



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 26 733 T2 2006.11.02

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 246 905 B1

(51) Int Cl.⁸: C12N 9/00 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 26 733.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/33622

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 982 576.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/042437

(86) PCT-Anmeldetag: 08.12.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 14.06.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 09.10.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 15.03.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.11.2006

(30) Unionspriorität:

169723 P 08.12.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

AXYS Pharmaceuticals, Inc., South San
Francisco, Calif., US

(72) Erfinder:
BUGGY, Joseph, San Carlos, CA 94070, US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: HISTONE-DEACETYLASE-8 PROTEINE, NUKLEINSÄUREN UND METHODEN ZUR VERWEN-
DUNG

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

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die in die Steuerung von Chromatinstruktur eingebunden sind, und somit die Regulierung von Transkription sowie Verwendungsverfahren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuren, die für Histon-Deacetylase-Proteine kodieren, die in die Transkriptionsregulierung eingebunden sind. Verwendungsverfahren umfassen die Verwendung in Tests, in denen auf Transkriptionsmodulatoren gescreent wird, sowie die Verwendung als Therapeutika.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Modifikation von Chromatinstruktur über reversible Acetylierung von Nucleosomenhistonen spielt bei der Regulierung der Transkription in eukaryotischen Zellen eine wichtige Rolle (Grunstein, Nature 389, 349–352 (1997), befasst sich hiermit). Acetylierung der ε-Aminogruppe spezifischer Lysinreste innerhalb des Amino-terminalen Endes von Kernhistonen führt zu lokalisierter Chromatinrelaxation. Diese Acetylierung ist erforderlich, um die ungefaltete Struktur von Nucleosomen, die Transkription erfahren, aufrechtzuerhalten (Walia et al., J. Biol. Chem. 273, 14516–14522 (1998)). Allgemein korreliert Histonacetylierungsaktivität mit Transkriptionsaktivierung, während Deacetylaseaktivität mit Transkriptionsunterdrückung korreliert. Es wird angenommen, dass umfassende Veränderungen der Genexpression das Resultat des dynamischen Gleichgewichts zwischen Histonacetyltransferase-(HAT-)Enzymaktivität und Histondeacetylase-(HDAC-)Enzymaktivität innerhalb des Kerns einer Zelle sind.

[0003] HDACs vermitteln Transkriptionsunterdrückung durch Wechselwirkung mit größeren Mehrfachuntereinheits-Komplexen. Für eine spezifische HDAC beispielsweise, die als HDAC1 bekannt ist, ist bekannt, dass sie den Corepressor Sin3 bindet, und HDAC1-Sin3 assoziiert sich seinerseits weiter mit den Verstummungsvermittlern NCoR und SMRT (Allard et al., Nature 387, 49–55 (1997)). N-CoR/SMRT-HDAC1 wird anschließend mittels spezifischer Transkriptionsfaktoren rekrutiert, die an Promotorelemente innerhalb des Zellkerns gebunden sind. Das Retinoblastom-(Rb-)Genprodukt beispielsweise rekrutiert N-CoR/SMRT-HDAC1, um den Transkriptionsfaktor E2F zu binden, um E2F-regulierte Promotoren zu unterdrücken (Luo et al., Cell 92, 463–473 (1998); Brehm et al., Nature 391, 597–600 (1998), Magnaghi-Jaulin et al., Nature 391, 601–605 (1998)). HDAC1-Sin3 bindet sich auch an das MAD/MAX-Repressorheterodimer und vermittelt Repression durch dieses Heterodimer (Laherty et al., Cell 89, 349–356 (1997)). Die Histondeacetylierungsaktivität von HDAC1 ist für diese Transkriptionsrepression wesentlich (Hassig et al., PNAS 95, 3519–3524 (1998)).

[0004] Mehrere cDNAs, die für Histondeacetylasen kodieren, wurden bereits charakterisiert. Die erste, die kloniert wurde, war das Hefeprotein RPD3, das zuerst in genetischen Screens auf Transkriptionsrepressoren identifiziert wurde (Vidal et al., Mol. Cell Biol. 11, 6317–6327 (1991)). Säugetier-HDAC1 wurde unabhängig davon als Molekültarget von TSA kloniert (Taunton et al., Science 272, 408–411 (1996)). Für HDAC1 wurde beobachtet, dass sie ein Ortholog von Hefe-RPD3 war, und für beide wurde gezeigt, dass sie in vitro HDAC-Aktivität aufwiesen. Drei cDNAs, HDAC1, HDAC2 und HDAC3, die für Proteine kodieren, die homolog zu RPD3 sind, wurden bereits beschrieben (Yang et al., J. Biol. Chem. 272, 28001–28007 (1997); Emiliani et al., PNAS 95, 2795–2800 (1998)). Alle drei weisen ubiquitäre Gewebeverteilung auf, und ihre Aktivitäten scheinen sich zu überschneiden. Bis heute wurden fünf *S.-cerevisiae*-Gene entdeckt, die für HDACs kodieren, und die Familie wurde basierend auf Sequenzkonserverung und vorgeschlagener biochemischer Funktion in zwei Klassen eingeteilt. *S.-cerevisiae*-Hos1, -Hos2, -Hos3 und -RPD3 bilden zusammen mit Säugetier-HDAC1, -2 und -3 die Klasse 1. Die zweite Klasse setzt sich aus der Hefe-HDA1 und -HDA3 und den erst jüngst identifizierten menschlichen Homologen HDAC4, HDAC5 und HDAC6 zusammen (Grozinger et al., PNAS 96, 4868–4873 (1999); Fischle et al., J. Biol. Chem. 274, 11713–11720 (1999)).

[0005] Da HDACs dafür bekannt sind, als Teil von Mehrfachuntereinheits-Transkriptionsregulationskomplexen zu funktionieren, kann die Regulierung von HDACs verwendet werden, um die Transkription eines spezifischen Gens oder einer Reihe von spezifischen Genen unter der Steuerung eines Regulationskomplexes, der eine HDAC enthält, zu modulieren, d.h. zu steigern oder zu reduzieren (Carmen et al., J. Biol. Chem. 271(26), 15837–15844 (1996)).

[0006] Für zahlreiche verschiedene Verbindungen, die HDAC-Inhibierungsaktivität aufweisen, wurde gezeigt, dass sie zu Hyperacetylierung von Histonen führen, und diese Modifikation geht in zahlreichen Zelltypen mit Zellzyklusstillstand und terminaler Differenzierung einher (siehe den Bericht der American Association for Cancer Research 40, März 1999). Wie für NaBu wurde für das Pilztoxin Trichostatin A (TSA), einen potenteren, spe-

zifischen und reversiblen Inhibitor, gezeigt, dass er Zellzyklusstillstand und/oder Differenzierung in zahlreichen verschiedenen Systemen induziert. Erst jüngst wurde ein synthetisches Benzamidderivat (MS-27275) mit HDAC-Inhibitorkaktivität beschrieben (Saito et al., PNAS 96, 4592–5497 (1999)). MS-27275 induziert Histonhyperacetylierung und zeigt Wirksamkeit beim Inhibieren von Tumorwachstum in Nacktmäusen, die einen Tumor in sich tragen.

