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

(10) **DE 693 34 211 T2** 2009.06.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 666 911 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 211.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA93/00439**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 922 874.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/010303**
(86) PCT-Anmeldetag: **27.10.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.05.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.08.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.06.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/12*** (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A01K 67/02 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

966923	**27.10.1992**	**US**
29340	**08.03.1993**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
Queen's University at Kingston, Kingston, Ontario, CA

(72) Erfinder:
DEELEY, Roger G., Ontario K7G2V6, CA; COLE, Susan P., Kingston, Ontario K7M 2B4, CA

(74) Vertreter:
MÜLLER FOTTNER STEINECKE Rechtsanwälte Patentanwälte, 80335 München

(54) Bezeichnung: **MULTIDRUG RESISTENZ GEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Querverweis auf verwandte Patentanmeldungen. Die vorliegende Patentanmeldung ist eine Teilfortführungsanmeldung zu der Patentanmeldung 08/029.340, die am 8. März 1993 eingereicht wurde und die eine Teilfortführungsanmeldung der Patentanmeldung 07/966.923 ist, welche am 27. Oktober 1992 eingereicht wurde.

[0002] Es ist ausreichend bekannt, dass zahlreiche Krebstypen als Reaktion auf zurzeit verfügbare Medikamente zunächst zurückgehen. Wenn allerdings die Krankheit erneut auftritt, wie dies mit unterschiedlicher Häufigkeit der Fall ist, ist sie häufig unempfänglich für die weitere Behandlung mit dem ursprünglich zur Behandlung verwendeten Mittel oder Mitteln, denen der Patient bis dahin nicht ausgesetzt wurde. Derzeit kann nur wenig für Patienten getan werden, deren Tumoren diese Form von mehrfacher Arzneimittelresistenz zeigen.

[0003] Ein Mechanismus, durch den Krebszellen gleichzeitig Resistenzen gegen eine Gruppe strukturell verschiedener Medikamente entwickeln können, wurde in den vergangenen 15 Jahren mit der Charakterisierung von P-Glykoprotein geklärt.

[0004] P-Glykoprotein ist ein Mitglied einer Superfamilie von Membranproteinen, die zum Transport einer Vielzahl von Molekülen, von Ionen bis hin zu Proteinen, durch die Zellmembranen dienen. Diese Superfamilie ist als die ABC(ATP-binding Cassette, ATP-bindende Kassette)-Superfamilie von Membrantransportproteinen bekannt. Für einen Überblick hierüber siehe C. F. Higgins, Ann. Rev. Cell Biol. 8, 67 (1992). Beispielsweise beinhaltet diese Familie neben P-Glykoprotein, das chemotherapeutische Medikamente transportiert, den Regulator der Transmembran-Leitfähigkeit bei zystischer Fibrose, der Chloridionenflüsse steuert, sowie Proteine von Insekten, die Resistenz gegen Antimalariamedikamente vermitteln. Von P-Glykoprotein wird angenommen, dass es Resistenz gegen mehrere Antikrebsmedikamente verleiht, indem es als energieabhängige Effluxpumpe fungiert, die die Anreicherung einer breiten Palette von zytotoxischen Mitteln und anderen Xenobiotika in der Zelle begrenzt. Zusammensetzungen, die durch P-Glykoprotein aus Säugetierzellen ausgeschlossen werden, sind häufig natürlich produzierte Wirkstoffe, jedoch sind auch andere große heterozyklische Moleküle „Trägersubstanzen" für diese Effluxpumpe.

[0005] Die Entdeckung des P-Glykoproteins und seines Vorkommens in verschiedenen Tumorarten hat die Suche nach Zusammensetzungen stimuliert, die in der Lage sind, seine Funktion zu blockieren und dementsprechend die Resistenz umzukehren. Diese Untersuchungen haben zur Identifikation einer großen Zahl so genannter Chemosensibilisatoren oder Umkehrmittel geführt. Einige dieser Zusammensetzungen wirken durch Inhibition der Pumpenaktivität von P-Glykoprotein, während der Wirkmechanismus von anderen noch unbestimmt ist. Eine ausgewählte Gruppe dieser Mittel wird derzeit intensiv klinisch erforscht und zeigt sich vielversprechend als Ergänzung zur konventionellen Chemotherapie. Zu den Chemosensibilisatoren, die die durch P-Glykoprotein übertragene mehrfache Arzneimittelresistenz umkehren können, gehören Verapamil und Cyclosporin A.

[0006] Leider erklärt die Überexpression von P-Glykoprotein nicht die große Häufigkeit von mehrfachen Arzneimittelresistenzen in einigen der vorherrschenderen Formen von Krebs, beispielsweise Lungenkrebs. In der westlichen Welt macht Lungenkrebs etwa 30% der Gesamtzahl von Krebstoten aus. Es gibt vier hauptsächliche histologische Kategorien von Lungenkrebs: epidermoide oder squamöse Adenokarzinome, großzellige Karzinome, Adenokarzinome und kleinzellige Karzinome. Die ersten drei Kategorien, die zusammenfassend als nicht-kleinzelliger Lungenkrebs bezeichnet werden, unterscheiden sich von dem letzten durch ihr anfängliches Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie. Nicht-kleinzellige Lungenkrebsarten sind von vornherein relativ resistent gegen beide Behandlungsformen. Im Gegensatz dazu zeigt der kleinzellige Lungenkrebs, der etwa 20% aller Lungentumore ausmacht, eine hohe anfängliche Ansprechrate (80–90% bei begrenzter Tumorausdehnung) auf Chemotherapie. Allerdings werden fast alle Patienten mit einer mehrfach arzneimittelresistenten Form der Krankheit rückfällig und liegt die Zwei-Jahres-Überlebensrate unter 10%. Obwohl das gezeigte Arzneimittelresistenzprofil bei rückfälligen Patienten mit kleinzelligem Lungenkrebs ähnlich dem durch P-Glykoprotein verliehenen ist, scheint P-Glykoprotein hieran nicht beteiligt zu sein. Außerdem weisen begrenzte Studien an Zellkulturen und Patienten darauf hin, dass mehrfach arzneimittelresistenter kleinzelliger Lungenkrebs nicht auf Chemosensibilisatoren, beispielsweise Verapamil und Cyclosporin A, anspricht, die bei anderen Arten arzneimittelresistenter Tumore vielversprechend sind.

[0007] Science Bd. 258, 1992, S. 1650–1654, Cole et al., beschreibt die Überexpression eines ABC-Transmembrantransporter-Gens in einer mehrfach arzneimittelresistenten humanen Lungenkrebs-Zelllinie.

[0008] Allerdings hat sich die Überlebensrate bei Lungenkrebs in 40 Jahren nicht wesentlich verbessert und besteht aufgrund seiner weiten Verbreitung klarerweise ein großer Bedarf an einer verbesserten Therapie für diese Krankheit.

[0009] Die vorliegende Erfindung basiert zumindest teilweise auf der Entdeckung einer Nukleinsäure, die ein Protein codiert, welches einer medikamentenempfindlichen Säugetierzelle mehrfache Arzneimittelresistenz verleihen kann, wenn es in der Zelle zur Expression kommt, und welches in gewissen mehrfach arzneimittelresistenten Krebszelllinien Überexpression zeigt. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure wurde aus einer mehrfach arzneimittelresistenten Krebszelllinie isoliert, die keine Überexpression von P-Glykoprotein zeigt und deren Resistenz durch Chemosensibilisatoren, die P-Glykoprotein blockieren, nicht wesentlich umgekehrt wird. Die Nukleinsäure und das codierte Protein der vorliegenden Erfindung repräsentieren Moleküle, die gezielt therapeutisch in mehrfach arzneimittelresistenten Tumoren eingesetzt werden können, in denen die Nukleinsäure und das Protein exprimiert sind.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt eine isolierte Nukleinsäure bereit, die eine Nukleotidsequenz aufweist, welche ein mit mehrfacher Arzneimittelresistenz assoziiertes Protein codiert, das in mehrfach arzneimittelresistenten Zellen Überexpression zeigt, unabhängig von der Überexpression von P-Glykoprotein. Dieses Protein wurde mehrfach Arzneimittelresistenz-assoziiertes Protein (kurz MRP) genannt. Das erfindungsgemäße Protein unterscheidet sich in der Aminosäuresequenz von P-Glykoprotein. Die isolierte Nukleinsäure kann, wenn sie in einer nicht mehrfach arzneimittelresistenten Zelle zur Expression kommt, der Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz verleihen.

[0011] In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine isolierte Nukleinsäure bereitgestellt, die eine Sequenz besitzt, welche für ein mehrfach Arzneimittelresistenz-assoziiertes Protein codiert, welches eine Aminosäuresequenz besitzt, die eine wesentliche Sequenzhomologie zu der in SEQ ID NO: 2 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist. Vorzugsweise besitzt die isolierte Nukleinsäure eine Sequenz, die eine wesentliche Sequenzhomologie zu der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenz aufweist. Ferner stellt die Erfindung eine isolierte Nukleinsäure bereit, die zu einer Nukleinsäure, die eine wesentliche Sequenzhomologie zu der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenz aufweist, antisense ist.

[0012] Ferner stellt die Erfindung einen für die Transformation einer Wirtszelle, welche die erfindungsgemäße, operativ mit einer Regulatorsequenz verbundene Nukleinsäure enthält, geeigneten rekombinanten Expressionsvektor bereit. Außerdem stellt die Erfindung einen für die Transformation einer Wirtszelle, die ein operativ mit einer Regulatorsequenz verbundenes DNA-Molekül enthält, geeigneten rekombinanten Expressionsvektor bereit, um die Expression eines RNA-Moleküls zu ermöglichen, das zu einer Nukleotidsequenz von SEQ IS NO: 1 antisense ist.

[0013] Die Erfindung stellt außerdem ein Verfahren bereit zum Präparieren eines Proteins, das in der Lage ist, mithilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mehrfache Arzneimittelresistenz zu verleihen. Das Verfahren umfasst das Kultivieren einer transformanten Wirtszelle einschließlich eines rekombinanten Expressionsvektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und eine Regulatorsequenz, die operativ mit der Nukleinsäure verbunden ist, in einem geeigneten Medium, bis ein mehrfach arzneimittelresistentes Protein gebildet wird, und das anschließende Isolieren des Proteins.

[0014] Ferner stellt die Erfindung ein isoliertes Protein mit der biologischen Aktivität von MRP bereit, das einer medikamentenempfindlichen Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz verleiht, wenn das Protein in der Zelle zur Expression kommt, wobei die Resistenz nicht durch Chemosensibilisatoren von P-Glykoprotein umgekehrt wird. Das isolierte erfindungsgemäße Protein ist mit einer mehrfachen Arzneimittelresistenz in Tumorzellen assoziiert und zeigt in mehrfach arzneimittelresistenten Zellen Überexpression, in denen P-Glykoprotein überexprimiert ist oder auch nicht. In einer bevorzugten Ausführungsform hat das Protein eine Aminosäuresequenz, die wesentliche Homologie zu der in SEQ ID NO: 2 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist.

[0015] Die Erfindung stellt ferner einen für ein Epitop eines erfindungsgemäßen Proteins spezifischen Antikörper bereit. Vorzugsweise ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Der Antikörper kann an eine nachweisbare Substanz oder eine Substanz, die toxisch oder therapeutisch aktiv ist, gekoppelt werden.

[0016] Außerdem stellt die Erfindung einen bispezifischen Antikörper bereit, der speziell an ein erfindungsgemäßes Protein, das durch eine Tumorzelle exprimiert wird, und an eine nachweisbare Substanz oder eine Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität bindet. Vorzugsweise ist die toxische Substanz eine zytotoxische Zelle und vernetzt der bispezifische Antikörper spezifisch die Tumorzelle und die zytotoxische Zelle und

ermöglicht so die Lyse der Tumorzelle. Die Erfindung stellt weiters einen Tetramer-Antikörperkomplex eines ersten monoklonalen Antikörpers bereit, der spezifisch an ein erfindungsgemäßes Protein bindet, welches durch eine Tumorzelle exprimiert wird, und an einen zweiten monoklonalen Antikörper, der spezifisch an eine nachweisbare Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität bindet, wobei der erste und der zweite Antikörper von einer ersten Tierart stammen, konjugiert zur Bildung eines zyklischen Tetramers mit zwei monoklonalen Antikörpern einer zweiten Tierart, die gegen das Fc-Fragment der Antikörper der ersten Tierart gerichtet sind.

[0017] Die Antikörper, bispezifischen Antikörper oder Tetramer-Antikörperkomplexe können in Rezepturen enthalten sein, die zur Verabreichung in einer pharmazeutisch zulässigen Trägersubstanz geeignet sind.

[0018] Moleküle, die an ein erfindungsgemäßes Protein binden, einschließlich die erfindungsgemäßen Antikörper, bispezifischen Antikörper und Tetramer-Antikörperkomplexe, können in einem Verfahren zur Identifizierung von mehrfach arzneimittelresistenten Tumorzellen durch Markieren des Antikörpers mit einer nachweisbaren Substanz, Zusammenbringen des Antikörpers mit Tumorzellen und Nachweisen der an die Tumorzellen gebundenen nachweisbaren Substanz verwendet werden. Ein Antikörper, der an ein erfindungsgemäßes Protein bindet, kann ferner in einem Verfahren zur Inhibition der mehrfachen Arzneimittelresistenz einer Zelle durch die blockierende Aktivität eines MRP-Proteins verwendet werden. Ein Antikörper, der an ein erfindungsgemäßes Protein bindet, kann ferner verwendet werden, um eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle abzutöten, in der das Protein exprimiert ist, indem der Antikörper, der mit einer toxischen oder therapeutischen Substanz gekoppelt ist, mit der mehrfach arzneimittelresistenten Zelle zusammengebracht wird. Erfindungsgemäße Nukleinsäuren können in einem Verfahren eingesetzt werden, um eine medikamentenempfindliche Zelle gegen Zytotoxizität aufgrund der Exposition mit einem Medikament zu schützen, indem die Zelle mit einer Nukleinsäure in einer zur Expression des durch die Nukleinsäure codierten Proteins in der Zelle geeigneten Form transfektiert wird, wodurch der Zelle Arzneimittelresistenz verliehen wird.

[0019] Die erfindungsgemäßen rekombinanten Moleküle können dazu verwendet werden, transformante Wirtszellen zu erzeugen, in denen das erfindungsgemäße Protein zur Expression kommt. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Moleküle können außerdem dafür verwendet werden, transgene nichtmenschliche Tiere und nichtmenschliche Knockout-Tiere zu erzeugen. Die transfektierten Zellen, transgenen Tiere und Knockout-Tiere können verwendet werden, um Substanzen auf ihre Wirkung auf mehrfache Arzneimittelresistenzen zu testen. Ein Verfahren zum Identifizieren einer Substanz, die ein Chemosensibilisator eines therapeutischen Mittels ist, und ein Verfahren zum Identifizieren einer zytotoxischen Substanz für mehrfach arzneimittelresistente Zellen mithilfe von erfindungsgemäßen transformanten Wirtszellen oder Tieren werden bereitgestellt.

[0020] Die Erfindung betrifft außerdem eine Zelllinie mit mehrfacher Arzneimittelresistenz, die keine Überexpression von P-Glykoprotein zeigt und im Wesentlichen resistent gegen hydrophobe Medikamente ist. Die Zelllinie kann von Zellen des kleinzelligen Lungenkrebses gewonnen werden, vorzugsweise der Zelllinie NCI-H69. Am meisten bevorzugt ist die mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie H69AR (ATCC CRL 11351). Eine revertante medikamentenempfindliche Zelllinie kann aus der mehrfach arzneimittelresistenten Zelllinie gewonnen werden, indem die mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie in Abwesenheit eines Medikaments über einen für die Produktion einer revertanten medikamentenempfindlichen Zelllinie ausreichenden Zeitraum kultiviert wird. Vorzugsweise ist die revertante medikamentenempfindliche Zelllinie H69PR (ATCC CRL 11350). Die Zelllinien H69AR (ATCC CRL 11351) und H69PR (ATCC CRL 11350) wurden beim ATCC, Rockville, Maryland, am 14. Mai 1993 hinterlegt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0021] Abb. 1A ist ein Northern-Blot von Poly(A^+)-RNA von H69-, H69AR- und H69PR-Zellen, hybridisiert mit einem 1,8 kb EcoRI cDNA-Fragment des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten Proteins.

[0022] Abb. 1B ist eine Southern-Blot-Analyse der EcoRI-verdauten genomischen DNA aus H69-, H69AR- und H69PR-Zellen, hybridisiert mit einem 1,8 kb EcoRI cDNA-Fragment des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten Proteins.

[0023] Abb. 1C ist ein Northern-Blot von Poly(A^+)-RNA einer medikamentenempfindlichen und -resistenten HeLa-Zelle, hybridisiert mit einem 1,8 kb EcoRI cDNA-Fragment des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten Proteins.

[0024] Abb. 2 ist eine Clusteranalyse der relativen Ähnlichkeit des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimit-

telresistenten Proteins mit ausgewählten Mitgliedern der ABC-Transporter-Superfamilie, die hydrophobe Transmembranregionen gefolgt von Nukleotid-Bindungsfalten enthalten.

[0025] Die Abb. 3A & B stellen die komplette Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten Proteins der kompletten Aminosäuresequenz von ItPgpA (Lei/PgpA) gegenüber.

[0026] Abb. 3C ist ein Diagramm, das die Gegenüberstellung der erweiterten Nukleotid-Bindungsregionen des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten Proteins, von humanem CFTR und Leishmania ItPgpA und humanem P-Glykoprotein (Hum/Mdr1) zeigt.

[0027] Abb. 4 ist ein Northern-Blot der Gesamt-RNA von normalem Gewebe, hybridisiert mit einem 0,9 kb EcoRI cDNA-Fragment des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten Proteins.

[0028] Abb. 5 ist ein von ISCN abgeleitetes Ideogramm des menschlichen Karyotyps, welches eine Silberkornverteilung nach der In-Situ-Hybridisierung eines 1,8 kb EcoRi cDNA-Fragments des erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten Proteins zu Metaphasen-Chromosomen zeigt.

[0029] Abb. 6 ist ein Graph, der die relative toxische Wirkung von Doxorubicin auf MRP-transfektierte HeLa-Zellpopulationen (T2, T5), ein Klon der T5-Population (T5-5, nicht-transfektierte HeLa-Zellen und mit dem parentalen Expressionsvektor transfektierte HeLa-Zellen (C1) zeigt.

[0030] **Abb.** 7A ist ein Northern-Blot von Poly(A)+ RNA aus transfektierten und Kontroll-HeLa-Zellen, hybridisiert mit einem 4 kb MRP cDNA-Fragment, welches mit endogener MRP mRNA (e) und von dem Expressionsvektor abgeleiteter MRP mRNA (v) hybridisiert. Hybridisierung mit einer GAPDH cDNA zeigt die relativen Mengen von Poly(A)+ RNA in jeder Linie.

[0031] **Abb.** 7B ist ein Northern-Blot von Poly(A)+ RNA aus transfektierten und Kontroll-HeLa-Zellen, hybridisiert mit einem DNA-Fragment des pRc/CMV-Vektors, das nur zu der von dem Expressionsvektor abgeleiteten MRP mRNA (v) hybridisiert. Hybridisierung mit einer GAPDH cDNA zeigt die relativen Mengen von Poly(A)+ RNA in jeder Linie.

[0032] **Abb.** 7C zeigt einen Northern-Blot (MRP mRNA) und Immunblots (MRP-Protein), die den jeweiligen Pegel an von dem Expressionsvektor abgeleiteter MRP mRNA und Protein in transfektierten HeLa-Zellen und endogener MRP mRNA und Protein in der Zelllinie H69AR darstellt.

[0033] **Abb.** 8A ist ein Northern-Blot von Poly(A)+ RNA von transfektierten HeLa-Zellen und Kontrollzellen, hybridisiert mit cDNA-Sonden für Topoisomerase II (Topo II) Alpha und Beta mRNAs. Hybridisierung mit einer GAPDH cDNA zeigt die relativen Mengen von Poly(A)+ RNA in jeder Linie.

[0034] **Abb.** 8B ist ein Northern-Blot von Poly(A)+ RNA von transfektierten HeLa-Zellen und Kontrollzellen, hybridisiert mit einer cDNA-Sonde für Annexin II mRNA. Hybridisierung mit einer GAPDH cDNA zeigt die relativen Mengen von Poly(A)+ RNA in jeder Linie.

[0035] Abb. 9 ist ein Graph, der die relative Zytotoxizität von VP-16, Vincristin und Cisplatin auf MRP-transfektierte HeLa-Zellpopulationen (T2, T5), ein Klon der T5-Population (T5-5), nicht-transfektierte HeLa-Zellen und mit dem parentalen Expressionsvektor transfektierte HeLa-Zellen (C1) zeigt.

Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0036] Mehrfach arzneimittelresistente Säugetierzelllinien wurden von einer Reihe von Tumortypen abgeleitet und haben In-vitro-Modelle zur Untersuchung erworbener Resistenz geliefert. Obwohl sie mittels eines einzelnen natürlich produzierten Wirkstoffs selektiert wurden, zeigen diese Zelllinien Kreuzresistenz gegen eine Vielzahl chemisch nicht miteinander verwandter Xenobiotika mit mehreren subzellularen Zielen. Üblicherweise sind diese Zellen resistent gegen Anthrazykline [z. B. Doxorubicin (DOX), Epipodophyllotoxine (z. B. VP-16) und die Vinca-Alkaloide (z. B. Vinblastin)], jedoch nicht gegen Antimetabolite wie 5-Fluorouracil oder gegen platinhaltige Medikamente. Mehrfach arzneimittelresistente Zellen zeigen ebenfalls häufig eine kollaterale Sensitivität gegen bestimmte hydrophobe Medikamente einschließlich Lokalanästhetika und Steroidhormone.

[0037] Die häufigste berichtete Veränderung in mehrfach arzneimittelresistenten Tumorzellen war die erhöhte Expression des 170 kDA Plasmamembran-Glykoproteins, P-Glykoprotein (P-gp), das durch das MDR1-Gen

codiert ist. In verschiedenen Labors durchgeführte Studien mit klinischen Proben und Zelllinien, die zahlreiche Tumorarten repräsentieren, haben zu dem Schluss geführt, das P-gp, obwohl es bei einigen bösartigen Veränderungen klinisch relevant ist, für andere mit geringer Wahrscheinlichkeit von Bedeutung ist. Eine Überexpression von P-gp tritt sowohl beim kleinzelligen Lungenkrebs (SCLC) als auch beim nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC) selten auf.

[0038] Eine der in experimentellen Studien zu SCLC am häufigsten eingesetzten Zelllinien ist NCI-H69 (H69) (Gadzar et al., Cancer res. 40, 3502–3507 (1980)) (ATCC HTB 119). Diese Zelllinie wurde wiederholt mit einem Anthrazyklin behandelt, etwa Daunorubicin oder Epirubicin und vorzugsweise DOX, und schrittweise zu einer finalen Konzentration von 0,8 μM selektiert, um eine mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie zu erzeugen, die die Bezeichnung H69AR trägt. Eine Beschreibung der Prozeduren, mit denen eine mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie wie H69AR zu erzeugen ist, findet sich in Cole, Cancer Chemother Pharmacol. 17, 259–263 (1986), und in Mirski et al., Cancer Research 47, 2594–2598 (1987).

[0039] Die Zelllinie H69AR (ATCC CRL 11351) ist etwa 50fach resistenter gegen DOX im Vergleich mit der parentalen Zelllinie H69. H69AR ist außerdem kreuzresistent gegen eine Vielzahl von natürlich produzierten Wirkstoffen. Dagegen sind Medikamente wie Carboplatin, 5-Fluorouracil und Bleomycin für die medikamentenempfindlichen H69- und die resistenten H69AR-Zellen gleichermaßen toxisch. Obwohl das Kreuzresistenzenmuster von H69AR-Tellen typisch ist für eine mit erhöhten P-gp-Pegeln assoziierte Resistenz, unterscheiden sich diese Zellen dahingehend, dass sie wenig oder gar keine kollaterale Sensitivität gegenüber hydrophoben Medikamenten wie Steroiden oder Lokalanästhetika zeigen. Ein weiteres u. U. klinisch relevantes Unterscheidungsmerkmal von H69AR, das diese Zelllinie von Zelllinien mit P-gp-Überexpression unterscheidet, ist die eingeschränkte Fähigkeit von Verapamil, Cyclosporin A und anderen chemosensitivierenden Mitteln, die mit P-gp interagieren, die DOX-Resistenz in diesen Zellen umzukehren. Die Abwesenheit von P-gp-Überexpression stützt die Vermutung, dass H69AR ein klinisch relevantes Modell der Arzneimittelresistenz bei Lungenkrebs liefert.

[0040] Eine revertante medikamentenempfindliche Zelllinie H69PR (Cole et al., Br J. Cancer 65, 498–502, 1992) (ATCC CRL 11350) wurde isoliert, indem die H69AR-Zelllinie in Abwesenheit von Medikamenten wie etwa DOX über einen für die Produktion einer revertanten Zelllinie ausreichenden Zeitraum kultiviert wurde. Vorzugsweise wird die Zelllinie H69PR in Abwesenheit von Medikamenten für mindestens 3 Monate und bis zu 48 Monate, am meisten bevorzugt 42 Monate, kultiviert.

[0041] Die erfindungsgemäßen Zelllinien können zum Assayieren einer Substanz genutzt werden, die auf eine mehrfach arzneimittelresistente Tumorzelle einwirkt. Zellen einer erfindungsgemäßen Zelllinie können mit einer Testsubstanz inkubiert werden, von der vermutet wird, dass sie auf mehrfache Arzneimittelresistenzen einwirkt. Die Wirkung der Substanz kann durch Analysieren des Arzneimittelresistenzmusters der Zellen und Vergleichen der Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe bestimmt werden. Wie weiter oben bereits angesprochen, ist die erfindungsgemäße mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie resistent gegen Anthrazykline, Epipodophyllotoxine, Vinca-Alkaloide und andere natürlich produzierte Wirkstoffe. Somit ist ein Screening auf eine agonistische oder eine antagonistische Substanz der mehrfachen Arzneimittelresistenz oder einen Antagonisten, der die Auswirkungen eines Agonisten hemmt, möglich.

[0042] In einer Ausführungsform der Erfindung kann eine Substanz, von der vermutet wird, dass sie für eine mehrfach arzneimittelresistente Tumorzelle zytotoxisch ist, identifiziert werden. Daher kann das vorstehend beschriebene Verfahren zum Identifizieren von Substanzen verwendet werden, die möglicherweise für die Behandlung von mehrfach arzneimittelresistenten Tumoren eingesetzt werden können.

[0043] Wie in den Beispielen beschrieben, wurde die Zelllinie H69AR dazu verwendet, eine cDNA zu identifizieren, die ein neuartiges, mit mehrfacher Arzneimittelresistenz assoziiertes Protein, genannt MRP, codiert. Die DNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von MRP sind in SEQ ID NO: 1 bzw. SEQ ID NO: 2 dargestellt. MRP mRNA zeigt in gewissen mehrfach arzneimittelresistenten Tumorzelllinien einschließlich H69AR Überexpression. Ferner verleiht die Expression des MRP-Proteins in einer medikamentenempfindlichen Säugetierzelle der Zelllinie mehrfache Arzneimittelresistenz. Ein hier beschriebenes Protein „mit der biologischen Aktivität von MRP" kann einer Säugetierzelle mehrfache Arzneimittelresistenz gegen Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide verleihen, wenn das Protein in der Säugetierzelle zur Expression kommt, und diese Resistenz wird durch Chemosensibilisatoren, welche durch P-Glykoprotein verursachte mehrfache Arzneimittelresistenzen umkehren, etwa Verapamil oder Cyclosporin A, nicht wesentlich umgekehrt.

[0044] Die Begriffe „arzneimittelresistent" und „Arzneimittelresistenz", wie sie hier verwendet werden, um eine Eigenschaft einer Zelle zu beschreiben, beziehen sich auf die Fähigkeit der Zelle, ohne Zytotoxizität erhöhten Konzentrationen eines Medikaments zu widerstehen, verglichen mit einer geeigneten Kontrollzelle. Eine geeignete Kontrollzelle für eine Zelle, bei der durch fortgesetzte Exposition mit einem Medikament eine mehrfache Arzneimittelresistenz hervorgerufen wurde, ist die Stammzelle, aus der die arzneimittelresistente Zelle abgeleitet wurde. Eine geeignete Kontrollzelle für eine Zelle, die durch Expression eines Proteins, das der Zelle Arzneimittelresistenz verleiht, in der Zelle arzneimittelresistent gemacht wurde, ist dieselbe Zelle ohne Expression des Proteins. Geeignete Kontrollzellen für natürlich vorkommende Tumorzellen, bei denen in vivo durch fortgesetzte Exposition mit einem Medikament eine mehrfache Arzneimittelresistenz hervorgerufen wurde, sind dieselben Tumorzellen zum Zeitpunkt der ersten Exposition mit dem Medikament.

[0045] Die Erfindung stellt isolierte Nukleinsäuren bereit, welche Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP codieren. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäure eine cDNA, die eine in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz enthält. Die Erfindung stellt ferner Antisense-Nukleinsäuren der Nukleinsäuren, welche Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP codieren, bereit. Die Erfindung stellt ferner rekombinante Expressionsvektoren bereit, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und Antisense-Nukleinsäuren enthalten, sowie transformante Wirtszellen, die erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäuren enthalten, bereit.

[0046] Die Erfindung stellt isolierte Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP sowie ein Verfahren zur Präparation solcher Proteine bereit. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das isolierte Protein mit der biologischen Aktivität von MRP eine Aminosäuresequenz wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt. Das Protein, das die Aminosäurensequenz von SEQ ID NO: 2 enthält, ist ein Mitglied der ABC-Superfamilie von Membrantransportproteinen. Die Erfindung stellt ferner für die erfindungsgemäßen isolierten Proteine spezifische Antikörper sowie Rezepturen bereit, die zur Verabreichung geeignet sind und solche Antikörper enthalten. Die Erfindung stellt ferner nichtmenschliche transgene und Knockout-Tiere bereit, die mithilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erzeugt wurden.

[0047] Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Identifizieren einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle mithilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und Antikörper bereit. Ferner stellt die Erfindung Verfahren bereit, um mithilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und Antikörper eine mehrfache Arzneimittelresistenz einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle zu hemmen und um eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle abzutöten. Ferner stellt die Erfindung Verfahren bereit, um mithilfe der erfindungsgemäßen transformanten Wirtszellen und Tiere Substanzen zu identifizieren, die Chemosensibilisatoren von therapeutischen Mitteln oder zytotoxisch für arzneimittelresistente Zellen sind. Darüber hinaus stellt die Erfindung Diagnosekits zur Identifizierung arzneimittelresistenter Tumorzellen bereit.

[0048] Diese und weitere Gesichtspunkte der Erfindung werden in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

I. Isolierte Nukleinsäuren

[0049] Die Erfindung stellt isolierte Nukleinsäuren bereit, welche Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP codieren. Der Begriff „isoliert" bezieht sich auf eine Nukleinsäure, die im Wesentlichen frei ist von Zellmaterial oder Kulturmedium, wenn sie durch rekombinante DNA-Verfahren erzeugt wird, oder von Vorläuferprodukten oder anderen chemischen Stoffen, wenn sie chemisch synthetisiert wird. Eine „isolierte" Nukleinsäure ist außerdem frei von Sequenzen, die natürlicherweise die Nukleinsäure in dem Organismus, aus dem die Nukleinsäure abgeleitet wurde, flankieren (d. h. Sequenzen, die am 5'- und 3'-Ende der Nukleinsäure angeordnet sind). Der Begriff „Nukleinsäure" soll DNA und RNA beinhalten, die entweder doppelsträngig oder einsträngig sein können. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäure eine cDNA, welche eine in SEQ ID NO: 1 dargestellte Nukleotidsequenz enthält. In einer anderen Ausführungsform ist die Nukleinsäure eine cDNA, die die Codierregion der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleotidsequenz enthält. In einer weiteren Ausführungsform codiert die Nukleinsäure ein Protein, das die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthält.

[0050] Es ist einzusehen, dass die Erfindung Nukleinsäuren, die eine wesentliche Sequenzhomologie zu der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenz aufweisen, oder codierende Proteine mit wesentlicher Homologie zu der in SEQ ID NO: 2 gezeigten Aminosäuresequenz umfasst. Homologie bezieht sich auf die Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen und kann festgestellt werden, indem eine Position in jeder Sequenz verglichen wird, die zu Vergleichszwecken gegenübergestellt werden können. Wenn eine Position in der verglichenen Sequenz

mit derselben Nukleotidbase oder Aminosäure besetzt ist, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog. Ein Grad der Homologie zwischen Sequenzen ist abhängig von der Anzahl der übereinstimmenden oder homologen Positionen, die die Sequenzen gemeinsam haben.

[0051] Der Ausdruck „Sequenzen, die eine wesentliche Sequenzhomologie aufweisen" bezeichnet solche Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, die geringfügige oder unbedeutende Sequenzvariationen gegenüber den in SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 gezeigten Sequenzen aufweisen, d. h., die homologen Nukleinsäuren haben im Wesentlichen dieselbe Funktion und produzieren im Wesentlichen dieselben Polypeptide wie die eigentlichen Sequenzen. Die Variationen können auf örtliche Mutationen oder strukturelle Veränderungen zurückzuführen sein. Es wird erwartet, dass in verschiedenen Regionen der Nukleotid- oder Aminosäuresequenz Substitutionen oder Veränderungen vorgenommen werden können, ohne die Funktion des Proteins zu beeinflussen, insbesondere, wenn sie außerhalb der Regionen erfolgen, denen funktionale Bedeutung beigemessen wird.

[0052] Eine Analyse des durch SEQ ID NO: 1 codierten Proteins, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 enthält, ergibt 12 hydrophobe Abschnitte, die voraussichtlich membranspannende Regionen und von funktionaler Bedeutung sind. Diese Aminosäurerückstände korrespondieren mit den Positionen 99–115, 137–153, 175–191, 365–381, 444–460, 466–482, 555–571, 591–607, 969–985, 1028–1044, 1102–1118 und 1205–1221 von SEQ ID NO: 2. Nukleotidsubstitutionen, die zu Änderungen der Aminosäuresequenz in diesen Regionen führen, insbesondere solche, die die hydrophobe Beschaffenheit dieser Regionen verringern, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in ein funktionales Protein umgesetzt.

[0053] Eine Analyse des durch SEQ ID NO: 1 codierten Proteins, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 enthält, ergibt zwei Regionen mit den strukturellen Eigenschaften von Nukleotid-Bindungsfalten (NBF), die für ABC (ATP-binding Cassette)-Domänen typisch sind. Siehe Hyde, S. C. et al., Nature 346, 362–365 (1990). Elemente, die einen Teil der Struktur dieser NBFs haben, werden in anderen Mitgliedern der ABC-Superfamilie von Membrantransportproteinen konserviert, und es wurde gezeigt, dass die Domänen Nukleotide binden und funktionale Bedeutung haben. Siehe beispielsweise Higgins, C. F., Ann. Rev. Cell Biol. 8, 67–113 (1992). In dem Protein, das die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthält, befinden sich die beiden NBFs in etwa zwischen den Aminosäurerückständen 661–810 und 1310–1469 von SEQ ID NO: 2. Nukleotide und korrespondierende Aminosäuresubstitutionen, die den Grad der Homologie dieser Regionen verglichen mit anderen Mitgliedern der ABC-Superfamilie von Membrantransportproteinen verringern, werden mit großer Wahrscheinlichkeit in einem funktionalen Protein nicht toleriert. Alternativ werden Nukleotide und korrespondierende Aminosäuresubstitutionen, die die Struktur einer NBF wahren, wahrscheinlich toleriert. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Nukleotide, die eine NBF eines Mitglieds der ABC-Superfamilie von Membrantransportproteinen codieren, unter Erhaltung der Funktion des Proteins durch die homologe Domäne eines anderen Familienmitglieds ersetzt werden können. Siehe Buschman, F., und Gros, P., Mol. Cell. Biol. 11, 595–603 (1991). Entsprechend stellt die Erfindung eine Nukleinsäure bereit, die ein Protein codiert, welches eine durch die Formel V-W-X-Y-Z repräsentierte Aminosäuresequenz enthält, wobei V für Aminosäurerückstände korrespondierend zu Aminosäurerückständen von etwa 1 bis 660 von SEQ ID NO: 2 steht, W für Aminosäurerückstände von einer im Wesentlichen mit Aminosäurerückständen von etwa 661 bis 810 von SEQ ID NO: 2 homologen NBF steht, X für Aminosäurerückstände korrespondierend zu Aminosäurerückständen von etwa 811 bis 1309 von SEQ ID NO: 2 steht, Y für Aminosäurerückstände von einer im Wesentlichen mit Aminosäurerückständen von etwa 1310 bis 1469 von SEQ ID NO: 2 homologen NBF steht und Z für Aminosäurerückstände korrespondierend zu Aminosäurerückständen von etwa 1470 bis 1531 von SEQ ID NO: 2 steht. Der Ausdruck „von etwa" bedeutet hier, dass die Verbindung zwischen zwei Regionen des Proteins (z. b. zwischen V und W) um einige Aminosäuren von den jeweils angegebenen abweichen kann.

