotid podľa nároku 4.
8. Transformant transformovaný rekombinantným vektorom podľa nároku 7.
9. Spôsob výroby proteínu alebo jeho soli podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa kultivuje transformant podľa nároku 8 a že sa produkuje a

akumuluje proteín podľa nároku 1.

10. Protilátka na proteín alebo jeho soli podľa nároku 1 a na čiastočný peptid alebo jeho estery alebo jeho amidy alebo jeho soli podľa nároku 3
11. Protilátka podľa nároku 10, ktorá znamená neutralizujúcu protilátku na deaktivovanie transdukcie signálu proteínu podľa nároku 1
12. Diagnostický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje protilátku podľa nároku 10.
13. Ligand na proteín alebo jeho soli podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa dá získať použitím proteínu alebo jeho soli podľa nároku 1 použitím čiastočného peptidu, jeho esterov, jeho amidov alebo jeho solí podľa nároku 3.
14. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje ligand podľa nároku 13.
15. Spôsob stanovenia ligandu na proteín alebo jeho soli podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa používa proteín alebo jeho soli podľa nároku 1 alebo čiastočný peptid, jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa nároku 3.
16. Spôsob testovania zlúčeniny alebo ich solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa používa proteín alebo jeho soli podľa nároku 1 alebo čiastočný peptid alebo jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa nároku 3.
17. Zostava na testovanie zlúčeniny alebo jej solí, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho soľami podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa používa proteín alebo jeho soli podľa nároku 1 alebo čiastočný peptid alebo jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa nároku 3.

z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrňuje proteín alebo jeho soli podľa nároku 1 alebo čiastočný peptid alebo jeho amidy, jeho estery alebo jeho soli podľa nároku 3.

18. Zlúčenina alebo jej soli, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho sol'ami podľa nároku 1, ktorú je možné získať použitím spôsobu testovania podľa nároku 16 alebo testovacej zostavy podľa nároku 17.
19. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje zlúčeninu alebo jej soli, ktoré menia vlastnosti väzby medzi ligandom a proteínom alebo jeho sol'ami podľa nároku 1, ktorý je možné získať použitím spôsobu testovania podľa nároku 16 alebo testovacej zostavy podľa nároku 17.
20. Spôsob kvantitatívneho vyhodnotenia proteínu podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrňuje použitie protilátky podľa nároku 10.
21. Peptid, jeho amid, jeho ester alebo jeho sol', ktorý v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10 obsahuje sekvenciu N-koncových aminokyselín 47 až 54 a obsahuje 8 až 54 zvyškov aminokyselín.
22. Peptid, jeho amid, jeho ester alebo jeho sol' podľa nároku 21, ktorý v aminokyselinovej sekvencii predstavovanej sekvenciou sekv. id. č. 10 obsahuje N-koncovú sekvenciu aminokyselín 47 až 54 na C-konci a obsahuje 8 až 15 zvyškov aminokyselín.
23. Amid alebo sol' peptidu podľa nároku 21, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu predstavovanú sekvenciou sekv. id. č. 11, sekv. id. č. 12, sekv. id. č. 13 alebo sekv. id. č. 14.

24. Spôsob testovania podľa nároku 16, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ligand znamená peptid alebo jeho amid, jeho ester alebo jeho soľ podľa nároku 21.
25. Zostava na testovanie podľa nároku 16, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ligand znamená peptid alebo jeho amid, jeho ester alebo jeho soľ podľa nároku 21.