[0007] Bei akuter Promyelozytenleukämie (APL) führt eine genetische Umordnung zur Fusion des Retinolsäurererezeptors α (RAR α) mit entweder den PML- oder den PLZF-Proteinen. Sowohl PML-RAR α als auch PLZF-RAR α rekrutieren in untypischer Weise N-CoR/SMRT-HDAC und vermitteln Leukämogenese durch ihr Unterdrücken von Retinolsäure-regulierten Genen (Lin et al., Nature 391, 811–814 (1998); Grignani et al., Nature 391, 815–818 (1998)). Tatsächlich zeigte die therapeutische Verwendung von Natriumbutyrat (NaBu), einem nichtspezifischen HDAC-Inhibitor, zur Targettranskription in APL bereits Erfolge, sogar in Retinolsäure-resistenten Formen der Erkrankung (Warrell et al., J. Natl. Cancer Inst. 90, 1621–1625 (1998)). Eine Rolle von HDAC wurde auch bei akuter myeloischer Leukämie nachgewiesen, die als Resultat der Fusion des AML1-Transkriptionsfaktors mit dem ETO-(“eight twenty one”- oder MT68-)Genprodukt entsteht (Gelmetti et al., Mol. Cell Biol. 18, 7185–7191 (1998); Wang et al., PNAS 95, 10860–10865 (1998)). Diese Informationen zusammen lassen darauf schließen, dass Inhibierung von HDAC ein sinnvoller Ansatz zur Behandlung von bestimmten Leukämieformen ist. Es gibt weitere Hinweise auf eine wahrscheinliche Rolle von HDAC bei anderen Krebsarten, einschließlich Kolonkrebs (Hassig et al., Chem. Biol. 4, 783–789 (1997); Archer et al., PNAS 95, 6791–6796 (1998)), Plattenepithelkarzinom (Gillenwater et al., Int. J. Cancer 75, 217–224 (1998); Saunders et al., Cancer Res. 59, 399–404 (1999)), Adenokarzinome (McBain et al., Biochem. Pharmacol. 53, 1357–1368 (1997)) und Neuroblastome (Swendeman et al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 40, Abstract Nr. 3836 (1999)). Für HDACs wurde auch erkannt, dass sie in die durch BRCA1 (Yarden et al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 40, Abstr. Nr. 3387 (1999)) und c-fos (Bakin & Curran, Science 283, 387–390 (1999)) vermittelte Transkriptionsregulation eingebunden sind.

[0008] Andererseits ist es manchmal auch wünschenswert, Proliferation von Zellen auf gesteuerte Art und Weise zu fördern. Proliferation von Zellen ist beispielsweise zur Wundheilung und bei erwünschtem Gewebe-wachstum nützlich. Somit ist die Identifizierung von Modulatoren, die die Inhibierung von Proliferation fördern, steigern oder auch hemmen, wünschenswert.

[0009] Trotz der erwünschten Identifikation von Transkriptionskomponenten und -modulatoren gibt es auf dem Gebiet solcher Verbindungen noch Defizite. Folglich wäre es von Vorteil, Zusammensetzungen und Verfahren bereitzustellen, die zum Screenen auf Transkriptionsmodulatoren nützlich sind. Auch wäre es von Vorteil, neue Zusammensetzungen bereitzustellen, die in die Transkriptionsregulierung eingebunden sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Gemäß den oben angeführten Zielen stellt die vorliegende Erfindung eine Nucleinsäure bereit, die für ein HDAC-Protein kodiert, worin das Polypeptid in der vorliegenden Anmeldung als "HDAC8" bezeichnet wird.

[0011] Das isolierte Nucleinsäuremolekül der Erfindung kodiert für HDAC8 und umfasst die in [Fig. 1](#) gezeigte Nucleinsäuresequenz (Seq.-ID Nr. 1).

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt Expressionsvektoren bereit, die für ein HDAC8-Protein kodieren und dieses exprimieren.

[0013] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Wirtszellen bereit, die rekombinante Nucleinsäuren und Expressionsvektoren, die für das HDAC8-Protein kodieren, umfassen. Folglich stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung eines HDAC8-Proteins bereit.

[0014] In wiederum einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel, das sich an ein HDAC8-Protein bindet, bereit.

[0015] Andere Aspekte der Erfindung werden Fachleuten durch die folgende Beschreibung der Erfindung ersichtlich sein.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0016] [Fig. 1](#) zeigt die vollständige Nucleotidsequenz des cDNA-Klons, der als HDAC8 bezeichnet wird, des-

sen Sequenz (Seq.-ID Nr. 1) ein Proteinprodukt (Seq.-ID Nr. 2) mit Homologie zur RPD3-Klasse (I) von HDACs vorhersagt. Die Translationsinitiations- und -terminationscodons sind unterstrichen.

[0017] [Fig. 2](#) zeigt die Aminosäuresequenzähnlichkeit zwischen HDAC1 (Seq.-ID Nr. 3), HDAC2 (Seq.-ID Nr. 4), HDAC3 (Seq.-ID Nr. 5) und HDAC8 (Seq.-ID Nr. 6). Identische Reste sind in dunkelgrauen Kästchen und konservative Substitutionen in hellgrauen Kästchen dargestellt. Dem vorhergesagten, 377 Aminosäuren langen HDAC8-Produkt (etwa 42 kDa) scheint eine Region zu fehlen, die zu den ~100 carboxyterminalen Aminosäuren von HDAC1, 2 und 3 homolog ist.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0018] Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuren bereit, die für Histondeacetylase-8-(HDAC8)-Proteine kodieren. Auch werden Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel bereitgestellt, das in der Lage ist, sich an das HDAC8-Protein zu binden und vorzugsweise die Aktivität dieses Proteins zu modulieren. Das Verfahren umfasst das Kombinieren eines HDAC8-Proteins und eines bioaktiven Kandidatenmittels und einer Zelle oder einer Population von Zellen und das Bestimmen der Wirkung auf die Zelle in Gegenwart und Abwesenheit des Kandidatenmittels. Andere Screening-Tests, einschließlich Bindungstests, werden hierin, wie nachstehend beschrieben, auch bereitgestellt.

[0019] Ein HDAC8-Protein kann auf mehrere Arten identifiziert werden. "Protein" in diesem Zusammenhang umfasst Proteine, Polypeptide und Peptide. Die HDAC8-Proteine der Erfindung können zwei allgemeinen Klassen zugeordnet werden: Proteine, die völlig neu sind, d.h. zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung nicht Teil einer öffentlichen Datenbank sind, auch wenn sie Homologie entweder zu bekannten Proteinen oder Peptiden aufweisen, für die exprimierte Sequenzmarkierungen (ESTs) kodieren. Alternativ dazu sind die HDAC8-Proteine bekannte Proteine, für die jedoch nicht bekannt war, dass sie in die Chromatinstrukturregulierung, Histonacetylierung, Transkriptionsregulation und dergleichen eingebunden sind, d.h. dass hierin erkannt wurde, dass sie eine neue biologische Funktion tragen. Folglich kann ein HDAC8-Protein anfänglich durch seine Assoziation mit einem Protein, das dafür bekannt ist, in Histonacetylierung und/oder -transkription eingebunden zu sein, identifiziert werden. Für jene Fälle, in denen HDAC8-Proteine und Nucleinsäuren neu sind, werden hierin Zusammensetzungen und Verwendungsverfahren bereitgestellt. Für Fälle, in denen die HDAC8-Proteine und Nucleinsäuren bereits bekannt waren, jedoch nicht dafür, in die Chromatinstrukturregulierung, Histonacetylierung und/oder Transkription wie hierin beschrieben eingebunden zu sein, werden Verwendungsverfahren, d.h. funktionelle Screens, bereitgestellt.

[0020] Ein HDAC8-Protein wie hierin definiert weist eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften auf: Acetylierung von Histonen; Homologie zu HDAC1 (Seq.-ID Nr. 3), HDAC2 (Seq.-ID Nr. 4), HDAC3 (Seq.-ID Nr. 5) und HDAC8 (Seq.-ID Nr. 6). Die Homologie wird unter Verwendung der folgenden Datenbank, Algorithmen und Parameter festgestellt. Unter "Homologie" wird hierin Sequenzähnlichkeit und -identität verstanden, wobei Identität bevorzugt wird.