[0054] Es wird angenommen, dass außerhalb der oben angegebenen Regionen eine Nukleinsäure, die ein Protein codiert, welches eine Aminosäuresequenz enthält, die zu etwa 50% der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 ähnlich ist, funktionale Proteine ergibt. Alternativ können Proteine, die eine zu 60%, 70%, 80% oder 90% mit der in SEQ ID NO: 2 gezeigten Aminosäuresequenz homologe Aminosäuresequenz enthalten, Proteine mit MRP-Aktivität ergeben. Die Erfindung umfasst eine Nukleinsäure, die ein Protein mit der biologischen Aktivität von MRP codiert, das zu mindestens 50% zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 homolog ist.

[0055] Es ist ferner einzusehen, dass Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die durch alternatives Spleißen einer mRNA entstehen, welche einer erfindungsgemäßen cDNA entspricht, in den Schutzbereich der Erfindung fallen. Die Hybridisierung einer erfindungsgemäßen cDNA, die die SEQ ID NO: 1 ganz oder teilweise enthält, zu zellularer RNA identifiziert eine mRNA von annähernd 6,5 kb mit einem erweiterten offenen Leserahmen von 1531 Aminosäuren. Mehrere cDNA-Klone wurden isoliert, die interne Löschungen enthalten,

welche den ursprünglichen Leserahmen erhalten, was nahelegt, dass sie durch alternatives Spleißen erzeugt werden können. Das Vorhandensein von mRNA-Arten, die diese Löschungen enthalten, wurde durch reverse PCR von RNA aus mehrfach arzneimittelresistenten ebenso wie aus medikamentenempfindlichen Zellen bestätigt. In den meisten Fällen repräsentieren die mRNA-Varianten kleinere Komponenten von 10% oder weniger. Einige allerdings umfassen über 20% der gesamten MRP mRNA. Alternative Spleißformen wurden identifiziert, die die Nukleotide 657 bis 783 von SEQ ID NO: 1 (Aminosäuren 155–196 einschließlich SEQ ID NO: 2), 1845 bis 1992 (einschließlich Aminosäuren 551–599), 2287 bis 2463 (einschließlich Aminosäuren 698–756), 2287 bis 2628 (einschließlich Aminosäuren 698–811) und 4230 bis etwa 4818 (einschließlich Aminosäuren 1346 bis 1531). Zwei der verbreiteteren Varianten fehlen Segmente der zum NH2-Ende hin gelegenen NBF. Beide beginnen an derselben Stelle (Aminosäure 698) und betreffen Regionen der Kassette, die sehr nahe und zum COOH-Ende zu der gängigen Exon 9 Spleißvariante der CFTR (Regulator der Transmembran-Leitfähigkeit bei zystischer Fibrose)-mRNA liegen. Siehe Chu, C-S. et al., EMBOJournal 10, 1355–1363 (1991). Die kürzere der beiden (Aminosäuren 698–756) eliminiert ein Phenylalanin an einer Position, die F508 des CFTR entspricht. Die längere (Aminosäuren 698–811) entfernt die Signatur der aktiven Transportfamilie, die die konservierte LSGGQ-Sequenz und das Walker-B-Motiv enthält. Einer weiteren der verbreiteteren Varianten (Aminosäuren 1346–1531) fehlt eine Region, die ein Segment des Proteins nahe bei dem COOH-Terminus spezifiziert, ähnlich der durch alternatives Spleißen von Exon 23 der CFTR mRNA betroffenen Stelle. Siehe Yoshimura, K., et al., J. Biol. Chem. 268, 686–690 (1993). Darüber hinaus wurden zwei weitere Löschungen identifiziert, eine, die zwei der Transmembrandomänen in der zum NH2-Ende hin gelegenen Hälfte des Moleküls eliminiert (Aminosäuren 551–599), und eine zweite, die eine potentielle Spaltstelle für das sekretorische Signalzwischen den Aminosäuren 189/190 entfernt (Aminosäuren 155–196).

[0056] Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung stellt eine Nukleinsäure bereit, welche unter hochstringenten und niedrigstringenten Bedingungen zu einer Nukleinsäure hybridisiert, die ein Protein codiert, welches die gesamte bzw. einen Teil der in SEQ ID NO: 2 gezeigte(n) Aminosäuresequenz enthält. Entsprechende Stringenzbedingungen, die die DNA-Hybridisierung begünstigen, beispielsweise 6,0 × Natriumchlorid/Natriumzitrat (SSC) bei 45°C, gefolgt von einem Waschschritt mit 2,0 × SSC bei 50°C, sind Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt oder können in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1–6.3.6 gefunden werden. Beispielsweise kann die Salzkonzentration in dem Waschschritt von einer niedrigen Stringenz von etwa 2,0 × SSC bei 50°C bis zu einer hohen Stringenz von etwa 0,2 × SSC bei 50°C gewählt werden. Zusätzlich kann die Temperatur des Waschschritts erhöht werden von niedrigstringenten Bedingungen bei Raumtemperatur von etwa 22°C bis zu hochstringenten Bedingungen bei etwa 65°C.

[0057] Isolierte Nukleinsäuren, die ein Protein mit der biologischen Aktivität von MRP codieren wie hier beschrieben, und mit einer Sequenz, die aufgrund einer Entartung des genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz abweicht, fallen ebenfalls in den Schutzbereich dieser Erfindung. Solche Nukleinsäuren codieren funktional gleichwertige Proteine (z. B. ein Protein mit MRP-Aktivität), unterscheiden sich jedoch in der Sequenz aufgrund einer Entartung des genetischen Codes von der Sequenz von SEQ ID NO: 1. Beispielsweise wird eine Anzahl von Aminosäuren durch mehr als ein Triplett bezeichnet. Codons, die dieselbe Aminosäure spezifizieren, oder Synonyme (z. B. sind CAU und CAC Synonyme für Histidin) können aufgrund der Entartung des genetischen Codes vorkommen. Als ein Beispiel können DNA-Sequenzpolymorphismen innerhalb der Nukleotidsequenz eines MRP-Proteins (insbesondere diejenigen in der dritten Base eines Codons) zu „stillen" Mutationen in der DNA führen, die sich nicht auf die codierte Aminosäure auswirken. Es wird allerdings erwartet, dass in einer Population DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Veränderungen in den Aminosäuresequenzen eines MRP-Proteins führen, vorliegen. Für Fachleute auf diesem Gebiet ist einzusehen, dass diese Variationen in einem oder mehreren Nukleotid(en) (bis zu etwa 3–4% der Nukleotide) der Nukleinsäuren, welche Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP codieren, aufgrund der natürlichen allelischen Variation bei Individuen in einer Population vorhanden sein können. Alle diese Nukleotidvariationen und daraus resultierenden Aminosäurepolymorphismen fallen in den Schutzbereich dieser Erfindung. Darüber hinaus können eine oder mehrere Isoformen oder verwandte, kreuzreagierende Familienmitglieder des hier beschriebenen MRP vorhanden sein. Derartige Isoformen oder Familienmitglieder werden definiert als in der biologischen Aktivität und Aminosäuresequenz mit MRP verwandte, jedoch durch Gene an anderen Loci codierte Proteine.

[0058] Eine isolierte Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung, die ein Protein mit der biologischen Aktivität von MRP codiert, lässt sich aus einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelllinie isolieren, die Resistenz gegen solche Medikamente wie Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide aufweist, die durch Chemosensibilisatoren, welche von P-Glykoprotein verliehene mehrfache Arzneimittelresistenzen umkehren, etwa Verapamil oder Cyclosporin A, nicht wesentlich umgekehrt wird. Ein Beispiel einer solchen Zelllinie ist H69AR. Weitere geeignete Zelllinien können erzeugt werden durch schrittweise Selektion einer nicht-resistenten Zelllinie in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen eines Medikaments, gegen das über einen Zeitraum von

mehreren Monaten bis Jahren Resistenz erworben werden soll. Beispielsweise wird eine Zelllinie in Anwesenheit eines Anthrazyklins, vorzugsweise Doxorubicin, für etwa 14 Monate kultiviert. Danach wird die mehrfache Arzneimittelresistenz beurteilt, indem die selektierte Zelllinie anderen Arzneimitteln ausgesetzt wird, beispielsweise einem Epipodophyllotoxin wie VP-16 und einem Vinca-Alkaloid wie Vincristin, und die Zytotoxizität des Arzneimittels für die Zelllinie bestimmt wird. Die Fähigkeit von Chemosensibilisatoren, die die von P-Glykoprotein verliehene mehrfache Arzneimittelresistenzen umkehren, etwa Verapamil oder Cyclosporin A, die mehrfache Arzneimittelresistenz umzukehren, wird anschließend dadurch beurteilt, dass die selektierte Zelllinie diesen Mitteln in Anwesenheit der resistenten Arzneimittel ausgesetzt wird. Eine ausführliche Beschreibung der Prozeduren, mit denen eine mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie wie H69AR zu erzeugen ist, findet sich in Cole, Cancer Chemother Pharmacol. 17, 259–263 (1986), und in Mirski et al., Cancer Research 47, 2594–2598 (1987).

[0059] Eine geeignete mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie (z. B. eine mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie, die Resistenz gegen Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide zeigt, welche durch Verapamil oder Cyclosporin A nicht wesentlich umgekehrt wird) wird verwendet, um eine erfindungsgemäße Nukleinsäure zu isolieren, indem mithilfe von Standardverfahren aus dieser Zelllinie eine cDNA-Bibliothek präpariert wird und diese Bibliothek mit cDNA gescreent wird, welche aus Gesamt-mRNA erzeugt wurde, die aus der mehrfach arzneimittelresistenten Zelllinie und ihrer medikamentenempfindlichen parentalen Zelllinie isoliert wurde. Beispielsweise wird eine aus Gesamt-mRNA von H69AR-Zellen bestehende cDNA-Bibliothek aufgebaut. Die Bibliothek wird ausplattiert und zwei Sätze Replika-Filter werden nach Standardverfahren präpariert. Ein Filtersatz wird dann mit aus H69AR-mRNA präparierter cDNA gescreent der andere Filtersatz wird mit einer vergleichbaren Menge von aus H69-mRNA präparierter cDNA gescreent. Die zum Screening der Bibliothek verwendete cDNA wird markiert, üblicherweise mit einem radioaktiven Marker. Nach der Visualisierung der Hybridisierungsergebnisse durch Standardprozeduren können aus der Bibliothek cDNA-Klone selektiert werden, die eine erhöhte Hybridisierung mit H69AR-cDNA im Vergleich zu H69-cDNA zeigen. Diese cDNAs werden von mRNAs abgeleitet, die in H69AR-Zellen verglichen mit H69-Zellen überexprimiert sind. Für Beschreibungen des differenziellen Screenings der cDNA-Bibliothek siehe King, C. T., et al., J. Bio. Chem. 254, 6781 (1979); Van der Bliek, A. M., et al., Mol. Cell. Biol. 6, 1671 (186).

[0060] Die Bestimmung, ob eine so isolierte cDNA die biologische Aktivität von MRP besitzt, kann erfolgen, indem die cDNA mithilfe von Standardverfahren in einer nicht resistenten Säugetierzelle zur Expression gebracht und beurteilt wird, ob die Expression des durch die cDNA codierten Proteins in der Zelle der Zelle eine mehrfache Arzneimittelresistenz gegen Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide verleiht, die durch Verapamil oder Cyclosporin A nicht wesentlich umgekehrt wird. Eine cDNA mit der biologischen Aktivität von MRP, die so isoliert wurde, kann mithilfe von Standardverfahren, etwa der Dideoxynukleotid-Ketten- oder der chemischen Maxam-Gilbert-Sequenzierung, sequenziert werden, um die Nukleinsäuresequenz und die vorausgesagte Aminosäuresequenz des codierten Proteins zu bestimmen.

[0061] Eine erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäure, die eine DNA ist, kann außerdem isoliert werden, indem eine markierte Nukleinsäuresonde präpariert wird, die die gesamte oder einen Teil der in SEQ ID NO: 1 gezeigte(n) Nukleotidsequenz enthält, und diese markierte Nukleinsäuresonde zum Screening einer geeigneten DNA-Bibliothek (z. B. einer cDNA- oder genomischen DNA-Bibliothek) verwendet wird. Beispielsweise kann eine cDNA-Bibliothek, die aus einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelllinie erzeugt wurde wie oben beschrieben, verwendet werden, um eine ein Protein mit MRP-Aktivität codierende cDNA zu isolieren, indem die Bibliothek mit der markierten Sonde mithilfe von Standardverfahren gescreent wird. Vorzugsweise wird eine H69AR cDNA-Bibliothek verwendet. Alternativ kann eine genomische DNA-Bibliothek in ähnlicher Weise gescreent werden, um ein genomisches Klon zu isolieren, das ein Gen enthält, welches ein Protein mit MRP-Aktivität codiert. Wie in Beispiel 4 dargestellt, wurde ein menschliches MRP-Gen auf Chromosom 16 kartiert. Daher kann auch eine Chromosom-16-Bibliothek statt der gesamten genomischen DNA-Bibliothek verwendet werden, um ein menschliches MRP-Gen zu isolieren. Durch Screening einer cDNA- oder genomischen DNA-Bibliothek isolierte Nukleinsäuren können mittels Standardverfahren sequenziert werden.

[0062] Eine erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäure, die eine DNA ist, kann auch dadurch isoliert werden, dass selektiv eine ein Protein mit MRP-Aktivität codierende Nukleinsäure im Polymerase-Kettenreaktions(PCR)-Verfahren und mit genomischer DNA oder mRNA amplifiziert wird. Zur Präparation von cDNA aus mRNA kann zellulare Gesamt-mRNA, beispielsweise aus einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelllinie, durch verschiedene Verfahren isoliert werden, z. B. die Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsprozedur nach Chirgwin et al., Biochemistry, 18, 5294–5299 (1979). Anschließend wird cDNA mithilfe von Reverse-Transkriptase synthetisiert. Reverse-Transkriptase des Moloney MLV von GibcoBRL, Bethesda, MD, oder Reverse-Transkriptase des AMV von Seikagaku America Inc., St. Petersburg, FL, werden vorzugsweise einge-

setzt. Es ist möglich, synthetische Oligonukleotid-Primer aus der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenz für die Verwendung in der PCR zu bilden. Eine Nukleinsäure kann unter Verwendung dieser Oligonukleotid-Primer und standardmäßiger PCR-Verstärkungsverfahren aus cDNA oder genomischer DNA amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor einkloniert und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden.

[0063] Eine erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäure, die RNA ist, kann isoliert werden durch Klonierung einer erfindungsgemäßen cDNA in einen geeigneten Vektor, der die Transkription der cDNA zur Bildung eines RNA-Moleküls erlaubt, welches ein Protein mit MRP-Aktivität codiert. Beispielsweise kann eine cDNA nach einem bakteriophagen Promotor, z. B. einem T7-Promotor, in einen Vektor einkloniert werden und kann die cDNA in vitro mit T7-Polymerase transkribiert werden. Eine daraus resultierende RNA kann in Standardverfahren isoliert werden.

[0064] Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, beispielsweise ein Oligonukleotid, kann auch mithilfe von Standardverfahren chemisch synthetisiert werden. Verschiedene Verfahren der chemischen Synthetisierung von Polydeoxynukleotiden sind bekannt, einschließlich der Festphasensynthese, die wie auch die Peptid-Synthese in kommerziell verfügbaren DNA-Synthetisatoren vollständig automatisiert wurden (siehe z. B. Itakura et al., US-Patent 4.598.049; Carushers et al., US-Patent Nr. 4.458.066; und Itakura, US-Patent Nr. 4.401.796 und 4.373.071).

[0065] Die Analyse der Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 1 mit gängigen hierfür entwickelten Computerprogrammen, etwa PC/Gene – IntelliGenetics Inc., Kalif., erlaubt die Identifikation des Startcodons und untranslatierter Sequenzen eines MRP. Der cDNA-Codierstrang, als SEQ ID NO: 1 bezeichnet, enthält einen 4593 Nukleotide langen offenen Leserahmen, der 1531 Aminosäuren codiert, sowie 195 untranslatierte 5'-Nukleotide und 223 untranslatierte 3'-Nukleotide. Die Intron-Exon-Struktur und die Transkriptions-Regulatorsequenzen des Gens, das die MRP cDNA codiert, können bestimmt werden, indem mithilfe einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure eine genomische DNA-Klonbibliothek sondiert wird. Regulatorelemente wie Promotor und Enhancer, die für die Expression des das MRP codierenden Gens in verschiedenen Geweben benötigt werden, können mithilfe konventioneller Verfahren identifiziert werden. Die Funktion der Elemente kann bestätigt werden, indem sie dazu verwendet werden, ein Indikatorgen wie das bakterielle Gen lacZ, das operativ mit den Fragmenten verbunden ist, zur Expression zu bringen. Ein derartiges Konstrukt kann in Kulturzellen mithilfe von Standardverfahren oder in nichtmenschliche transgene Tiermodelle eingebracht werden. Zusätzlich zur Identifikation von Regulatorelementen in DNA können solche Konstrukte auch verwendet werden, um Nuklearproteine zu identifizieren, die mit diesen Elementen interagieren, wozu in der Technik bekannte Verfahren genutzt werden.

[0066] Eine Anzahl von einzigartigen Spaltstellen für Restriktionsenzyme sind in der Nukleinsäure enthalten, die die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst. Diese Spaltstellen ermöglichen den Zugang zu Nukleotidfragmenten, die für Polypeptide codieren, welche für das durch SEQ ID NO: 1 codierte Protein (d. h. ein erfindungsgemäßes Protein) einzigartig sind.

[0067] Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuren oder Oligonukleotid-Fragmente der isolierten Nukleinsäuren erlauben Fachleuten auf diesem Gebiet, Nukleotidsonden zu konstruieren, die zum Nachweis von Nukleotidsequenzen in biologischen Materialien wie beispielsweise Tumorzellproben verwendet werden. Eine Nukleotidsonde kann mit einem radioaktiven Element markiert werden, das ein geeignetes Signal als Nachweismittel darstellt und eine ausreichende Halbwertzeit hat, um für den Nachweis genutzt werden zu können, etwa ^{32}P, ^{3}H, ^{14}C oder ähnlich. Andere Materialien, die zum Markieren der Sonde verwendet werden können, umfassen Antigene, die durch einen speziell markierten Antikörper erkannt werden, fluoreszierende Zusammensetzungen, Enzyme, Antikörper, die für ein markiertes Antigen spezifisch sind, und chemilumineszente Zusammensetzungen. Ein geeigneter Marker kann unter Berücksichtigung der Hybridisierungsrate und Bindung der Sonde an das nachzuweisende Nukleotid sowie der Menge des Nukleotids, die für die Hybridisierung verfügbar ist, gewählt werden.

II. Antisense-Nukleinsäuren

[0068] Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Antisense-Nukleinsäure einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder ein Oligonukleotid-Fragment davon. Eine Antisense-Nukleinsäure kann ein Nukleotidsequenz enthalten, die zu einem codogenen Strang einer Nukleinsäure komplementär ist, z. B. komplementär zu einer mRNA-Sequenz, die gemäß den Regeln der Basenpaarung von Watson und Crick aufgebaut ist, und kann hydrogen an den codogenen Strang der Nukleinsäure binden. Die Antisense-Sequenz, die zu einer Sequenz einer mRNA

komplementär ist, kann komplementär zu einer in der Codierregion der mRNA zu findenden Sequenz sein oder kann komplementär zu einer 5' oder 3' untranslatierten Region der mRNA sein. Darüber hinaus kann eine Antisense-Nukleinsäure in der Sequenz komplementär zu einer Regulatorregion des die mRNA codierenden Gens sein, beispielsweise eine Transkriptions-Initiationssequenz oder ein Regulatorelement. Vorzugsweise wird eine Antisense-Nukleinsäure komplementär zu einer Region, die dem Startcodon vorangeht oder dieses überspannt oder in der 3' untranslatierten Region einer mRNA liegt, verwendet. Eine Antisense-Nukleinsäure kann basierend auf der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenz aufgebaut werden. Es wird eine Nukleinsäure aufgebaut, die eine zu einer Sequenz der codierenden oder untranslatierten Region der gezeigten Nukleinsäure komplementäre Sequenz enthält. Alternativ kann eine Antisense-Nukleinsäure basierend auf Sequenzen eines MRP-Gens aufgebaut werden, das durch Screening einer genomischen Bibliothek wie weiter oben beschrieben identifiziert wurde. Beispielsweise kann die Sequenz eines wichtigen Regulatorelements wie oben beschrieben bestimmt werden und kann eine Sequenz, die zu dem Regulatorelement antisense ist, aufgebaut werden.

[0069] Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren und Oligonukleotide können mittels chemischer Synthese oder enzymatischer Ligationsreaktionen nach in der Technik bekannten Prozeduren aufgebaut werden. Die Antisense-Nukleinsäuren und Oligonukleotide können chemisch synthetisiert werden, unter Verwendung von natürlich vorkommenden Nukleotiden oder unterschiedlich modifizierten Nukleotiden, die dafür ausgelegt sind, die biologische Stabilität der Moleküle oder die physische Stabilität der zwischen den Antisense- und den Sense-Nukleinsäuren gebildeten Doppelhelix zu erhöhen, d. h. es können Phosphorothioat-Derivate und Aricidin-substituierte Nukleotide verwendet werden. Alternativ können die Antisense-Nukleinsäuren und Oligonukleotide biologisch erzeugt werden, indem ein Expressionsvektor verwendet wird, in den eine Nukleinsäure in einer Antisense-Ausrichtung subkloniert wurde (d. h. Nukleinsäure, die von der inserierten Nukleinsäure transkribiert wird, hat Antisense-Ausrichtung zu einer interessierenden Ziel-Nukleinsäure). Der Antisense-Expressionsvektor wird in Zellen in der Form eines rekombinanten Plasmids, Phagmids oder abgeschwächten Virus eingebracht, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter Kontrolle einer hocheffizienten Regulatorregion erzeugt werden, deren Aktivität durch den Typ der Zelle bestimmt werden kann, in die der Vektor eingebracht wird. Für eine Diskussion der Regulierung der Genexpression mithilfe von Antisense-Genen siehe Weintraub, H., et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews – Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986.

III. Rekombinante Expressionsvektoren

[0070] Die Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung, die Proteine mit MRP-Aktivität codieren, können in bekannter Weise in einen rekombinanten Expressionsvektor eingebunden werden, was eine gute Expression des codierten Proteins oder von Teilen davon gewährleistet. Die rekombinanten Expressionsvektoren sind „geeignet zur Transformation einer Wirtszelle", das bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein Oligonukleotid-Fragment davon und eine Regulatorsequenz enthalten, die basierend auf der für die Expression zu verwendenden Wirtszelle gewählt werden, welche operativ mit der Nukleinsäure oder dem Oligonukleotid-Fragment verbunden ist. Mit „operativ verbunden" soll ausgedrückt werden, dass die Nukleinsäure mit einer Regulatorsequenz in einer Weise verbunden ist, die die Expression der Nukleinsäure zulässt. Regulatorsequenzen sind in der Technik bekannt und werden für die direkte Expression des gewünschten Proteins in einer geeigneten Wirtszelle gewählt. Entsprechend beinhaltet der Begriff „Regulatorsequenz" Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente. Solche Regulatorsequenzen sind Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt, oder es kann eine der in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, KA (1990), beschriebenen verwendet werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Ausgestaltung des Expressionsvektors von Faktoren wie der Wahl der zu transfektierenden Wirtszelle und/oder dem Typ des Proteins, das exprimiert werden soll, abhängen kann. Derartige Expressionsvektoren können zur Transfektion von Zellen verwendet werde, um hierdurch Proteine oder Peptide zu erzeugen, die durch Nukleinsäuren codiert werden wie hier beschrieben.

[0071] Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von codierten Proteinen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ausgestaltet werden. Beispielsweise können Proteine in bakteriellen Zellen wie etwa E. coli, Insektenzellen (mithilfe des Baculovirus), Hefezellen oder Säugetierzellen exprimiert werden. Weitere geeignete Wirtszellen sind in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, KA (1990), zu finden.

[0072] Eine Expression in Prokaryoten erfolgt meist in E. coli mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusionsproteinen oder Nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren fügen eine Anzahl von Aminosäuren gewöhnlich am Amino-Terminus des exprimierten Zielgens hinzu. Solche Fusionsvektoren haben üblicherweise einen dreifachen Zweck: 1) die Expression des rekombi-

nanten Proteins zu verstärken; 2) die Löslichkeit des rekombinanten Zielproteins zu erhöhen; und 3) die Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins zu unterstützen, indem sie als Ligand bei der Affinitätsaufreinigung fungieren. Häufig wird in Fusionsexpressionsvektoren an der Verbindung von Fusionsanteil und rekombinantem Zielprotein eine proteolytische Spaltstelle eingefügt, um die Trennung des rekombinanten Zielproteins von dem Fusionsanteil nach der Aufreinigung des Fusionsproteins zu ermöglichen. Solche Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen beinhalten Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase. Typische Fusionsexpressionsvektoren beinhalten pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australien), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), die Glutathion-S-Transferase, Maltose-Ebindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

[0073] Induzierbare Nicht-Fusionsexpressionsvektoren beinhalten pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69: 301–315) und pET 11d (Studier et a., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60–89). Während die Zielgenexpression auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von dem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor in pTrc beruht, stützt sich die Expression von in pET 11d inserierten Zielgenen auf die Transkription von dem T7-gn10-lac-0-Fusionspromotor, die von einer koexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21(DE3) oder HMS174(DE3) von einem residenten λ-Prophagen geliefert, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV-5-Promotors birgt.

[0074] Eine Strategie zur Maximierung der Expression des rekombinanten Proteins in E. coli ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins abgeschwächt ist (Gottesman, S. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119–128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure (z. B. eine Nukleinsäure, die ein MRP-Protein codiert), sodass die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in hochexprimierten E.-coli-Proteinen verwendet werden (Wada et al. (1992) Nuc. Acids Res. 20: 2111–2118). Diese Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Syntheseverfahren.

[0075] Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe S. cerevisiae umfassen pYepSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6: 229–234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30: 933–943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113–123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, KA).

[0076] Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in kultivierten Insektenzellen (bspw. SF-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156–2165) und die pVL-Reihe (Lucklow L. A. und Summers M. D. (1989) Virology 170: 31–39).

[0077] Die Expression eines MRP-Proteins in Säugetierzellen erfolgt mit einem Säugetier-Expressionsvektor. Beispiele für Säugetier-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329: 840) und pMP2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6: 187–195). Bei der Verwendung in Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen Elementen bereitgestellt. Beispielsweise stammen gemeinhin verwendete Promotoren aus Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalievirus und meistens aus Simianvirus 40. Vorzugsweise wird der pRc/CMV-Expressionsvektor (Invitrogen) verwendet. In dem pRc/CMV-Vektor wird die in den zu exprimierenden Vektor eingebrachte Nukleinsäure durch die Enhancer/Promotor-Sequenz aus dem Sofortgen des humanen Cytomegalievirus gesteuert. Zusätzlich wird durch den Vektor ein Gen codiert, das Neomycin-Resistenz verleiht. In einer Ausführungsform kann der rekombinante Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in einem bestimmten Zelltyp bewirken. Das bedeutet, dass die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors durch Regulatorsequenzen bereitgestellt werden, die die vorzugsweise Expression einer in dem Vektor enthaltenen Nukleinsäure in einem bestimmten Zelltyp erlauben, sodass eine gewebe- oder zelltypspezifische Expression eines codierten Proteins möglich wird. Beispielsweise kann eine ein Protein mit MRP-Aktivität codierende Nukleinsäure vorzugsweise in Herzmuskelzellen exprimiert werden, indem Promotor- und Enhancer-Sequenzen eines Gens verwendet werden, das vorzugsweise in Herzmuskelzellen zur Expression kommt, etwa ein Herz-Myosin-Gen oder ein Herz-Aktin-Gen.

[0078] Der erfindungsgemäße rekombinante Expressionsvektor kann ein Plasmid sein. Der erfindungsgemäße Expressionsvektor kann ferner ein Virus oder ein Teil davon sein, das die Expression einer in die virale Nukleinsäure eingebrachten Nukleinsäure erlaubt. Beispielsweise können replikationsdefekte Retroviren, Adenoviren und adeno-assoziierte Viren verwendet werden.

[0079] Die Erfindung stellt ferner einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, der ein erfindungsgemäßes

DNA-Molekül umfasst, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor einkloniert ist. Dies bedeutet, dass das DNA-Molekül derart mit einer Regulatorsequenz operativ verbunden ist, dass die Expression durch Transkription des DNA-Moleküls eines RNA-Moleküls, das zur Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 1 antisense ist, möglich ist. Es können Regulatorsequenzen ausgewählt werden, die operativ an eine Antisense-Nukleinsäure gebunden sind und die die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, z. B. können virale Promotoren und/oder Enhancer oder Regulatorsequenzen ausgewählt werden, die die gewebe- oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern wie vorstehend beschrieben.

IV. Transformante Wirtszellen

[0080] Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können verwendet werden, um eine transformante Wirtszelle zu schaffen, die den rekombinanten Expressionsvektor enthält. Der Begriff „transformante Wirtszelle" soll prokaryotische und eukaryotische Zellen beinhalten, die mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektor transformiert oder transfektiert wurden. Die Begriffe „transformiert mit", „transfektiert mit", „Transformation" und „Transfektion" sollen das Einbringen von Nukleinsäure (z. B. eines Vektors) in eine Zelle mithilfe eines der zahlreichen möglichen, in der Technik bekannten Verfahren bezeichnen. Prokaryotische Zellen können beispielsweise mittels Elektroporation oder Kalzium-Chlorid-vermittelter Transformation mit Nukleinsäuren transformiert werden. Eine Nukleinsäure kann in Säugetierzellen mithilfe von konventionellen Verfahren eingebracht werden, etwa Kalzium-Phosphat- oder Kalzium-Chlorid-Kopräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofectin, Elektroporation oder Mikroinjektion. Geeignete Verfahren für die Transformation und Transfektion von Wirtszellen finden sich in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)) und anderen Labor-Textbüchern.

[0081] Die Anzahl der mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektor und mithilfe von Verfahren wie den vorstehend beschriebenen transformierten Wirtszellen ist abhängig von dem verwendeten Typ des rekombinanten Expressionsvektors und dem verwendeten Transformationsverfahren. Plasmidvektoren, die in Säugetierzellen eingebracht werden, werden nur mit geringer Frequenz in Wirtszellen-DNA integriert. Um diese Integranten zu identifizieren, wird im Allgemeinen ein Gen, das einen selektierbaren Marker enthält (d. h. Resistenz gegen Antibiotika) enthält, zusammen mit dem interessierenden Gen in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker beinhalten solche, die Resistenz gegen bestimmte Medikamente verleihen, etwa G418 und Hygromycin. Selektierbare Marker können auf einem separaten Plasmid der interessierenden Nukleinsäure eingebracht werden oder werden vorzugsweise auf demselben Plasmid eingebracht. Wirtszellen, die mit einem oder mehreren rekombinanten Expressionsvektoren, welche eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und ein Gen für einen selektierbaren Marker enthalten, transformiert werden, können durch Selektieren für Zellen identifiziert werden, indem ein selektierbarer Marker gewählt wird. Wenn beispielsweise der selektierbare Marker ein Gen codiert, das Neomycin-Resistenz verleiht (etwa pRc/CMV), können transformante Zellen mit G418 selektiert werden. Zellen, in denen das selektierbare Markergen enthalten ist, überleben, die anderen Zellen sterben ab.

[0082] Wie in den Beispielen 5 und 6 gezeigt, können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren einer medikamentenempfindlichen Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz gegen Medikamente einschließlich Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide verleihen, wenn sie in die Zelle transfektiert werden. Auf diese Weise können diese Medikamente als Selektionsmittel bei der Präparation einer transformanten Wirtszelle verwendet werden, statt einen unabhängigen selektierbaren Marker zu verwenden (etwa Neomycin-Resistenz). Daher sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht nur einsetzbar, um einer Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz zu verleihen, sondern auch als selektierbare Marker für Zellen, in die die Nukleinsäure eingebracht wurde. Siehe beispielsweise Pastan et al., US-Patent Nr. 5.166.059; Croop et al., US-Patent Nr. 5.198.344. Zellen werden selektiert, indem sie einem oder mehreren Medikament(en) ausgesetzt werden, gegen das/die die Nukleinsäure Resistenz verleiht. Eine MRP-codierende Nukleinsäure in einem rekombinanten Expressionsvektor kann zusammen mit einer zweiten Nukleinsäure, die ein interessierendes Gen enthält, in eine Zelle eingebracht werden, entweder in demselben Vektor oder in getrennten Vektoren, und transformante Zellen können basierend auf der von ihnen erworbenen Arzneimittelresistenz selektiert werden. Arzneimittelresistente Zellen, die selektiert werden, enthalten die MRP-codierende Nukleinsäure oft kointegriert mit dem interessierenden Gen. Darüber hinaus ist es möglich, durch schrittweises Erhöhen der Konzentration eines Medikaments, dass bei der Zellselektion verwendet wird, transformante Zellen mit einer größeren Anzahl von Kopien der eingebrachten Nukleinsäure zu erzeugen, die sowohl die MRP-codierende Nukleinsäure als auch ein interessierendes Gen enthalten. Daher sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren auch als verstärkbare Marker verwendbar.

[0083] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codieren Proteine „mit biologischer Aktivität von MRP". Die biologische Aktivität von MRP ist definiert als die Fähigkeit des Proteins, bei Expression in einer medikamentenempfindlichen Säugetierzelle der Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz gegen Medikamente wie Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide zu verleihen, die durch Chemosensibilisatoren, welche durch P-Glykoprotein vermittelte mehrfache Arzneimittelresistenz umkehren, beispielsweise Verapamil oder Cyclosporin A, nicht wesentlich umgekehrt wird. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auf MRP-Aktivität getestet werden, indem die Nukleinsäure in einen erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektor eingebaut wird, wodurch eine medikamentenempfindliche Säugetierzelle mit dem rekombinanten Expressionsvektor transformiert wird, um eine erfindungsgemäße transformante Wirtszelle zu erzeugen wie vorstehend beschrieben, und die mehrfache Arzneimittelresistenz der transformanten Wirtszelle getestet wird. Die mehrfache Arzneimittelresistenz der transformanten Wirtszelle wird getestet, indem die Zytotoxizität der zu testenden Medikamente (d. h. Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide) für die transformierte Zelle verglichen mit der nichttransformierten Zelle und die Fähigkeit anderer Medikamente (d. h. Verapamil und Cyclosporin A) zum Umkehren der mehrfachen Arzneimittelresistenz bestimmt wird. Beispielsweise ist die transformante Wirtszelle in einer bevorzugten Ausführungsform eine HeLa-Zelle und wird die mehrfache Arzneimittelresistenz der transfektierten HeLa-Zellen verglichen mit derjenigen von nichttransfektierten HeLa-Zellen oder vorzugsweise HeLa-Zellen, die mit dem parentalen Expressionsvektor transfektiert ist, dem die ein Protein mit MRP-Aktivität codierende Nukleinsäure fehlt.