Fig. 1

10	20	30	40	50	60
ATG GCC GCA GAG GCG ACG TTG GGT CCG AAC GTG AGC TGG TGG GCT CCG TCC AAC GCT TCG					
Met Ala Ala Glu Ala Thr Leu Gly Pro Asn Val Ser Trp Trp Ala Pro Ser Asn Ala Ser					
70	80	90	100	110	120
GGA TGC CCG GGC TGC GGT GTC AAT GCC TCG GAT GGC CCA GGC TCC GCG CCA AGG CCC CTG					
Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Gly Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu					
130	140	150	160	170	180
GAT GCC TGG CTG GTG CCC CTG TTT TTC GCT GCC CTA ATG TTG CTG GGG CTA GTC GGG AAC					
Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn					
190	200	210	220	230	240
TCA CTG GTC ATC TTC GTT ATC TGC CGC CAC AAG CAC ATG CAG ACC GTC ACC AAT TTC TAC					
Ser Leu Val Ile Phe Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr					
250	260	270	280	290	300
ATC GCT AAC CTG GCG GCC ACA GAT GTC ACT TTC CTT CTG TGC TGC GTA CCC TTC ACC GCG					
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val Pro Phe Thr Ala					
310	320	330	340	350	360
CTC CTC TAT CCG CTG CCC ACC TGG GTG CTG GGA GAC TTC ATG TGC AAA TTC GTC AAC TAC					
Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Asp Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr					
370	380	390	400	410	420
ATC CAG CAG GTC TCG GTG CAA GCC ACA TGT GCC ACT TTG ACA GCC ATG AGT GTG GAC CGC					
Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg					

Fig. 2

430	440	450	460	470	480
TGG TAC GTG ACT GTG TTC CCG CTG CGT GCA CTT CAC CGC CGC ACT CCG CGC CTG GCC CTG					
Trp Tyr Val Thr Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu					
490	500	510	520	530	540
ACT GTC AGC CTT AGC ATC TGG GTG GGT TCC GCA GCT GTT TCC GCC CCG GTG CTG GCT CTG					
Thr Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro Val Leu Ala Leu					
550	560	570	580	590	600
CAC CGC CTG TCG CCC GGG CCT CAC ACC TAC TGC AGT GAG GCG TTT CCC AGC CGT GCC CTG					
His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu					
610	620	630	640	650	660
GAG CGC GCT TTC GCG CTC TAC AAC CTG CTG GCC CTA TAC CTG CTG CCG CTG CTC GCC ACC					
Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr					
670	680	690	700	710	720
TGC GCC TGC TAC GGT GCC ATG CTG CGC CAC CTG GGC CGC GCC GCT GTA CGC CCC GCA CCC					
Cys Ala Cys Tyr Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro					
730	740	750	760	770	780
ACT GAT GGC GCC CTG CAG GGG CAG CTG CTA GCA CAG CGC GCT GGA GCA GTG CGC ACC AAG					
Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala Val Arg Thr Lys					
790	800	810	820	830	840
GTC TCC CGG CTG GTG GCC GCT GTC GTC CTG CTC TTC GCC GCC TGC TGG GGC CCG ATC CAG					
Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln					
850	860	870	880	890	900
CTG TTC CTG GTG CTT CAA GCC CTG GGC CCC TCG GGG GCC TGG CAC CCT CGA AGC TAT GCC					
Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala					

Fig. 3

910	920	930	940	950	960
GCC TAC GCG CTC AAG ATC TGG GCT CAC TGC ATG TCC TAC AGC AAT TCT GCG CTC AAC CCG					
Ala Tyr Ala Leu Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro					
970	980	990	1000	1010	1020
CTG CTC TAT GCC TTC CTG GGT TCC CAC TTC AGA CAG GCC TTC TGC CGC GTG TGC CCC TGC					
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg Val Cys Pro Cys					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GGC CCG CAA CGC CAG CGT CGG CCC CAC GCG TCA GCG CAC TCG GAC CGA GCC GCA CCC CAT					
Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AGT GTG CCG CAC AGC CGG GCT GCG CAC CCT GTC CGG GTC AGG ACC CCC GAG CCT GGG AAC					
Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CCT GTG GTG CGC TCG CCC TCT GTT CAG GAT GAA CAC ACT GCC CCA CTC TGA					
Pro Val Val Arg Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu ***					