[0021] HDAC8-Nucleinsäuren oder HDAC8-Proteine können anfänglich durch substanzelle Nucleinsäure- und/oder Aminosäuresequenzidentität oder -ähnlichkeit zur/zu den hierin bereitgestellten Sequenz(en) identifiziert werden. HDAC8-Nucleinsäuren oder HDAC8-Proteine können Sequenzidentität oder -ähnlichkeit zu den hierin bereitgestellten Sequenzen wie nachstehend beschrieben und eine oder mehrere der HDAC8-Protein-bioaktivitäten, wie nachstehend noch näher beschrieben wird, aufweisen. Solche Sequenzidentität oder -ähnlichkeit kann auf der gesamten Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz basieren.

[0022] Hierin ist ein Protein ein "HDAC8-Protein" wie hierin definiert, wenn die Gesamt-Sequenzidentität der Aminosäuresequenz aus [Fig. 1](#) vorzugsweise mehr als etwa 60%, noch bevorzugter mehr als etwa 70%, noch bevorzugter mehr als etwa 80%, und am meisten bevorzugt mehr als etwa 90%, beträgt. In manchen Ausführungsformen beträgt die Sequenzidentität etwa 93 bis 95 oder 98%.

[0023] Wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, können zahlreiche verschiedene Programme verwendet werden, um zu erkennen, ob ein Protein (oder eine Nucleinsäure wie nachstehend erläutert) Sequenzidentität oder -ähnlichkeit mit einer bekannten Sequenz aufweist. Sequenzidentität und/oder -ähnlichkeit wird unter Verwendung von Standardverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, bestimmt, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, den lokalen Sequenzidentität-Algorithmus von Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981); den Sequenzidentitätsabgleich-Algorithmus von Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443 (1970), das Verfahren zur Ähnlichkeitssuche von Pearson & Lipman, PNAS USA 85, 2444 (1988), die Computerimplementierungen dieser Algorithmen (GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA im Wisconsin Genetics

Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), das Best-Fit-Sequenzprogramm, das von Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387–395 (1984), beschrieben wird, vorzugsweise unter Verwendung der Standardeinstellungen, oder Sichtprüfung. Vorzugsweise wird die prozentuelle Identität mittels FastDB basierend auf den folgenden Parametern berechnet: mismatch penalty = 1; gap penalty = 1; gap size penalty = 0,33; und joining penalty = 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, Alan R. Liss, Inc., 127–149 (1988).

[0024] Ein Beispiel für einen geeigneten Algorithmus ist PILEUP. PILEUP schafft einen Mehrfach-Sequenzabgleich aus einer Gruppe verwandter Sequenzen unter Verwendung von progressiven, paarweisen Abgleichen. Auch kann er in Diagrammform einen Baum darstellen, der die für die Bildung des Abgleichs verwendeten Clusterbildungsbeziehungen zeigt. PILEUP verwendet eine Vereinfachung des progressiven Abgleichverfahrens von Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35, 351–360 (1987); das Verfahren ist jenem ähnlich, das von Higgins & Sharp, CABIOS 5, 151–153 (1989), beschrieben wird. Nützliche PILEUP-Parameter umfassen eine Standard-gap-Gewichtung von 3,00, eine Standard-gap-Längengewichtung von 0,10 und gewichtete Endgaps.

[0025] Ein anderes Beispiel für einen geeigneten Algorithmus ist der BLAST-Algorithmus, der in Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403–410 (1990), und in Karlin et al., PNAS USA 90, 5873–5787 (1993), beschrieben wird. Ein besonders nützliches BLAST-Programm ist das WU-BLAST-2-Programm, das von Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460–480 (1996), [<http://blast.wustl.edu/blast/README.html>], erhalten wurde. WU-BLAST-2 verwendet mehrere Suchparameter, wovon die meisten auf die Standardwerte eingestellt sind. Die einstellbaren Parameter werden mit den folgenden Werten eingestellt: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = 11. Die HSP-S- und HSP-S2-Parameter sind dynamische Werte und werden vom Programm selbst je nach der Zusammensetzung der bestimmten Sequenz und der Zusammensetzung der bestimmten Datenbank, in der die Sequenz von Interesse gesucht wird, festgelegt; die Werte können jedoch auch eingestellt werden, um die Empfindlichkeit zu erhöhen.

[0026] Ein weiterer geeigneter Algorithmus ist gapped BLAST wie von Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402, berichtet wird. gapped BLAST verwendet BLOSUM-62-Substitutionsergebnisse; threshold T-Parameter eingestellt auf 9; verwendet das two hit-Verfahren, um nicht verkappte Verlängerungen auszulösen; berechnet für gap-Längen von k einen Betrag von $10 + k \cdot X_u$ eingestellt auf 16, X_g eingestellt auf 40 für die Datenbanksuchphase und auf 67 für die Ergebnisphase der Algorithmen. Verkappte Abgleiche werden durch ein Ergebnis von ~22 Bits ausgelöst.

[0027] Ein %-Wert der Aminosäuresequenzidentität wird durch die Anzahl an übereinstimmenden identischen Resten, dividiert durch die Gesamtzahl an Resten der "längeren" Sequenz in der abgeglichenen Region bestimmt. Die "längere" Sequenz ist jene, die die meisten tatsächlichen Reste in der abgeglichenen Region aufweist (Gaps, die durch WU-Blast-2 eingeführt werden, um das Abgleichergebnis zu maximieren, werden außer Acht gelassen).

[0028] In ähnlicher Weise ist die "prozentuelle (%) Nucleinsäuresequenzidentität" in Bezug auf die Kodiersequenz der hierin identifizierten Polypeptide als der Prozentsatz von Nucleotidresten in einer Kandidatensequenz, die mit den Nucleotidresten in der Kodiersequenz des HDAC8-Proteins identisch sind, definiert. Ein bevorzugtes Verfahren verwendet das BLASTN-Modul von WU-BLAST-2, eingestellt auf die Standardparameter mit overlap span = 1 und overlap fraction = 0,125.

[0029] Der Abgleich kann das Einführen von Gaps in die Sequenzen, die es abzulegen gilt, umfassen. Darüber hinaus gilt für Sequenzen, die entweder mehr oder weniger Aminosäuren als das Protein, für das die Sequenzen in den Figuren kodieren, enthalten, zu verstehen, dass in einer Ausführungsform der Prozentsatz von Sequenzidentität basierend auf der Anzahl an identischen Aminosäuren in Bezug auf die Gesamtanzahl an Aminosäuren bestimmt wird. Somit wird in einer Ausführungsform beispielsweise Sequenzidentität von Sequenzen, die kürzer als jene in [Fig. 1](#) sind, wie nachstehend erläutert, unter Verwendung der Anzahl der Aminosäuren in der kürzeren Sequenz bestimmt. In prozentuellen Identitätsberechnungen wird die relative Gewichtung verschiedenen Manifestationen von Sequenzvariation, wie Insertionen, Deletionen, Substitutionen und dergleichen, nicht zugeordnet.

[0030] Hierin werden nur Identitäten als positiv (+1) verzeichnet, und allen Formen von Sequenzvarianten, einschließlich Gaps, wird ein Wert von "0" zugeordnet, wodurch der Bedarf an einer Gewichtungsskala oder Parametern, wie hierin für Sequenzähnlichkeitsberechnungen beschrieben, hinfällig wird. Prozentuelle Identitä-

tät kann beispielsweise durch Dividieren der Anzahl an übereinstimmenden identischen Resten durch die Gesamtanzahl an Resten der "kürzeren" Sequenz in der abgeglichenen Region und Multiplizieren mit 100 berechnet werden. Die "längere" Sequenz ist jene, die die meisten tatsächlichen Reste in der abgeglichenen Region aufweist.