V. Isolierte Proteine

[0084] Die Erfindung stellt isolierte Proteine bereit, die biologische Aktivität von MRP aufweisen. Der Begriff „isoliert" bezieht sich auf ein Protein, das im Wesentlichen frei ist von Zellmaterial oder Kulturmedium, wenn es durch rekombinante DNA-Verfahren erzeugt wird, oder von Vorläuferprodukten oder anderen chemischen Stoffen, wenn es chemisch synthetisiert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Protein mit der biologischen Aktivität von MRP eine Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 2 gezeigt wird. Alternativ kann das Protein durch eine Nukleinsäure codiert werden, die die Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 1 enthält. Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP, die im Wesentlichen Sequenzhomologie zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 aufweisen, wie weiter oben definiert, fallen ebenfalls in den Schutzbereich der Erfindung. Darüber hinaus fallen in den Schutzbereich der Erfindung Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP, die durch Nukleinsäuren codiert werden, welche unter hoch- oder niedrigstringenten Bedingungen wie oben definiert zu einer Nukleinsäure hybridisiert werden, die eine in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst. Außerdem fallen immunogene Abschnitte von MRP-Proteinen in den Schutzbereich der Erfindung. Wie in Beispiel 7 demonstriert, korrespondieren zwei immunogene Abschnitte eines Proteins, das eine in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthält, mit Aminosäurerückständen 932–943, die in SEQ ID NO: 2 gezeigt werden (Rückstände AELQKAEAKKEE) und Aminosäurerückständen 1427–1441 (Rückstände GENLSVGQRQLVCLA). Bevorzugte immunogene Abschnitte korrespondieren mit Regionen des Proteins, die nicht in anderen Mitgliedern der ABC-Superfamilie konserviert sind, d. h. außerhalb der beiden NBF-Domänen (Aminosäurerückstände 661–810 und 1310–1469), und enthalten Regionen zwischen den 12 membranspannenden Regionen. Ein immunogener Abschnitt hat eine Länge von mindestens acht Aminosäuren.

[0085] Das erfindungsgemäße MRP-Protein, oder Isoformen oder Teile davon, kann durch Expression in einer geeigneten Wirtszelle mit in der Technik bekannten Verfahren isoliert werden. Geeignete Wirtszellen umfassen prokaryotische oder eukaryotische Organismen oder Zelllinien, beispielsweise Hefe, E. coli und Insektenzellen. Die weiter oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können verwendet werden, um ein Protein mit MRP-Aktivität in einer Wirtszelle zu exprimieren, um das Protein zu isolieren. Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Präparation eines erfindungsgemäßen isolierten Proteins bereit, das umfasst, in eine Wirtszelle eine das Protein codierende rekombinante Nukleinsäure einzubringen, sodass das Protein in der Wirtszelle exprimiert werden kann, und das Protein zu isolieren. Vorzugsweise ist die rekombinante Nukleinsäure ein rekombinanter Expressionsvektor. Proteine können aus einer Wirtszelle, in der das Protein zur Expression kommt, nach Standardverfahren der Technik isoliert werden, die die Ammonium-Sulfat-Präzipitation, säulenchromatografische Fraktionierung (z. B. Ionenaustausch, Gelfiltration, Elektrophorese, Affinitätschromatografie etc.) und schließlich Kristallisierung (siehe allgemein Enzyme Purification and Related Techniques", Methods in Enzymology, 22, 233–577 (1971)) umfassen.

[0086] Alternativ können das Protein oder Teile davon durch chemische Synthese mithilfe von in der Proteinchemie ausreichend bekannten Verfahren präpariert werden, etwa Festphasensynthese (Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149–2154) oder Synthese in homogener Lösung (Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, Hrsg. E. Wansch, Bd. 151 und II, Thieme, Stuttgart).

VI. Antikörper

[0087] Die erfindungsgemäßen Proteine oder Teile davon können verwendet werden, um für die Proteine spezifische Antikörper zu präparieren. Es können Antikörper präpariert werden, die ein bestimmtes Epitop in einer nichtkonservierten Region des Proteins binden. Eine nicht konservierte Region des Proteins ist eine solche, die keine wesentliche Sequenzhomologie zu anderen Proteinen aufweist, beispielsweise anderen Mitgliedern der ABC-Superfamilie von Membrantransportproteinen. Beispielsweise können nichtkonservierte Regionen verwendet werden, die Sequenzen zwischen den zwölf membranspannenden Regionen ohne die NBF-Domänen umfassen. Alternativ kann eine Region von einer der beiden NBF-Domänen genutzt werden, um einen Antikörper zu einer konservierten Region eines MRP-Proteins zu präparieren. Ein Antikörper zu einer konservierten Region kann unter Umständen mit anderen Mitgliedern der ABC-Familie von Membrantransportproteinen reaktionsfähig sein. Konventionelle Verfahren können zur Präparation der Antikörper eingesetzt werden. Beispielsweise können unter Verwendung eines Peptids eines MRP-Proteins in Standardverfahren polyklonale Antiseren oder monoklonale Antikörper erzeugt werden. Wie in Beispiel 7 demonstriert, kann ein Säugetier (z. B. Maus, Hamster oder Kaninchen) mit einer immunogenen Form des Peptids immunisiert werden, was eine Antikörperreaktion in dem Säugetier auslöst. Verfahren zur Verleihung von Immunogenizität an ein Peptid beinhalten die Konjugation zu Trägern oder andere in der Technik bekannte Verfahren. Beispielsweise können die Peptide in Anwesenheit eines Adjuvans verabreicht werden. Der Fortschritt der Immunisierung kann durch Ermittlung von Antikörper-Titern in Plasma oder Serum überwacht werden. Standard-ELISA- oder andere Immunassays können mit dem Immunogen als Antigen verwendet werden, um die Antikörperpegel zu beurteilen. Nach der Immunisierung können Antiseren gewonnen und bei Bedarf polyklonale Antikörper aus den Seren isoliert werden.

[0088] Um monoklonale Antikörper zu erzeugen, können antikörperproduzierende Zellen (Lymphozyten) aus einem immunisierten Tier gewonnen und in standardmäßigen somatischen Zellfusionsverfahren mit Myelomzellen fusioniert werden, wodurch diese Zellen immortalisiert und Hybridome gewonnen werden. Diese Verfahren sind in der Technik ausreichend bekannt. Beispiele sind das ursprünglich von Kohler und Milstein entwickelte Hybridomverfahren (Nature 256, 495–497 (1975)) sowie weitere Verfahren wie das Verfahren mit menschlichen B-Zell-Hybridomen (Kozbor et al., Immunol. Today 4, 72 (1983)), das EBV-Hybridom-Verfahren zur Erzeugung von monoklonalen menschlichen Antikörpern (Cole et al. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., Seite 77–96) und Screening kombinatorischer Antikörperbibliotheken (Huse et al., Science 246, 1275 (1989)). Hybridome können immunchemisch auf die Produktion von Antikörpern, die speziell mit dem Peptid reagieren, und isolierte monoklonale Antikörper gescreent werden.

[0089] Der Begriff Antikörper, wie er hier verwendet wird, soll Fragmente davon mit einschließen, die ebenfalls spezifisch mit einem Protein oder einem Peptid davon reagieren, welches die biologische Aktivität von MRP aufweist. Antikörper können mithilfe konventioneller Verfahren fragmentiert werden, und die Fragmente können in derselben Weise wie oben für vollständige Antikörper beschrieben gescreent werden. Beispielsweise können F(ab')2-Fragmente durch die Behandlung des Antikörpers mit Pepsin erzeugt werden. Das resultierende F(ab')2-Fragment kann behandelt werden, um Disulfid-Brücken zum Produzieren von Fab'-Fragmenten zu reduzieren.

[0090] Wenn in nichtmenschlichen Subjekten produzierte Antikörper therapeutisch bei Menschen eingesetzt werden, werden sie in unterschiedlichem Maße als fremd erkannt und kann im Körper des Patienten eine Immunreaktion ausgelöst werden. Ein Ansatz zur Minimierung oder zum Ausschluss dieses Problems, das der allgemeinen Immunsuppression vorzuziehen ist, ist die Erzeugung von chimären Antikörperderivaten, d. h. Antikörpermolekülen, die eine variable Region von einem nichtmenschlichen Tier und eine konstante Region vom Menschen in sich vereinen. Chimäre Antikörpermoleküle können beispielsweise die Antigen-Bindungsdomäne eines Antikörpers von Maus, Ratte oder einer anderen Spezies mit konstanten menschlichen Regionen enthalten. Verschiedene Ansätze zur Erzeugung chimärer Antikörper wurden bereits beschrieben und können verwendet werden, um chimäre Antikörper zu erzeugen, die die variable Immunglobulin-Region enthalten, die das Genprodukt der neuartigen erfindungsgemäßen B-Lymphozyten-Antigene erkennt. Siehe beispielsweise Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1985); Takeda et al., Nature 314, 452 (1985), Cabilly et al., US-Patent Nr. 4.816.567; Boss et al., US-Patent Nr. 4.816.397; Tanaguchi et al., Europäische Patentveröffentlichung EP171496; Europäische Patentveröffentlichung 0173494, GB-Patent GB 2177096B. Es wird erwartet, dass solche chimären Antikörper in einem menschlichen Subjekt weniger immunogen wären als der entsprechende nicht-chimäre Antikörper.

[0091] Für humantherapeutische Zwecke können die monoklonalen oder chimären Antikörper, die speziell mit einem Protein mit der biologischen Aktivität von MRP oder einem Peptid davon reagieren wie hier beschrieben,

weiter humanisiert werden, indem Chimären mit konstanten menschlichen Regionen erzeugt werden, in denen Teile der variablen Regionen, speziell die konservierten Gerüstregionen der antigenbindenden Domäne, menschlichen Ursprungs und lediglich die hypervariablen Regionen nichtmenschlichen Ursprungs sind. Solche veränderten Immunglobulinmoleküle können nach einem beliebigen von verschiedenen in der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden (z. B. Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 7308–7312 (1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson et al., Meth. Enzymol., 92, 3–16 (1982)) und werden vorzugsweise entsprechend den Lehren der PCT-Publikation WO92/06193 oder von EP 0239400 hergestellt. Humanisierte Antikörper können kommerziell beispielsweise von Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Großbritannien, hergestellt werden. Humanisierte Antikörper mit reduzierter Immunogenizität werden für die Immuntherapie in menschlichen Subjekten bevorzugt. Die Immuntherapie mit humanisierten Antikörpern wird wahrscheinlich die Notwendigkeit einer begleitenden Immunsuppression verringern und kann zu einer langfristig gesteigerten Wirksamkeit bei der Behandlung chronischer Erkrankungssituationen oder Situationen, die wiederholte Antikörperbehandlungen erfordern, führen.

[0092] Ein weiteres Verfahren zur Erzeugung spezifischer Antikörper oder Antikörperfragmente, die auf ein Protein mit der biologischen Aktivität von MRP oder ein Peptid davon reagieren, ist das Screening von Expressionsbibliotheken, die Immunglobulin-Gene oder Teile davon codieren, welche in Bakterien mit aus den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hergestellten Peptiden zur Expression kommen. Beispielsweise können komplette Fab-Fragmente, VH-Regionen und FV-Regionen in Bakterien unter Verwendung von Phagenexpressionsbibliotheken exprimiert werden. Siehe beispielsweise Ward et al, Nature 341, 544–546: (1989); Huse et al., Science 246, 1275–1281 (1989); und McCafferty et al. Nature 348, 552–554 (1990). Screening dieser Bibliotheken, beispielsweise mit einem B7-2-Peptid, kann Immunglobulin-Fragmente identifizieren, die mit B7-2 reagieren. Alternativ kann die von Genpharm entwickelte SCID-hu-Maus für die Produktion von Antikörpern oder Fragmenten davon verwendet werden.

[0093] Die polyklonalen, monoklonalen oder chimären monoklonalen Antikörper können verwendet werden, um erfindungsgemäße Proteine, Teile davon oder eng verwandte Isoformen in verschiedenen biologischen Materialien nachzuweisen, beispielsweise können sie in ELISA-, Radioimmunassay- oder histochemischen Tests verwendet werden. Somit können die Antikörper dazu verwendet werden, die Menge eines erfindungsgemäßen MRP-Proteins, von Teilen davon oder von nahe verwandten Isoformen in einer Probe zu quantifizieren, um mehrfache Arzneimittelresistenz zu diagnostizieren, und die Rolle von MRP-Proteinen in bestimmten Zellereignissen oder pathologischen Zuständen zu bestimmen, insbesondere ihre Rolle im Zusammenhang mit mehrfacher Arzneimittelresistenz. Mithilfe der vorstehend beschriebenen Verfahren können polyklonale, monoklonale Antikörper oder chimäre monoklonale Antikörper für nicht konservierte Regionen von MRP entwickelt und dazu genutzt werden, MRP von nahe verwandten Isoformen und anderen Proteinen zu unterscheiden, die ein konserviertes Epitop gemeinsam haben.

[0094] Die polykonalen oder monoklonalen Antikörper können an eine nachweisbare Substanz gekoppelt werden. Der Begriff „gekoppelt" wird in der Bedeutung verwendet, dass die nachweisbare Substanz physisch an den Antikörper gebunden ist. Geeignete nachweisbare Substanzen schließen verschiedene Enzyme, prostethische Gruppen, fluoreszierende, luminiszente und radioaktive Materialien ein. Bespiele geeigneter Enzyme umfassen Meerrettichperoxidase, Alkaliphosphatase, β-Galactosidase oder Acetylcholinesterase; Beispiele geeigneter prothetischer Gruppenkomplexe umfassen Streptavidin/Biotin und Avidin/Biotin; Beispiele geeigneter fluoreszierender Materialien sind Umbelliferon, Fluorescein, Fluorescein-Isothiocyanat, Rhodamin, Dichlorotriazin-Amino-Fluorescein, Dansyl-Chlorid oder Phycoerythrin; ein Beispiel eines lumineszenten Materials ist Luminol; und Beispiele geeigneter radioaktiver Materialien umfassen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S oder ^{3}H.

[0095] Die vorliegende Erfindung erlaubt es dem Fachmann auf diesem Gebiet, bispezifische Antikörper und Tetramer-Antikörperkomplexe zu präparieren. Bispezifische Antikörper können durch Bilden von Hybrid-Hybridomen präpariert werden. Die Hybrid-Hybridome können anhand von in der Technik bekannten Prozeduren präpariert werden, wie beispielsweise in Staerz & Bevan (PNAS (USA) 83: 1453, 1986 und Immunology Today, 7: 241, 1986) beschrieben. Im Allgemeinen wird ein Hybrid-Hybridom gebildet durch Fusionieren einer ersten Zelllinie, die einen ersten monoklonalen Antikörper produziert, welcher spezifisch an ein erfindungsgemäßes in einer Tumorzelle exprimiertes Protein bindet, und einer zweiten Zelllinie, die einen zweiten monoklonalen Antikörper produziert, welcher spezifisch an eine nachweisbare Substanz oder eine Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität bindet. Die bispezifischen Antikörper können auch mit chemischen Mitteln anhand von Prozeduren wie den von Staerz et al. (Nature, 314: 628, 1985) und Perez et al. (Nature 316: 354, 1985) beschrieben aufgebaut werden.

[0096] Bispezifische monoklonale Antikörper, die eine variable Region eines Antikörpers, vorzugsweise eines

menschlichen Antikörpers, der spezifisch für ein erfindungsgemäßes Protein oder einen Teil davon ist, eine variable Region eines Antikörpers, der spezifisch an eine nachweisbare Substanz bindet, oder eine Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität und die konstanten Regionen von Human-Immunglobulinen wie humanes IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 enthalten, können ebenfalls wie oben beschrieben hergestellt werden. Bispezifische chimäre monoklonale Antikörper können ebenfalls wie oben beschrieben hergestellt werden.

[0097] Ein Tetramer-Antikörperkomplex kann präpariert werden, indem ein erster monoklonaler Antikörper, der spezifisch an ein erfindungsgemäßes in einer Tumorzelle exprimiertes Protein bindet, und ein zweiter monoklonaler Antikörper, der spezifisch an eine nachweisbare Substanz oder eine Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität bindet, präpariert werden. Der erste und der zweite Antikörper stammen von einer ersten Tierart. Der erste und der zweite Antikörper werden mit einer etwa äquimolaren Menge von Antikörpern einer zweiten Tierart oder Fab-Fragmenten davon, die gegen die Fc-Fragmente der Antikörper der ersten Tierart gerichtet sind, zur Reaktion gebracht. Der gebildete Tetramer-Komplex wird anschließend isoliert. (Siehe US-Patent Nr. 4.868.109 an Lansdorp für eine Beschreibung der Verfahren zur Präparation von Tetramer-Antikörperkomplexen).

[0098] Beispiele für nachweisbare Substanzen sind Enzyme, etwa Meerrettichperoxidase, Alkaliphosphatase, Glukoseoxidase und Galactosidase. Beispiele für Substanzen mit toxischer oder therapeutischer Aktivität sind zytotoxische Zellen wie Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, NK-Zellen, LAK-Zellen und große granuläre Lymphozyten oder Substanzen, die für Tumorzellen toxisch sind, etwa Radionuklide, und Toxine, etwa Diphterietoxin und Ricin oder abgeschwächte Derivate davon. Es ist einzusehen, dass der Antikörper gegen den Fc-Rezeptor zytotoxischer Zellen gerichtet sein kann. Beispiele für Substanzen mit therapeutischer Aktivität sind chemotherapeutische Mittel wie Carboplatin und Methotrexat. Vorzugsweise ist das chemotherapeutische Mittel kein Medikament, gegen das ein Protein mit MRP-Aktivität Resistenz verleiht.

[0099] Die erfindungsgemäßen Antikörper, bispezifischen Antikörper und Tetramer-Antikörperkomplexe, die gegen eine Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität gerichtet und an die Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität gekoppelt sind, können zur Behandlung von mehrfach arzneimittelresistenten Tumoren verwendet werden. Entsprechend stellt die Erfindung eine Rezeptur bereit, die Antikörper, bispezifische Antikörper oder Tetramer-Antikörperkomplexe in einer pharmazeutisch zulässigen Trägersubstanz beinhaltet. Vorzugsweise sind die Antikörper, bispezifischen Antikörper oder Tetramer-Antikörperkomplexe gekoppelt oder binden spezifisch mit einer Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität und mit einem erfindungsgemäßen Protein, das durch eine Tumorzelle exprimiert wird.

[0100] Die erfindungsgemäßen Rezepturen werden Subjekten in einer biologisch kompatiblen Form verabreicht, die für die pharmazeutische Verabreichung in vivo geeignet ist. Unter einer „biologisch kompatiblen Form, die für die pharmazeutische Verabreichung in vivo geeignet ist" ist eine Form des zu verabreichenden Antikörpers zu verstehen, bei der jegliche toxische Wirkungen durch die therapeutischen Wirkungen des Antikörpers aufgehoben werden. Der Begriff „Subjekt" soll lebende Organismen umfassen, in denen eine Immunreaktion ausgelöst werden kann, z. B. Säugetiere. Beispiele für Subjekte umfassen Menschen, Hunde, Katzen, Mäuse, Ratten und transgene Arten davon. Die Verabreichung einer therapeutisch aktiven Menge der erfindungsgemäßen therapeutischen Rezepturen ist definiert als eine wirksame Menge, in Dosierungen und über Zeiträume, die zur Erzielung der gewünschten Wirkung erforderlich sind. Beispielsweise kann eine therapeutisch aktive Menge eines Antikörpers, der mit einem erfindungsgemäßen MRP-Protein reagiert, abhängig sein von Faktoren wie Krankheitsstadium, Alter, Geschlecht und Gewicht des Individuums und der Fähigkeit des Antikörpers, in dem Individuum die gewünschte Reaktion auszulösen. Dosierungsregime können angepasst werden, um die optimale therapeutische Reaktion zu erzielen. Beispielsweise können täglich mehrere aufgeteilte Dosen verabreicht werden oder kann die Dosis proportional verringert werden, wie durch die Erfordernisse der Therapiesituation vorgegeben.

[0101] Die aktive Zusammensetzung (z. B. Antikörper) kann in einer dienlichen Form verabreicht werden, etwa durch Injektion (subkutan, intravenös etc.), orale Verabreichung, Inhalation, transdermale Verabreichung oder rektale Verabreichung. Je nach Verabreichungsweg kann die aktive Zusammensetzung in ein Material gehüllt sein, das die Rezeptur gegen die Wirkung von Enzymen, Säuren und anderen natürlichen Gegebenheiten schützt, durch die die Zusammensetzung wirkungslos werden könnte.

[0102] Eine Antikörperzusammensetzung kann einem Subjekt in einer/einem geeigneten Trägersubstanz oder Verdünnungsmittel verabreicht werden, unter gemeinsamer Verabreichung mit Enzyminhibitoren oder in einer geeigneten Trägersubstanz wie etwa Liposomen. Der Begriff „pharmazeutisch zulässige Trägersubstanz", wie er hier verwendet wird, soll Verdünnungsmittel wie salzige und wässrige Pufferlösungen beinhalten.

Um einen mit einem MRP-Protein reagierenden Antikörper anders als per parenteraler Verabreichung zu verabreichen, kann es erforderlich sein, den Antikörper mit einem Material zu umhüllen oder gemeinsam zu verabreichen, das seine Inaktivierung verhindert. Enzyminhibitoren umfassen Pankreas-Trypsin-Inhibitor, Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Trasylol. Liposome beinhalten Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen sowie konventionelle Liposome (Strejan et al., (1984) J. Neuroimmunol 7:27). Die aktive Zusammensetzung kann auch parenteral oder intraperitoneal verabreicht werden. Dispersionen können auch in Glycerin, flüssigen Polyethylenglykolen und Mischungen davon sowie in Ölen zubereitet werden. Unter normalen Lager- und Gebrauchsbedingungen können diese Zubereitungen ein Konservierungsmittel enthalten, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

[0103] Pharmazeutische Rezepturen, die geeignet sind zur Verwendung durch Injektion, beinhalten sterile wässrige Lösungen (soweit wasserlöslich) oder Dispersionen und sterile Pulver zur extemporierten Herstellung steriler injizierbarer Lösungen oder Dispersionen. In allen Fällen muss die Zusammensetzung steril und flüssig sein in dem Maße, dass einfache Spritzbarkeit vorliegt. Sie muss unter den Bedingungen der Herstellung und Lagerung stabil sein und gegen die kontaminierende Wirkung von Mikroorganismen, wie etwa Bakterien und Pilzen, geschützt sein. Die pharmazeutisch zulässige Trägersubstanz kann ein Lösungsmittel oder elf Dispersionsmedium sein, enthaltend beispielsweise Wasser, Ethanol, Polyol (beispielsweise Glycerin, Propylenglykol und flüssiges Polyethylenglykol und dergleichen) und geeignete Mischungen davon. Die geeignete Fluidität kann aufrechterhalten werden beispielsweise durch Verwendung einer Beschichtung, wie etwa Lecithin, durch die Aufrechterhaltung einer erforderlichen Partikelgröße im Falle einer Dispersion und durch die Verwendung von Tensiden. Die Verhinderung der Wirkung von Mikroorganismen kann erzielt werden durch verschiedene antibakterielle Mittel und Antipilzmittel, beispielsweise Parabene, Chlorobutanol, Phenol, Ascorbinsäure, Thimerosal und dergleichen. In vielen Fällen wird bevorzugt, isotonische Mittel, beispielsweise Zucker oder Polyalkohole, wie etwa Mannitol und Sorbitol, Natriumchlorid in der Rezeptur zu beinhalten. Verlängerte Absorption der injizierbaren Rezepturen kann erzielt werden durch Beinhalten eines Mittels in der Rezeptur, welches die Absorption verzögert, beispielsweise Aluminiummonostearat oder Gelatine.

[0104] Steril injizierbare Lösungen können nach Bedarf hergestellt werden durch Einarbeiten der aktiven Zusammensetzung (z. B. Antikörper, der gegen ein MRP-Protein wirksam ist) in der erforderlichen Menge in ein geeignetes Lösungsmittel mit einem oder einer Kombination der oben aufgezählten Bestandteile, gefolgt von Sterilisation durch Filtration. Im Allgemeinen werden Dispersionen hergestellt durch Einarbeiten der aktiven Zusammensetzung in einen sterilen Träger, der ein basisches Dispersionsmedium und die erforderlichen anderen aus den oben aufgezählten Bestandteilen enthält. Im Falle steriler Pulver zur Herstellung steriler injizierbarer Lösungen sind die bevorzugten Verfahren der Herstellung Vakuumtrocknung und Gefriertrocknung, was ein Pulver des aktiven Bestandteils (z. B. Antikörper) plus jeglicher zusätzlicher gewünschter Bestandteile aus einer vorher steril gefilterten Lösung davon ergibt.

[0105] Wenn die aktive Zusammensetzung in geeigneter Weise geschützt wird wie oben beschrieben, kann die Rezeptur oral verabreicht werden, beispielsweise mit einem inerten Verdünnungsmittel oder einer assimilierbaren essbaren Trägersubstanz. Gemäß Verwendung hier beinhaltet „pharmazeutisch zulässige Trägersubstanz" jegliche Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Umhüllungen, antibakterielle und Antipilzmittel, isotonische und absorptionsverzögernde Mittel und dergleichen. Die Verwendung derartiger Medien und Mittel für pharmazeutisch aktive Substanzen ist in der Technik ausreichend bekannt. Ausgenommen insoweit konventionelle Medien oder Mittel mit der aktiven Zusammensetzung inkompatibel sind; die Verwendung davon in den therapeutischen Rezepturen wird betrachtet. Ergänzende aktive Zusammensetzungen können ebenfalls in die Rezeptur eingearbeitet werden.

[0106] Es ist besonders vorteilhaft, die parenteralen Rezepturen in Form von Dosiereinheiten zur einfachen Verabreichung und Gleichförmigkeit der Dosierung zu formulieren. Die hier verwendet Form von Dosiereinheiten bezieht sich auf physikalisch diskrete Einheiten, die als Dosiereinheiten für die zu behandelnden Säugetier-Subjekte geeignet sind; wobei jede Einheit eine vorbestimmte Menge der aktiven Zusammensetzung enthält, die berechnet wurde zur Erzielung des gewünschten therapeutischen Effekts, zusammen mit der erforderlichen pharmazeutischen Trägersubstanz. Die Spezifizierung der erfindungsgemäßen Formen der Dosiereinheiten wird bestimmt durch und ist direkt abhängig von (a) den speziellen Eigenschaften der aktiven Zusammensetzung und der besonderen zu erzielenden therapeutischen Wirkung, und (b) den auf dem Gebiet der Zusammenstellung einer solchen aktiven Zusammensetzung für die therapeutische Behandlung von Individuen inhärenten Beschränkungen.

VII. Transgen und nichtmenschliche Knockout-Tiere

[0107] Nukleinsäuren, die Proteine mit der biologischen Aktivität von MRP codieren, können verwendet werden, um entweder transgene nichtmenschliche Tiere oder nichtmenschliche „Knockout"-Tiere zu erzeugen, die wiederum für Entwicklung und Screening von therapeutisch einsetzbaren Mitteln genutzt werden können. Ein transgenes nichtmenschliches Tier (z. B. eine Maus) ist ein Tier mit Zellen, die ein Transgen enthalten, welches in das Tier oder einen Vorfahr des Tieres in einer pränatalen, z. B. embryonalen Phase eingebracht wurde. Ein Transgen ist eine DNA, die in das Genom einer Zelle eingearbeitet wurde, aus der sich ein transgenes Tier entwickelt. In einer Ausführungsform kann eine menschliche MRP cDNA, die die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz enthält, oder eine geeignete Sequenz davon verwendet werden, um ein Maus-MRP-Gen gemäß bekannten Verfahren zu klonieren und kann die genomische Nukleinsäure genutzt werden, um transgene Tiere zu erzeugen, die Zellen aufweisen, in denen MRP-Protein zur Expression kommt. Verfahren zum Erzeugen von transgenen Tieren, insbesondere Tieren wie Mäusen, sind in der Technik inzwischen gebräuchlich und werden beispielsweise in den US-Patenten Nr. 4.736.866 und 4.870.009 beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Plasmide, die erfindungsgemäße rekombinante Moleküle enthalten, in Mausembryos mikroinjiziert. Insbesondere werden die Plasmide in männliche Pronuklei befruchteter einzelliger Mauseizellen mikroinjiziert; die injizierten Eizellen werden pseudo-schwangeren Pflegeweibchen eingepflanzt; und die Eizellen können in den Pflegeweibchen ausgetragen werden. [Hogan, B. et al., (1986) A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory]. Alternativ kann eine embryonale Stammzelllinie, sofern sie nicht von menschlichen Embryonen stammt, mit einem Expressionsvektor transfektiert werden, der eine ein Protein mit MRP-Aktivität codierende Nukleinsäure enthält, und können Zellen, die die Nukleinsäure enthalten, zur Herstellung von Aggregationschimären mit Embryonen von einem geeigneten Mausstamm verwendet werden. Die chimären Embryonen können anschließend in eine geeignet pseudo-schwangere weibliche Maus des geeigneten Stammes eingepflanzt der Embryo ausgetragen werden. Nachkommen, die in ihren Keimzellen die transfektierte DNA bergen, können zum Züchten einheitlich transgener Mäuse verwendet werden.

[0108] Typischerweise würden gezielt bestimmte Zellen für die Einbringung des MTP-Transgens durch die Verwendung von gewebespezifischen Enhancern, die operativ mit dem MRP-codierenden Gen verbunden sind, gewählt. Beispielsweise können Promotoren und/oder Enhancer, die die Expression eine Gens, mit dem sie operativ verbunden sind, in Herzmuskelzellen steuern, dazu verwendet werden, ein transgenes Tier zu erzeugen, bei dem ein MRP-Protein vorzugsweise in Herzmuskelgewebe zur Expression kommt. Beispiele geeigneter Promotoren und Enhancer umfassen solche, die die Expression der Gene für Herz-Mysin und Herz-Aktin regulieren. Transgene Tiere, die eine Kopie eines während einer embryonalen Phase in die Keimlinie des Tieres eingebrachten MRP-Transgens tragen, können ebenfalls verwendet werden, um den Effekt einer erhöhten MRP-Expression in verschiedenen Geweben zu untersuchen.

[0109] Das Muster und der Grad der Expression eines erfindungsgemäßen rekombinanten Moleküls in einer transgenen Maus wird dadurch ermöglicht, dass ein Indikatorgen an das rekombinante Molekül fusioniert wird, sodass beide Gene zu einer polycistronischen mRNA kotranskribiert werden. Das Indikatorgen kann mithilfe konventioneller Verfahren wie etwa den in Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschriebenen in das rekombinante Molekül eingebracht werden. Eine effiziente Expression der beiden Cistrone der polycistronischen mRNA, die das erfindungsgemäße Protein und das Indikatorprotein codiert, kann erzielt werden, indem eine bekannte interne Translationsstartsequenz wie etwa die in Polioviren-mRNA enthaltene eingearbeitet wird. Das Indikatorgen sollte von der Regulatorsequenz des erfindungsgemäßen rekombinanten Moleküls kontrolliert werden, und das Muster und der Grad der Expression des ein erfindungsgemäßes Protein codierenden Gens können entsprechend durch Assayieren des Phänotyps des Indikatorgens bestimmt werden. Vorzugsweise codiert das Indikatorgen für einen Phänotyp, den die Wirtszelle nicht zeigt, und kann der Phänotyp assayiert werden. Beispiele geeigneter Indikatorgene beinhalten lacZ (β-Galactosidase), neo (Neomycin-Phosphotransferase), CAT (Chloamphenicol-Acetyltransferase), dhfr (Dihydrofolat-Reduktase), aphIV (Hygromycin-Phosphotransferase), lux (Luciferase), uidA (β-Glucuronidase). Vorzugsweise ist das Indikatorgen lacZ, welches für β-Galactosidase codiert. β-Galactosidase kann assayiert werden durch das Lactose-Analog X-gal(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galactopyranoside), das durch β-Galactosidase zu einem blaufarbigen Produkt umgewandelt wird. (Siehe beispielsweise Old R. W. & Primrose S. B., Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering, 4. Ausgabe Oxford University Press, Seite 63–66, für eine Diskussion der Prozeduren zum Screening von Rekombinanten).

[0110] Obwohl als Labortiere in der beschriebenen bevorzugten Ausführungsform Mäuse verwendet werden, ist die Erfindung nicht hierauf zu beschränken. Es kann wünschenswert sein, andere Arten wie Ratten, Hamster und Kaninchen einzusetzen.

[0111] Die erfindungsgemäßen transgenen, nichtmenschlichen Tiere können verwendet werden, um die Molekularbasis der mehrfachen Arzneimittelresistenz zu untersuchen. Die erfindungsgemäßen transgenen, nichtmenschlichen Tiere können auch eingesetzt werden, um Substanzen auf ihre Fähigkeit zu testen, mehrfache Arzneimittelresistenz zu verhindern, zu verlangsamen oder umzukehren. Ein transgenes Tier kann mit der Substanz zeitgleich mit einem nichtbehandelten transgenen Kontrolltier behandelt werden.

[0112] Zellen der erfindungsgemäßen transgenen Tiere können mittels standardmäßiger Gewebekulturverfahren kultiviert werden. Insbesondere können Zellen, die das erfindungsgemäße rekombinante Molekül tragen, kultiviert und dazu verwendet werden, Substanzen auf ihre Fähigkeit zu testen, die Entwicklung einer mehrfachen Arzneimittelresistenz zu verhindern, zu verlangsamen oder umzukehren.

[0113] Zusätzlich können die nichtmenschlichen Homologe der Gene, die Proteine mit MRP-Aktivität codieren, verwendet werden, um ein nichtmenschliches MRP „Knockout"-Tier zu erzeugen, das ein defektes oder verändertes MRP-Gen besitzt. Beispielsweise kann eine menschliche MRP cDNA, welche die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz oder eine geeignete Sequenz davon enthält, verwendet werden, um ein Maus-MRP-Gen gemäß bekannten Verfahren zu klonieren. Ein Abschnitt der genomischen MRP DNA (z. B. ein Exon) kann entfernt oder durch ein anderes Gen ersetzt werden, etwa ein Gen, das einen selektierbaren Marker codiert, welcher zur Überwachung der Integration verwendet werden kann. Die veränderte MRP DNA kann dann in eine embryonale Stammzelllinie transfektiert werden, sofern diese nicht von menschlichen Embryonen gewonnen wurde. Die veränderte MRP DNA wird homolog zu dem endogenen MRP-Gen in bestimmten Zellen rekombinieren, und es können Klone selektiert werden, die das veränderte Gen enthalten. Zellen, die das veränderte Gen enthalten, werden in eine Blastozyste eines Tieres, etwa einer Maus, injiziert, um Aggregationschimären zu bilden, wie für transgene Tiere beschrieben. Chimäre Embryonen werden wie oben beschrieben implantiert. Die Übertragung des veränderten Gens in die Keimlinie eines hieraus resultierenden Tieres kann mithilfe von Standardverfahren bestätigt werden, und das Tier kann verwendet werden, um Tiere mit einem veränderten MRP-Gen in jeder Zelle zu züchten. Dementsprechend kann ein Knockout-Tier erzeugt werden, in dem kein funktionales MRP-Protein zur Expression kommen kann. Ein solches Knockout-Tier kann beispielsweise eingesetzt werden, um die Wirksamkeit eines chemotherapeutischen Mittels in Abwesenheit eines mehrfach arzneimittelresistenten MRP-Proteins zu testen.

VIII. Erfindungsgemäße Verwendungen

[0114] Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuren sind einsetzbar als Molekülsonden für die diagnostische Verwendung zur Bestimmung von mehrfacher Arzneimittelresistenz eines Tumors. Wie in Beispiel 1 gezeigt, ist die mehrfache Arzneimittelresistenz bestimmter Tumorzelllinien assoziiert mit einer erhöhten Expression von Zell-mRNA, die der Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 1 entspricht. Entsprechend können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit einem nachweisbaren Marker, etwa einem radioaktiven, fluoreszenten oder biotinylierten Marker, markiert und in einem konventionellen Dot-Blot-, Northern-Hybridisierungs- oder In-situ-Hybridisierungsverfahren eingesetzt werden, um mRNA-Moleküle von Gesamt-Zellen- oder -Poly(A)+ RNAs aus einer biologischen Probe zu sondieren, etwa Zellen einer Tumorbiopsie.