Fig. 4

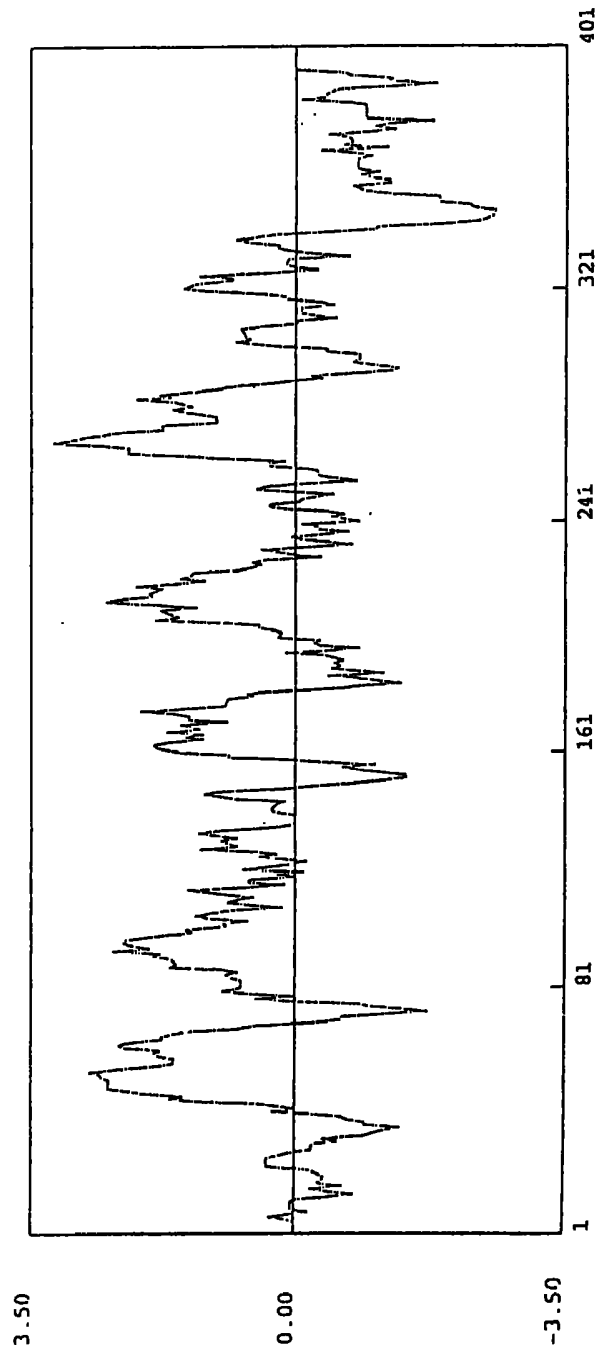


Fig. 5

```

      10      20      30      40      50      60
ATGCACACCG TGGCTACGTC CGGACCCAAC GCGTCCTGGG GGGCACCGGC CAACGCCTCC
METHisThrV alAlaThrSe rGlyProAsn AlaSerTrpG lyAlaProAl aAsnAlaSer

      70      80      90      100     110     120
GGCTGCCCCG GCTGTGGCGC CAACGCCTCG GACGGCCCAG TCCCTTCGCC GCGGGCCGTG
GlyCysProG lyCysGlyAl aAsnAlaSer AspGlyProV alProSerPr oArgAlaVal

      130     140     150     160     170     180
GACGCCTGGC TCGTGCCGCT CTTCTTCGCG GCGCTGATGC TGCTGGGCCT GGTGGGGAAC
AspAlaTrpL euValProLe uPhePheAla AlaLeuMETL euLeuGlyLe uValGlyAsn

      190     200     210     220     230     240
TCGCTGGTCA TCTACGTCAT CTGCCGCCAC AAGCCGATGC GGACCGTGAC CAACTTCTAC
SerLeuValI leTyrValII eCysArgHis LysProMETA rgThrValTh rAsnPheTyr

      250     260     270     280     290     300
ATCGCCAACC TGGCGGCCAC GGACGTGACC TTCCTCCTGT GCTGCGTCCC CTTACGGCC
IleAlaAsnL euAlaAlaTh rAspValThr PheLeuLeuC ysCysValPr oPheThrAla

      310     320     330     340     350     360
CTGCTGTACC CGCTGCCCGG CTGGGTGCTG GGCGACTTCA TGTGCAAGTT CGTCAACTAC
LeuLeuTyrP roLeuProGl yTrpValLeu GlyAspPheM ETCysLysPh eValAsnTyr

      370     380     390     400     410     420
ATCCAGCAGG TCTCGGTGCA GGCCACGTGT GCCACTCTGA CCGCCATGAG TGTGGACCGC
IleGlnGlnV alSerValGl nAlaThrCys AlaThrLeuT hrAlaMETSe rValAspArg