[0031] Wie Fachleuten bekannt sein wird, können die Sequenzen der vorliegenden Erfindung Sequenzierungsfehler enthalten. Das heißt, es können nicht korrekte Nucleoside, Rahmenverschiebungen, unbekannte Nucleoside oder andere Arten von Sequenzierungsfehlern in jeder der Sequenzen auftreten; die korrekten Sequenzen fallen jedoch in den Bereich der hierin vorgegebenen Homologie- und Stringenzdefinitionen.

[0032] HDAC8-Proteine hierin können kürzer oder länger als die Aminosäuresequenz sein, für die die in [Fig. 1](#) gezeigte Nucleinsäure kodiert. Somit umfasst die Definition von HDAC8-Proteinen hierin alle Teile oder Fragmente der Aminosäuresequenz, für die die hierin bereitgestellte Nucleinsäuresequenz kodiert. Fragmente von HDAC8-Proteinen werden hierin als HDAC8-Proteine betrachtet, wenn a) sie zumindest ein antigenes Epitop gemeinsam haben; b) zumindest die angegebene Sequenzidentität aufweisen; und c) vorzugsweise biologische Histondeacetylase-8-Aktivität besitzen, wie hierin noch näher definiert wird. In manchen Fällen, wenn die Sequenz diagnostisch eingesetzt wird, d.h. wenn die Gegenwart oder Abwesenheit einer HDAC8-Protein-nucleinsäure bestimmt wird, ist nur die angegebene Sequenzidentität erforderlich. Die Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung können auch länger als die Sequenz in [Fig. 1](#) sein. Nucleinsäurefragmente umfassen jeden beliebigen Teil der hierin beschriebenen Nucleinsäuren, der eine Sequenz aufweist, die davor noch nicht exakt identifiziert wurde; Fragmente mit Sequenzen mit der angegebenen Sequenzidentität zu jenem Teil, der davor noch nicht identifiziert wurde, werden auch beschrieben.

[0033] Darüber hinaus können, wie nachstehend noch näher erläutert wird, HDAC8-Proteine gebildet werden, die länger als jene in [Fig. 1](#) abgebildeten sind; beispielsweise durch Zusatz von Epitop- oder Reinigungs-markierungen, den Zusatz anderer Fusionssequenzen oder die Aufklärung zusätzlicher Kodier- und Nichtkodiersequenzen. Wie nachstehend beschrieben ist die Fusion eines HDAC8-Peptids an ein fluoreszierendes Peptid, wie z.B. grün fluoreszierendes Peptid (GFP), besonders bevorzugt.

[0034] HDAC8-Proteine können auch als solche identifiziert werden, für die HDAC8-Nucleinsäuren kodieren, die an die in [Fig. 1](#) gezeigte Sequenz hybridisieren, oder ein Komplement davon, wie hierin erläutert. Hybridisierungsbedingungen werden nachstehend noch näher beschrieben.

[0035] Wird ein HDAC8-Protein verwendet, um Antikörper zu bilden, so muss HDAC8 zumindest ein Epitop oder eine Determinante mit dem Protein voller Länge gemeinsam haben. Unter "Epitop" oder "Determinante" wird hierin ein Teil eines Proteins verstanden, der einen Antikörper bildet und/oder bindet. Somit sind in den meisten Fällen Antikörper, die gegen ein kleineres HDAC8-Protein gebildet werden, in der Lage, sich an das Protein voller Länge zu binden. Es wird bevorzugt, dass das Epitop einmalig ist; das heißt, die gegen ein einmaliges Epitop gebildeten Antikörper zeigen wenig oder überhaupt keine Kreuzreakтивität. Die Bezeichnung "Antikörper" umfasst Antikörperfragmente, wie sie nach dem Stand der Technik bekannt sind, einschließlich Fab, Fab₂, einkettige Antikörper (Fv beispielsweise), chimäre Antikörper und dergleichen, die entweder durch die Modifikation ganzer Antikörper gebildet werden oder unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren neu synthetisiert werden.

[0036] Antikörper gegen ein HDAC8-Protein können bei Bindung an ein HDAC8-Protein zumindest eine biologische Funktion des HDAC8-Proteins wie hierin beschrieben reduzieren oder ausschalten. Das heißt, dass der Zusatz von Anti-HDAC8-Protein-Antikörpern (entweder polyklonal oder vorzugsweise monoklonal) zu HDAC8-Proteinen (oder Zellen, die HDAC8-Proteine enthalten) eine HDAC8-Aktivität reduzieren oder ausschalten kann. Im Allgemeinen wird zumindest eine 25%ige Senkung der Aktivität bevorzugt, wobei zumindest etwa 50% besonders bevorzugt werden, und eine Senkung von etwa 95–100% noch stärker bevorzugt wird.

[0037] Die HDAC8-Antikörper hierin binden sich spezifisch an HDAC8-Proteine. Unter "spezifisch binden" wird verstanden, dass sich die Antikörper mit einer Bindungskonstante im Bereich von zumindest 10^{-4} – 10^{-6} M⁻¹, wobei ein bevorzugter Bereich von 10^{-7} – 10^{-9} M⁻¹ reicht, an das Protein binden. Antikörper werden nachstehend noch näher erläutert.

[0038] Im Fall der Nucleinsäure steht die Gesamt-Sequenzidentität der Nucleinsäuresequenz mit der Aminosäuresequenzidentität in Einklang, berücksichtigt jedoch die Degeneration des genetischen Codes und Codon-vorgaben verschiedener Organismen. Folglich kann die Nucleinsäuresequenzidentität entweder geringer oder höher als jene der Proteinsequenz sein. Somit beträgt die Sequenzidentität der Nucleinsäuresequenz im Ver-

gleich zur Nucleinsäuresequenz aus der Figur vorzugsweise mehr als 75%, noch bevorzugter mehr als etwa 80%, insbesondere mehr als etwa 85%, und am meisten bevorzugt mehr als 90%. In manchen Ausführungsformen beträgt die Sequenzidentität etwa 93 bis 95 oder 98%.

[0039] Eine HDAC8-Nucleinsäure kodiert vorzugsweise für ein HDAC8-Protein. Wie Fachleuten bekannt sein wird, kann aufgrund der Degeneration des genetischen Codes eine äußerst große Anzahl an Nucleinsäuren gebildet werden, die alle für die HDAC8-Proteine der vorliegenden Erfindung kodieren. Somit könnten, nachdem eine bestimmte Aminosäuresequenz identifiziert wurde, Fachleute durch einfache Modifizierung der Sequenz eines oder mehrerer Codons in einer Weise, die die Aminosäuresequenz des HDAC8-Proteins nicht verändert, jede beliebige Anzahl an verschiedenen Nucleinsäuren bilden.