[0115] Die Nukleinsäuresonden können zum Nachweis von Genen verwendet werden, vorzugsweise in menschlichen Zellen, welche dem erfindungsgemäßen MRP verwandte oder analoge Proteine codieren. Vorzugsweise kann eine Nukleinsäure, die die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz enthält, oder ein Segment davon als Sonde verwendet werden, um DNA-Fragmente zu identifizieren, die Gene oder Teile von Genen enthalten, welche mit dem erfindungsgemäßen Gen koamplifiziert werden und in derselben Amplifikationseinheit, auch Amplicon, an der Chromosomenposition 16p13.1 enthalten sind. Spezieller kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure als Sonde für das Screening menschlicher genomischer DNA-Bibliotheken verwendet werden, die in Cosmid- oder künstlichen Hefe-Chromosomvektoren aufgebaut sind, wozu Standardprozeduren der Technik verwendet werden, um ein zusammenhängendes DNA-Segment zu definieren, das die in einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelllinie wie H69AR erkannte Amplifikationseinheit enthält. Auf diese Weise können weitere Gene identifiziert werden, die ebenfalls dem Phänotyp von H69AR und anderen, noch zu untersuchenden menschlichen Zelllinien, die jedoch bekanntermaßen die HeLa-Zelllinie J2c und die Zelllinie HT1080 DR4 enthalten, mehrfache Arzneimittelresistenz verleihen oder dazu beitragen.

[0116] Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren sind nutzbar zur Inhibition der Expression von Nukleinsäuren (z. B. mRNAs), welche Proteine mit MRP-Aktivität codieren, wodurch die Expression von Proteinen mit MRP-Aktivität verringert wird. Da eine erhöhte Expression von Proteinen mit MRP-Aktivität mit mehrfacher Arzneimittelresistenz assoziiert ist und diese einer Zelle verleihen kann, kann das Verringern der Expression solcher Proteine die mehrfache Arzneimittelresistenz einer Zelle, in welche die Antisense-Nukleinsäu-

re eingebracht wurde, hemmen oder umkehren. Antisense-Nukleinsäuren können in eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle in Kultur eingebracht werden, um die MRP-Expression zu hemmen. Eine oder mehrere Antisense-Nukleinsäuren, etwa Oligonukleotide, können Zellen im Kulturmedium, üblicherweise bei 200 µg/ml, hinzugefügt werden. Eine kultivierte mehrfach arzneimittelresistente Zelle, in der die MRP-Expression gehemmt wurde, ist verwendbar zum Testen der Wirksamkeit potenzieller therapeutischer Mittel. Beispielsweise könnte die MRP-Expression in einer Tumorzelllinie gehemmt werden, in der sowohl MRP als auch P-Glykoprotein zur Expression kommt, um den Beitrag von MRP zu einer beobachteten Resistenz oder Empfindlichkeit der Zelle gegen ein bestimmtes therapeutisches Mittel festzustellen.

[0117] Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren oder Oligonukleotide davon können auch in der Gentherapie eingesetzt werden, um mehrfache Arzneimittelresistenz in einem Subjekt zu korrigieren oder zu verhindern. Beispielsweise können Antisense-Sequenzen verwendet werden, um mehrfach arzneimittelresistente bösartige Zellen empfindlich für chemotherapeutische Mittel zu machen. Die Verabreichung von Antisense-Nukleinsäuren an ein Subjekt kann die größte Wirkung zeigen, wenn die Antisense-Nukleinsäure in einen rekombinanten Expressionsvektor eingebaut ist, der die ständige Produktion von Antisense-RNA erlaubt. Rekombinante Moleküle, die eine Antisense-Nukleinsäure oder Oligonukleotide davon enthalten, können direkt in Gewebe, einschließlich Lungengewebe in vivo, eingebracht werden, wozu Transportvehikel wie Liposome, retrovirale Vektoren, adenovirale Vektoren und DNA-Virenvektoren verwendet werden. Es kann ein Transportvehikel gewählt werden, das gezielt auf eine interessierende Zelle in dem Subjekt (z. B. eine mehrfach arzneimittelresistente Tumorzelle) gerichtet werden kann. Antisense-Nukleinsäuren könne auch ex vivo mittels viraler Vektoren oder physikalischer Verfahren wie Mikroinjektion und Elektroporation oder chemischer Verfahren wie Kopräzipitation und Einbau der DNA in Liposome in isolierte Zellen eingebracht werden, etwa solche des hämato-poetischen Systems, und derartige Zellen können in den Spender zurückverpflanzt werden. Rekombinante Moleküle können auch in Form eines Aerosols oder durch Waschung transportiert werden. Bei der Behandlung von bösartigen Veränderungen der Lunge können Antisense-Sequenzen durch ein Aerosol oder durch Waschung direkt in das Lungengewebe transportiert werden.

[0118] Entsprechend stellt die Erfindung ein Verfahren zur Inhibition von mehrfacher Arzneimittelresistenz einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle bereit, indem in die mehrfach arzneimittelresistente Zelle eine Nukleinsäure eingebracht wird, die antisense zu einer das in SEQ ID NO: 2 gezeigte Protein codierenden Nukleinsäure ist.

[0119] Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuren und Antisense-Nukleinsäuren können verwendet werden, rekombinante Expressionsvektoren zu konstruieren, wie weiter oben beschrieben. Diese rekombinanten Expressionsvektoren können dann eingesetzt werden zur Erzeugung transformanter Wirtszellen, die die rekombinanten Expressionsvektoren enthalten, um von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codierte Proteine zur Expression zu bringen und um erfindungsgemäße Proteine zu isolieren, wie weiter oben beschrieben. Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuren und Antisense-Nukleinsäuren können außerdem verwendet werden, transgene und Knockout-Tiere zu erzeugen, wie weiter oben beschrieben.

[0120] Wie in den Beispielen 5 und 6 gezeigt, kann ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält, zur Transfektion einer medikamentenempfindlichen Zelllinie verwendet werden, um in der Zelle ein Protein zu produzieren, das der transfektierten Zelllinie mehrfache Arzneimittelresistenz verleihen kann. Somit können die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren verwendet werden, einer medikamentenempfindlichen Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz zu verleihen. Entsprechend stellt die Erfindung ein Verfahren bereit, wie eine medikamentenempfindliche Zelle gegen Zytotoxizität aufgrund der Exposition mit einem Medikament geschützt werden kann, indem die Zelle mit Nukleinsäure, die eine in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz enthält, transfektiert wird, um der Zelle Arzneimittelresistenz zu verleihen. In bevorzugten Ausführungsformen ist die medikamentenempfindliche Zelle eine Herzmuskelzelle oder hämato-poetische Stammzelle, vorausgesetzt, dass die hämato-poetische Stammzelle nicht von menschlichen Embryonen gewonnen wurde. Die Fähigkeit, einer Zelle Arzneimittelresistenz zu verleihen, bietet wichtige klinische Anwendungsmöglichkeiten. Ein wichtiger dosislimitierender Faktor für chemotherapeutische Mittel ist ihre Zytotoxizität für normale Zellen in einem Patienten ebenso wie für Tumorzellen. In Patienten mit mehrfach arzneimittelresistenten Tumoren verbietet sich eine Erhöhung der Dosierung von chemotherapeutischen Mitteln durch die Toxizität dieser Mittel für normale Zellen. Im Fall von Anthrazyklinen kann die Kardiotoxizität der Medikamente eine wesentliche klinische Einschränkung sein. Für chemotherapeutische Medikamente, die auf sich schnell teilende Zellen zielen, kann die Toxizität für hämato-poetische Zellen eine wichtige klinische Einschränkung sein. Zusätzlich kann es zu Neurotoxizität kommen. Der Schutz nicht resistenter Nicht-Tumorzellen vor den Wirkungen chemotherapeutischer Mittel dadurch, dass der Zelle eine mehrfache Arzneimittelresistenz verliehen wird, ist somit von hoher klinischer Bedeutung.

[0121] Die erfindungsgemäßen Wirtszellen und die rekombinanten Expressionsvektoren, die zu ihrer Herstellung verwendet werden, sind dafür nutzbar, potenzielle therapeutische Mittel auf ihre Wirksamkeit gegen mehrfach arzneimittelresistente Zellen zu testen. Diese Mittel beinhalten Mittel, die selbst zytotoxisch für mehrfach arzneimittelresistente Zellen sind oder die Chemosensibilisatoren anderer therapeutischer Mittel sind. Der Begriff „Chemosensibilisator", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf eine Substanz, die die Wirksamkeit eines therapeutischen Mittels gegen eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle erhöhen und/oder die Resistenz einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle gegen ein therapeutisches Mittel verringern kann.

[0122] Ein Verfahren wird bereitgestellt, um einen Chemosensibilisator eines therapeutischen Mittels zu identifizieren. Das Verfahren beinhaltet das Inkubieren des therapeutischen Mittels mit einer Zelle, die mit einer Nukleinsäure transfektiert ist, welche der Zelle Resistenz gegen das therapeutische Mittel verleiht, mit oder ohne zu testende(r) Substanz, Bestimmen der Resistenz der Zelle gegen das therapeutische Mittel bei Inkubation mit und ohne zu testende(r) Substanz und Identifizieren einer Substanz, die ein Chemosensibilisator des therapeutischen Mittels ist, durch die Fähigkeit der Substanz, die Resistenz der Zelle gegen das therapeutische Mittel zu verringern, wenn sie mit der Substanz inkubiert wird, im Vergleich mit der Resistenz der Zelle gegen das therapeutische Mittel, wenn die Inkubation ohne die Substanz erfolgt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäure ein rekombinanter Expressionsvektor, der Nukleinsäure beinhaltet, welche eine in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst. Vorzugsweise ist die Zelle, in die die Nukleinsäure transfektiert wird, vor der Transfektion medikamentenempfindlich, sodass die Wirkungen eines potenziellen Chemosensibilisators in Anwesenheit eines einzelnen, isolierten, mehrfache Arzneimittelresistenz verleihenden Proteins beurteilt werden. Die zum Testen potenzieller chemosensibilisierender Substanzen verwendete Zelle kann eine Zelle in Kultur sein, z. B. eine erfindungsgemäße transformante Wirtszelle, und das therapeutische Mittel und die zu testende Substanz werden in Kultur mit der Zelle inkubiert. Alternativ kann die Zelle eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle in einem transgenen Tier sein, transgen für eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, und werden das therapeutische Mittel und die zu testende Substanz dem transgenen Tier verabreicht. Ferner kann die Zelle eine Zelle in Kultur sein, die von einem erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten, transgenen Tier isoliert wurde. Die Resistenz der Zelle gegen das therapeutische Mittel in Gegenwart oder Abwesenheit des potenziellen therapeutischen Mittels wird dadurch beurteilt, dass die Konzentration des therapeutischen Mittels festgestellt wird, die für die Zelle entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit der zu testenden Substanz zytotoxisch ist.

[0123] Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Identifizieren einer Substanz bereit, die unmittelbar zytotoxisch für eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle ist, umfassend das Inkubieren einer zu testenden Substanz mit einer Zelle, die mit einer Nukleinsäure transfektiert ist, welche der Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz verleiht, und Bestimmen der Zytotoxizität der Substanz für die Zelle. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäure ein rekombinanter Expressionsvektor, der Nukleinsäure beinhaltet, welche eine in SEQ ID NO: 1 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst. Vorzugsweise ist die Zelle, in die die Nukleinsäure transfektiert wird, vor der Transfektion medikamentenempfindlich, sodass die Wirkungen eines potenziellen Chemosensibilisators in Anwesenheit eines einzelnen, isolierten, mehrfache Arzneimittelresistenz verleihenden Proteins beurteilt werden. Die zum Testen potenzieller zytotoxischer Substanzen verwendete Zelle kann eine Zelle in Kultur sein, z. B. eine erfindungsgemäße transformante Wirtszelle, und die zu testende Substanz wird in Kultur mit der Zelle inkubiert. Alternativ kann die Zelle eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle in einem transgenen Tier sein, transgen für eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, und wird die zu testende Substanz dem transgenen Tier verabreicht. Ferner kann die Zelle eine Zelle in Kultur sein, die von einem erfindungsgemäßen mehrfach arzneimittelresistenten, transgenen Tier isoliert wurde.

[0124] Darüber hinaus kann eine mehrfach arzneimittelresistente Zelllinie wie etwa H69AR oder eine gleichwertige Zelllinie in denselben Verfahren verwendet werden, um einen Chemosensibilisator eines therapeutischen Mittels zu identifizieren oder um eine Substanz zu identifizieren, die für eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle unmittelbar zytotoxisch wirkt.

[0125] Die erfindungsgemäßen isolierten Proteine können genutzt werden, um Antikörper herzustellen, die gegen Proteine mit MRP-Aktivität reagieren, wie weiter oben beschrieben. Alternativ können die erfindungsgemäßen Antikörper verwendet werden, um ein erfindungsgemäßes Protein durch standardmäßige Immunoaffinitätsverfahren zu isolieren. Ferner können die erfindungsgemäßen Antikörper, einschließend bispezifische Antikörper und Tetramer-Antikörperkomplexe, für diagnostische und therapeutische Zwecke eingesetzt werden.

[0126] In einer Ausführungsform der Erfindung können Antikörper, die mit einer nachweisbaren Substanz, beispielsweise einem fluoreszenten Marker, einem Enzym oder einem radioaktiven Marker, markiert sind, ver-

wendet werden, um mehrfach arzneimittelresistente Tumorzellen in einer Tumorprobe oder in vivo zu identifizieren. Einem Patienten entnommenes Tumorgewebe kann als die Tumorprobe dienen. Um zu verhindern, dass Tumorproben zerfallen, können die Proben bei Temperaturen unterhalb von –20°C gelagert werden. Ein Gewebeabschnitt, beispielsweise ein gefriergetrockneter oder frischgefrorener Abschnitt Tumorgewebe, das einem Patienten entnommen wurde, kann ebenfalls als die Tumorprobe dienen. Die Proben können fixiert werden, wobei das geeignete Fixierungsverfahren je nach der für Antikörper verwendeten Art der Markierung gewählt wird. Alternativ kann eine Zellmembranfraktion von dem einem Patienten entnommenen Tumorgewebe getrennt und als die Tumorprobe verwendet werden. Konventionelle Verfahren wie Differenzial- oder Dichtegradientenzentrifugation können eingesetzt werden, um eine Membranfraktion zu trennen.

[0127] Eine mehrfach arzneimittelresistente Tumorzelle wird dadurch identifiziert, dass ein erfindungsgemäßer Antikörper, beispielsweise ein monoklonaler Antikörper, mit einer auf mehrfache Arzneimittelresistenz zu testenden Tumorzelle. Eine Bindung des Antikörpers an die Tumorzelle zeigt das Vorhandensein eines Proteins mit MRP-Aktivität an der Tumorzelle an. Der Grad der Antikörperbindung an die Tumorzelle kann mit dem Grad der Antikörperbindung an eine normale Kontrollzelle verglichen werden, und eine erhöhte Bindung des Antikörpers an die Tumorzelle im Vergleich zu der normalen Zelle kann als Indikator für mehrfache Arzneimittelresistenz verwendet werden. Die Bindung des Antikörpers an eine Zelle (z. B. eine zu testende Tumorzelle oder eine normale Kontrollzelle) kann bestimmt werden, indem eine nachweisbare Substanz nachgewiesen wird, mit der der Antikörper markiert ist. Die nachweisbare Substanz kann direkt an den Antikörper gekoppelt sein oder alternativ kann die nachweisbare Substanz mit einem anderen Molekül gekoppelt sein, das an den Antikörper binden kann. Beispielsweise ist ein erfindungsgemäßer Antikörper mit einer Kaninchen-Fc-Region (die z. B. durch Immunisierung des Kaninchens präpariert wurde) mithilfe eines zweiten Antikörpers nachweisbar, der gegen die Kaninchen-Fc-Region gerichtet ist, wobei der zweite Antikörper an eine nachweisbare Substanz gekoppelt ist.

[0128] Eine mehrfach arzneimittelresistente Tumorzelle kann wie vorstehend beschrieben in vitro an einer Tumorprobe, die wie oben beschrieben präpariert wurde, nachgewiesen werden. Beispielsweise kann ein Tumorschnitt auf einem Objektträger mithilfe von standardmäßigen immunohistochemischen Verfahren mit Antikörpern zur Reaktion gebracht werden. Zusätzlich können, wenn eine Einzellsuspension von Tumorzellen hergestellt werden kann, Tumorzellen mit Antikörper zur Reaktion gebracht und mittels Durchflusscytometrie analysiert werden. Alternativ kann eine mehrfach arzneimittelresistente Tumorzelle in vivo in einem Subjekt, das einen Tumor aufweist, nachgewiesen werden. Markierte Antikörper können in das Subjekt eingebracht und an den Tumor gebundene Antikörper können nachgewiesen werden. Beispielsweise kann der Antikörper mit einem radioaktiven Marker markiert werden, dessen Anwesenheit und Position in einem Subjekt mithilfe von Standard-Bildgebungsverfahren nachgewiesen werden können.

[0129] Die erfindungsgemäßen Antikörper und Rezepturen davon können auch zur Inhibition der mehrfachen Arzneimittelresistenz einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle genutzt werden. Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Inhibition der mehrfachen Arzneimittelresistenz einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle bereit, das umfasst, die Aktivität eines Proteins zu hemmen, welches eine in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthält und Expression in der mehrfach arzneimittelresistenten Zelle zeigt. Vorzugsweise ist die mehrfach arzneimittelresistente Zelle eine Tumorzelle. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Molekül, das an ein Protein bindet, welches eine in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthält, ein erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper, bispezifischer Antikörper oder tetramerer immunologischer Komplex. Mehrfache Arzneimittelresistenz kann inhibiert werden, indem in die MRP-Aktivität des Proteins, an das das Molekül bindet, eingegriffen wird. Beispielsweise kann die Fähigkeit eines MRP-Proteins zum Transport von Medikamenten verringert werden. Entsprechend fallen jegliche Moleküle, die an ein Protein mit MRP-Aktivität binden und deren Bindung die MRP-Aktivität des Proteins inhibiert, in den Schutzbereich der Erfindung. Erfindungsgemäße isolierte Proteine, welche eine in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthalten, können zum Identifizieren von Molekülen, einschließlich und zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Antikörpern, verwendet werden, die an ein Protein mit MRP-Aktivität binden können, in einem Standard-Bindungsassay genutzt werden. Eine mehrfach arzneimittelresistente Zelle, in der die mehrfache Arzneimittelresistenz durch Inhibition der Aktivität eines MRP-Proteins inhibiert ist, kann weiter mit einem therapeutischen Mittel behandelt werden, gegen das die Zelle dank der Inhibition der MRP-Aktivität nicht länger resistent ist oder weniger resistent ist, um die Zelle abzutöten.

[0130] Moleküle, die an ein Protein binden, welches eine in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthält, können auch in einem Verfahren zum Abtöten einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle, in der das Protein exprimiert ist, eingesetzt werden. Vorzugsweise ist die mehrfach arzneimittelresistente Zelle eine Tumorzelle. Die Zerstörung einer mehrfach arzneimittelresistenten Zelle kann erreicht werden, indem das Molekül mit

einer Substanz markiert wird, die toxische oder therapeutische Aktivität aufweist. In der Formulierung „Substanz, die toxische oder therapeutische Aktivität aufweist", wie sie hier verwendet wird, sollen Moleküle inbegriffen sein, deren Aktivität eine Zelle zerstören kann, etwa ein radioaktives Isotop, ein Toxin (z. B. Diphterietoxin oder Ricin) oder ein chemotherapeutisches Medikament sowie Zellen, deren Aktivität eine Zelle zerstören kann, etwa eine zytotoxische Zelle. Das an mehrfach arzneimittelresistente Zellen bindende Molekül kann auch direkt mit einer Substanz gekoppelt werden, die toxische oder therapeutische Aktivität aufweist (z. B. ein Ricin-verbundener monoklonaler Antikörper) oder kann indirekt mit der Substanz verbunden werden. Beispielsweise kann ein bispezifischer Antikörper verwendet werden, der eine Tumorzelle und eine zytotoxische Zelle vernetzen kann, wodurch die Lyse der Tumorzelle ermöglicht wird. Ein bispezifischer Antikörper kann eine Tumorzelle und die zytotoxische Zelle vernetzen, indem er an die Fc-Rezeptoren von zytotoxischen Zellen bindet.

[0131] Die erfindungsgemäßen Rezepturen und Verfahren können zur Behandlung von Patienten, deren Tumore mehrfache Arzneimittelresistenz zeigen, speziell Resistenz gegen Anthrazykline, Epipodophyllotoxine, Vinca-Alkaloide und hydrophobe Medikamente, eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen Verfahren zur Inhibition der mehrfachen Arzneimittelresistenz einer Tumorzelle und zum Abtöten einer mehrfach arzneimittelresistenten Tumorzelle können bei Patienten angewendet werden, die einen mehrfach arzneimittelresistenten Tumor aufweisen. Die Rezepturen und Verfahren können insbesondere in der Behandlung von Brustkrebs, Leukämien, Fibrosarkomen, Gebärmutterkrebs und Lungenkrebs, besonders kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkrebsarten, eingesetzt werden.

[0132] Außerdem stellt die Erfindung ein Diagnosekit zur Identifizierung mehrfach arzneimittelresistenter Tumorzellen bereit, umfassend ein Molekül, das an ein Protein bindet, welches eine in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz enthält, zur Inkubation mit einer Probe von Tumorzellen; Mittel zum Nachweis des an das Protein gebundenen Moleküls, von nichtreagiertem Protein oder ungebundenen Molekülen; Mittel zum Bestimmen der Menge von Protein in der Probe; und Mittel zum Vergleichen der Menge von Protein in der Probe mit einem Standard. Vorzugsweise ist das Molekül ein monoklonaler Antikörper. Andere Moleküle, die ein Protein mit MRP-Aktivität binden können, können verwendet werden, darunter die erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörper und Tetramer-Antikörperkomplexe. Das Diagnosekit kann darüber hinaus eine Anleitung zur Verwendung des Kits enthalten.

[0133] Die Erfindung stellt ferner ein Diagnosekit zur Identifizierung von mehrfach arzneimittelresistenten Tumorzellen bereit, umfassend eine zu der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz oder einem Oligonukleotidfragment davon komplementäre Nukleotidsonde für die Hybridisierung mit mRNA aus einer Probe von Tumorzellen; Mittel zum Nachweis der an mRNA gebundenen Nukleotidsonde; Mittel zum Bestimmen der Menge von mRNA in der Probe; und Mittel zum Vergleichen der Menge von mRNA in der Probe mit einem Standard. Das Diagnosekit kann darüber hinaus eine Anleitung zur Verwendung des Kits enthalten.

[0134] Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht. Die Beispiele sollen jedoch lediglich Ausführungsformen der Erfindung veranschaulichen und sind nicht als Einschränkung des Schutzbereichs der Erfindung zu verstehen.

Beispiel 1: ISOLIERUNG VON cDNA-SEQUENZEN, DIE VON IN H69AR-ZELLEN ÜBEREXPRIMIERTEN mRNAs STAMMEN

[0135] Im Rahmen einer Suche nach Proteinen, die für die von H69AR-Zellen gezeigte mehrfache Arzneimittelresistenz verantwortlich sind, wurde eine aus H69AR mRNA aufgebaute random-primed cDNA-Bibliothek mittels Differenzialhybridisierung mit Gesamt-cDNA, die aus H69- und H69AR mRNA präpariert wurde, gescreent. Eines der isolierten Klone enthielt einen 2,8 kb cDNA-Abschnitt und ergab ein besonders starkes Differenzialsignal bei der Northern-Blot-Analyse (**Abb. 1A**). Die Analyse von 1 µg Poly(A^+)RNA von jeder Zelllinie erfolgte mithilfe von Standardverfahren. Poly(A^+)RNA wurde mittels eines FastTrack™ mRNA-Isolationskits (Invitrogen) gewonnen, und 1 µg wurde auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde auf Nitrozellulosemembran transferiert und vorhybridisiert in 50% Formamid, 5X SSPE(1X = 150 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4, 1 mM EDTA, pH 7,4), 2,5× Denhardts-Lösung (50X = 1% Rinderserum-Albumin, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Ficoll) und geschnittener denaturierter Hering-Hoden DNA (10 µg/ml) für 4–16 Stunden bei 42°C. Der Blot wurde mit einem 1,8 kb EcoRI-Fragement von MRP sondiert, welches mittels des Random-Priming-Verfahrens [A. P. Feinberg, B. Vogelstein, Analyt. Biochem. 132, 6 (1983)] auf eine spezifische Aktivität von > 5 × 10^8 cmp/µg DNA mit α-[32P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Dupont/NEN) markiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte für 16–20 Stunden bei 42°C. Die Blots wurden dreimal in 0,1% SDS und 0,1X SSC(pH 7,0) für je 30 Minuten bei 52°C gewaschen und dann auf Film exponiert. Um die Variation

der RNA-Ladung des Gels zu schätzen, wurde der Blot mit einer ^{32}P-markierten β-Aktin cDNA (201pBv2.2)) [H. Ueyama, H. Hamada, N. Battula, T. Kakunaga, Mol. Cell. Biol. 4, 1073 (1984)] nochmals sondiert. Das in Abb. 1A gezeigte Autoradiogramm ist eine 5-Stunden-Exposition mit intensivierenden Schirmen bei –70°C. Die Größe der überexprimierten mRNA in H69AR-Zellen wurde auf näherungsweise 7 kb geschätzt. Eine längere Exposition des Films enthüllte geringe Pegel dieser mRNA in H69- und H69PR-Zellen. Die Konzentration dieser mRNA war in H69AR-Zellen 100fach erhöht verglichen mit H69-Zellen. Der Pegel dieser mRNA in H69PR, einer medikamentenempfindlichen Revertante von H69AR, war um etwa das 20fache gesunken verglichen mit derjenigen in H69AR, was ein weiterer Beleg für die Wechselbeziehung von Überexpression dieser speziellen mRNA mit einem mehrfach arzneimittelresistenten Phänotypen ist.

[0136] Southern-Blot-Analysen von H69-, H69AR- und H69PR-DNA ergaben, dass der wichtigste der Überexpression zugrundeliegende Mechanismus die Genamplifikation war. Zehn µg jeder DNA wurde mit EcoRI verdaut, durch ein 0,7-%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die DNA wurde mit einem 1,8 kb EcoRi cDNA-Fragment von MRP hybridisiert, welches per Random Priming mit α-[^{32}P]-dCTP markiert war. Das in Abb. 1B gezeigte Autoradiogramm ist eine 6-Stunden-Exposition bei –70°C. Basierend auf der Untersuchung mehrerer Restriktionsdigests und Normalisierung der Mengen von geladener DNA war das MRP-Gen in resistenten H69AR-Zellen 40–50fach amplifiziert und wurden keine Unterschiede in der Kopienzahl des Gens in H69- und H69PR-Zellen nachgewiesen.

[0137] Die mRNA war in einer Doxorubicin-selektierten, mehrfach arzneimittelresistenten HeLa-Zelllinie, in der P-Glykoprotein keine Überexpression zeigt, ebenfalls 10- bis 15fach überexprimiert (Abb. 1C). S3 und J2c sind medikamentenempfindliche und resistente HeLa-Zelllinien, die von dem Labor Dr. R. M. Baker (Roswell Park Memorial Institute) bezogen wurden. Zwei µg von Poly(A$^+$)RNA von jeder Zelllinie wurden elektrophoretisch aufgetrennt, transferiert und mit MRP cDNA sondiert wie zu Abb. 1A beschrieben. Die in Abb. 1C gezeigten β-Aktin-Autoradiogramme sind 18- bzw. 1-Stunden-Expositionen bei –70°C. Southern Blotting der DNA von S3- und J2c-Zellen zeigte, dass das MRP-Gen in der resistenten Zelllinie 10–15fach amplifiziert war. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Beleg für den Zusammenhang von erhöhten Pegeln dieser mRNA und mehrfacher Arzneimittelresistenz.

[0138] Das ursprüngliche 2,8 kb cDNA-Klon wurde sequenziert, was die Isolation überlappender Klone durch erneutes Screening der H69AR cDNA-Bibliothek mit synthetischen Oligonukleotiden erlaubte. Ein einzelner erweiterter offener Leserahmen von 1531 Aminosäuren wurde definiert, der ein als Mehrfach-Arzneimittelresistenz-assoziiertes Protein (MRP) bezeichnetes Protein codiert. Die translatierten GenBank- und SwissProt-Datenbanken wurden mithilfe des FASTA-Programms nach Ähnlichkeiten zu MRP durchsucht. Die Suche ergab, dass MRP ein neues Mitglied der ABC (ATP-binding Cassette)-Superfamilie von Transportsystemen ist. Mitglieder dieser Superfamilie sind am energieabhängigen Transport einer breiten Vielfalt von Molekülen durch Zellmembranen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten beteiligt. Enthalten in dieser Superfamilie sind der menschliche Multidrug-Transporter P-Glykoprotein (MDR1) und der Regulator der Transmembran-Leitfähigkeit bei zystischer Fibrose (CFTR).

Beispiel 2: VERHÄLTNIS VON MRP ZU ANDEREN MITGLIEDERN DER ABC-TRANSPORTER-SUPERFAMILIE

[0139] Das Verhältnis von MRP zu den verschiedenen Mitgliedern der ABC-Transporter-Superfamilie wurde mit dem Programmpaket PILEUP der Genetics Computer Group (Version 7) unter Anwendung einer modifizierten Version des Progressive-Alignment-Verfahrens nach Feng und Doolittle [J. Mol. Evol. 25, 351 (1987)] untersucht. Eine repräsentative Auswahl eines phylogenetisch breiten Bereichs von ABC-Proteinen, die aus hydrophoben Membranregionen gefolgt von Nukleotid-Bindungsregionen bestehen und deren Sequenzen der GenBank- und SwissProt-Datenbank entnommen werden konnten, wurde in dieser Analyse erfasst. Die Analyse teilt diese Proteinfamilie in zwei wesentliche Untergruppen (Abb. 2). Eine dieser wesentlichen Untergruppen besteht aus dem Cluster, der MRP (Hum/MRP), das Leishmania P-Glykoprotein-verwandte Molekül (Lei/PgpA) und die CFTRs (Hum/CFTR, Bov/CFTR, Mus/CFTR und Squ/CFTR) enthält. Die andere Untergruppe besteht aus den P-Glykoproteinen, den MHC-Klasse II-verknüpften Peptid-Transportern (Hum/Tap2, Mus/Tap1), den bakteriellen Exportern (Eco/HlyB, Pas/LktB), dem Heterozysten-Differenzierungsprotein (Ana/HetA), dem Malariaparasiten-Transporter (Pfa/Mdr1) und dem Exporter für den Mating-Faktor der Hefe (Ysc/Ste6).

[0140] Das Dendrogramm in Abb. 2 zeigt, dass MRP nur entfernt mit früher identifizierten Mitgliedern der ABC-Transporter-Superfamilie verwandt ist. Obwohl die Analyse nahelegt, dass es Lei/PgpA am nächsten verwandt ist, bewegt sich die Ähnlichkeit zwischen MRP und Lei/PgpA überwiegend in zwei Regionen, die beide

Signaturen von Nukleotid-Bindungsfalten (NBFs) enthalten (Abb. 3A). Die Gegenüberstellung wurde mithilfe von PILEUP erstellt wie in Abb. 2 beschrieben. Die gezeigte MRP-Sequenz wurde aus vier überlappenden Lambda-gt11-cDNA-Klonen kompiliert. Die Gegenüberstellung beginnt bei einem Methionin-Rest im MRP, der an dem Start-Methionin von Lei/PgpA ausgerichtet wird. Das vorausgesagte Start-Methionin von MRP selbst befindet sich 66 Aminosäuren weiter aufwärts. Identische und konservierte Aminosäuren sind in Abb. 3A durch Doppel- bzw. Einzelpunkte gekennzeichnet. Die Motive Walker A und B und die Signatur der „aktiven Transport"-Familie, die für Nukleotid-Bindungsfalten (NBFs) von ABC-Transportern charakteristisch sind, werden durch einfache Linien angezeigt und mit A, B bzw. C bezeichnet. Die vorausgesagten Transmembranregionen jedes Proteins sind durch Doppellinien gekennzeichnet. Die Region Lei/PgpA, die durch eine gestrichelte Linie dargestellt ist, hat einen mittleren Hydrophobizitätswert, der demjenigen einer Transmembranregion nahe kommt.

[0141] Es ist vorgeschlagen worden, dass die Doppelstruktur von P-Glykoproteinen die Duplizierung eines Urgens widerspiegelt, die vor der evolutionären Trennung von Tieren und Pflanzen erfolgte. Ein Vergleich der NBFs im NH2- und COOH-Ende von MRP und Lei/PgpA ergab eine geringere Ähnlichkeit als zwischen zwei korrespondierenden Regionen von P-Glykoproteinen üblicherweise zu finden. Um zu ermitteln, ob dies ein gemeinsames Strukturmerkmal von MRP, Lei/PgpA und Hum/CFTR ist, wurden ihre NBFs im NH_2- und COOH-Ende aneinander und an denjenigen mehrerer P-Glykoproteine ausgerichtet. Ein solcher Vergleich unter Verwendung von menschlichem P-Glykoprotein (Hum/Mdr1) ist in Abb. 3B beispielhaft dargestellt. Abb. 3B zeigt die NH_2-Ende-(N) und COOH-Ende(C)-Hälften der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von MRP, die ltpgpA (Lei/PgpA) (Aminosäuren 650–799 und 1303–1463), menschlichem CFTR (Hum/CFTR) (Aminosäuren 441–590 und 1227–1385) und MDR1 (Hum/Mdr1) (Aminosäuren 410–573 und 1053–1215) entsprechen. Die Sequenzen werden in der Gegenüberstellung durch PILEUP dargestellt. Der Umkehrtyp zeigt an, dass 3 von 4 Aminosäuren an dieser Position identisch oder konserviert sind. Die in Abb. 3A beschriebenen konservierten Motive A, B und C sind einfach unterstrichen. Die NBFs im NH_2-Ende von MRP, Hum/CFTR und Lei/PgpA weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf, die sie klar von der NBF im NH_2-Ende von Hum/Mdr1 unterscheiden, insbesondere im Abstand der konservierten Motive. Dieser Unterschied im Abstand trägt auch zu der relativ geringen Ähnlichkeit zwischen NBFs im NH_2- und im COOH-Ende jedes der drei Proteine bei. Darüber hinaus sind die NBFs im COOH-Ende von MRP, Lei/PgpA und Hum/CFTR einander ähnlicher als den NBFs im COOH- oder NH-Ende von Hum/Mdr1. Ähnlichkeitswerte für die NBFs im NH Ende bezogen auf MRP sind: Lei/PgpA (0,93), Hum/CFTR (0,85) und Hum/Mdr1 (0,60). Die vergleichbaren Werte im COOH-Ende sind Lei/PgpA (0,87), Hum/CFTR (0,84) und Hum/Mdr1 (0,73). Ähnlichkeitswerte für NBFs im NH- und COOH-Ende in demselben Protein sind: MRP (0,61), Lei/PgpA (0,60), Hum/CFTR (0,62) und Hum/Mdr1 (1,10). Diese Beobachtungen in Kombination mit der in Abb. 2 gezeigten Gesamtanalyse legen nahe, dass MRP, Lei/PgpA und CFTR sich aus einem gemeinsamen Urgen entwickelt haben, das NBFs im NH_2- und im COOH-Ende enthielt, aber von dem Urgen von P-Glykoprotein verschieden war oder von diesem divergierte, bevor sich Tiere und Pflanzen trennten.