```

Fig. 6

```

      430      440      450      460      470      480
TGGTACGTGA CGGTGTTCCC GTTGCGCGCC CTGCACCGCC GCACGCCCCG CCTGGCGCTG
TrpTyrValT hrValPhePr oLeuArgAla LeuHisArgA rgThrProAr gLeuAlaLeu

      490      500      510      520      530      540
GCTGTCAGCC TCAGCATCTG GGTAGGCTCT GCGGCGGTGT CTGCGCCGGT GCTCGCCCTG
AlaValSerL euSerIleTr pValGlySer AlaAlaValS erAlaProVa lLeuAlaLeu

      550      560      570      580      590      600
CACCGCCTGT CACCCGGGCC GCGCGCCTAC TGCAGTGAGG CCTTCCCCAG CCGCGCCCTG
HisArgLeuS erProGlyPr oArgAlaTyr CysSerGluA laPheProSe rArgAlaLeu

      610      620      630      640      650      660
GAGCGCGCCT TCGCACTGTA CAACCTGCTG GCGCTGTACC TGCTGCCGCT GCTCGCCACC
GluArgAlaP heAlaLeuTy rAsnLeuLeu AlaLeuTyrL euLeuProLe uLeuAlaThr

      670      680      690      700      710      720
TGCGCCTGCT ATGCGGCCAT GCTGCGCCAC CTGGGCCGGG TCGCCGTGCG CCGCGCGCCC
CysAlaCysT yrAlaAlaME TLeuArgHis LeuGlyArgV alAlaValAr gProAlaPro

      730      740      750      760      770      780
GCCGATAGCG CCCTGCAGGG GCAGGTGCTG GCAGAGCGCG CAGGCGCCGT GCGGGCCAAG
AlaAspSerA laLeuGlnGl yGlnValLeu AlaGluArgA laGlyAlaVa lArgAlaLys

```

Fig. 7

```

      790      800      810      820      830      840
GTCTCGCGGC TGGTGGCGGC CGTGGTCCTG CTCTTCGCCG CCTGCTGGGG CCCCATCCAG
ValSerArgL euValAlaAl aValValLeu LeuPheAlaA laCysTrpGl yProIleGln

      850      860      870      880      890      900
CTGTTCTCTGG TGCTGCAGGC GCTGGGCCCC GCGGGCTCCT GGCACCCACG CAGCTACGCC
LeuPheLeuV alLeuGlnAl aLeuGlyPro AlaGlySerT rpHisProAr gSerTyrAla

      910      920      930      940      950      960
GCCTACGCGC TTAAGACCTG GGCTCACTGC ATGTCCTACA GCAACTCCGC GCTGAACCCG
AlaTyrAlaL euLysThrTr pAlaHisCys METSerTyrS erAsnSerAl aLeuAsnPro

      970      980      990      1000      1010      1020
CTGCTCTACG CCTTCCTGGG CTCGCACTTC CGACAGGCCT TCCGCCGCGT CTGCCCCTGC
LeuLeuTyrA laPheLeuGl ySerHisPhe ArgGlnAlaP heArgArgVa lCysProCys

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
GCGCCGCGCC GCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGGACCCT CGGACCCCGC AGCCCCACAC
AlaProArgA rgProArgAr gProArgArg ProGlyProS erAspProAl aAlaProHis

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
GCGGAGCTGC ACCGCCTGGG GTCCCACCCG GCGCCGCGCA GGGCGCAGAA GCCAGGGAGC
AlaGluLeuH isArgLeuGl ySerHisPro AlaProAlaA rgAlaGlnLy sProGlySer

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
AGTGGGCTGG CCGCGCGCGG GCTGTGCGTC CTGGGGGAGG ACAACGCCCC TCTCTGA
SerGlyLeuA laAlaArgGl yLeuCysVal LeuGlyGluA spAsnAlaPr oLeu**