[0040] In einer Ausführungsform wird die Nucleinsäure durch Hybridisierungsstudien bestimmt. So werden beispielsweise Nucleinsäuren, die unter hochstringenten Bedingungen an die in [Fig. 1](#) gezeigte Nucleinsäuresequenz hybridisieren, oder ihr Komplement als HDAC8-Nucleinsäure angesehen. Hochstringente Bedingungen sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt; siehe beispielsweise Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), und Short Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (Hrsg.). Stringente Bedingungen sind sequenzabhängig und unterscheiden sich unter verschiedenen gegebenen Umständen. Längere Sequenzen hybridisieren insbesondere bei höheren Temperaturen. Ein ausführlicher Leitfaden zur Hybridisierung von Nucleinsäuren ist in Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993), zu finden. Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen als eine Temperatur von etwa 5–10°C unter dem Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und pH ausgewählt. Die T_m ist die Temperatur (bei definierter/m Ionenstärke, pH und Nucleinsäurekonzentration), bei der 50% der Sonden, die zum Target komplementär sind, an die Targetsequenz im Gleichgewicht hybridisieren (da die Targetsequenzen im Überschuss vorhanden sind, bei T_m , werden 50% der Sonden im Gleichgewicht besetzt). Stringente Bedingungen sind jene, bei denen die Salzkonzentration weniger als etwa 1,0 M Natriumionen beträgt, typischerweise etwa 0,01 bis 1,0 M Natriumionenkonzentration (oder jene anderer Salze), bei einem pH von etwa 7,0 bis 8,3, und die Temperatur beträgt zumindest etwa 30°C für kurze Sonden (z.B. etwa 10 bis 50 Nucleotide lang) und zumindest etwa 60°C für längere Sonden (z.B. länger als etwa 50 Nucleotide). Stringente Bedingungen können auch mittels Zusatz von destabilisierenden Mitteln wie Formamid erreicht werden.

[0041] In einer anderen Ausführungsform werden weniger stringente Bedingungen verwendet; beispielsweise können mäßig oder wenig stringente Bedingungen verwendet werden, wie sie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind; siehe Maniatis & Ausubel, s.o., und Tijssen, s.o.

[0042] Die HDAC8-Proteine und -Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise rekombinant. Wie hierin verwendet und nachstehend näher definiert kann sich "Nucleinsäure" entweder auf DNA oder RNA oder Moleküle beziehen, die sowohl Desoxy- als auch Ribonucleotide enthalten. Die Nucleinsäuren umfassen genomische DNA, cDNA und Oligonucleotide einschließlich Sense- und Antisense-Nucleinsäuren. Solche Nucleinsäuren können auch Modifikationen in der Ribosephosphat-Hauptkette enthalten, um Stabilität und Halbwertszeit solcher Moleküle in physiologischen Umgebungen zu steigern.

[0043] Die Nucleinsäure kann doppelsträngig oder einzelsträngig sein oder kann Teile von sowohl doppelsträngiger als auch einzelsträngiger Sequenz enthalten. Wie Fachleuten bekannt sein wird, definiert die Darstellung eines einzelnen Strangs ("Watson") auch die Sequenz des anderen Strangs ("Crick"); somit umfassen die in den Figuren dargestellten Sequenzen auch das Komplement der Sequenz. Unter der Bezeichnung "rekombinante Nucleinsäure" wird hierin Nucleinsäure verstanden, die ursprünglich, im Allgemeinen durch Manipulation von Nucleinsäure durch Endonukleasen und/oder Polymerasen und/oder Ligasen, in einer Form, die in der Natur normalerweise nicht angetroffen wird, *in vitro* gebildet wurde. Somit werden für den Zweck dieser Erfindung sowohl eine isolierte HDAC8-Nucleinsäure in einer unverzweigten Form als auch ein Expressionsvektor, der *in vitro* durch Ligation von DNA-Molekülen, die normalerweise nicht verbunden sind, gebildet wird, als rekombinant angesehen. Es gilt zu verstehen, dass, sobald eine rekombinante Nucleinsäure gebildet und erneut in eine Wirtszelle oder einen Wirtsorganismus eingeführt wurde, sie nichtrekombinant replizieren wird, d.h. unter Verwendung des zellulären *In-vivo*-Mechanismus der Wirtszelle, und nicht durch *In-vitro*-Manipulationen; solche Nucleinsäuren, die einmal rekombinant gebildet wurden, auch wenn sie daraufhin nichtrekombinant replizieren, werden aber für die Zwecke der Erfindung stets als rekombinant angesehen.

[0044] In ähnlicher Weise ist ein "rekombinantes Protein" ein Protein, das unter Verwendung von Rekombinationsverfahren, d.h. durch die Expression einer rekombinanten Nucleinsäure, wie zuvor dargestellt, gebildet

wird. Ein rekombinantes Protein unterscheidet sich von natürlich vorkommendem Protein durch zumindest eine oder mehrere Eigenschaften. Beispielsweise kann das Protein von manchen oder allen der Proteine und Verbindungen, mit denen es normalerweise in seinem Wildtyp-Wirt assoziiert ist, isoliert oder getrennt werden und kann somit im Wesentlichen rein sein. Ein isoliertes Protein beispielsweise ist von zumindest gewissen Teilen des Materials, mit dem es normalerweise in seinem natürlichen Zustand verbunden ist, nicht mehr verbunden, das sich auf zumindest etwa 0,5 Gew.-%, noch bevorzugter zumindest etwa 5 Gew.-%, des Gesamtproteins in einer bestimmten Probe beläuft. Ein im Wesentlichen reines Protein umfasst zumindest etwa 75 Gew.-%, des Gesamtproteins, wobei zumindest etwa 80 Gew.-% bevorzugt werden, und zumindest etwa 90 Gew.-% besonders bevorzugt werden. Die Definition umfasst die Produktion eines HDAC8-Proteins aus einem Organismus in einem anderen Organismus oder einer Wirtszelle. Alternativ dazu kann das Protein durch Verwendung eines induzierbaren Promoters oder stark exprimierenden Promoters in signifikant höheren Konzentrationen, als normalerweise beobachtet wird, produziert werden, sodass das Protein in erhöhten Konzentrationen gebildet wird. Alternativ dazu kann das Protein in einer Form vorliegen, die normalerweise nicht in der Natur zu finden ist, beispielsweise mit dem Zusatz einer Epitopmarkierung oder von Aminosäuresubstitutionen, -insertionen und/oder -deletionen, wie nachstehend noch erläutert wird.

[0045] HDAC8-Proteinvarianten werden beschrieben. Diese Varianten können einer oder mehreren von drei Klassen zugeordnet werden: Substitutions-, Insertions- oder Deletionsvarianten. Diese Varianten werden üblicherweise durch ortspezifische Mutagenese von Nucleotiden in der für ein HDAC8-Protein kodierenden DNA, unter Verwendung von Kassetten- oder PCR-Mutagenese, Gen-Shuffling oder anderen Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt sind, hergestellt, um DNA zu bilden, die für die Variante kodiert, und hiernach die DNA in rekombinanter Zellkultur wie nachstehend erläutert exprimiert. Variable HDAC8-Proteinfragmente mit bis zu etwa 100–150 Resten können jedoch auch durch In-vitro-Synthese unter Verwendung anerkannter Verfahren hergestellt werden. Aminosäuresequenzvarianten werden durch die vorbestimmte Natur der Variante charakterisiert, eine Eigenschaft, die sie von natürlich vorkommenden Allel- oder Zwischenspeziesvarianten der HDAC8-Proteinaminosäuresequenz unterscheidet. Die Varianten weisen typischerweise dieselbe qualitative biologische Aktivität wie das natürlich vorkommende Analog auf, obwohl auch Varianten ausgewählt werden können, die modifizierte Eigenschaften aufweisen, wie nachstehend noch näher erläutert wird.

[0046] Obwohl die Stelle oder Region, an der eine Aminosäuresequenzvariante eingeführt wird, vorbestimmt ist, muss die Mutation an sich nicht vorbestimmt sein. Um beispielsweise die Leistung einer Mutation an einer bestimmten Stelle zu optimieren, kann am Targetcodon oder der -region Zufallsmutagenese durchgeführt und die exprimierten HDAC8-Varianten auf die optimale Kombination von gewünschter Aktivität gescreent werden. Verfahren zur Herstellung von Substitutionsmutationen an vorbestimmten Stellen in DNA mit einer bekannten Sequenz sind durchwegs bekannt und umfassen beispielsweise M13-Primermutagenese und PCR-Mutagenese. Screening der Mutanten erfolgt unter Verwendung von Tests zu HDAC8-Proteinaktivitäten und/oder -eigenschaften.