Beispiel 3: EXPRESSION VON MRP IN NORMALEN GEWEBEN

[0142] Trotz des Wissens um seine Struktur und seine Fähigkeit, als Medikamenten-Efflux-Pumpe zu fungieren, wurde(n) die normale(n) physiologische(n) Rolle(n) von P-Glykoprotein nicht aufgeklärt. Einige mögliche Hinweise auf seine Funktion ergaben sich aus seiner Verteilung in normalen Geweben. P-Glykoprotein ist in sekretorischen Organen und Geweben hochgradig exprimiert, etwa in Nebennieren, Nieren, Lumen des Dickdarm-Epithels und im schwangeren Uterus der Maus. Es wurde außerdem in der Lunge gefunden, wenngleich die Funde variieren. Anhand der Zelltypen, in denen es zur Expression kommt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass P-Glykoprotein am Steroid-Transport und/oder am Schutz gegen Xenobiotika beteiligt sein könnte. Northern-Blot-Analysen von Gesamt-RNA-Präparationen aus verschiedenen menschlichen Geweben zeigen, dass MRP in relativ hohen Pegeln in Lungen, Hoden und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) exprimiert ist (Abb. 4). Lungen- und Hoden-RNAs wurden von Clontech Laboratories (Palo Alto, Kalifornien) bezogen. PBMC RNA wurde aus Zellen präpariert, die durch Ficoll-Isopaque-Zentrifugation (spezifisches Gewicht 1,078 g/ml, Pharmacia) aus peripherem Blut von gesunden Probanden isoliert wurden. Gesamt-RNAs aus Lungen, Hoden und PBMCs (30 µg) und H69AR-Zellen (10 µg) wurden analysiert wie in Abb. 1A. Das in Abb. 4 gezeigte Autoradiogramm stammt von einem Blot, der mit einem 0,9 kb EcoRI cDNA-Fragment von MRP sondiert und im Fall der RNAs von normalem Gewebe 38 Stunden sowie im Fall der H69AR RNA für 24 Stunden exponiert wurde. Der Blot wurde gestrippt und mit ^{32}P-markierter β-Aktin cDNA erneut sondiert. Das Aktin-Autoradiogramm ist eine 24-Stunden-Exposition. MRP-Transkripte lagen unterhalb der Nachweisgrenze in Plazenta, Gehirn, Niere, Speicheldrüse, Uterus, Leber und Milz.

Beispiel 4: KARTIERUNG DES MENSCHLICHEN MRP-GENS

[0143] Die menschlichen CFTR- und MDR1-Gene wurden auf das Chromosom 7 in den Bändern q31 bzw. q21 kartiert. Die mögliche entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft von MRP zu diesen Proteinen gab Anlass zur Untersuchung der Möglichkeit, dass das MRP-Gen mit einem dieser zuvor identifizierten Loci verknüpft sein könnte. Es wurde eine In-situ-Hybridisierung eines 1,8 kb EcoRI-Fragments von MRP cDNA nach dem Verfahren von Harper und Saunders [Chromosoms 8, 431 (1981)] durchgeführt. Metaphase-Chromosomen auf Objektträgern wurden für 2 Minuten bei 70°C in 70%igem entionisiertem Formamid, 2X SSC denaturiert und dann mit Ethanol dehydriert. Die Hybridisierungsmixtur bestand aus 50% entionisiertem Formamid, 10% Dextransulfat, 2X SSC (pH 6), 20 µg/ml sonifizierter Lachssperma-DNA und 0,2 µg/ml ^{3}H-markierter MRP cDNA. Die cDNA-Sonde wurde mithilfe eines Multiprime DNA Labelling Systems (Amersham) markiert auf eine spezifische Aktivität von 8,5 × 10^{8} cpm/µg DNA mit [^{3}H]-dTTP und [^{3}H]-dATP (New England Nuclear) und in der Hybridisierungslösung bei 70°C für 5 Minuten denaturiert. 50 µl der Sondenlösung wurden auf jeden Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger in 50% entonisiertem Formamid, 2X SSC gefolgt von 2X SSC (pH 7) gewaschen und dann sequenziell in Ethanol dehydriert. Die Objektträger wurden mit Kodak NTB/2 Emulsion überzogen und nach einer Exposition von 5 Wochen bei 4°C entwickelt. Die Chromosomen wurden in einem modifizierten Fluoreszenzverfahren mit 0,25-%-Wright-Farbstof gefärbt [C. C. Lin, P. N. Daper, M. Braekeleer, Cytogenet. Cell Genet. 39, 269 (1985)]. Die Positionen von 200 Silberkörnern direkt über gut bandierten Metaphase-Chromosomen oder diese berührend wurden in dem von der ISCN abgeleiteten Idiogramm des menschlichen Karyotyps verzeichnet. Eine signifikante Ansammlung von Körnern (40) wurde in der 16p-Region ($p < 0,0001$) beobachtet, und die Spitze der Verteilung lag bei 16p13.1, wodurch bestätigt wurde, dass MRP nicht mit CFTR- oder MDR-Genen verbunden ist. Ungefähr 160 Metaphasen wurden untersucht. Diese Ergebnisse sind in **Abb. 5** zusammengefasst.

Beispiel 5: EXPRESSION VON MRP IN EINER MEDIKAMENTENEMPFINDLICHEN ZELLE VERLEIHT DER ZELLE DOXORUBICIN-RESISTENZ

[0144] Während erhöhte Konzentrationen von MRP und mRNA in mehrfach arzneimittelresistenten Zelllinien nachgewiesen wurden, die von verschiedensten Geweben stammten, und für verschiedene dieser Zelllinien außerdem gezeigt werden konnte, dass sie mehrere Kopien des MRP-Gens enthalten, als Resultat der Amplifizierung und Translokation einer Region des Chromosoms 16, die das MRP-Gen bei Bande p13.1 überspannt, blieb angesichts der vielschrittigen Selektionsprozeduren zur Gewinnung der Zelllinien die Möglichkeit, dass die Überexpression des MRP-Gens nur eine Komponente aus einer Reihe von Veränderungen ist, die zur Verleihung einer mehrfachen Arzneimittelresistenz erforderlich sind. Die Fähigkeit von MRP allein, einer medikamentenempfindlichen Zelllinie mehrfache Arzneimittelresistenz zu verleihen, wurde bestimmt, indem ein MRP-Expressionsvektor konstruiert, der Expressionsvektor in medikamentenempfindliche Zellen transfektiert und die relative Arzneimittelresistenz der transfektierten Zellpopulationen beurteilt wurde.

[0145] Ein DNA-Fragment, das der kompletten Codierregion von MRP mRNA plus 86 Nukleotide 5' und 32 Nukleotide 3' untranslatierte Sequenz entspricht, wurde assembliert und in den Expressionsvektor pRc/CMV unter Kontrolle des menschlichen Cytomegalievirus-Promotors übertragen. Ein DNA-Fragment, das die komplette Codierregion von MRP mRNA enthält, wurde in dem Vektor assembliert, pBluescript II KS^{+} (Stratagene), wozu überlappende cDNA-Klone oder aus diesen Klonen erzeugte PCR-Produkte verwendet wurden. Die Originaltreue der MRP-Sequenz wurde durch eine DNA-Sequenzanalyse bestätigt, bevor das intakte MRP-Fragment in den eukaryotischen Expressionsvektor, pRc/CMV (Invitrogen), verschoben wurde. Die Integrität des MRP-Fragments in dem Expressionsvektor wurde durch detaillierte Restriktionskartierung und DNA-Sequenzanalyse der Klonstellen beurteilt. In dem pRc/CMV-Vektor wird die MRP-Expression durch die Enhancer/Promotor-Sequenz von dem Sofortgen des menschlichen Cytomegalievirus kontrolliert. Das MRP-Transkript enthält ebenfalls einen Teil der 3' untranslatierten Region und das Polyadenylierungssignal von boviner Wachstumshormon-mRNA, das von dem Vektor bereitgestellt wird. Auf diese Weise erzeugt das pRc/CMV-MRP-Konstrukt ein Transkript von 5,2 bis 5,3 kb, das die gesamte Codiersequenz enthält (wovon 86 Nukleotide aus der MRP mRNA-Sequenz stammen) und etwa 250 Nukleotide von 3' untranslatierter Sequenz (wovon 32 Nukleotide aus der MRP mRNA-Sequenz stammen). Dieser Vektor enthält auch das bakterielle Aminoglukosid-3'-Phosphotransferase-Gen, das Resistenz gegen Geneticin verleiht (G418).

[0146] HeLa-Zellen wurden entweder mit dem parentalen Vektor oder dem Vektor, welcher die MRP-Codiersequenz enthält, transfektiert, wozu Supercoiled-DNA und ein standardmäßiges Kalziumphosphat-Transfektionsverfahren eingesetzt wurden. HeLa-Zellen wurden mit dem pRc/CMV-Vektor oder dem Vektor, welcher die MRP-Codierregion enthält, transfektiert, wozu ein standardmäßiges Kalziumphosphat-Transfektionsverfahren eingesetzt wurde [J. Sambrook, E. F. Firtsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)]. Annähernd 50.000 Zellen in jeder Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekulturplatte wurden für 16 Stunden 10 µg von Supercoiled-DNA in einem Kalzium-Phosphat-Präzipitat ausgesetzt. Nach 48 Stunden wurde das Wachstumsmedium gewechselt, sodass es G418 mit 200 µg/ml enthielt, wodurch Zellen selektiert wurden, die das durch den pRc/CMV-Vektor codierte Neomycin-Resistenzgen exprimierten. Drei Wochen später wurden unabhängig voneinander transfektierte Zellpopulationen mittels eines Tetrazoliumsalz-Mikrotiterplatten-Assay (S. P. C. Cole, Cancer Chemother. Pharmacol. 26, 250 (1990)) auf Resistenz gegen Doxorubicin getestet. Diese Populationen, die eine erhöhte relative Resistenz gegen das Medikament zeigten, wurden expandiert zwecks Testung auf Kreuzresistenzen gegen andere zytotoxische Medikamente und Analyse von MRP mRNA- und Protein-Pegeln.

[0147] Poly(A)$^+$ RNA wurde mithilfe des Micro-FastTrack RNA-Isolationskits (Invitrogen) isoliert. Die RNA wurde der Elektrophorese über ein Formaldehyd-Agarosegel unterzogen und auf eine Zetaprobe-Membran (Bio-Rad) transferiert. Die Blots wurden hybridisiert mit komplementären ^{32}P-markierten cDNA-Fragmentsonden zu den mRNAs für MRP, MDR1 [A. M. Van der Bliek, F. Bass, T. Ten Houte de Lange, P. M. Kooiman, T. Van der Velde Koerts, P. Borst, EMBO J. 6, 3325 (1987)], Topoisomerase II α[T. D. Y. Chung, F. H. Drake, K. B. Tan, S. R. Per, S. T. Crooke, C. K. Mirabelli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 9431 (1989)], Topoisomerase II β [ibid.], Annexin II (S. P. C. Cole, M. J. Pinkoski, G. Bhardwaj, R. G. Deeley, Br. J. Cancer 65, 498 (1992)) sowie einer Region des pRc/CMV-Vektors, der einen Teil der 3' untranslatierten Region codiert, und dem Polyadenylierungssignal von dem bovinen Wachstumshormon-Gen. Die Hybridisierung der Sonden wurde mittels Densitometrie der Autoradiogramme auf einem Molecular Dynamics Computing Densitometer quantifiziert. Sorgfältig wurde darauf geachtet, ausschließlich autoradiografische Expositionen zu vergleichen, die innerhalb des Linearbereichs des Films lagen. Darüber hinaus wurden Variationen im Laden von RNA auf die Gele bewertet, indem Blots mit einem ^{32}P-markierten Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-cDNA-Fragment (ATCC/NIH #57090) sondiert wurden und die mit Ethidium-Bromid gefärbten ribosomalen RNA-Banden auf Foto-Negativen der RNA-Gele densitometrisch gescannt wurden.

[0148] Die relativen Mengen von MRP-Protein wurden durch Immunblot-Analyse der Gesamt-Zellextrakte und membran-angereicherten Fraktionen beurteilt. Zellpellets wurden bei 5×10^7 Zellen/ml im Puffer resuspendiert, enthaltend 10 mM Tris HCl, pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ und Protease-Inhibitoren (2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 50 µg/ml Antipain, 2 µg/ml Aprotinin, 200 µg/ml EDTA, 200 µg/ml Benzamidin, 1 µg/ml Pepstatin). Nach 10 Minuten auf Eis wurden die Zellen mit etwa 80 Zügen eines Tenbroek-Homogenisators homogenisiert. Das Homogenat wurde auf 250 mM in Sukrose justiert, bevor verbleibende intakte Zellen und Nuklei mittels Zentrifugation mit 800 × g bei 4°C für 20 Minuten entfernt wurden. Zur Präparation einer membran-angereicherten Fraktion wurde der Überstand mit 100.000 × g bei 4°C für 20 Minuten in einer Beckman TL-100 Ultrazentrifuge zentrifugiert und wurde das Pellet in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 125 mM Sukrose und den oben aufgelisteten Protease-Inhibitoren resuspendiert. Für Sodium-Dodecyl-Sulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblotting wurden geeignete Mengen von Protein 1:1 mit einem Aufschlusspuffer gemischt (Endkonzentration 4 M Urea, 0,5% SDS, 50 mM Dithiothreitol). Proben wurden ohne Erwärmung auf ein 7%iges Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel aufgetragen. Proteine wurden auf Immobilon-P PVDF-Membranen (Millipore) überführt mit 50 mM3-(Cyclohexylamino)-1-Propansulfonat, pH 11,0. Zum Nachweis von MRP wurden die Blots mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen Kaninchen-Antikörper inkubiert, der gegen ein synthetisches Peptid entwickelt wurde, dessen Sequenz anhand der der klonierten MRP cDNA vorausgesagt wurde und die in keinem anderen bekannten Protein zu finden ist. Die Antikörperbindung wurde mittels meerrettichperoxidase-konjugiertem Ziege-Anti-Kaninchen-igG und erweiterter Chemilumineszenz-Detektion (Amersham) visualisiert. Der affinitätsgereinigte Anti-MRP-Antikörper erkennt ein glykosyliertes integrales Membranprotein mit einem offensichtlichen Molekülgewicht von 190 Kilodalton. In seiner deglykolysierten Form sinkt das Molekülgewicht des Proteins auf 165 bis 170 Kilodalton, was zu dem Molekülgewicht von 171 Kilodalton passt, das anhand der primären Aminosäuresequenz von MRP vorausgesagt wurde.

[0149] Zu diesem Zeitpunkt wurde der Pegel von G418 in dem Wachstumsmedium auf 400 oder 800 µg/ml erhöht ohne merklichen Effekt auf die Wachstumsrate von Zellen, die mit entweder dem parentalen Vektor oder dem Vektor, der die MRP-Codiersequenz enthält, transfektiert wurden. Transfektierte Populationen wurden kontinuierlich für bis zu vier Monate in G418-haltigem Medium vermehrt, ohne dass sich der Grad der Resistenz gegen Doxorubicin änderte. Der Einbau dieser Vektoren in genomische DNA bietet das Potenzial, die Expression von endogenen Genen, die die Arzneimittelresistenz adventiv erhöhen könnten, zu verändern. Folgerichtig wurden keine chemotherapeutischen Medikamente als Selektionsmittel eingesetzt. Populationen transfektierter Zellen wurden ausschließlich anhand ihrer Fähigkeit zum Wachstum in Anwesenheit von G418 selektiert. Da Zellen, in denen MRP in Überexpression vorliegt, keine erhöhte Resistenz gegen dieses Antibiotikum aufweisen, sind in den transfektierten Zellpopulationen variable Expressionsgrade von MRP zu erwarten.

[0150] Die relativen Resistenzen gegen Doxorubicin werden für zwei Beispiele von G418-resistenten Zellpopulationen gezeigt, welche mit dem MRP-Expressionsvektor transfektiert wurden (T2 und T5), sowie für untransfektierte HeLa-Zellen und eine Population, die mit dem parentalen Vektor (Cl) transfektiert wurde (Abb. 6). Schlüssel: HeLa-Zellen (◦); mit dem Expressionsvektor pRc/CMV transfektierte HeLa-Zellen (C1, °); mit dem Vektor, der die MRP-Codiersequenz enthält, transfektierte HeLa-Zellen (T2, □; T5, ▲); und ein aus den gezeigten doxorubicinresistenten transfektierten T5-Zellen isoliertes Klon (▲T5-5). Jeder Punkt repräsentiert das Mittel dreifacher Bestimmungen in einem Einzelexperiment, und die standardmäßigen Abweichungen waren < 5%. Ähnliche Resultate wurden in drei zusätzlichen Experimenten erzielt. IC_{50} ist in der Abbildung dargestellt und ist definiert als die Konzentration von Doxorubicin, die benötigt wird, um die mit nicht behandelten Zellen erhaltenen Werte um 50% zu verringern. In den gezeigten Beispielen zeigte eine der mit dem MRP-Expressionsvektor transfektierten Populationen (T2) wenig Veränderung der Doxorubicin-Resistenz, während die Resistenz der anderen (T5) 15fach erhöht war. Zusätzlich wurden mehrere Klone der resistenten Population in Anwesenheit von G418 kultiviert und der Grad ihrer Doxorubicin-Resistenz bestimmt. Die Dosis-Wirkungs-Kurven für zwei der Transfektanten (T2, T5) und für eines der Klone (T5-5) wurden dann verglichen, um festzustellen, ob ihre Resistenz gegen Doxorubicin mit den Konzentrationen von MRP mRNA korrelierte.

[0151] Die von dem Expressionsvektor produzierte MRP mRNA hat eine vorausgesagte Länge von 5,2 bis 5,3 kb einschließlich einem Poly(A)-Schwanz, sodass sie von der längeren endogenen MRP mRNA durch Northern-Analyse unterschieden werden kann. Ein Blot von Poly(A)$^+$ RNA von den in Abb. 6 gezeigten Zellpopulationen, der mit einer klonierten cDNA-Sonde, welche einem Teil der MRP-Codiersequenz entsprach, hybridisiert wurde, ergab eine relativ abundante mRNA von annähernd 5,3 Kb in resistenten Transfektanten und niedrige Pegel der endogenen MRP mRNA (**Abb.** 7A). Die relative Konzentration der 5,3 kb mRNA ist um das 70- bis 80fache bzw. 20- bis 30fache höher in der resistenten Zellpopulation (T5) und dem Klon (T5-5) als die der endogenen MRP mRNA in der Kontrollpopulation (C1). Die relativen Pegel von mRNAs wurden mittels Densitometrie und Normalisierung auf die Pegel von GAPDH mRNA bestimmt. Die Expression der 5,3 kb MRP mRNA in der transfektierten Zellpopulation, die nur eine geringe Veränderung der Resistenz zeigte (T2), betrug nur etwa die Hälfte derjenigen der endogenen MRP mRNA. Ähnliche RNA-Blots wurden ebenfalls mit einem DNA-Fragment des pRc/CMV-Plasmids sondiert, welches Teil der 3' untranslatierten Region der vektorcodierten MRP mRNA ist. Diese Sonde hybridisierte lediglich mit der 5,3 kb MRP mRNA, was bestätigte, dass sie von dem Vektor transkribiert wurde und nicht aus der erhöhten Expression eines der endogenen MRP verwandten Gens resultierte (**Abb.** 7B). Somit erhöht sich also in mit dem MRP-Expressionsvektor transfektierten Zellen der Grad der Arzneimittelresistenz mit der Konzentration von MRP mRNA.

[0152] Die Konzentration von endogener MRP mRNA in den mehrfach arzneimittelresistenten H69AR-Zellen (in den Abbildungen mit AR bezeichnet) ist annähernd 100fach höher als in den H69-Stammzellen (in den Abbildungen mit H69 bezeichnet), und die relativen Resistenzen der beiden Zelllinien gegen Doxorubicin unterscheiden sich ebenfalls um das 50- bis 100fache. Die Pegel von vektorcodierter MRP mRNA in der HeLa-Zellpopulation T5 sind 70- bis 80mal höher als diejenigen von endogener MRP mRNA in den Stammzellen. Die Arzneimittelresistenz ist jedoch nur um das 15fache erhöht. Um zu untersuchen, warum die relative Zunahme der Arzneimittelresistenz in den Transfektanten geringer war als in H69AR-Zellen, haben wir die Pegel von MRP mRNA und Protein in den beiden verschiedenen Zelltypen verglichen. Die Northern-Analyse ergab, dass die Pegel von endogener MRP mRNA in H69-Zellen und HeLa-Zellen, die mit dem parentalen pRc/CMV-Vektor transfektiert wurden, ähnlich waren. Die relative Abundanz von vektorcodierter MRP mRNA in der arzneimittelresistenten transfektierten Zellpopulation (T5) war außerdem vergleichbar derjenigen von endogener MRP mRNA in H69AR-Zellen (**Abb.** 7C). Allerdings zeigte ein Protein-Blot mit affinitätsgereinigtem Anti-MRP-Antikörper, dass der Pegel von Protein in den HeLa-Zelltransfektanten T5 5- bis 8mal niedriger als in H69AR-Zellen (**Abb.** 7C) war. Diese Ergebnisse decken sich mit der 15fachen Zunahme der Resistenz, die in den transfektierten T5-Zellen beobachtet wurde, verglichen mit der 50- bis 100fachen Zunahme in H69AR-Zellen. Der niedrigere Proteinpegel in den transfektierten Zellen ist höchstwahrscheinlich einem Unterschied in der translatorischen Effizienz zwischen den vektorcodierten und den endogenen MRP mRNAs zuzuschreiben, wenngleich auch ein Unterschied in der Proteinabbaurate zwischen den beiden Zelltypen nicht ausgeschlossen werden kann.

[0153] Da H69AR-Zellen in einer mehrstufigen Selektion gewonnen wurden, ist es möglich, dass zusätzliche Veränderungen aufgetreten sind, die entweder unabhängig von oder im Zusammenwirken mit MRP den Grad der Resistenz gegen einige Medikamente beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass H69AR-Zellen geringere Pegel von Topoisomerase II α und β mRNA und Protein aufweisen, was ihre Resistenz gegen Anthrazykline und Epipodophyllotoxine verstärken könnte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass darin Annexin II überexprimiert ist, was sich auf den Transport von Membranproteinen auswirken könnte. C. D. Evans, S. E. L. Mirski, M. K. Danks, W. T. Beck, S. P. C. Cole, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 33, 2694 (1992). Annexin II ist nach-

weislich an der Herstellung von fusogenen Vesikeln und an der Exozytose beteiligt. S. P. C. Cole, M. J. Pinkoski, G. Bhardwaj, R. G. Deeley, Br. J. Cancer 65, 498 (1992). Es ist nicht bekannt, in welchem Umfang diese zusätzlichen Veränderungen Einfluss auf den Grad der Resistenz von H69AR-Zellen haben oder ob sie in irgendeiner Weise mit der Überexpression von MRP zusammenhängen. Allerdings verändert die Überexpression von MRP in den transfektierten Zellen nicht die Pegel von mRNAs, die entweder das Topoisomerase II Isoform (**Abb.** 8A) oder Annexin II (**Abb.** 8b) spezifizieren, noch weisen die transfektierten HeLa-Zellen irgendwelche Veränderungen der Mdr1 mRNA-Pegel auf. Diese Beobachtungen untermauern die Schlussfolgerung, dass eine erhöhte Resistenz gegen Doxorubicin in den transfektierten Zellen direkt der Überexpression von MRP zugeschrieben werden kann.

Beispiel 6: EXPRESSION VON MRP IN EINER MEDIKAMENTENEMPFINDLICHEN ZELLE VERLEIHT DER ZELLE MEHRFACHE ARZNEIMITTELRESISTENZ

[0154] Zur Feststellung, ob die erhöhte Doxorubicin-Resistenz der transfektierten Zellen begleitet wurde von erhöhter Resistenz gegen andere Klassen von Chemotherapeutika, wurden die Zellen auf Kreuzresistenz gegen Vincristin (ein Vinca-Alkaloid), VP-16 (ein Epipodophyllotoxin) und Cisplatin getestet (**Abb. 9**). Zytotoxizitäts-Assays wurden an untransfektierten HeLa-Zellen (◦), mit dem Expressionsvektor pRc/CMV transfektierten HeLa-Zellen (Cl, °), mit dem Expressionsvektor pRc/CMV-MRP transfektierten und für 4 Monate in G418 bei 400 µg/ml gehaltenen HeLa-Zellen (T5, ▲) sowie T5-Zellen, die für 1 Monat (T5-800/1, ▲) bzw. für 3 Monate (T5-800/3, □) bei 800 Mg/ml G418 gehalten wurden. Jeder Punkt repräsentiert das Mittel dreifacher Bestimmungen in einem Einzelexperiment, und die standardmäßigen Abweichungen waren < 5%. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei bis drei zusätzlichen Experimenten mit Vincristin und VP-16 erzielt. Die IC_{50}-Werte der verschiedenen Zelllinien sind in der Abbildung dargestellt. Dosis-Wirkungs-Kurven für mehrere unabhängig voneinander vermehrte Kulturen von MRP-Transfektanten zeigen, dass sie ungefähr 25- bzw. 5- bis 10mal so resistent gegen Vincristin bzw. VP-16 sind verglichen mit untransfektierten HeLa-Zellen oder mit dem parentalen Vektor transfektierten Zellen (C1). Die Transfektanten zeigten keine Erhöhung der Cisplatin-Resistenz, was zu dem pharmakologischen Phänotyp von H69AR-Zellen passt und auch charakteristisch ist für Zellen, die eine Überexpression von P-Glykoprotein zeigen. Diese Ergebnisse beweisen erstmals, dass dieser Phänotyp durch ein Mitglied der ABC-Transporter-Superfamilie verliehen werden kann, das strukturell sehr verschieden von P-Glykoproteinen ist.

Beispiel 7: PRÄPARATION VON ANTI-MRP-ANTIKÖRPERN UND IHRE VERWENDUNG IN IMMUNPRÄZIPITATIONS- UND IMMUNBLOTTING-EXPERIMENTEN

[0155] MRP wird durch eine mRNA von etwa 6,5 kb mit einem erweiterten offenen Leserahmen von 1531 Aminosäuren codiert. Es wird vorausgesagt, dass das Protein zwei Nukleotid-Bindungsfalten (NBFs) und 12 Transmembran-Regionen, die 8 zu 4 auf die zum NH2- bzw. zum COOH-Ende hin gelegenen Hälften des Moleküls verteilt sind, enthalten wird. Zur Bestätigung, dass ein Protein mit der vorausgesagten Größe und Sequenz in resistenten H69AR-Zellen überexprimiert ist, wurden polyklonale Antikörper gegen synthetische Peptide präpariert, basierend auf der abgeleiteten Aminosäuresequenz von MRP, und in Immunanalysen verwendet.

[0156] Ein Peptid der Sequenz AELQKAEAKKEE wurde aus der hochdivergenten zytoplasmatischen Linker-Domäne von MRP (MRP-L, Position 932–943) selektiert, während das zweite Peptid (GENLSVGQRQLVCLA) aus der zweiten Nukleotid-Bindungsdomäne von MRP (MRP-2, Position 1427–1441) gewählt wurde. Beide Peptide wurden durch das Biotechnology Service Centre am Hospital for Sick Children (Toronto, Ontario) für die direkte Immunisierung auf Ultrasyn D-Harz synthetisiert. Etwa 400 µg von gebundenem Peptid wurden in destilliertem Wasser resuspendiert und sonifiziert. Die resultierende Suspension wurde in einem gleichen Volumen von komplettem Freund-Adjuvans (Difco) emulgiert und 3 Monate alten weiblichen weißen Neuseeland-Kaninchen an vier Stellen s. k. injiziert. In Abständen von 2 bis 3 Wochen wurde dieselbe Menge Immunogen emulgiert in inkomplettem Freund-Adjuvans s. k. injiziert. Beginnend zwei Wochen nach der dritten Immunisierung wurde den Kaninchen mittels Arterienpunktion Blut abgenommen und wurde ihr Serum mittels enzymgebundenem Immunosorbent-Test (ELISA) und Immunblotting auf Vorhandensein von Antikörpern getestet.

[0157] Nach der Immunisierung mit MRP-L-Peptid gewonnene Kaninchen-Antiseren, die in ELISA oder Western-Blotting positiv waren, wurden durch Ammoniumsulfat-Präzipitation konzentriert und per Affinitätschromatografie aufgereinigt. Affinitätssäulen wurden konstruiert, indem das MRP-L-Peptid gemäß den Anweisungen des Herstellers (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) an CNBr-aktivierte Sepharose (5 µmol Peptid/ml Gel) gekoppelt wurde, gefolgt von ausführlicher Waschung mit 10 mM Tris, pH 7,5. Das Ammoniumsulfat-Präzipitat

wurde in phosphatgepufferter Salzlösung gelöst, ausführlich gegen denselben Puffer dialysiert und dann der vorgewaschenen Affinitätssäule appliziert. Die geladene Säule wurde zunächst mit 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen, gefolgt von 10 mM Tris, pH 7,5, 0,5 M NaCl, bevor der Antikörper mit 0,1 M Glycin, pH 2,5, eluiert wurde. Die Fraktionen wurden in Sammelrohren neutralisiert, welche 1 M Trips, pH 8,0, enthielten. Die gewünschten Fraktionen wurden gepoolt, ausführlich gegen phosphatgepufferte Salzlösung dialysiert und durch Amicon-Konzentratoren/-Filtrierung konzentriert. Die schlussendliche Proteinkonzentration des aufgereinigten Antikörpers wurde auf 0,7–1,5 mg/ml eingestellt. Kaninchen-Antiseren, die nach der Immunisierung mit Peptid MRP-2 gewonnen wurden, wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

[0158] ELISA-positive Antiseren von diesen Kaninchen wurden in Immunblot-Analysen verwendet. Es wurde eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach dem Verfahren von Laemmli mit einem 5%igen oder 7%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel durchgeführt. Proben wurden 1:1 in Aufschlusspuffer verdünnt zu einer Endkonzentration von 4 M Urea, 0,5% SDS, 50 mM DTT und ohne Erwärmung auf die Gele geladen. Für das Immunblotting wurden Proteine nach der Gelelektrophorese auf Immobilon-P PVDF-Membranen (Millipore, Mississauga, Ontario) mit 50 mM CAPS, pH 11,0 transferiert. Die Blots wurden für eine Stunde in Blockierungslösung (5% normales Ziegenserum/5% HyClone-Serum/1% BSA) in TBS-T (10 mM Tris, pH 7,5, 0,05% Tween 20, 150 mM NaCl) inkubiert. Anti-MRP-Antikörper wurden direkt der Blockierungslösung hinzugefügt und für 2 Stunden inkubiert. Der Blot wurde 3 × 5 Minuten in TBS-T gewaschen und in Blockierungspuffer verdünntes Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat [affinitätsgereinigtes F(ab')2-Fragment (Jackson Immun Research) oder ganzes Molekül (ICN Biomedicals)] hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation wurde der Blot 5 × 5 Minuten in TBS-T gewaschen und Antikörperbindung nachgewiesen durch ECL (Amersham, GB) und Exposition auf Kodak XOMAT-Film. Die Antiseren wiesen ein 190 kD Protein in resistenten H69AR-Zellen nach, das in medikamentenempfindlichen H69- und revertanten H69PR-Zellen nicht nachweisbar war.

[0159] Die Antiseren wurden auch in Immunpräzipitations-Experimenten mit Zellmembran-Präparaten von Zellen benutzt, welche metabolisch mit ^{35}S-Methionin markiert wurden. Die Zellen wurden in 50 µCi/ml ^{35}S-Methionin (Tran ^{35}S-Marker; cell labelling grade; spezifische Aktivität, 710 Ci/mmol) (Dupont NEN) über Nacht in methioninarmem RPMI 1640-Medium (Sigma) oder mit 500 µCi/ml ^{32}P-Orthophosphorsäure (trägerfrei, 500 mCi/m1) (Dupont NEN) in phosphatarmem TPMI-Medium (ICN) für 4 Stunden kultiviert. Radiomarkierte 100.000 × g membran-angereicherte Rohfraktionen wurden wie folgt präpariert und immunpräzipitiert. Gefrorene oder frische Zellen (50 × 10^6/ml) wurden suspendiert in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthaltend 10 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ mit Protease-Inhibitoren (2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 50 µg/ml Antipain, 2 µg/ml Aprotinin, 200 µg/ml EDTA, 200 µg/ml Benzamidin, 0,5 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin) und 0,025 mg/ml RNase A und 0,05 mg/ml DNase 1. Nach 10 Minuten wurde die Suspension in einem gekühlten Tenbroek-Homogenisator mit 80 Zügen des Pistills homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit 800 × g bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, um Nuklei und verbleibende intakte Zellen zu entfernen. Eine membran-angereicherte Fraktion wurde durch Ultrazentrifugation des Überstands mit 100.000 × g bei 4°C für 20 Min. präpariert. Die Pellets wurden in 10 mM Tris HCl, pH 7,6 mit 125 mM Sukrose und Protease-Inhibitoren wie oben resuspendiert. Die Proteinkonzentrationen wurden durch die Modifikation des Lowry-Assay nach Peterson bestimmt, und Teilproben wurden bei –80°C gelagert.

[0160] Proteine wurden aufgeschlossen in 1% CHAPS, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, bei einem Lösungsmittel-Protein-Verhältnis von 20:1 für eine Stunde bei 4°C mit häufigem Verwirbeln gefolgt von einer Zentrifugation mit 100.000 × g für 20 Minuten in einem T100.3-Rotor in einer Beckman-Ultrazentrifuge. Der Überstand (unabhängig davon, welcher Prozentsatz des Proteins von ursprünglich 40 µg des Membran-Proteins aufgeschlossen wurde) wurde mit affinitätsgereinigtem MRP-L-Antiserum (25 mg aufgeschlossen in 1% CHAPS, 100 mM KCl, 50 Mm Tris-HCl, pH 7,5) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden aus 700 µl mit 1% CHAPS-Puffer hergestellt und danach mit 50 µl (10% w/v) Protein-A-Sepharose Cl-4B (Pharmacia) für 3 Stunden bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Proben wurden 10 Sekunden bei 14.000 × g zentrifugiert und nacheinander 5 Minuten mit jeweils 1 ml Puffer 1 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 0,05% SDS), Puffer 2 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,15 M NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 0,05% SDS, 0,5% Deoxycholat) und Puffer 3 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,05% SDS) gewaschen. Die gewaschenen Perlen wurden mit 100 µl 4 M Urea, 0,5% SDS, 50 mM DTT für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit häufigem Verwirbeln inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und die Überstände auf 7%igen Polyacrylamidgelen analysiert. Die Gele wurden in Isopropanol:Wasser:Essigsäure (25:65:10) für 30 Minuten fixiert, gefolgt vom Hinzufügen des fluorographischen Agens Amplify (Amersham). Die Gele wurden getrocknet und dann über Nacht bei –80°C auf Film exponiert. Durch Immunpräzipitation der membran-assoziierten Proteine von ^{35}S-Methionin-markierten H69AR-Zellen mit den immunreaktiven Antiseren war ein 190 kD Protein nachweisbar.

[0161] Das offensichtliche Molekülgewicht des immunodetektierbaren 190 kD Proteins in H69AR-Zellmembranen ist etwa 20 kD höher als das vorausgesagte MRP-Molekülgewicht von 171 kD auf Basis der abgeleiteten primären Aminosäuresequenz. Die Analyse der MRP-Sequenz zeigt jedoch das Vorhandensein von drei potenziellen N-Glykosylierungsstellen in Regionen, die laut Voraussage asymmetrisch über eine Membran-Doppelschicht verteilt sind. Um festzustellen, ob das 190 kD Protein N-glykosyliert wurde oder nicht, wurden zwei Experimentreihen durchgeführt. Zuerst wurden resistente H69AR-Zellen in Anwesenheit von Tunicamycin, einem potenten Inhibitor der N-verknüpften Glykosylierung, vermehrt. Die N-verknüpfte Glykosylierung wurde in H69AR-Zellen durch Kultivierung in 15 µg/ml Tunicamycin (Sigma) für 24 Stunden inhibiert. Die behandelten Zellen wurden zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, danach wurden Ganzzell-Lysate präpariert durch Homogenisierung in Lysis-Puffer (20 mM Tris HCl, pH 7,5, 20 mM KCl, 3 mM MgCl2, 0,5 mg/ml DNase 1, 0,25 mg/ml RNase A) mit Protease-Inhibitoren wie weiter oben beschrieben. Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Immunblotting der Ganzzell-Lysate wurden durchgeführt wie oben. In dem zweiten Ansatz wurden H69AR 100.000 × g Membranen mit Deglycosylase PNGase F inkubiert. Membran-angereicherte Fraktionen (200 µg Protein) wurden zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,5, enthaltend 25.000 NEB-Einheiten PNGase F (New England Biolabs), verdünnt. Nach 8 Stunden bei 37°C wurden weitere 25.000 NEB-Einheiten PBGase F hinzugefügt, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 37°C. Probenpuffer wurde direkt zugegeben und SDS-PAGE und Immunblotting wurden durchgeführt wie oben. In beiden Fällen wurde durch Immunblot-Analysen ein 170 kD Protein nachgewiesen, das gut zu dem vorausgesagten MRP-Molekülgewicht von 171 kD korreliert.