```

Fig. 8

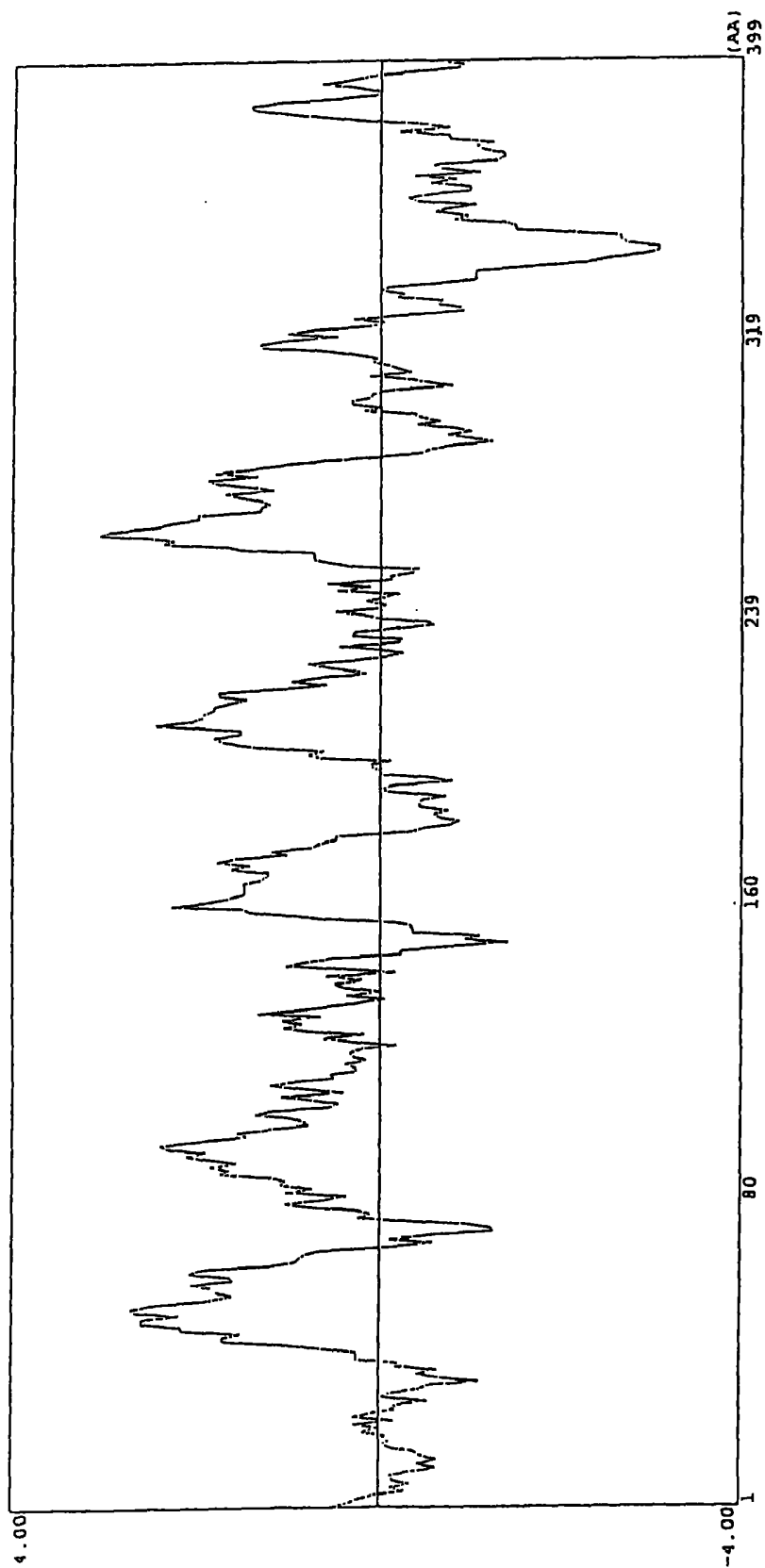


Fig. 9