[0047] Aminosäuresubstitutionen betreffen typischerweise einzelne Reste; Insertionen liegen üblicherweise im Bereich von etwa 1 bis 20 Aminosäuren, wenn auch beträchtlich größere Insertionen akzeptiert werden können. Deletionen liegen im Bereich von etwa 1 bis etwa 20 Resten, wenn auch in manchen Fällen Deletionen viel größer sein können.

[0048] Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder jegliche Kombination davon können verwendet werden, um ein Endderivat zu erlangen. Im Allgemeinen werden diese Veränderungen an einigen wenigen Aminosäuren durchgeführt, um die Veränderung des Moleküls zu minimieren. Unter bestimmten Umständen können jedoch auch größere Veränderungen akzeptiert werden. Sind geringfügige Veränderungen an den Eigenschaften des HDAC8-Proteins erwünscht, so werden Substitutionen im Allgemeinen gemäß dem folgenden Schema durchgeführt:

Schema I

Ursprüngliche Reste	Beispiele für Substitutionen
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0049] Wesentliche Änderungen an Funktion oder immunologischer Identität werden durch die Auswahl von Substitutionen hervorgerufen, die weniger konservativ als jene aus Schema I sein. Beispielsweise können Substitutionen gebildet werden, die folgende Elemente wesentlicher beeinflussen: die Struktur der Polypeptid-Hauptkette im Bereich der Änderung, beispielsweise die alpha-Helix- oder beta-Faltblatt-Struktur; die Ladung oder Hydrophobizität des Moleküls an der Targetstelle; oder den Hauptteil der Seitenkette. Die Substitutionen, von denen im Allgemeinen erwartet wird, dass sie die größten Änderungen an den Eigenschaften von Polypeptiden hervorrufen, sind jene, bei denen (a) ein hydrophiler Rest, z.B. Seryl oder Threonyl, anstelle eines (oder durch einen) hydrophoben Rest(s), z.B. Leucyl, Isoleucyl, Phenylalanyl, Valyl oder Alanyl, substituiert wird; (b) ein Cystein oder Prolin anstelle eines (oder durch einen) beliebigen, anderen Rest(s) substituiert wird; (c) ein Rest mit einer elektropositiven Seitenkette, z.B. Lysyl, Arginyl oder Histidyl anstelle eines (oder durch einen) elektronegativen Rest(s), z.B. Glutamyl oder Aspartyl, substituiert wird; oder (d) ein Rest mit einer sptigen Seitenkette, z.B. Phenylalanin, anstelle eines (oder durch einen) Rest(s) ohne Seitenkette, z.B. Glycin, substituiert wird.

[0050] Die Varianten weisen typischerweise dieselbe qualitative biologische Aktivität auf und zeigen dieselbe Immunantwort wie das natürlich vorkommende Analogon, obwohl Varianten auch ausgewählt werden, um die Eigenschaften der HDAC8-Proteine je nach Bedarf zu modifizieren. Alternativ dazu kann die Variante auch so entworfen werden, dass die biologische Aktivität des HDAC8-Proteins verändert wird. Beispielsweise können Glykosylierungsstellen hinzugefügt, verändert oder entfernt werden. HDAC8-Varianten können so entworfen werden, dass beispielsweise an den Aminosäurepositionen 36–39, unter denen die cAMP-vermittelte Phosphorylierungs-Consensussequenz "KRAS" zu finden ist, Phosphorylierungsstellen hinzugefügt oder Phosphorylierungsstellen verändert oder entfernt werden. Die Tyrosin-Phosphorylierungs-Consensussequenz ist an Tyr-174 zu finden, der auch verändert werden kann.

[0051] Kovalente Modifikationen von HDAC8-Polypeptiden werden nun beschrieben. Ein Typ von kovalenter Modifikation umfasst das Umsetzen von Target-Aminosäureresten eines HDAC8-Polypeptids mit einem organischen derivatisierenden Mittel, das in der Lage ist, mit ausgewählten Seitenketten der N- oder C-terminalen Reste eines HDAC8-Polypeptids zu reagieren. Derivatisierung mit bifunktionellen Mitteln ist nützlich, beispielsweise zum Vernetzen von HDAC8-Protein zu einer wasserunlöslichen Trägermatrix oder Oberfläche zur Verwendung in einem Verfahren zur Reinigung von Anti-HDAC8-Antikörpern oder in Screening-Tests, wie nachstehend noch näher beschrieben wird. Üblicherweise verwendete Vernetzer umfassen beispielsweise 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, beispielsweise Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, einschließlich Disuccinimidylester wie 3,3'-Dithiobis(succinimidylpropionat), bifunktionelle Maleimide wie Bis-N-maleimido-1,8-octan und Mittel wie Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat.

[0052] Andere Modifikationen umfassen Desamidierung von Glutamyl- und Asparaginylresten zu den ent-

sprechenden Glutamyl- bzw. Aspartylresten, Hydrolyse von Prolin und Lysin, Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonylresten, Methylierung der Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidin-Seitenketten (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 79–86 (1983)), Acetylierung des N-terminalen Amins und Amidierung beliebiger C-terminaler Carboxylgruppen.

[0053] Ein anderer Typ von kovalenter Modifikation des HDAC8-Polypeptids umfasst eine Änderung des nativen Glykosylierungsmusters des Polypeptids. "Änderung des nativen Glykosylierungsmusters" bezieht sich für die Zwecke hierin auf das Deleteieren einer oder mehrerer Kohlenhydratgruppierungen, die im HDAC8-Polypeptid mit nativer Sequenz zu finden sind, und/oder das Hinzufügen einer oder mehrerer Glykosylierungsstellen, die im HDAC8-Polypeptid nativer Sequenz nicht vorhanden sind.

[0054] Hinzufügung von Glykosylierungsstellen zu HDAC8-Polypeptiden kann durch Änderung ihrer Aminosäuresequenz erfolgen. Die Änderung kann beispielsweise durch Hinzufügung von, oder die Substitution durch, einem/n oder mehrere(n) Serin- oder Threoninreste(n) zum bzw. am HDAC8-Polypeptid nativer Sequenz (anstelle von O-gebundenen Glykosylierungsstellen) erfolgen. Die Änderung kann beispielsweise auch durch Hinzufügung von, oder die Substitution durch, eine(r) oder mehrere(n) Axn-Xaa-Ser/Thr-Stellen (Xaa = jede beliebige Aminosäure) zum bzw. am HDAC8-Polypeptid nativer Sequenz (anstelle von N-gebundenen Glykosylierungsstellen) erfolgen. Die HDAC8-Aminosäuresequenz kann gegebenenfalls durch Änderungen auf DNA-Ebene, insbesondere durch Mutation der DNA, die für das HDAC8-Polypeptid kodiert, an vorbestimmten Basen, sodass Codons gebildet werden, die zu den erwünschten Aminosäuren translatiert werden, verändert werden.

[0055] Ein anderes Mittel zur Steigerung der Anzahl an Kohlenhydratgruppierungen am HDAC8-Polypeptid ist das chemische oder enzymatische Binden von Glykosiden an das Polypeptid. Solche Verfahren werden auf dem Gebiet der Erfindung, z.B. in der WO 87/05330, veröffentlicht am 11. September 1987, und in Aplin & Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259–306 (1981), beschrieben.