[0162] Um zu bestätigen, dass MRP ein ATP-bindendes Protein ist, wie es das Vorhandensein von ATP-bindenden Signaturmotiven nahe legt, wurden Membranen von resistenten H69AR- und medikamentenempfindlichen H69-Zellen mit ^{32}P-8-Azido-ATP photomarkiert. Membran-angereicherte Rohfraktionen wurden mit 1 µg/µl Protein in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, Puffer resuspendiert, der 1 mM $MgCl^2$ und Protease-Inhibitoren enthielt wie oben beschrieben. Nach der Zugabe von 3–4 µCi ^{32}P-8-Azido-ATP (spezifische Aktivität 2–10 Ci/mmol; ICN Biomedical, Mississauga, Ontario) wurde die Inkubation auf Eis für 1–5 Minuten fortgesetzt. Das Azido-ATP wurde durch Bestrahlung mit 366 nm etwa 10 cm von der Lichtquelle für 8 Minuten mittels eines Stratalinker-Sets mit 1100 µW zu dem Protein auf Eis vernetzt. Die markierten Proteine wurden bei –80°C gelagert, bis die Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder die Immunpräzipitation durchgeführt wurden. Die Spezifität der Markierung wurde bestätigt durch Konkurrenz mit Überschuss von kaltem ATP (Boehringer Mannheim, Laval, Que.), der vor der Zugabe von ^{32}P-8-Azido-ATP den Membranpräparaten zugefügt wurde. Diese Studien ergaben eine starke spezifische Markierung eines 190 kD Proteins in Membranen von den H69AR-Zellen, das in medikamentenempfindlichen H69-Zellen nicht nachgewiesen wurde. Unsere Ergebnisse zeigen, dass in H69AR-Zellen das MRP-Gen ein N-glykosyliertes ATP-bindendes Protein von 190 kD codiert.

[0163] Die beigefügte Sequenzliste für das erfindungsgemäße mehrfach arzneimittelresistente Protein ist Bestandteil der vorliegenden Offenbarungsschrift.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

I) ANMELDER: Cole, Susan P.C.
Deeley, Roger G.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZ ANSCHRIFT:
(A) ADRESSAT: LAHIVE & COCKFIELD
(B) STRASSE: 60 STATE STREET, SUITE 510
(C) STADT: BOSTON
(D) STAAT: MASSACHUSETTS
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 02109

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: US 000000
(B) ANMELDETAG: -OCT-1993
(C) KLASSIFICATION:

(viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:
(A) NAME:
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 000000
(C) ZEICHEN/AKTENNUMMER: PQI-002

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
(A) TELEPHON: (617) 227-7400
(B) TELEFAX: (617) 227-5149

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(I) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 5011 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(II) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 196 .. 4788

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
CAGGCGGCGT TGCGGCCCCG GCCCCGGCTC CCTGCGCCGC CGCCGCCGCC GCCGCCGCCG      60

CCGCCGCCGC CGCCGCCAGC GCTAGCGCCA GCAGCCGGGC CCGATCACCC GCCGCCCGGT     120

GCCCGCCGCC GCCCGCGCCA GCAACCGGGC CCGATCACCC GCCGCCCGGT GCCCGCCGCC     180

GCCCGCGCCA CCGGC ATG GCG CTC CGG GGC TTC TGC AGC GCC GAT GGC TCC       231
                 Met Ala Leu Arg Gly Phe Cys Ser Ala Asp Gly Ser
                   1               5                  10

GAC CCG CTC TGG GAC TGG AAT GTC ACG TGG AAT ACC AGC AAC CCC GAC       279
Asp Pro Leu Trp Asp Trp Asn Val Thr Trp Asn Thr Ser Asn Pro Asp
          15                  20                  25

TTC ACC AAG TGC TTT CAG AAC ACG GTC CTC GTG TGG GTG CCT TGT TTT       327
Phe Thr Lys Cys Phe Gln Asn Thr Val Leu Val Trp Val Pro Cys Phe
      30                  35                  40

TAC CTC TGG GCC TGT TTC CCC TTC TAC TTC CTC TAT CTC TCC CGA CAT       375
Tyr Leu Trp Ala Cys Phe Pro Phe Tyr Phe Leu Tyr Leu Ser Arg His
 45                  50                  55                  60

GAC CGA GGC TAC ATT CAG ATG ACA CCT CTC AAC AAA ACC AAA ACT GCC       423
Asp Arg Gly Tyr Ile Gln Met Thr Pro Leu Asn Lys Thr Lys Thr Ala
                 65                  70                  75

TTG GGA TTT TTG CTG TGG ATC GTC TGC TGG GCA GAC CTC TTC TAC TCT       471
Leu Gly Phe Leu Leu Trp Ile Val Cys Trp Ala Asp Leu Phe Tyr Ser
             80                  85                  90

TTC TGG GAA AGA AGT CGG GGC ATA TTC CTG GCC CCA GTG TTT CTG GTC       519
Phe Trp Glu Arg Ser Arg Gly Ile Phe Leu Ala Pro Val Phe Leu Val
          95                  100                 105

AGC CCA ACT CTC TTG GGC ATC ACC ACG CTG CTT GCT ACC TTT TTA ATT       567
Ser Pro Thr Leu Leu Gly Ile Thr Thr Leu Leu Ala Thr Phe Leu Ile
     110                 115                 120

CAG CTG GAG AGG AGG AAG GGA GTT CAG TCT TCA GGG ATC ATG CTC ACT       615
Gln Leu Glu Arg Arg Lys Gly Val Gln Ser Ser Gly Ile Met Leu Thr
125                 130                 135                 140

TTC TGG CTG GTA GCC CTA GTG TGT GCC CTA GCC ATC CTG AGA TCC AAA       663
Phe Trp Leu Val Ala Leu Val Cys Ala Leu Ala Ile Leu Arg Ser Lys
                145                 150                 155

ATT ATG ACA GCC TTA AAA GAG GAT GCC CAG GTG GAC CTG TTT CGT GAC       711
Ile Met Thr Ala Leu Lys Glu Asp Ala Gln Val Asp Leu Phe Arg Asp
            160                 165                 170

ATC ACT TTC TAC GTC TAC TTT TCC CTC TTA CTC ATT CAG CTC GTC TTG       759
Ile Thr Phe Tyr Val Tyr Phe Ser Leu Leu Leu Ile Gln Leu Val Leu
        175                 180                 185
```

```
TCC TGT TTC TCA GAT CGC TCA CCC CTG TTC TCG GAA ACC ATC CAC GAC      807
Ser Cys Phe Ser Asp Arg Ser Pro Leu Phe Ser Glu Thr Ile His Asp
    190                 195                 200

CCT AAT CCC TGC CCA GAG TCC AGC GCT TCC TTC CTG TCG AGG ATC ACC      855
Pro Asn Pro Cys Pro Glu Ser Ser Ala Ser Phe Leu Ser Arg Ile Thr
205                 210                 215                 220

TTC TGG TGG ATC ACA GGG TTG ATT GTC CGG GGC TAC CGC CAG CCC CTG      903
Phe Trp Trp Ile Thr Gly Leu Ile Val Arg Gly Tyr Arg Gln Pro Leu
                225                 230                 235

GAG GGC AGT GAC CTC TGG TCC TTA AAC AAG GAG GAC ACG TCG GAA CAA      951
Glu Gly Ser Asp Leu Trp Ser Leu Asn Lys Glu Asp Thr Ser Glu Gln
            240                 245                 250

GTC GTG CCT GTT TTG GTA AAG AAC TGG AAG AAG GAA TGC GCC AAG ACT      999
Val Val Pro Val Leu Val Lys Asn Trp Lys Lys Glu Cys Ala Lys Thr
        255                 260                 265

AGG AAG CAG CCG GTG AAG GTT GTG TAC TCC TCC AAG GAT CCT GCC CAG     1047
Arg Lys Gln Pro Val Lys Val Val Tyr Ser Ser Lys Asp Pro Ala Gln
    270                 275                 280

CCG AAA GAG AGT TCC AAG GTG GAT GCG AAT GAG GAG GTG GAG GCT TTG     1095
Pro Lys Glu Ser Ser Lys Val Asp Ala Asn Glu Glu Val Glu Ala Leu
285                 290                 295                 300

ATC GTC AAG TCC CCA CAG AAG GAG TGG AAC CCC TCT CTG TTT AAG GTG     1143
Ile Val Lys Ser Pro Gln Lys Glu Trp Asn Pro Ser Leu Phe Lys Val
                305                 310                 315

TTA TAC AAG ACC TTT GGG CCC TAC TTC CTC ATG AGC TTC TTC TTC AAG     1191
Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Pro Tyr Phe Leu Met Ser Phe Phe Phe Lys
            320                 325                 330

GCC ATC CAC GAC CTG ATG ATG TTT TCC GGG CCG CAG ATC TTA AAG TTG     1239
Ala Ile His Asp Leu Met Met Phe Ser Gly Pro Gln Ile Leu Lys Leu
        335                 340                 345

CTC ATC AAG TTC GTG AAT GAC ACG AAG GCC CCA GAC TGG CAG GGC TAC     1287
Leu Ile Lys Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Pro Asp Trp Gln Gly Tyr
    350                 355                 360

TTC TAC ACC GTG CTG CTG TTT GTC ACT GCC TGC CTG CAG ACC CTC GTG     1335
Phe Tyr Thr Val Leu Leu Phe Val Thr Ala Cys Leu Gln Thr Leu Val
365                 370                 375                 380

CTG CAC CAG TAC TTC CAC ATC TGC TTC GTC AGT GGC ATG AGG ATC AAG     1383
Leu His Gln Tyr Phe His Ile Cys Phe Val Ser Gly Met Arg Ile Lys
                385                 390                 395

ACC GCT GTC ATT GGG GCT GTC TAT CGG AAG GCC CTG GTG ATC ACC AAT     1431
Thr Ala Val Ile Gly Ala Val Tyr Arg Lys Ala Leu Val Ile Thr Asn
            400                 405                 410

TCA GCC AGA AAA TCC TCC ACG GTC GGG GAG ATT GTC AAC CTC ATG TCT     1479
Ser Ala Arg Lys Ser Ser Thr Val Gly Glu Ile Val Asn Leu Met Ser
        415                 420                 425
```

```
GTG GAC GCT CAG AGG TTC ATG GAC TTG GCC ACG TAC ATT AAC ATG ATC      1527
Val Asp Ala Gln Arg Phe Met Asp Leu Ala Thr Tyr Ile Asn Met Ile
    430                 435                 440

TGG TCA GCC CCC CTG CAA GTC ATC CTT GCT CTC TAC CTC CTG TGG CTG      1575
Trp Ser Ala Pro Leu Gln Val Ile Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Trp Leu
445                 450                 455                 460

AAT CTG GGC CCT TCC GTC CTG GCT GGA GTG GCG GTG ATG GTC CTC ATG      1623
Asn Leu Gly Pro Ser Val Leu Ala Gly Val Ala Val Met Val Leu Met
                465                 470                 475

GTG CCC GTC AAT GCT GTG ATG GCG ATG AAG ACC AAG ACG TAT CAG GTG      1671
Val Pro Val Asn Ala Val Met Ala Met Lys Thr Lys Thr Tyr Gln Val
            480                 485                 490

GCC CAC ATG AAG AGC AAA GAC AAT CGG ATC AAG CTG ATG AAC GAA ATT      1719
Ala His Met Lys Ser Lys Asp Asn Arg Ile Lys Leu Met Asn Glu Ile
        495                 500                 505

CTC AAT GGG ATC AAA GTG CTA AAG CTT TAT GCC TGG GAG CTG GCA TTC      1767
Leu Asn Gly Ile Lys Val Leu Lys Leu Tyr Ala Trp Glu Leu Ala Phe
    510                 515                 520

AAG GAC AAG GTG CTG GCC ATC AGG CAG GAG GAG CTG AAG GTG CTG AAG      1815
Lys Asp Lys Val Leu Ala Ile Arg Gln Glu Glu Leu Lys Val Leu Lys
525                 530                 535                 540

AAG TCT GCC TAC CTG TCA GCC GTG GGC ACC TTC ACC TGG GTC TGC ACG      1863
Lys Ser Ala Tyr Leu Ser Ala Val Gly Thr Phe Thr Trp Val Cys Thr
                545                 550                 555

CCC TTT CTG GTG GCC TTG TGC ACA TTT GCC GTC TAC GTG ACC ATT GAC      1911
Pro Phe Leu Val Ala Leu Cys Thr Phe Ala Val Tyr Val Thr Ile Asp
            560                 565                 570

GAG AAC AAC ATC CTG GAT GCC CAG ACA GCC TTC GTG TCT TTG GCC TTG      1959
Glu Asn Asn Ile Leu Asp Ala Gln Thr Ala Phe Val Ser Leu Ala Leu
        575                 580                 585

TTC AAC ATC CTC CGG TTT CCC CTG AAC ATT CTC CCC ATG GTC ATC AGC      2007
Phe Asn Ile Leu Arg Phe Pro Leu Asn Ile Leu Pro Met Val Ile Ser
    590                 595                 600

AGC ATC GTG CAG GCG AGT GTC TCC CTC AAA CGC CTG AGG ATC TTT CTC      2055
Ser Ile Val Gln Ala Ser Val Ser Leu Lys Arg Leu Arg Ile Phe Leu
605                 610                 615                 620

TCC CAT GAG GAG CTG GAA CCT GAC AGC ATC GAG CGA CGG CCT GTC AAA      2103
Ser His Glu Glu Leu Glu Pro Asp Ser Ile Glu Arg Arg Pro Val Lys
                625                 630                 635

GAC GGC GGG GGC ACG AAC AGC ATC ACC GTG AGG AAT GCC ACA TTC ACC      2151
Asp Gly Gly Gly Thr Asn Ser Ile Thr Val Arg Asn Ala Thr Phe Thr
            640                 645                 650

TGG GCC AGG AGC GAC CCT CCC ACA CTG AAT GGC ATC ACC TTC TCC ATC      2199
Trp Ala Arg Ser Asp Pro Pro Thr Leu Asn Gly Ile Thr Phe Ser Ile
```

```
        655                 660                 665

CCC GAA GGT GCT TTG GTG GCC GTG GTG GGC CAG GTG GGC TGC GGA AAG      2247
Pro Glu Gly Ala Leu Val Ala Val Val Gly Gln Val Gly Cys Gly Lys
    670                 675                 680

TTG TCC CTG CTC TCA GCC CTC TTG GCT GAG ATG GAC AAA GTG GAG GGG      2295
Leu Ser Leu Leu Ser Ala Leu Leu Ala Glu Met Asp Lys Val Glu Gly
685                 690                 695                 700

CAC GTG GCT ATC AAG GGC TCC GTG GCC TAT GTG CCA CAG CAG GCC TGG      2343
His Val Ala Ile Lys Gly Ser Val Ala Tyr Val Pro Gln Gln Ala Trp
                705                 710                 715

ATT CAG AAT GAT TCT CTC CGA GAA AAC ATC CTT TTT GGA TGT CAG CTG      2391
Ile Gln Asn Asp Ser Leu Arg Glu Asn Ile Leu Phe Gly Cys Gln Leu
            720                 725                 730

GAG GAA CCA TAT TAC AGG TCC GTG ATA CAG GCC TGT GCC CTC CTC CCA      2439
Glu Glu Pro Tyr Tyr Arg Ser Val Ile Gln Ala Cys Ala Leu Leu Pro
        735                 740                 745

GAC CTG GAA ATC CTG CCC AGT GGG GAT CGG ACA GAG ATT GGC GAG AAG      2487
Asp Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly Asp Arg Thr Glu Ile Gly Glu Lys
    750                 755                 760

GGC GTG AAC CTG TCT GGG GGA CAG AAG CAG CGC GTG AGC CTG GCC CGG      2535
Gly Val Asn Leu Ser Gly Gly Gln Lys Gln Arg Val Ser Leu Ala Arg
765                 770                 775                 780

GCC GTG TAC TCC AAC GCT GAC ATT TAC CTC TTC GAT GAT CCC CTC TCA      2583
Ala Val Tyr Ser Asn Ala Asp Ile Tyr Leu Phe Asp Asp Pro Leu Ser
                785                 790                 795

GCA GTG GAT GCC CAT GTG GGA AAA CAC ATC TTT GAA AAT GTG ATT GGC      2631
Ala Val Asp Ala His Val Gly Lys His Ile Phe Glu Asn Val Ile Gly
            800                 805                 810

CCC AAG GGG ATG CTG AAG AAC AAG ACG CGG ATC TTG GTC ACG CAC AGC      2679
Pro Lys Gly Met Leu Lys Asn Lys Thr Arg Ile Leu Val Thr His Ser
        815                 820                 825

ATG AGC TAC TTG CCG CAG GTG GAC GTC ATC ATC GTC ATG AGT GGC GGC      2727
Met Ser Tyr Leu Pro Gln Val Asp Val Ile Ile Val Met Ser Gly Gly
    830                 835                 840

AAG ATC TCT GAG ATG GGC TCC TAC CAG GAG CTG CTG GCT CGA GAC GGC      2775
Lys Ile Ser Glu Met Gly Ser Tyr Gln Glu Leu Leu Ala Arg Asp Gly
845                 850                 855                 860

GCC TTC GCT GAG TTC CTG CGT ACC TAT GCC AGC ACA GAG CAG GAG CAG      2823
Ala Phe Ala Glu Phe Leu Arg Thr Tyr Ala Ser Thr Glu Gln Glu Gln
                865                 870                 875
```

```
GAT GCA GAG GAG AAC GGG GTC ACG GGC GTC AGC GGT CCA GGG AAG GAA      2871
Asp Ala Glu Glu Asn Gly Val Thr Gly Val Ser Gly Pro Gly Lys Glu
            880                 885                 890

GCA AAG CAA ATG GAG AAT GGC ATG CTG GTG ACG GAC AGT GCA GGG AAG      2919
Ala Lys Gln Met Glu Asn Gly Met Leu Val Thr Asp Ser Ala Gly Lys
        895                 900                 905

CAA CTG CAG AGA CAG CTC AGC AGC TCC TCC TCC TAT AGT GGG GAC ATC      2967
Gln Leu Gln Arg Gln Leu Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Gly Asp Ile
    910                 915                 920

AGC AGG CAC CAC AAC AGC ACC GCA GAA CTG CAG AAA GCT GAG GCC AAG      3015
Ser Arg His His Asn Ser Thr Ala Glu Leu Gln Lys Ala Glu Ala Lys
925                 930                 935                 940

AAG GAG GAG ACC TGG AAG CTG ATG GAG GCT GAC AAG GCG CAG ACA GGG      3063
Lys Glu Glu Thr Trp Lys Leu Met Glu Ala Asp Lys Ala Gln Thr Gly
                945                 950                 955

CAG GTC AAG CTT TCC GTG TAC TGG GAC TAC ATG AAG GCC ATC GGA CTC      3111
Gln Val Lys Leu Ser Val Tyr Trp Asp Tyr Met Lys Ala Ile Gly Leu
            960                 965                 970

TTC ATC TCC TTC CTC AGC ATC TTC CTT TTC ATG TGT AAC CAT GTG TCC      3159
Phe Ile Ser Phe Leu Ser Ile Phe Leu Phe Met Cys Asn His Val Ser
        975                 980                 985

GCG CTG GCT TCC AAC TAT TGG CTC AGC CTC TGG ACT GAT GAC CCC ATC      3207
Ala Leu Ala Ser Asn Tyr Trp Leu Ser Leu Trp Thr Asp Asp Pro Ile
    990                 995                 1000

GTC AAC GGG ACT CAG GAG CAC ACG AAA GTC CGG CTG AGC GTC TAT GGA      3255
Val Asn Gly Thr Gln Glu His Thr Lys Val Arg Leu Ser Val Tyr Gly
1005                1010                1015                1020

GCC CTG GGC ATT TCA CAA GGG ATC GCC GTG TTT GGC TAC TCC ATG GCC      3303
Ala Leu Gly Ile Ser Gln Gly Ile Ala Val Phe Gly Tyr Ser Met Ala
            1025                1030                1035

GTG TCC ATC GGG GGG ATC TTG GCT TCC CGC TGT CTG CAC GTG GAC CTG      3351
Val Ser Ile Gly Gly Ile Leu Ala Ser Arg Cys Leu His Val Asp Leu
        1040                1045                1050

CTG CAC AGC ATC CTG CGG TCA CCC ATG AGC TTC TTT GAG CGG ACC CCC      3399
Leu His Ser Ile Leu Arg Ser Pro Met Ser Phe Phe Glu Arg Thr Pro
    1055                1060                1065

AGT GGG AAC CTG GTG AAC CGC TTC TCC AAG GAG CTG GAC ACA GTG GAC      3447
Ser Gly Asn Leu Val Asn Arg Phe Ser Lys Glu Leu Asp Thr Val Asp
1070                1075                1080

TCC ATG ATC CCG GAG GTC ATC AAG ATG TTC ATG GGC TCC CTG TTC AAC      3495
Ser Met Ile Pro Glu Val Ile Lys Met Phe Met Gly Ser Leu Phe Asn
1085                1090                1095                1100
```

```
GTC ATT GGT GCC TGC ATC GTT ATC CTG CTG GCC ACG CCC ATC GCC GCC      3543
Val Ile Gly Ala Cys Ile Val Ile Leu Leu Ala Thr Pro Ile Ala Ala
                1105                1110                1115

ATC ATC ATC CCG CCC CTT GGC CTC ATC TAC TTC TTC GTC CAG AGG TTC      3591
Ile Ile Ile Pro Pro Leu Gly Leu Ile Tyr Phe Phe Val Gln Arg Phe
            1120                1125                1130

TAC GTG GCT TCC TCC CGG CAG CTG AAG CGC CTC GAG TCG GTC AGC CGC      3639
Tyr Val Ala Ser Ser Arg Gln Leu Lys Arg Leu Glu Ser Val Ser Arg
        1135                1140                1145

TCC CCG GTC TAT TCC CAT TTC AAC GAG ACC TTG CTG GGG GTC AGC GTC      3687
Ser Pro Val Tyr Ser His Phe Asn Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser Val
    1150                1155                1160

ATT CGA GCC TTC GAG GAG CAG GAG CGC TTC ATC CAC CAG AGT GAC CTG      3735
Ile Arg Ala Phe Glu Glu Gln Glu Arg Phe Ile His Gln Ser Asp Leu
1165                1170                1175                1180

AAG GTG GAC GAG AAC CAG AAG GCC TAT TAC CCC AGC ATC GTG GCC AAC      3783
Lys Val Asp Glu Asn Gln Lys Ala Tyr Tyr Pro Ser Ile Val Ala Asn
                1185                1190                1195

AGG TGG CTG GCC GTG CGG CTG GAG TGT GTG GGC AAC TGC ATC GTT CTG      3831
Arg Trp Leu Ala Val Arg Leu Glu Cys Val Gly Asn Cys Ile Val Leu
            1200                1205                1210

TTT GCT GCC CTG TTT GCG GTG ATC TCC AGG CAC AGC CTC AGT GCT GGC      3879
Phe Ala Ala Leu Phe Ala Val Ile Ser Arg His Ser Leu Ser Ala Gly
        1215                1220                1225

TTG GTG GGC CTC TCA GTG TCT TAC TCA TTG CAG GTC ACC ACG TAC TTG      3927
Leu Val Gly Leu Ser Val Ser Tyr Ser Leu Gln Val Thr Thr Tyr Leu
    1230                1235                1240

AAC TGG CTG GTT CGG ATG TCA TCT GAA ATG GAA ACC AAC ATC GTG GCC      3975
Asn Trp Leu Val Arg Met Ser Ser Glu Met Glu Thr Asn Ile Val Ala
1245                1250                1255                1260

GTG GAG AGG CTC AAG GAG TAT TCA GAG ACT GAG AAG GAG GCG CCC TGG      4023
Val Glu Arg Leu Lys Glu Tyr Ser Glu Thr Glu Lys Glu Ala Pro Trp
                1265                1270                1275

CAA ATC CAG GAG ACA CGT CCG CCC AGC AGC TGG CCC CAG GTG GGC CGA      4071
Gln Ile Gln Glu Thr Arg Pro Pro Ser Ser Trp Pro Gln Val Gly Arg
            1280                1285                1290

GTG GAA TTC CGG AAC TAC TGC CTG CGC TAC CGA GAG GAC CTG GAC TTC      4119
Val Glu Phe Arg Asn Tyr Cys Leu Arg Tyr Arg Glu Asp Leu Asp Phe
        1295                1300                1305

GTT CTC AGG CAC ATC AAT GTC ACG ATC AAT GGG GGA GAA AAG GTC GGC      4167
Val Leu Arg His Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Gly Glu Lys Val Gly
    1310                1315                1320
```

```
ATC GTG GGG CGG ACG GGA GCT GGG AAG TCG TCC CTG ACC CTG GGC TTA      4215
Ile Val Gly Arg Thr Gly Ala Gly Lys Ser Ser Leu Thr Leu Gly Leu
1325                1330                1335                1340

TTT CGG ATC AAC GAG TCT GCC GAA GGA GAG ATC ATC ATC GAT GGC ATC      4263
Phe Arg Ile Asn Glu Ser Ala Glu Gly Glu Ile Ile Ile Asp Gly Ile
                1345                1350                1355

AAC ATC GCC AAG ATC GGC CTG CAC GAC CTC CGC TTC AAG ATC ACC ATC      4311
Asn Ile Ala Lys Ile Gly Leu His Asp Leu Arg Phe Lys Ile Thr Ile
            1360                1365                1370

ATC CCC CAG GAC CCT GTT TTG TTT TCG GGT TCC CTC CGA ATG AAC CTG      4359
Ile Pro Gln Asp Pro Val Leu Phe Ser Gly Ser Leu Arg Met Asn Leu
        1375                1380                1385

GAC CCA TTC AGC CAG TAC TCG GAT GAA GAA GTC TGG ACG TCC CTG GAG      4407
Asp Pro Phe Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Val Trp Thr Ser Leu Glu
    1390                1395                1400

CTG GCC CAC CTG AAG GAC TTC GTG TCA GCC CTT CCT GAC AAG CTA GAC      4455
Leu Ala His Leu Lys Asp Phe Val Ser Ala Leu Pro Asp Lys Leu Asp
1405                1410                1415                1420

CAT GAA TGT GCA GAA GGC GGG GAG AAC CTC AGT GTC GGG CAG CGC CAG      4503
His Glu Cys Ala Glu Gly Gly Glu Asn Leu Ser Val Gly Gln Arg Gln
                1425                1430                1435

CTT GTG TGC CTA GCC CGG GCC CTG CTG AGG AAG ACG AAG ATC CTT GTG      4551
Leu Val Cys Leu Ala Arg Ala Leu Leu Arg Lys Thr Lys Ile Leu Val
            1440                1445                1450

TTG GAT GAG GCC ACG GCA GCC GTG GAC CTG GAA ACG GAC GAC CTC ATC      4599
Leu Asp Glu Ala Thr Ala Ala Val Asp Leu Glu Thr Asp Asp Leu Ile
        1455                1460                1465

CAG TCC ACC ATC CGG ACA CAG TTC GAG GAC TGC ACC GTC CTC ACC ATC      4647
Gln Ser Thr Ile Arg Thr Gln Phe Glu Asp Cys Thr Val Leu Thr Ile
    1470                1475                1480

GCC CAC CGG CTC AAC ACC ATC ATG GAC TAC ACA AGG GTG ATC GTC TTG      4695
Ala His Arg Leu Asn Thr Ile Met Asp Tyr Thr Arg Val Ile Val Leu
1485                1490                1495                1500

GAC AAA GGA GAA ATC CAG GAG TAC GGC GCC CCA TCG GAC CTC CTG CAG      4743
Asp Lys Gly Glu Ile Gln Glu Tyr Gly Ala Pro Ser Asp Leu Leu Gln
                1505                1510                1515

CAG AGA GGT CTT TTC TAC AGC ATG GCC AAA GAC GCC GGC TTG GTG          4788
Gln Arg Gly Leu Phe Tyr Ser Met Ala Lys Asp Ala Gly Leu Val
            1520                1525                1530

TGAGCCCCAG AGCTGGCATA TCTGGTCAGA ACTGCAGGGC CTATATGCCA GCGCCCCAGG    4848

GAGGAGTCAG TACCCCTGGT AAACCAAGCC TCCCACACTG AAACCAAAAC ATAAAAACCA    4908

AACCCAGACA ACCAAAACAT ATTCAAAGCA GCAGCCACCG CCATCCGGTC CCCTGCCTGG    4968
AACTGGCTGT GAAGACCCAG GAGAGACAGA GATGCGAACC ACC                      5011
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1531 AMINOSÄUREN
(B) ART: AMINOSÄURE
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Met Ala Leu Arg Gly Phe Cys Ser Ala Asp Gly Ser Asp Pro Leu Trp
 1               5                  10                  15

Asp Trp Asn Val Thr Trp Asn Thr Ser Asn Pro Asp Phe Thr Lys Cys
            20                  25                  30

Phe Gln Asn Thr Val Leu Val Trp Val Pro Cys Phe Tyr Leu Trp Ala
        35                  40                  45

Cys Phe Pro Phe Tyr Phe Leu Tyr Leu Ser Arg His Asp Arg Gly Tyr
    50                  55                  60

Ile Gln Met Thr Pro Leu Asn Lys Thr Lys Thr Ala Leu Gly Phe Leu
65                  70                  75                  80

Leu Trp Ile Val Cys Trp Ala Asp Leu Phe Tyr Ser Phe Trp Glu Arg
                85                  90                  95

Ser Arg Gly Ile Phe Leu Ala Pro Val Phe Leu Val Ser Pro Thr Leu
            100                 105                 110

Leu Gly Ile Thr Thr Leu Leu Ala Thr Phe Leu Ile Gln Leu Glu Arg
        115                 120                 125

Arg Lys Gly Val Gln Ser Ser Gly Ile Met Leu Thr Phe Trp Leu Val
    130                 135                 140

Ala Leu Val Cys Ala Leu Ala Ile Leu Arg Ser Lys Ile Met Thr Ala
145                 150                 155                 160

Leu Lys Glu Asp Ala Gln Val Asp Leu Phe Arg Asp Ile Thr Phe Tyr
                165                 170                 175

Val Tyr Phe Ser Leu Leu Leu Ile Gln Leu Val Leu Ser Cys Phe Ser
            180                 185                 190

Asp Arg Ser Pro Leu Phe Ser Glu Thr Ile His Asp Pro Asn Pro Cys
        195                 200                 205

Pro Glu Ser Ser Ala Ser Phe Leu Ser Arg Ile Thr Phe Trp Trp Ile
    210                 215                 220

Thr Gly Leu Ile Val Arg Gly Tyr Arg Gln Pro Leu Glu Gly Ser Asp
225                 230                 235                 240

Leu Trp Ser Leu Asn Lys Glu Asp Thr Ser Glu Gln Val Val Pro Val
                245                 250                 255
```

```
Leu Val Lys Asn Trp Lys Lys Glu Cys Ala Lys Thr Arg Lys Gln Pro
            260                 265                 270

Val Lys Val Val Tyr Ser Ser Lys Asp Pro Ala Gln Pro Lys Glu Ser
        275                 280                 285

Ser Lys Val Asp Ala Asn Glu Glu Val Glu Ala Leu Ile Val Lys Ser
    290                 295                 300

Pro Gln Lys Glu Trp Asn Pro Ser Leu Phe Lys Val Leu Tyr Lys Thr
305                 310                 315                 320

Phe Gly Pro Tyr Phe Leu Met Ser Phe Phe Phe Lys Ala Ile His Asp
                325                 330                 335

Leu Met Met Phe Ser Gly Pro Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ile Lys Phe
            340                 345                 350

Val Asn Asp Thr Lys Ala Pro Asp Trp Gln Gly Tyr Phe Tyr Thr Val
        355                 360                 365

Leu Leu Phe Val Thr Ala Cys Leu Gln Thr Leu Val Leu His Gln Tyr
    370                 375                 380

Phe His Ile Cys Phe Val Ser Gly Met Arg Ile Lys Thr Ala Val Ile
385                 390                 395                 400

Gly Ala Val Tyr Arg Lys Ala Leu Val Ile Thr Asn Ser Ala Arg Lys
                405                 410                 415

Ser Ser Thr Val Gly Glu Ile Val Asn Leu Met Ser Val Asp Ala Gln
            420                 425                 430

Arg Phe Met Asp Leu Ala Thr Tyr Ile Asn Met Ile Trp Ser Ala Pro
        435                 440                 445

Leu Gln Val Ile Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Trp Leu Asn Leu Gly Pro
    450                 455                 460

Ser Val Leu Ala Gly Val Ala Val Met Val Leu Met Val Pro Val Asn
465                 470                 475                 480

Ala Val Met Ala Met Lys Thr Lys Thr Tyr Gln Val Ala His Met Lys
                485                 490                 495

Ser Lys Asp Asn Arg Ile Lys Leu Met Asn Glu Ile Leu Asn Gly Ile
            500                 505                 510

Lys Val Leu Lys Leu Tyr Ala Trp Glu Leu Ala Phe Lys Asp Lys Val
        515                 520                 525

Leu Ala Ile Arg Gln Glu Glu Leu Lys Val Leu Lys Lys Ser Ala Tyr
    530                 535                 540
```

```
Leu Ser Ala Val Gly Thr Phe Thr Trp Val Cys Thr Pro Phe Leu Val
545                 550                 555                 560

Ala Leu Cys Thr Phe Ala Val Tyr Val Thr Ile Asp Glu Asn Asn Ile
                565                 570                 575

Leu Asp Ala Gln Thr Ala Phe Val Ser Leu Ala Leu Phe Asn Ile Leu
            580                 585                 590

Arg Phe Pro Leu Asn Ile Leu Pro Met Val Ile Ser Ser Ile Val Gln
        595                 600                 605

Ala Ser Val Ser Leu Lys Arg Leu Arg Ile Phe Leu Ser His Glu Glu
    610                 615                 620

Leu Glu Pro Asp Ser Ile Glu Arg Arg Pro Val Lys Asp Gly Gly Gly
625                 630                 635                 640

Thr Asn Ser Ile Thr Val Arg Asn Ala Thr Phe Thr Trp Ala Arg Ser
                645                 650                 655

Asp Pro Pro Thr Leu Asn Gly Ile Thr Phe Ser Ile Pro Glu Gly Ala
            660                 665                 670

Leu Val Ala Val Val Gly Gln Val Gly Cys Gly Lys Leu Ser Leu Leu
        675                 680                 685

Ser Ala Leu Leu Ala Glu Met Asp Lys Val Glu Gly His Val Ala Ile
    690                 695                 700

Lys Gly Ser Val Ala Tyr Val Pro Gln Gln Ala Trp Ile Gln Asn Asp
705                 710                 715                 720

Ser Leu Arg Glu Asn Ile Leu Phe Gly Cys Gln Leu Glu Glu Pro Tyr
                725                 730                 735

Tyr Arg Ser Val Ile Gln Ala Cys Ala Leu Leu Pro Asp Leu Glu Ile
            740                 745                 750

Leu Pro Ser Gly Asp Arg Thr Glu Ile Gly Glu Lys Gly Val Asn Leu
        755                 760                 765

Ser Gly Gly Gln Lys Gln Arg Val Ser Leu Ala Arg Ala Val Tyr Ser
    770                 775                 780

Asn Ala Asp Ile Tyr Leu Phe Asp Asp Pro Leu Ser Ala Val Asp Ala
785                 790                 795                 800

His Val Gly Lys His Ile Phe Glu Asn Val Ile Gly Pro Lys Gly Met
                805                 810                 815

Leu Lys Asn Lys Thr Arg Ile Leu Val Thr His Ser Met Ser Tyr Leu
            820                 825                 830

Pro Gln Val Asp Val Ile Ile Val Met Ser Gly Gly Lys Ile Ser Glu
        835                 840                 845
```

```
Met Gly Ser Tyr Gln Glu Leu Leu Ala Arg Asp Gly Ala Phe Ala Glu
 850                 855                 860

Phe Leu Arg Thr Tyr Ala Ser Thr Glu Gln Glu Gln Asp Ala Glu Glu
865                 870                 875                 880

Asn Gly Val Thr Gly Val Ser Gly Pro Gly Lys Glu Ala Lys Gln Met
                885                 890                 895

Glu Asn Gly Met Leu Val Thr Asp Ser Ala Gly Lys Gln Leu Gln Arg
            900                 905                 910

Gln Leu Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Gly Asp Ile Ser Arg His His
        915                 920                 925

Asn Ser Thr Ala Glu Leu Gln Lys Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Thr
    930                 935                 940

Trp Lys Leu Met Glu Ala Asp Lys Ala Gln Thr Gly Gln Val Lys Leu
945                 950                 955                 960

Ser Val Tyr Trp Asp Tyr Met Lys Ala Ile Gly Leu Phe Ile Ser Phe
                965                 970                 975

Leu Ser Ile Phe Leu Phe Met Cys Asn His Val Ser Ala Leu Ala Ser
            980                 985                 990

Asn Tyr Trp Leu Ser Leu Trp Thr Asp Asp Pro Ile Val Asn Gly Thr
        995                1000                1005

Gln Glu His Thr Lys Val Arg Leu Ser Val Tyr Gly Ala Leu Gly Ile
    1010                1015                1020

Ser Gln Gly Ile Ala Val Phe Gly Tyr Ser Met Ala Val Ser Ile Gly
1025                1030                1035                1040

Gly Ile Leu Ala Ser Arg Cys Leu His Val Asp Leu Leu His Ser Ile
                1045                1050                1055

Leu Arg Ser Pro Met Ser Phe Phe Glu Arg Thr Pro Ser Gly Asn Leu
            1060                1065                1070

Val Asn Arg Phe Ser Lys Glu Leu Asp Thr Val Asp Ser Met Ile Pro
        1075                1080                1085

Glu Val Ile Lys Met Phe Met Gly Ser Leu Phe Asn Val Ile Gly Ala
    1090                1095                1100

Cys Ile Val Ile Leu Leu Ala Thr Pro Ile Ala Ala Ile Ile Ile Pro
1105                1110                1115                1120

Pro Leu Gly Leu Ile Tyr Phe Phe Val Gln Arg Phe Tyr Val Ala Ser
                1125                1130                1135

Ser Arg Gln Leu Lys Arg Leu Glu Ser Val Ser Arg Ser Pro Val Tyr
            1140                1145                1150
```

Ser His Phe Asn Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser Val Ile Arg Ala Phe
1155 1160 1165

Glu Glu Gln Glu Arg Phe Ile His Gln Ser Asp Leu Lys Val Asp Glu
1170 1175 1180

Asn Gln Lys Ala Tyr Tyr Pro Ser Ile Val Ala Asn Arg Trp Leu Ala
1185 1190 1195 1200

Val Arg Leu Glu Cys Val Gly Asn Cys Ile Val Leu Phe Ala Ala Leu
1205 1210 1215

Phe Ala Val Ile Ser Arg His Ser Leu Ser Ala Gly Leu Val Gly Leu
1220 1225 1230

Ser Val Ser Tyr Ser Leu Gln Val Thr Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Val
1235 1240 1245

Arg Met Ser Ser Glu Met Glu Thr Asn Ile Val Ala Val Glu Arg Leu
1250 1255 1260

Lys Glu Tyr Ser Glu Thr Glu Lys Glu Ala Pro Trp Gln Ile Gln Glu
1265 1270 1275 1280

Thr Arg Pro Pro Ser Ser Trp Pro Gln Val Gly Arg Val Glu Phe Arg
1285 1290 1295

Asn Tyr Cys Leu Arg Tyr Arg Glu Asp Leu Asp Phe Val Leu Arg His
1300 1305 1310

Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Gly Glu Lys Val Gly Ile Val Gly Arg
1315 1320 1325

Thr Gly Ala Gly Lys Ser Ser Leu Thr Leu Gly Leu Phe Arg Ile Asn
1330 1335 1340

Glu Ser Ala Glu Gly Glu Ile Ile Ile Asp Gly Ile Asn Ile Ala Lys
1345 1350 1355 1360

Ile Gly Leu His Asp Leu Arg Phe Lys Ile Thr Ile Ile Pro Gln Asp
1365 1370 1375

Pro Val Leu Phe Ser Gly Ser Leu Arg Met Asn Leu Asp Pro Phe Ser
1380 1385 1390

Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Val Trp Thr Ser Leu Glu Leu Ala His Leu
1395 1400 1405

Lys Asp Phe Val Ser Ala Leu Pro Asp Lys Leu Asp His Glu Cys Ala
1410 1415 1420

Glu Gly Gly Glu Asn Leu Ser Val Gly Gln Arg Gln Leu Val Cys Leu
1425 1430 1435 1440

Ala Arg Ala Leu Leu Arg Lys Thr Lys Ile Leu Val Leu Asp Glu Ala
1445 1450 1455

```
Thr Ala Ala Val Asp Leu Glu Thr Asp Asp Leu Ile Gln Ser Thr Ile
            1460                1465                1470

Arg Thr Gln Phe Glu Asp Cys Thr Val Leu Thr Ile Ala His Arg Leu
        1475                1480                1485

Asn Thr Ile Met Asp Tyr Thr Arg Val Ile Val Leu Asp Lys Gly Glu
    1490                1495                1500

Ile Gln Glu Tyr Gly Ala Pro Ser Asp Leu Leu Gln Gln Arg Gly Leu
1505                1510                1515                1520