[0056] Die Entfernung von Kohlenhydratgruppierungen, die am HDAC8-Polypeptid vorhanden sind, kann chemisch oder enzymatisch oder durch Mutationssubstitution von Codons, die für Aminosäurereste kodieren, die als Targets für Glykosylierung dienen, durchgeführt werden. Chemische Deglykosylierungsverfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden beispielsweise von Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259, 52 (1987), und von Edge et al., Anal. Biochem. 118, 131 (1981), beschrieben. Enzymatische Spaltung von Kohlenhydratgruppierungen an Polypeptiden kann durch die Verwendung von zahlreichen verschiedenen Endo- und Exoglykosidasen, wie von Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138, 350 (1987), beschrieben, erreicht werden.

[0057] Ein anderer Typ von kovalenter Modifikation von HDAC8-Polypeptid umfasst die Bindung des HDAC8-Polypeptids an eines von zahlreichen verschiedenen, nicht proteinartigen Polymeren, z.B. Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene, auf eine Weise, wie sie in den US-Patenten Nr. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 oder 4.179.337 beschrieben wird.

[0058] HDAC8-Polypeptide können auch auf solch eine Weise modifiziert werden, dass sie chimäre Moleküle bilden, die ein HDAC8-Polypeptid umfassen, das an ein anderes, heterologes Polypeptid oder eine Aminosäuresequenz fusioniert ist. Solch ein chimäres Molekül kann eine Fusion eines HDAC8-Polypeptids mit einem Markierungs-Polypeptid umfassen, woraus ein Epitop entsteht, an das sich ein Anti-Markierungs-Antikörper selektiv binden kann. Die Epitopmarkierung ist im Allgemeinen am Amino- oder Carboxyl-Terminus des HDAC8-Polypeptids angeordnet, kann jedoch auch als eine innere Insertion oder Substitution inkorporiert sein. Die Gegenwart solcher Epitop-markierter Formen eines HDAC8-Polypeptids kann unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Markierungs-Polypeptid nachgewiesen werden. Auch ermöglicht die Bereitstellung der Epitopmarkierung, dass das HDAC8-Polypeptid leicht durch Affinitätsreinigung unter Verwendung eines Anti-Markierungs-Antikörpers oder eines anderen Typs von Affinitätsmatrix, die sich an die Epitopmarkierung bindet, zu reinigen ist. Alternativ dazu kann das chimäre Molekül eine Fusion eines HDAC8-Polypeptids mit einem Immunglobulin oder einer bestimmten Region eines Immunglobulins umfassen. Für eine zweiwertige Form des chimären Moleküls könnte solch eine Fusion an die Fc-Region eines IgG-Moleküls vorhanden sein, wie nachstehend noch näher erläutert wird.

[0059] Verschiedene Markierungs-Polypeptide und ihre jeweiligen Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt. Beispiele umfassen poly-Histidin-(poly-his-) oder poly-Histidin-Glycin-(poly-his-gly-)Markierungen; das flu-HA-Markierungs-Polypeptid und sein Antikörper 12CA5 (Field et al., Mol. Cell.

Biol. 8, 2159–2165 (1988)); die c-myc-Markierung und die Antikörper 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 und 9E10 hiergegen (Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5, 3610–3616 (1985)); und das die Herpes-Simplex-Virus-Glykoprotein-D-(gD)Markierung und ihren Antikörper (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6), 547–553 (1990)). Andere Markierungs-Polypeptide umfassen das Flag-Peptid (Hopp et al., BioTechnology 6, 1204–1210 (1988)); das KT3-Epitoppeptid (Martin et al., Science 255, 192–194 (1992)); Tubulin-Epitoppeptid (Skinner et al., J. Biol. Chem. 266, 15163–15166 (1991)); und die T7-Gen-10-Proteinpeptid-Markierung (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6393–6397 (1990)) sowie die Histidin-Markierungs und Metallbindungsstellen (Smith, Ann. NY. Acad. Sci. 646, 315–321 (1991)), wobei die Flag- und Histidin-Markierungen bevorzugt sind.

[0060] In einer Ausführungsform hierin werden HDAC8-Proteine der HDAC-Familie und HDAC-Proteine aus anderen Organismen wie nachstehend beschrieben kloniert und exprimiert. Sonden- oder degenerierte Polymerasekettenreaktion-(PCR-)Primersequenzen können verwendet werden, um andere verwandte HDAC8-Proteine aus Menschen oder anderen Organismen zu finden. Wie Fachleuten bekannt sein wird, umfassen besonders nützliche Sonden- und/oder PCR-Primersequenzen die einmaligen Bereiche der HDAC8-Nucleinsäuresequenz. Auf dem Gebiet der Erfindung ist allgemein bekannt, dass bevorzugte PCR-Primer eine Länge von etwa 15 bis etwa 35 Nucleotiden aufweisen, wobei eine Länge von etwa 20 bis etwa 30 bevorzugt wird, und können je nach Bedarf Inosin enthalten. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion sind auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt. Fachleute können routinemäßig eine Nucleotidsequenz mit der erwünschten Länge synthetisieren oder sie zu dieser Länge zuschneiden.

[0061] Nachdem sie aus ihrer natürlichen Quelle isoliert wurde, wenn sie z.B. in einem Plasmid oder anderen Vektor enthalten war oder daraus als ein unverzweigtes Nucleinsäuresegment ausgeschnitten wurde, kann die rekombinante HDAC8-Nucleinsäure weiter als Sonde verwendet werden, um andere HDAC8-Nucleinsäuren zu identifizieren und isolieren. Auch kann sie als eine "Vorläufer"-Nucleinsäure verwendet werden, um modifizierte oder variierte HDAC8-Nucleinsäuren und -Proteine zu bilden.

[0062] Unter Verwendung der Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung, die für ein HDAC8-Protein kodieren, können zahlreiche verschiedene Expressionsvektoren hergestellt werden. Die Expressionsvektoren können entweder selbstreplizierende, extrachromosomal Vektoren oder Vektoren sein, die sich in ein Wirtsge nom einfügen. Im Allgemeinen umfassen diese Expressionsvektoren Transkriptions- und Translationsregulations-Nucleinsäure, die operabel an die für das HDAC8-Protein kodierende Nucleinsäure gebunden ist. Die Bezeichnung "Kontrollsequenzen" bezieht sich auf Nucleinsäuresequenzen, die für die Expression einer operabel gebundenen Kodiersequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich sind. Die Kontrollsequenzen, die für Prokaryoten geeignet sind, umfassen beispielsweise einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz und eine Ribosombindungsstelle. Eukaryotische Zellen sind dafür bekannt, Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer zu verwenden.

[0063] Nucleinsäure ist "operabel gebunden", wenn sie in eine funktionelle Beziehung mit einer anderen Nucleinsäuresequenz gebracht wird. Beispielsweise ist DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader operabel an DNA für ein Polypeptid gebunden, wenn es als ein Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptids teilnimmt; ein Promotor oder Enhancer ist operabel an eine Kodiersequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosombindungsstelle ist operabel an eine Kodiersequenz gebunden, wenn sie so angeordnet ist, dass sie Translation erleichtert. Um ein weiteres Beispiel zu nennen, bezieht sich operabel gebunden auf DNA-Sequenzen, die so verbunden sind, dass sie zusammenhängend sind, und im Fall eines Sekretionsleaders zusammenhängend sind und in Lesephase stehen. Enhancer müssen jedoch nicht zusammenhängend sein. Bindung erfolgt durch Ligation an passenden Restriktionsstellen. Sind solche Stellen nicht vorhanden, so werden die synthetischen Oligonucleotidadaptoren oder -linker gemäß der herkömmlichen Praxis verwendet. Die Transkriptions- und Translationsregulations-Nucleinsäure ist im Allgemeinen für die verwendete Wirtszelle geeignet, um das HDAC8-Protein zu exprimieren; Transkriptions- und Translationsregulations-Nucleinsäuresequenzen aus *Bacillus* werden beispielsweise bevorzugt verwendet, um das HDAC8-Protein in *Bacillus* zu exprimieren. Zahlreiche Typen von geeigneten Expressionsvektoren und geeignete Regulationssequenzen sind auf dem Gebiet der Erfindung für viele verschiedene Wirtszellen bekannt.