Phe Tyr Ser Met Ala Lys Asp Ala Gly Leu Val
                1525                1530
```

Patentansprüche

1. Eine ein Protein mit mehrfacher Arzneimittelresistenz codierende isolierte Nukleinsäure, gewinnbar durch:
(1) Präparierung einer cDNA-Bibliothek aus mRNA aus einer Zelllinie, die Resistenz gegen Anthrazykline, Epipodophyllotoxine oder Vinca-Akaloide zeigt, welche durch Verapamil oder Cyclosporin A nicht wesentlich umgekehrt wird;
(2) Screening der Bibliothek durch Differenzialhybridisierung mit markierter cDNA, gewonnen aus Gesamt-mRNA, die aus der Zelllinie mit mehrfacher Arzneimittelresistenz und ihrer medikamentenempfindlichen Stammzelllinie isoliert wurde;
(3) Visualisieren der Hybridisierungsergebnisse;
(4) Selektion der Klone, die im Vergleich zu der aus der medikamentenempfindlichen Stammzelllinie gewonnenen cDNA eine erhöhte Hybridisierung mit der aus der Zelllinie mit mehrfacher Arzneimittelresistenz gewonnen cDNA zeigen, wobei diese Klone die Nukleinsäure aus der Bibliothek enthalten;
(5) Expression eines aus den selektierten Klonen gewonnenen Klons, welches die Nukleinsäure aus der Bibliothek in einer nicht-resistenten Säugetierzelle enthält; und
(6) Beurteilung, ob die Expression in dem von der Nukleinsäure codierten Protein der Zelle mehrfache Arzneimittelresistenz gegen Anthrazykline, Epipodophyllotoxine oder Vinca-Akaloide verleiht, welche durch Verapamil oder Cyclosporin A nicht wesentlich umgekehrt wird.

2. Eine isolierte Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei die cDNA-Bibliothek aus mRNA aus H69AR-Zellen präpariert wird.

3. Eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, welche unter hochstringenten Bedingungen zu einer Nukleinsäure hybridisiert wird, die eine Protein codiert, welches die gesamte bzw. einen Teil der in SEQ ID No: 2 gezeigten Aminosäuresequenz enthält.

4. Eine isolierte Nukleinsäure, welche in normalen Humanzellen in der Chromosomenposition 16p13.1 auftritt, gewinnbar durch In-situ-Hybridisierung mit einer ^{3}H-markierten Sonde, die ein 1,8 KB EcoR1-Fragment der MPR cDNA von SEQ ID No: 1 ist, wobei die Nukleinsäure ein mehrfach Arzneimittelresistenz-assoziiertes Protein (MRP) codiert, welches einer medikamentenempfindliche Zelle eine mehrfache Arzneimittelresistenz verleiht, wenn sie in der Zelle zur Expression kommt, wobei die mehrfache Arzneimittelresistenz nicht durch chemosensitivierende Mittel wesentlich umgekehrt wird, welche eine durch P-Glykoprotein verliehene mehrfache Arzneimittelresistenz umkehren.

5. Eine isolierte Nukleinsäure die ein Protein codiert, welches einer Zelle eine mehrfache Arzneimittelresistenz verleiht, wobei die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz zum Codieren eines Proteins enthält, welches eine durch die Formel V-W-X-Y-Z repräsentierte Aminosäuresequenz enthält, wobei V für Aminosäurerückstände korrespondierend zu Aminosäurerückständen aus 1 bis 660 von SEQ ID No: 2 steht, W für Aminosäurerückstände von einer im Wesentlichen mit Aminosäurerückständen aus 661 bis 810 von SEQ ID No: 2 homologen Nukleotid-Bindungsfalte steht, X für Aminosäurerückstände korrespondierend zu Aminosäurerückständen aus 811 bis 1309 von SEQ ID No: 2 steht, Y für Aminosäurerückstände von einer im Wesentlichen mit Aminosäurerückständen aus 1310 bis 1469 von SEQ ID No: 2 homologen Nukleotid-Bindungsfalte steht und Z für Aminosäurerückstände korrespondierend zu Aminosäurerückständen aus 1470 bis 1531 von SEQ ID No: 2 steht.

6. Eine isolierte Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 mit einer Nukleotidsequenz, welche ein

mit mehrfacher Arzneimittelresistenz assoziiertes Protein codiert, die in Zellen mit mehrfacher Arzneimittelresistenz, unabhängig von Überexpression von P-Glykoprotein, Überexpression zeigt.

7. Eine isolierte Nukleinsäure oder ein Oligonukleotid, welches antisense zu einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 ist.

8. Die isolierte Nukleinsäure oder das Oligonukleotid gemäß Anspruch 7, welches antisense zu einer Codierregion einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 ist.

9. Ein zur Transformation einer Wirtszelle, welche eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 enthält, geeigneter rekombinanter Expressionsvektor und eine operativ mit der Nukleinsäure verbundene Regulatorsequenz.

10. Eine transformante Wirtszelle einschließlich eines rekombinanten Expressionsvektors gemäß Anspruch 9.

11. Ein Verfahren zur Verleihung von mehrfacher Arzneimittelresistenz an eine medikamentenempfindliche Zelle durch Transfektion eines eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthaltenden rekombinanten Expressionsvektors in die medikamentenempfindliche Zelle, um gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in der Zelle ein durch die Nukleinsäure codiertes Protein zu erzeugen.

12. Das Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei die medikamentenempfindlichen Zelle eine Herzmuskelzelle oder eine hämatopoetische Stammzelle ist, vorausgesetzt die hämatopoetische Stammzelle wurde nicht von menschlichen Embryos gewonnen.

13. Ein Verfahren zur Selektion von Zellen bei der Präparierung einer transformanten Wirtszelle bestehend aus Transfektion einer Zelle mit einer isolierten Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 und der Verwendung von Anthrazyklinen, Epipodophyllotoxinen oder Vinca-Akaloiden als Selektionsmittel.

14. Ein durch eine Nukleinsäure gemäß Ansprüchen 1 bis 5 codiertes isoliertes Protein mit der biologischen Aktivität eines mehrfach Arzneimittelresistenz-assoziierten Proteins (MRP), welches einer medikamentenempfindlichen Säugetierzelle mehrfache Arzneimittelresistenz verleiht, wenn das Protein in der Zelle zur Expression kommt, wobei die mehrfache Arzneimittelresistenz nicht durch Chemosensibilisatoren wesentlich umgekehrt wird, welche eine durch P-Glykoprotein übertragene mehrfache Arzneimittelresistenz umkehren.

15. Ein für ein Epitop eines Proteins gemäß Anspruch 14 spezifischer Antikörper.

16. Ein Antikörper gemäß Anspruch 15, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

17. Ein bispezifischer Antikörper, der speziell sowohl an durch eine Tumorzelle zur Expression kommendes Protein bindet, wobei das Protein durch die isolierte Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 codiert ist als auch an eine nachweisbare Substanz oder eine Substanz mit toxischer oder therapeutischer Aktivität bindet.

18. Der bispezifische Antikörper aus Anspruch 17, wobei die toxisch aktive Substanz eine zytotoxische Zelle ist und der bispezifische Antikörper die Tumorzelle und die zytotoxische Zelle vernetzen kann, wodurch eine Lyse der Tumorzelle gefördert wird.

19. Der bispezifische Antikörper aus Anspruch 17 oder 18, der an die Fc-Rezeptoren der zytotoxischen Zellen binden kann.

20. Ein Tetramer-Antikörperkomplex eines ersten monoklonalen Antikörpers, der speziell an ein durch eine Tumorzelle zur Expression kommendes Protein bindet, wobei das Protein durch die isolierte Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 codiert ist, und ein zweiter monoklonaler Antikörper, der an eine nachweisbare Substanz oder eine toxisch oder therapeutisch aktive Substanz binden kann, wobei die ersten und zweiten monoklonalen Antikörper von einer ersten Tierart gewonnen wurden, konjugiert zur Bildung eines zyklischen Tetramers mit zwei monoklonalen Antikörpern aus einer zweiten Tierart und gerichtet gegen Fc-Fragmente der ersten und zweiten monoklonalen Antikörper der ersten Tierart.

21. Eine zur Verabreichung geeignete pharmazeutische Rezeptur, welche einen monoklonalen Antikörper

gemäß Anspruch 16 oder einen bispezifischen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19 bzw. einen Tetramer-Antikörperkomplex gemäß Anspruch 20 in einer pharmazeutisch zulässigen Trägersubstanz enthält.

22. Nutzung der isolierten Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Produktion von transgenen, nichtmenschlichen Tieren.

23. Nutzung der isolierten Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Produktion von nichtmenschlichen Knockout-Tieren.

24. Ein In-vitro-Verfahren zur Identifikation einer Tumorzelle mit mehrfacher Arzneimittelresistenz, bestehend aus Zusammenbringen der Tumorzelle mit einem Antikörper, der speziell an ein durch isolierte Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 codiertes Protein bindet, wobei der Antikörper mit einer nachweisbaren Substanz markiert wird, sowie Nachweis der an die Tumorzelle gebundenen nachweisbaren Substanz.

25. Das Verfahren gemäß Anspruch 24, wobei das Molekül ein monoklonaler Antikörper, ein bispezifischer Antikörper oder ein tetramer Antikörperkomplex ist.

26. Das Verfahren gemäß Anspruch 25, wobei der Antikörper mit einer nachweisbaren Substanz markiert ist.

27. Das Verfahren gemäß Anspruch 26, wobei die nachweisbare Substanz ein fluoreszierender Marker, ein Enzym oder ein radioaktiver Marker ist.

28. Ein In-vitro-Verfahren zur Inhibition der mehrfachen Arzneimittelresistenz einer Zelle durch Blockierung der Aktivität eines MRP-Proteins durch Verwendung eines Antikörpers, der an ein durch eine isolierte Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 codiertes Protein bindet.

29. Das Verfahren gemäß Anspruch 28, wobei das Molekül der monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 13 ist.

30. Ein In-vitro-Verfahren zur Inhibition in einer Zelle, Expression von Nukleinsäure codierenden Proteinen mit MRP-Aktivität, wodurch eine verringerte Expression von Proteinen mit MRP-Aktivität erzielt wird, welches Verfahren das Verabreichen einer Antisense-Nukleinsäure gemäß Anspruch 7 an die Zelle umfasst.

31. Ein Verfahren gemäß Anspruch 30, wobei die Antisense-Nukleinsäure in einem rekombinanten Expressionsvektor enthalten ist, welcher die anhaltende Produktion von Antisense-RNA ermöglicht.

32. Ein In-vitro-Verfahren zur Inhibition der mehrfachen Arzneimittelresistenz in einer Zelle mit mehrfacher Arzneimittelresistenz, welches Verfahren das Verabreichen eines Antikörpers gemäß Anspruch 15 an die Zelle umfasst.

33. Das Verfahren gemäß Anspruch 32, wobei die Zelle mit mehrfacher Arzneimittelresistenz eine Tumorzelle ist.

34. Ein Verfahren zur Identifikation einer Substanz, die ein Chemosensibilisator eines therapeutischen Mittels ist, welches Verfahren umfasst:
(a) Inkubieren des therapeutischen Mittels mit einer Zelle, die mit einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 transfektiert ist, wodurch der Zeile, mit und ohne einer zu testenden Substanz, Resistenz gegen das therapeutische Mittel verliehen wird;
(b) Bestimmen der Resistenz der transfektierten Zelle gegen das therapeutische Mittel bei Inkubieren mit und ohne der zu testenden Substanz;
(c) Identifikation einer Substanz, welche ein Chemosensibilisator eines therapeutischen Mittels ist, durch die Eigenschaft der Substanz, die Resistenz der transfektierten Zelle gegen das therapeutische Mittel bei Inkubieren mit dem Mittel im Vergleich zur Resistenz der transfektierten Zelle gegen das therapeutische Mittel bei Inkubieren ohne das Mittel zu verringern.

35. Das Verfahren gemäß Anspruch 34, wobei die Zelle empfindlich gegenüber dem therapeutischen Mittel ist, bevor sie mit der Nukleinsäure transfektiert worden ist.

36. Das Verfahren gemäß Anspruch 34, wobei das therapeutische Mittel aus einer Gruppe bestehend aus

Anthrazyklinen, Epipodophyliotoxinen oder Vinca-Akaloiden gewählt wird.

37. Das Verfahren gemäß Anspruch 34, wobei die Zelle in einem nichtmenschlichen, transgenen Tier ist und das zu testende therapeutische Mittel und Substanz durch Verabreichen des zu testenden therapeutischen Mittels und Substanz an das nichtmenschliche, transgene Tier mit der Zelle inkubiert wird.

38. Ein Verfahren zur Identifikation einer Substanz, die zytotoxisch für eine Zelle mit mehrfacher Arzneimittelresistenz ist, welches Verfahren das Inkubieren einer zu testenden Substanz mit einer Zelle umfasst, die mit einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 transfektiert ist und welche Nukleinsäure der Zelle eine mehrfache Arzneimittelresistenz verleiht, sowie Bestimmen der Zytotoxizität der Substanz für die Zelle mit mehrfacher Arzneimittelresistenz.

39. Das Verfahren gemäß Anspruch 38, wobei die Zelle mit mehrfacher Arzneimittelresistenz vor Transfektieren der Zelle mit der Nukleinsäure mehrfach medikamentenempfindlich ist.

40. Das Verfahren gemäß Anspruch 38, wobei die Zelle in einem nichtmenschlichen, transgenen Tier ist und die zu testende Substanz durch Verabreichen der zu testenden Substanz an das nichtmenschliche, transgene Tier mit der Zelle inkubiert wird.

41. Eine pharmazeutische Rezeptur gemäß Anspruch 21 zur Verwendung in der Behandlung oder Diagnose von mehrfacher Arzneimittelresistenz in einer Zelle, wobei die mehrfache Arzneimittelresistenz nicht durch Chemosensibilisatoren wesentlich umgekehrt wird, welche eine durch P-Glykoprotein übertragene mehrfache Arzneimittelresistenz umkehren.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

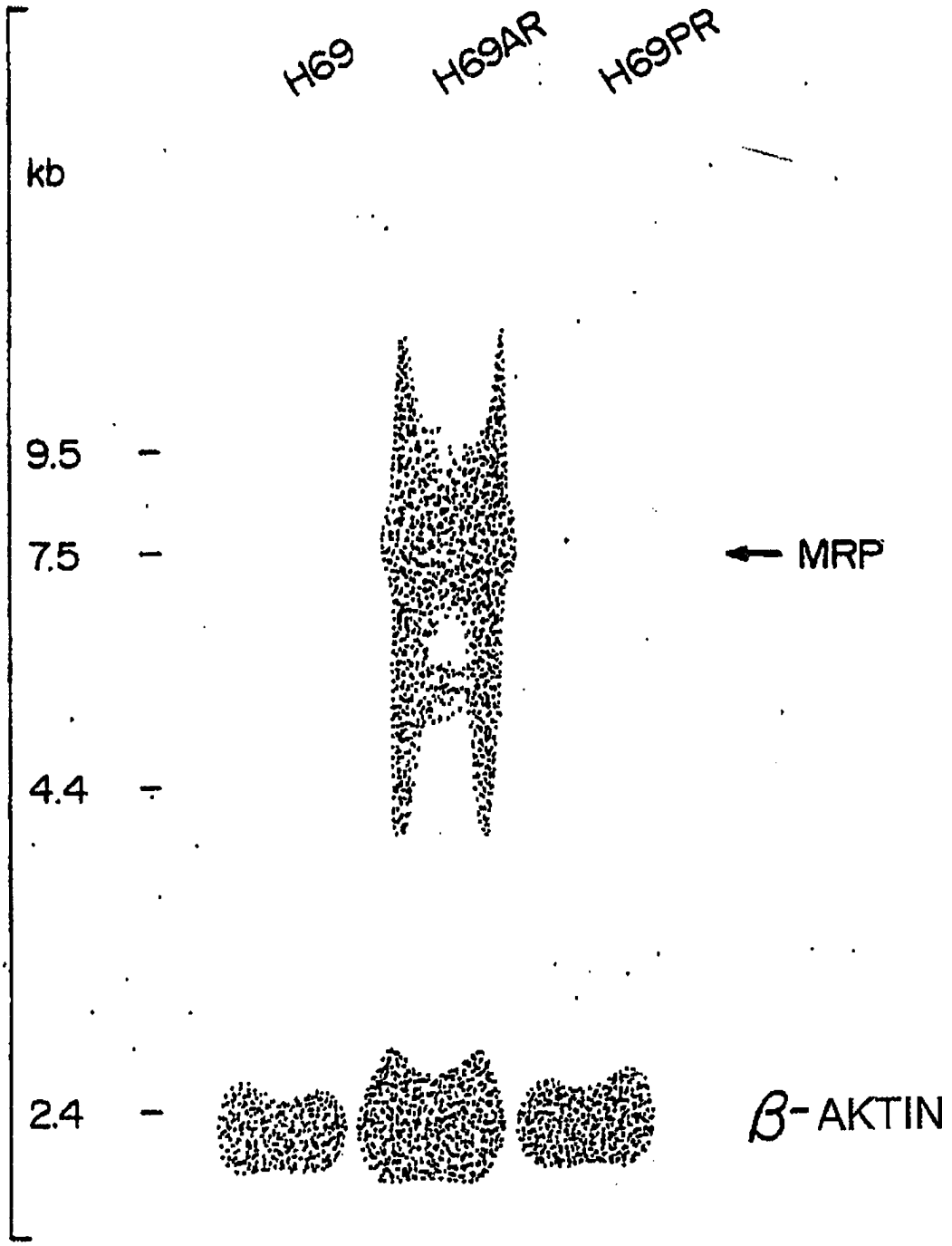


FIG. 1A

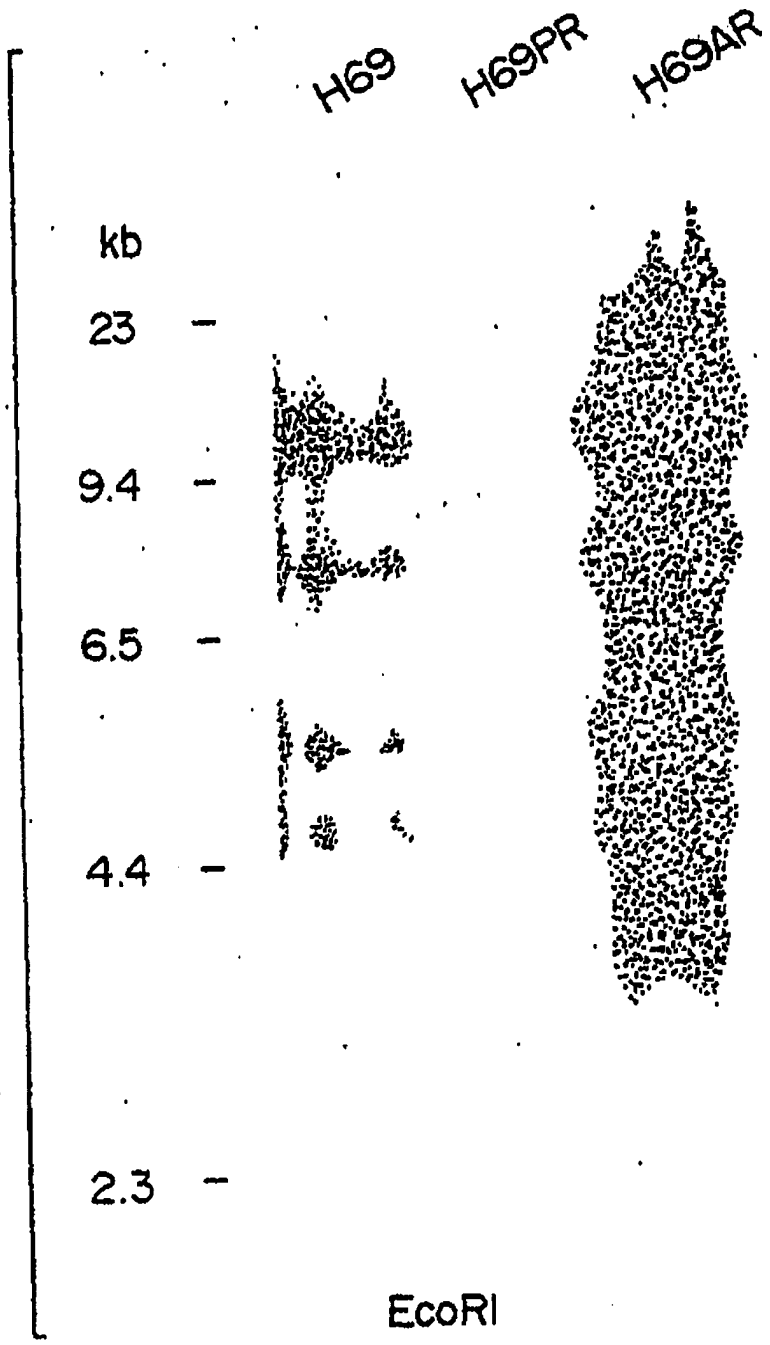


FIG. IB

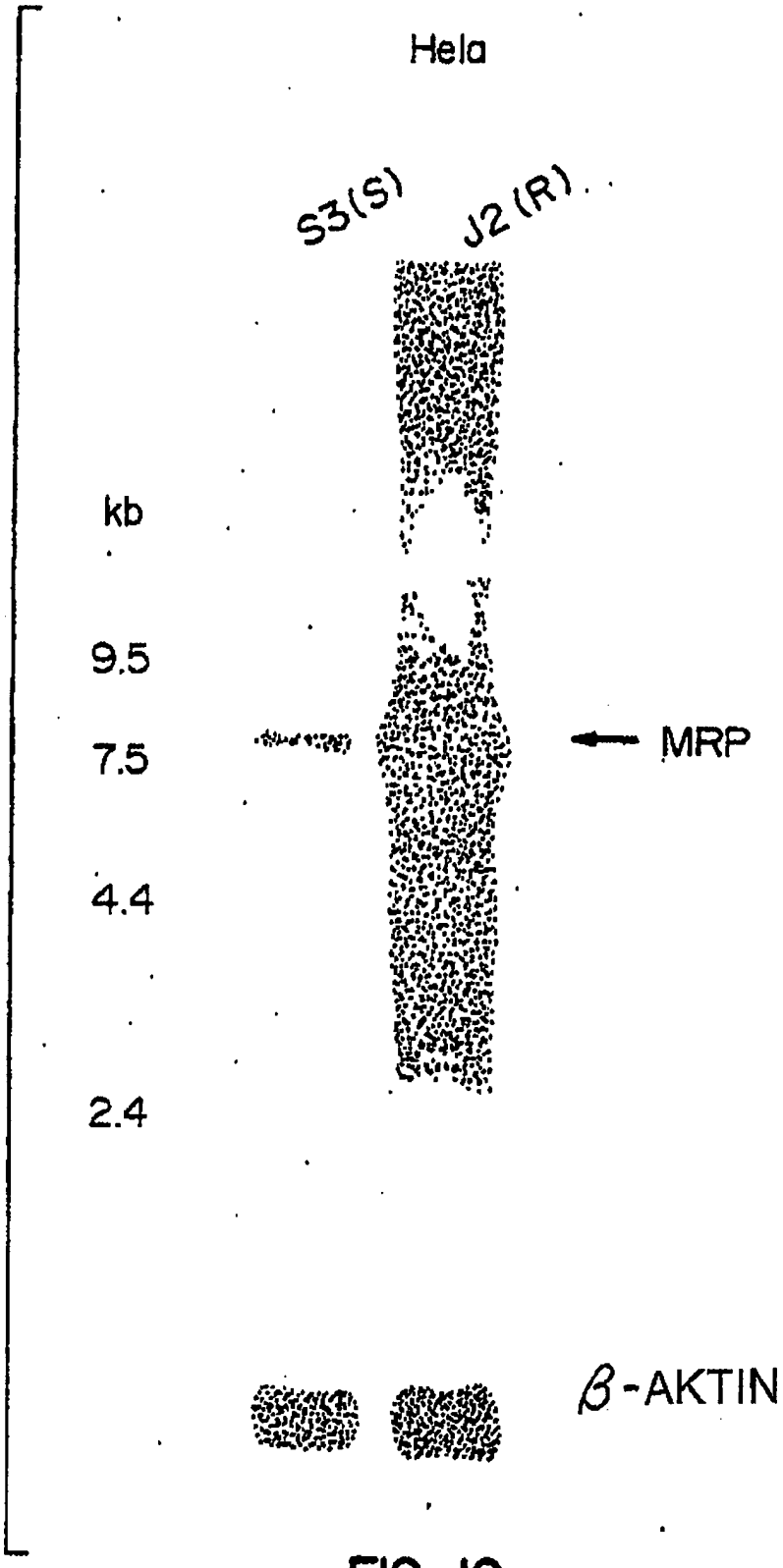


FIG. IC

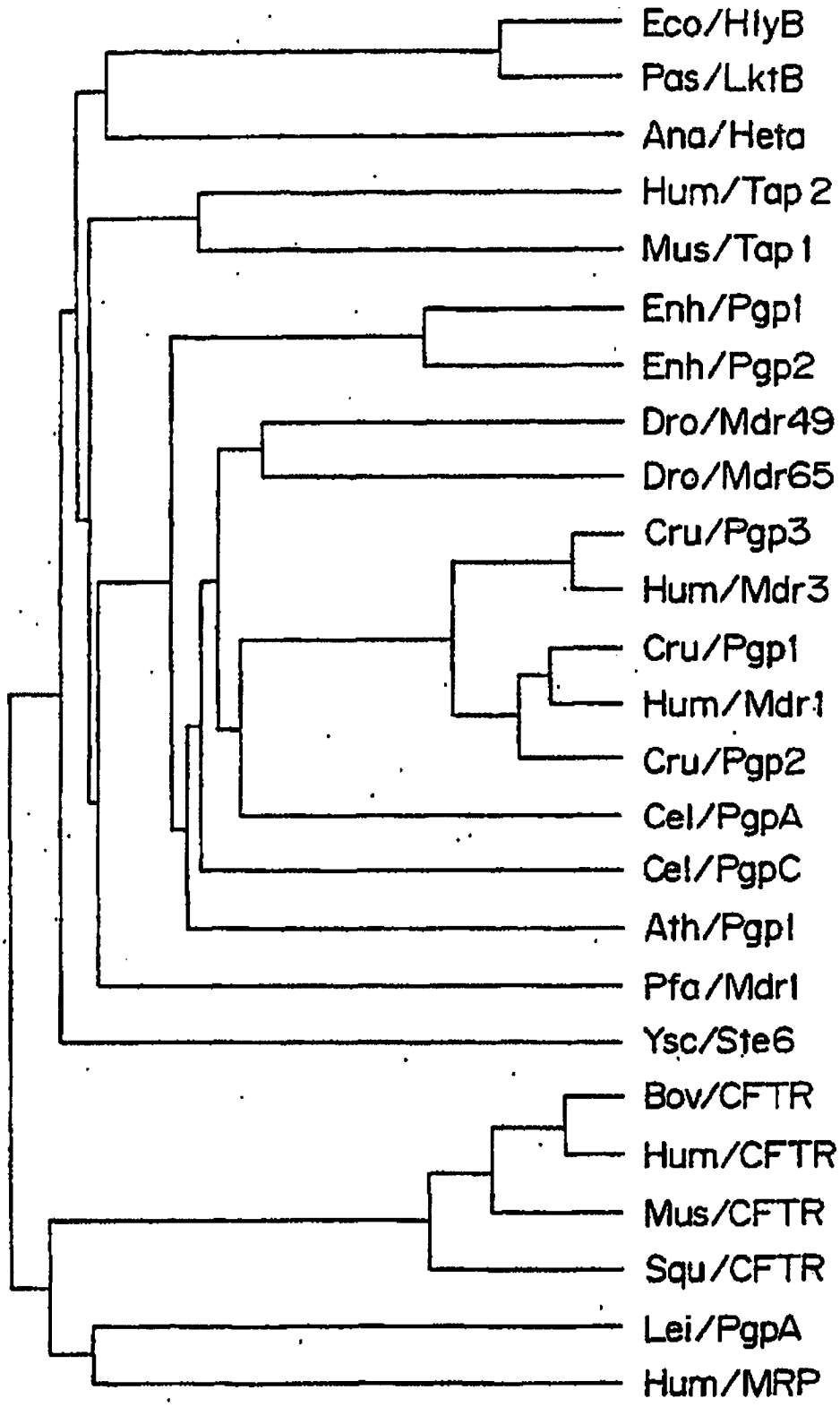

Eco/HlyB
Pas/LktB
Ana/Heta
Hum/Tap 2
Mus/Tap 1
Enh/Pgp1
Enh/Pgp2
Dro/Mdr49
Dro/Mdr65
Cru/Pgp3
Hum/Mdr3
Cru/Pgp1
Hum/Mdr1
Cru/Pgp2
Cel/PgpA
Cel/PgpC
Ath/Pgp1
Pfa/Mdr1
Ysc/Ste6
Bov/CFTR
Hum/CFTR
Mus/CFTR
Squ/CFTR
Lei/PgpA
Hum/MRP

FIG. 2

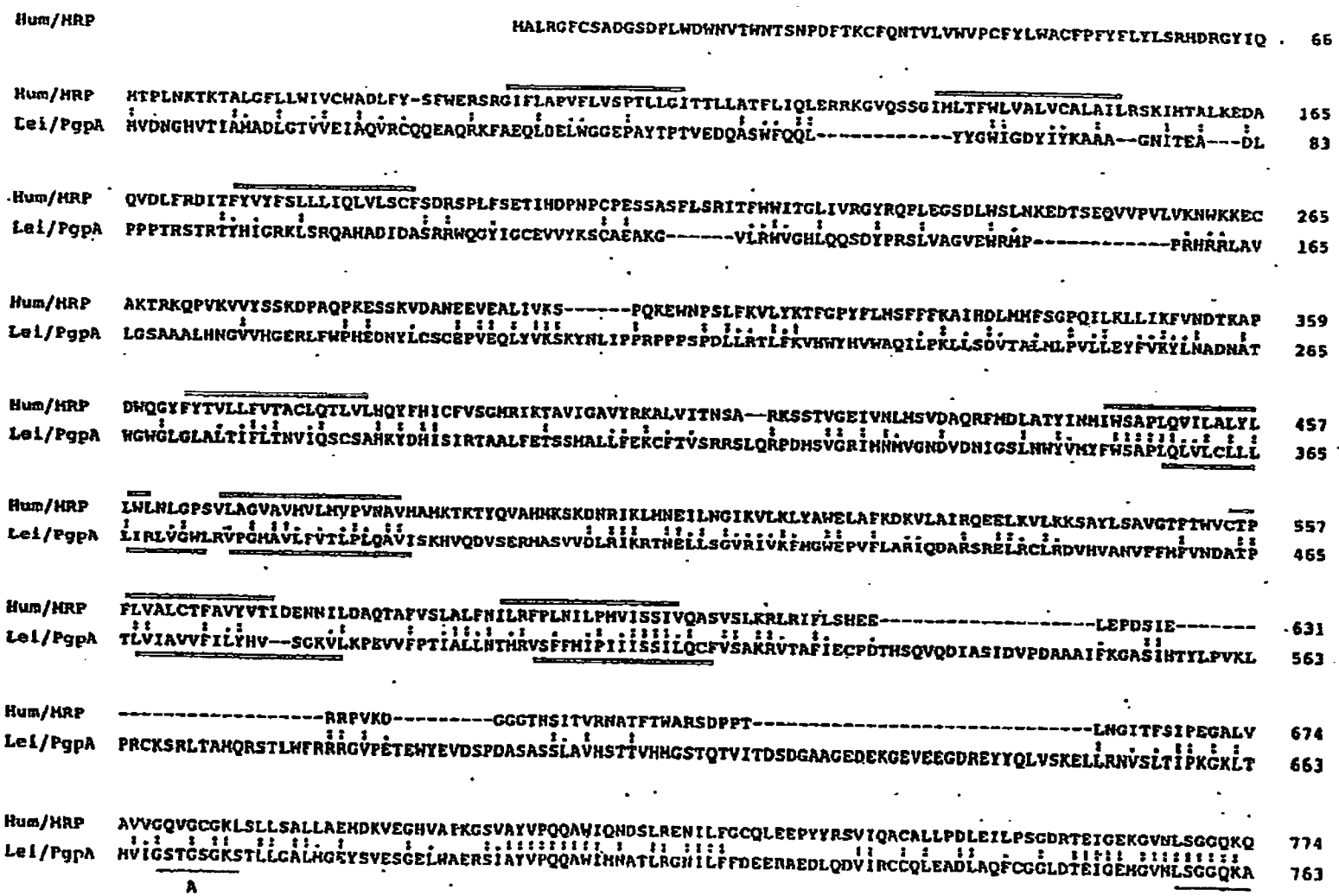


FIG. 3A

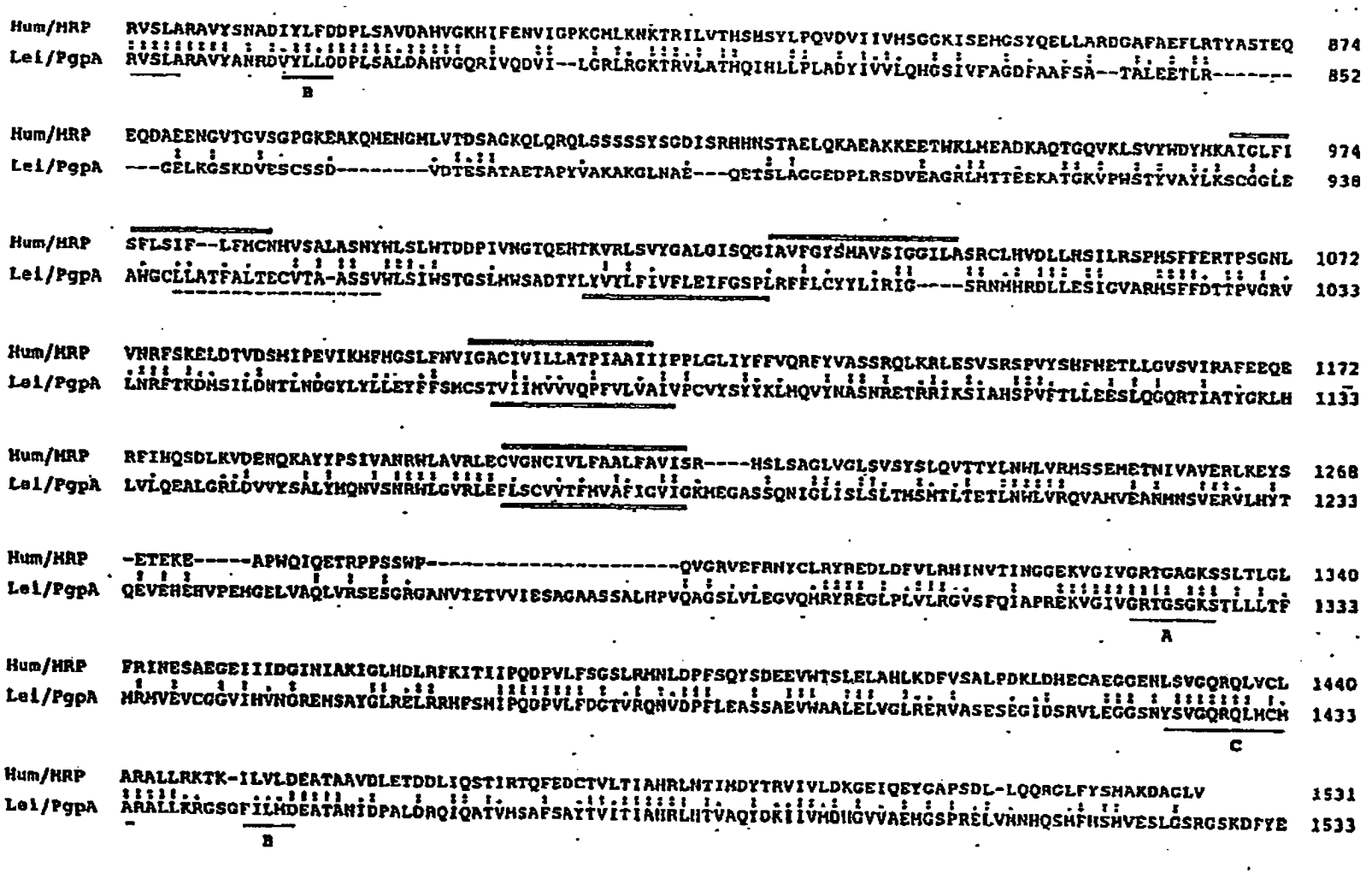

Hum/HRP RVSLARAVYSNADIYLFDDPLSAVDAHVGKHIFENVIGPKGMLKNKTRILVTHSMSYLPQVDVIIVHSGGKISEHGSYQELLARDGAFAEFLRTYASTEQ 874
Lei/PgpA RVSLARAVYANRDVYLLDDPLSALDAHVGQRIVQDVI--LGRLRGKTRVLATHQIHLLPLADYIVVLQHGSIVFAGDFAAFSA--TALEETLR------- 852
B
Hum/HRP EQDAEENGVTGVSGPGKEAKQNENGMLVTDSAGKQLQRQLSSSSSYSGDISRHHNSTAELQKAEAKKEETWKLMEADKAQTGQVKLSVYWDYMKAIGLFI 974
Lei/PgpA ---GELKGSKDVESCSSD---------VDTESATAETAPYVAKAKGLNAE---QETSLAGGEDPLRSDVEAGRLMTTEEKATGKVPWSTYVAYLKSGGLE 938
Hum/HRP SFLSIF--LFHCNHVSALASNYWLSLWTDDPIVNGTQEHTKVRLSVYGALGISQGIAVFGYSMAVSIGGILASRCLHVDLLHSILRSPMSFFERTPSGNL 1072
Lei/PgpA AHGCLLATFALTECVTA-ASSVWLSIWSTGSLHWSADTYLYVYLFIVFLEIFGSPLRFFLCYYLIRIG----SRNMHRDLLESIGVARMSFFDTTPVGRV 1033
Hum/HRP VNRFSKELDTVDSMIPEVIKMFMGSLFNVIGACIVILLATPIAAIIIPPLGLIYFFVQRFYVASSRQLKRLESVSRSPVYSHFNETLLGVSVIRAFEEQE 1172
Lei/PgpA LNRFTKDMSILDNTLNDGYLYLLEYFFSMCSTVIIMVVVQPFVLVAIVPCVYSYYKLMQVYNASNRETRRIKSIAHSPVFTLLEESLQGQRTIATYGKLH 1133
Hum/HRP RFIMQSDLKVDENQKAYYPSIVANRWLAVRLECVGNCIVLFAALFAVISR----HSLSAGLVGLSVSYSLQVTTYLNWLVRMSSEMETNIVAVERLKEYS 1268
Lei/PgpA LVLQEALGRLDVVYSALYMQNVSNRWLGVRLEFLSCVYTFMVAFIGVIGKMEGASSQNIGLISLSLTMSMTLTETLNWLVRQVAHVEANMNSVERVLHYT 1233
Hum/HRP -ETEKE-----APWQIQETRPPSSWP----------QVGRVEFRNYCLRYREDLDFVLRHINVTINGGEKVGIVGRTGAGKSSLTLGL 1340
Lei/PgpA QEVEHEHVPEHGELVAQLVRSESGRGANVTETVVIESAGAASSALHPVQAGSLVLEGVQHRYREGLPLVLRGVSFQIAPREKVGIVGRTGSGKSTLLLTF 1333
A
Hum/HRP FRINESAEGEIIIDGINIAKIGLHDLRFKITIIPQDPVLFSGSLRMNLDPFSQYSDEEVWTSLELAHLKDFVSALPDKLDHECAEGGENLSVGQRQLVCL 1440
Lei/PgpA HRMVEVCGGVIHVNGREHSAYGLRELRRHFSNIPQDPVLFDGTVRQNVDPFLEASSAEVWAALELVGLRERVASESEGIDSRVLEGGSNYSVGQRQLHCH 1433
C
Hum/HRP ARALLRKTK-ILVLDEATAAVDLETDDLIQSTIRTQFEDCTVLTIAHRLNTIMDYTRVIVLDKGEIQEYGAPSDL-LQQRGLFYSMAKDAGLV 1531
Lei/PgpA ARALLKRGSGFILMDEATANIDPALDRQIQATVHSAFSAYTVITIAHRLHTVAQIDKIIVMDIGVVAEHGSPRELVHNHQSHFHSHVESLGSRGSKDFYE 1533
B
Lei/PgpA LLHGRRIVQPAVLSD 1548

FIG. 3B

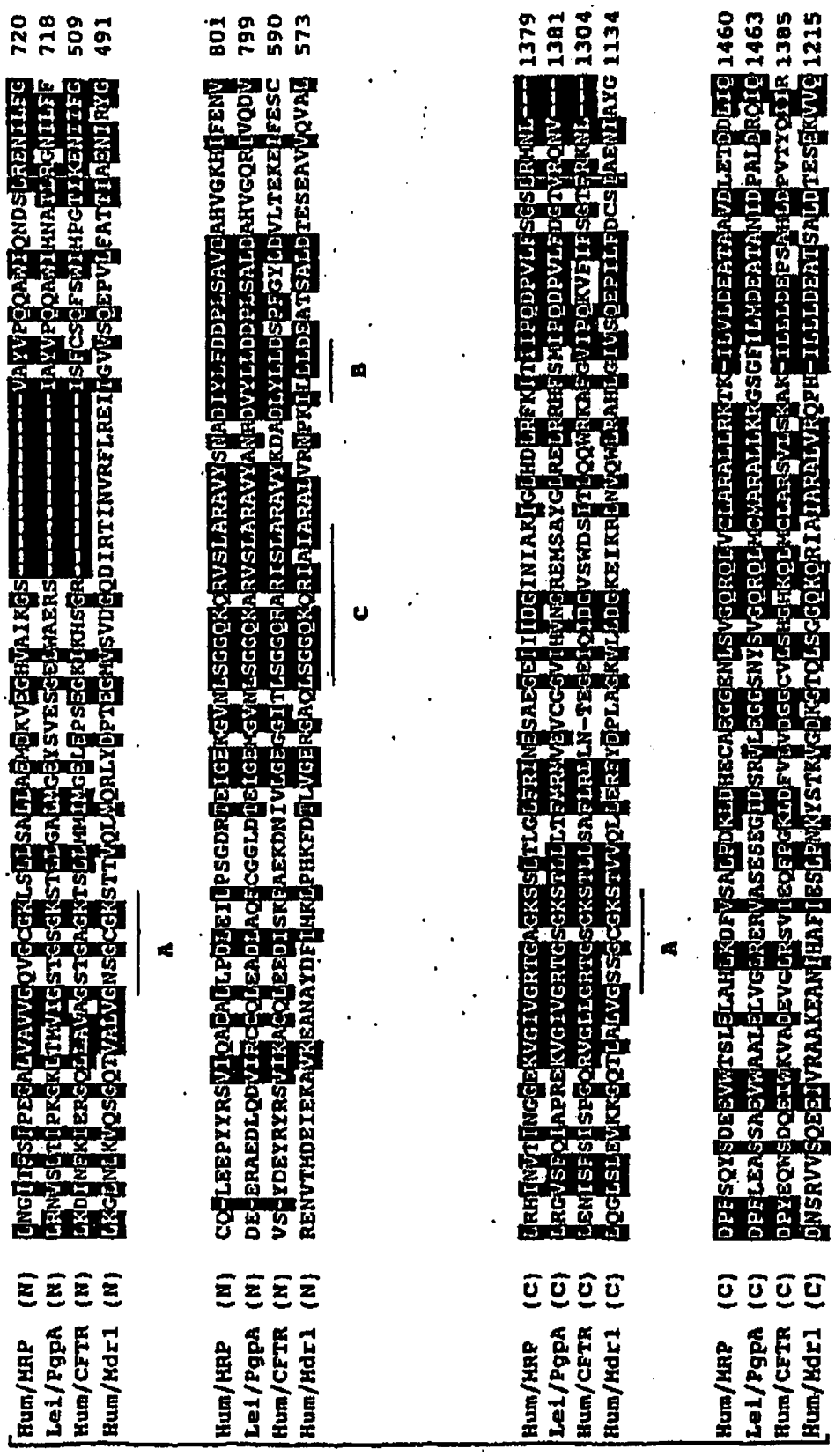

Hum/MRP (N)
Lei/PgpA (N)
Hum/CFTR (N)
Hum/Mdr1 (N)
720
718
509
491
A
Hum/MRP (N)
Lei/PgpA (N)
Hum/CFTR (N)
Hum/Mdr1 (N)
801
799
590
573
C
B
Hum/MRP (C)
Lei/PgpA (C)
Hum/CFTR (C)
Hum/Mdr1 (C)
1379
1381
1304
1134
A
Hum/MRP (C)
Lei/PgpA (C)
Hum/CFTR (C)
Hum/Mdr1 (C)
1460
1463
1385
1215
C
B

FIG. 3C

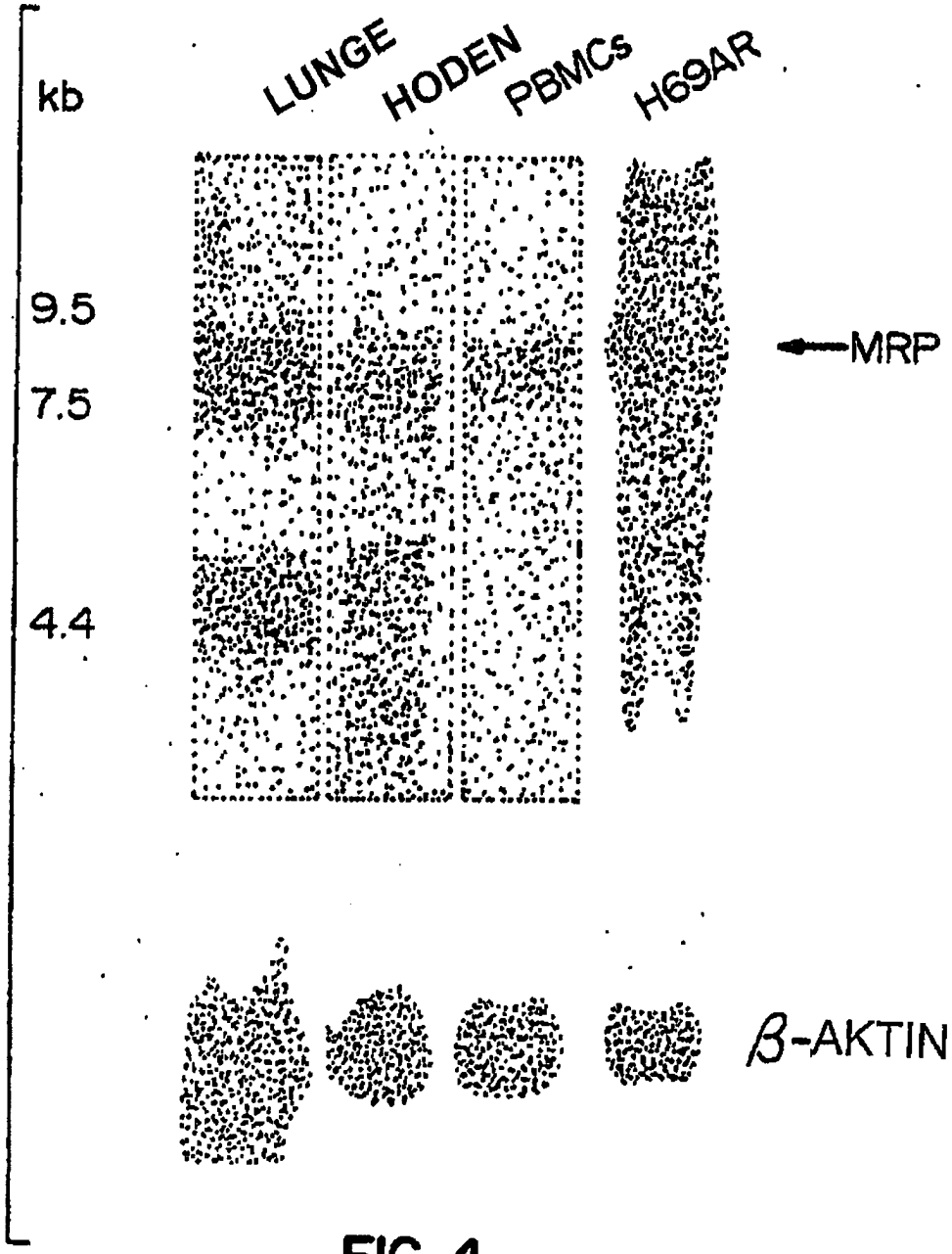


FIG. 4

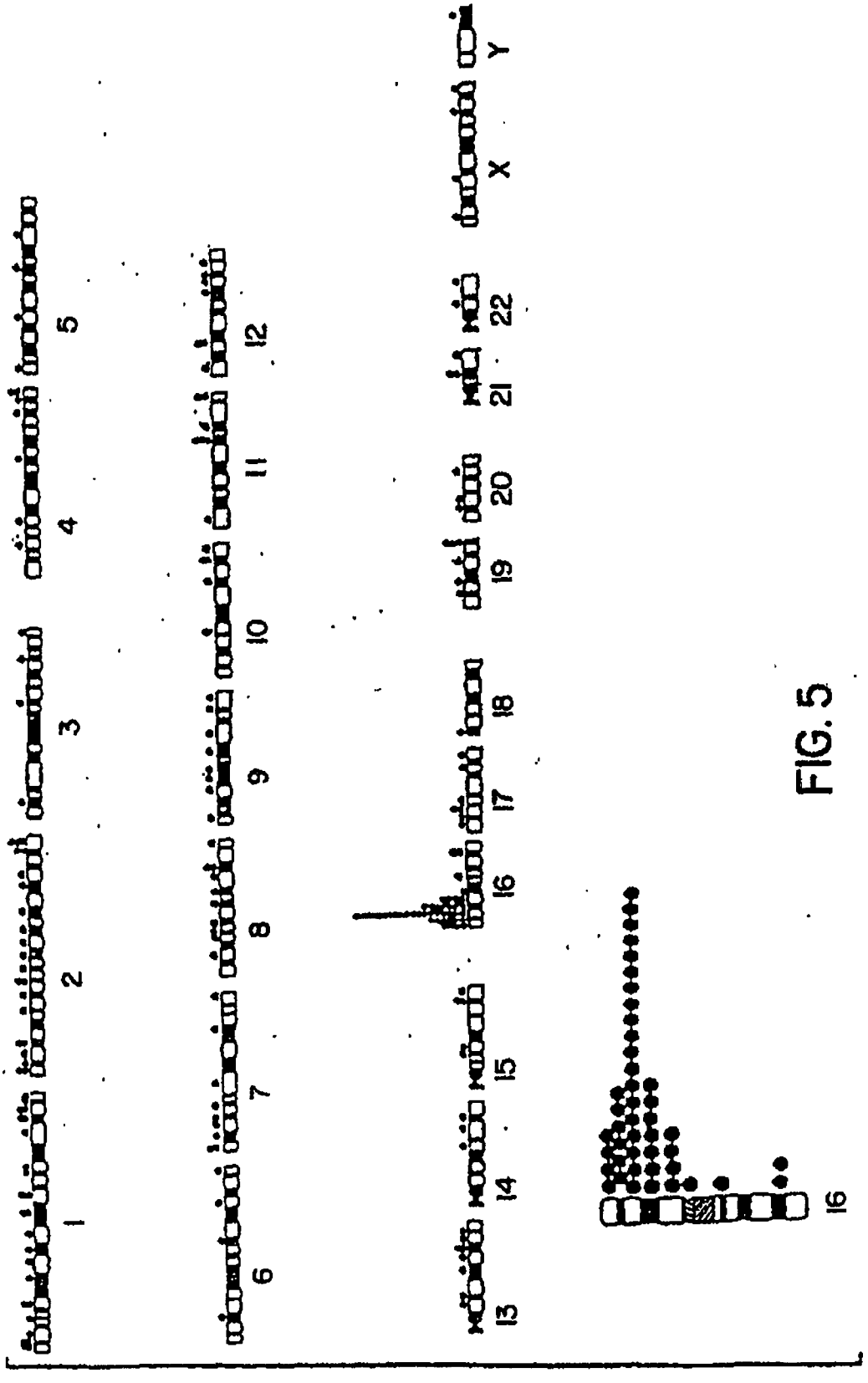


FIG. 5

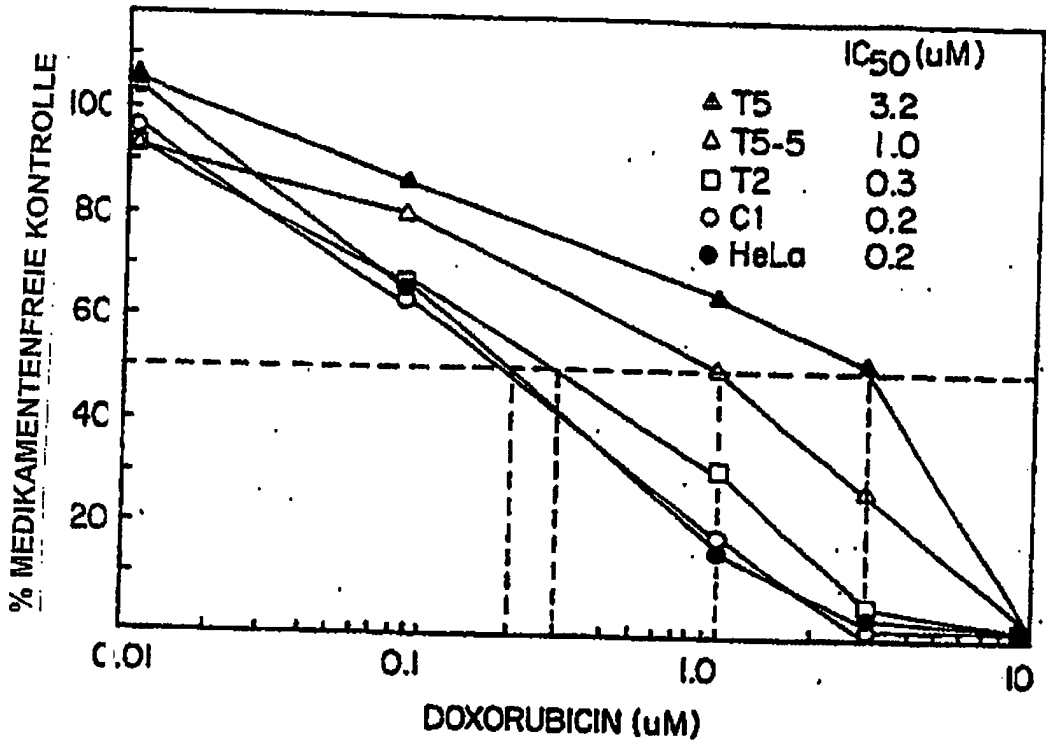

% MEDIKAMENTENFREIE KONTROLLE
100
80
60
40
20
0.01
0.1
1.0
10
DOXORUBICIN (uM)
IC50 (uM)
T5 3.2
T5-5 1.0
T2 0.3
C1 0.2
HeLa 0.2

FIG. 6

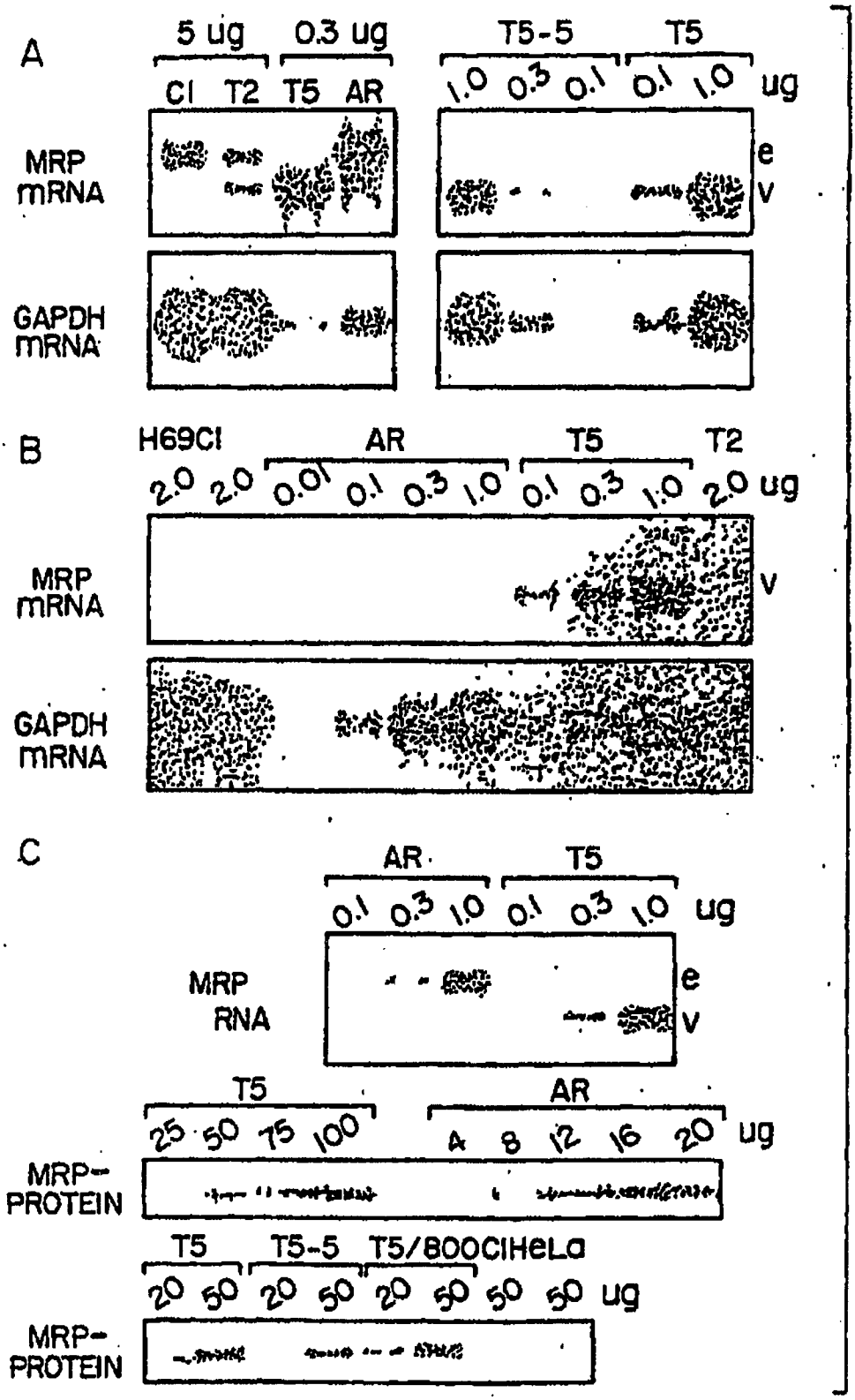

A
5 ug
0.3 ug
T5-5
T5
C1 T2 T5 AR
1.0 0.3 0.1 0.1 1.0 ug
MRP mRNA
e
v
GAPDH mRNA
B
H69C1
AR
T5
T2
2.0 2.0 0.01 0.1 0.3 1.0 0.1 0.3 1.0 2.0 ug
MRP mRNA
v
GAPDH mRNA
C
AR
T5
0.1 0.3 1.0 0.1 0.3 1.0 ug
MRP RNA
e
v
T5
AR
25 50 75 100 4 8 12 16 20 ug
MRP-PROTEIN
T5
T5-5
T5/800CIHeLa
20 50 20 50 20 50 50 50 ug
MRP-PROTEIN

FIG. 7

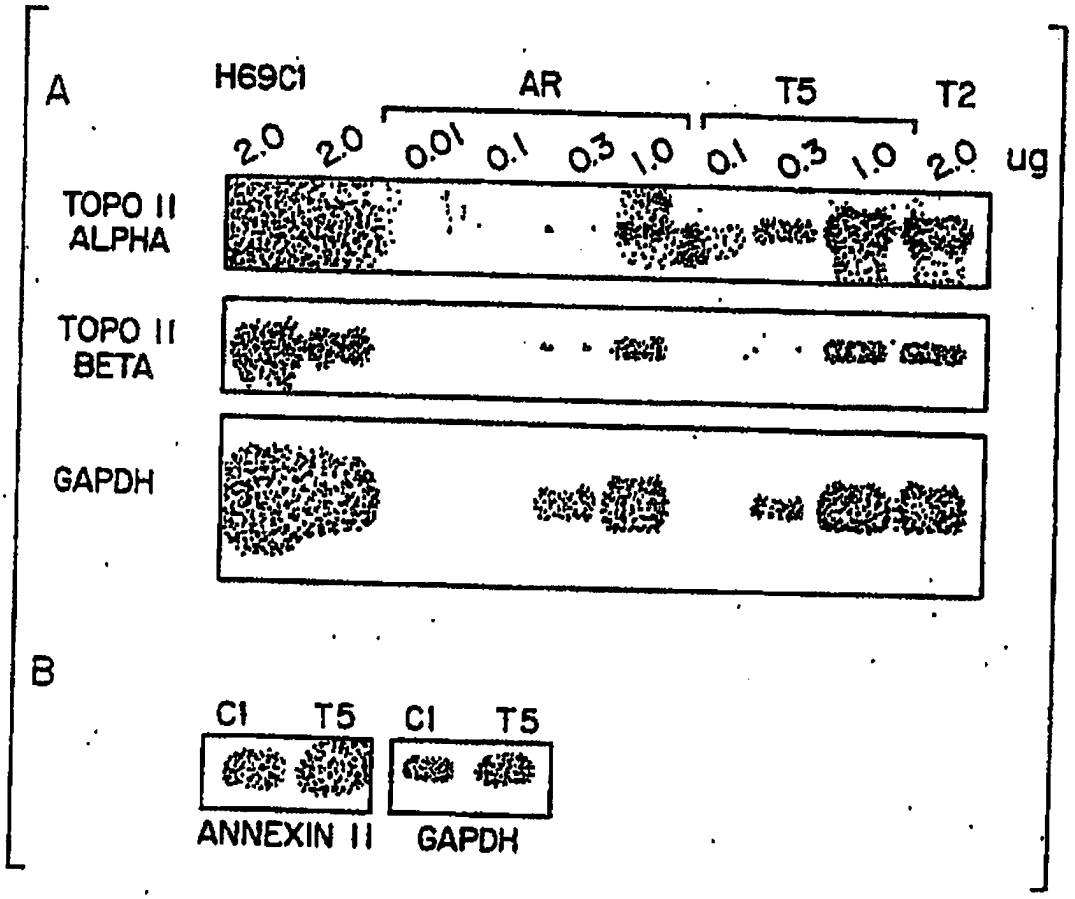

A
H69CI
AR
T5
T2
2.0 2.0 0.01 0.1 0.3 1.0 0.1 0.3 1.0 2.0 ug
TOPO II ALPHA
TOPO II BETA
GAPDH
B
CI T5 CI T5
ANNEXIN II
GAPDH

FIG. 8

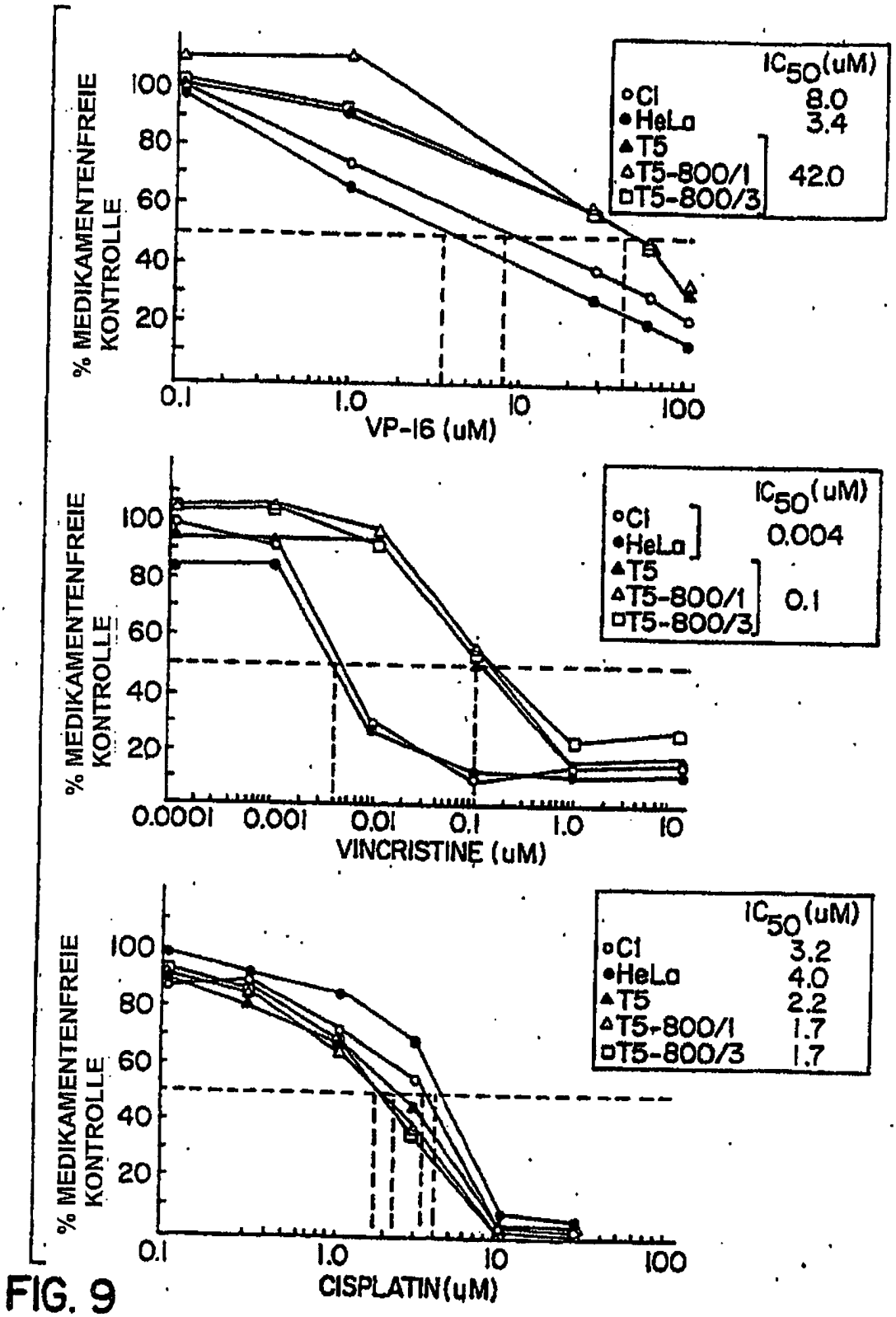

% MEDIKAMENTENFREIE KONTROLLE
100
80
60
40
20
0.1
1.0
10
100
VP-16 (uM)
IC50(uM)
oCl 8.0
•HeLa 3.4
▲T5
△T5-800/1 42.0
□T5-800/3
% MEDIKAMENTENFREIE KONTROLLE
0.0001
0.001
0.01
0.1
1.0
10
VINCRISTINE (uM)
IC50(uM)
oCl
•HeLa 0.004
▲T5
△T5-800/1 0.1
□T5-800/3
% MEDIKAMENTENFREIE KONTROLLE
CISPLATIN(uM)
IC50(uM)
oCl 3.2
•HeLa 4.0
▲T5 2.2
△T5-800/1 1.7
□T5-800/3 1.7

FIG. 9