[0064] Im Allgemeinen können die Transkriptions- und Translationsregulationssequenzen Promotorsequenzen, Ribosombindungsstellen, Transkriptionsstart- und -stoppssequenzen, Translationsstart- und -stoppssequenzen und Enhancer- oder Aktivatorsequenzen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt darauf. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Regulationssequenzen einen Promotor und Transkriptionsstart- und -stoppssequenzen.

[0065] Promotorsequenzen kodieren entweder für konstitutive oder induzierbare Promotoren. Die Promotoren können entweder natürlich vorkommende Promotoren oder Hybridpromotoren sein. Hybridpromotoren, die Elemente aus mehr als einem Promotor kombinieren, sind auf dem Gebiet der Erfindung auch bekannt und sind in der vorliegenden Erfindung nützlich.

[0066] Darüber hinaus kann der Expressionsvektor zusätzliche Elemente umfassen. Beispielsweise kann der Expressionsvektor zwei Replikationssysteme aufweisen, wodurch ermöglicht wird, dass er in zwei Organismen erhalten wird, beispielsweise in Säugetier- oder Insektenzellen zur Expression und in einem prokaryotischen Wirt zum Klonieren und zur Amplifikation. Weiters enthält zur Integration von Expressionsvektoren der Expressionsvektor zumindest eine Sequenz, die zum Wirtszellgenom homolog ist, und vorzugsweise zwei homologe Sequenzen, die das Expressionskonstrukt flankieren. Der integrierende Vektor kann durch Auswählen der geeigneten homologen Sequenz zur Einbindung in den Vektor auf einen spezifischen Locus in der Wirtszelle gerichtet werden. Konstrukte für integrierende Vektoren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt.

[0067] Weiters enthält in einer bevorzugten Ausführungsform der Expressionsvektor ein selektierbares Markerogen, um die Selektion von transformierten Wirtszellen zu ermöglichen. Selektionsgene sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und variieren je nach der verwendeten Wirtszelle.

[0068] Ein bevorzugtes Expressionsvektorsystem ist ein Retrovirusvektorsystem, wie es beispielsweise in der PCT/US97/01019 und der PCT/US97/01048 beschrieben wird.

[0069] HDAC8-Proteine können durch Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der für ein HDAC8-Protein kodierende Nucleinsäure enthält, unter geeigneten Bedingungen, um Expression des HDAC8-Proteins zu induzieren oder zu verursachen, hergestellt werden. Die für HDAC8-Proteinexpression geeigneten Bedingungen variieren mit der Auswahl des Expressionsvektors und der Wirtszelle und können von Fachleuten mittels Routineversuchen leicht festgelegt werden. Die Verwendung von konstitutiven Promotoren im Expressionsvektor beispielsweise erfordert ein Optimieren von Wachstum und Proliferation der Wirtszelle, während die Verwendung eines induzierbaren Promotors die geeigneten Wachstumsbedingungen für Induktion erfordert. Darüber hinaus kann in manchen Ausführungsformen der Zeitpunkt der Ernte von Bedeutung sein. Beispielsweise sind die Baculovirussysteme, die bei Insektenzellexpression verwendet werden, lytische Viren, daher kann die Auswahl der Erntezeit für die Produktausbeute wesentlich sein.

[0070] Geeignete Wirtszellen umfassen Hefe, Bakterien, Archebakterien, Pilze und Insekten- und Tierzellen einschließlich Säugetierzellen. Von besonderem Interesse sind Drosophila-melanogaster-Zellen, Saccharomyces cerevisiae und andere Hefearten, E. coli, Bacillus subtilis, SF9-Zellen, C129-Zellen, 293-Zellen, Neurospora, BHK, CHO, COS und HeLa-Zellen, Fibroblasten, Schwannom-Zelllinien, sich unbegrenzt vermehrende Säugetier-Knochenmarks- und -Lymphzelllinien, wobei HeLa- und SF9-Zellen bevorzugt sind.

[0071] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die HDAC8-Proteine in Säugetierzellen exprimiert. Säugetier-Expressionssysteme sind auch auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und umfassen Retrovirussysteme. Ein Säugetierpromotor ist jegliche DNA-Sequenz, die in der Lage ist, Säugetier-RNA-Polymerase zu binden und die Stromab-(3')-Transkription einer Kodiersequenz für HDAC8-Protein zu mRNA zu initiieren. Ein Promotor weist eine Transkriptionsinitiationsregion auf, die üblicherweise proximal zum 5'-Ende der Kodiersequenz angeordnet ist, und von einer TATA-Box wird angenommen, dass sie RNA-Polymerase II steuert, die RNA-Synthese an der korrekten Stelle zu beginnen. Ein Säugetierpromotor enthält auch ein Promotorelement stromauf (Enhancer-Element), das typischerweise innerhalb von 100 bis 200 Basenpaaren stromauf von der TATA-Box angeordnet ist. Ein Stromauf-Promotorelement bestimmt die Geschwindigkeit, mit der Transkription initiiert wird, und kann in jede Richtung wirken. Von besonderer Nützlichkeit als Säugetierpromotoren sind die Promotoren aus Säugetier-Virusgenen, da die Virusgene häufig stark exprimiert werden und einen breiten Wirtsbereich aufweisen. Beispiele umfassen den frühen SV40-Promotor, Maus-Mammakarzinomvirus-LTR-Promotor, den späten Adenovirus-Hauptpromotor, Herpes-Simplex-Virus-Promotor und den CMV-Promotor.

[0072] Typischerweise sind Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssequenzen, die durch Säugetierzellen erkannt werden, Regulationsregionen, die 3' zum Translationsstoppcodon angeordnet sind und somit zusammen mit Promotorelementen die Kodiersequenz flankieren. Der 3'-Terminus der reifen mRNA wird durch ortsspezifische posttranskriptionale Spaltung und Polyadenylierung gebildet. Beispiele für Transkriptionsterminator- und Polyadenylierungssignale umfassen jene, die aus SV40 abstammen.

[0073] Die Verfahren zum Einführen exogener Nucleinsäure in Säugetierwirte sowie andere Wirte sind auf

dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt und variieren je nach verwendeter Wirtszelle. Verfahren umfassen Dextran-vermittelte Transfektion, Calciumphosphatausfällung, Polybren-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, Virusinfektion, Einkapselung des/der Polynukleotids/e in Liposomen und direkte Mikroinjektion der DNA in Zellkerne.

[0074] In einer bevorzugten Ausführungsform werden HDAC8-Proteine in Bakteriensystemen exprimiert. Bakterien-Expressionssysteme sind auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt.

[0075] Ein geeigneter Bakterienpromotor ist jede beliebige Nucleinsäuresequenz, die in der Lage ist, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und die Stromab-(3')Transkription der Kodiersequenz von HDAC8-Protein zu mRNA zu initiieren. Ein Bakterienpromotor weist eine Transkriptionsinitiationsregion auf, die üblicherweise proximal zum 5'-Ende der Kodiersequenz angeordnet ist. Diese Transkriptionsinitiationsregion umfasst typischerweise eine RNA-Polymerasebindungsstelle und eine Transkriptionsinitiationsstelle. Sequenzen, die für Stoffwechselwegsenzyme kodieren, stellen besonders nützliche Promotorsequenzen bereit. Beispiele umfassen Promotorsequenzen, die aus Zucker-metabolisierenden Enzymen wie Galactose, Lactose oder Maltose stammen, und Sequenzen, die aus biosynthetischen Enzymen wie beispielsweise Tryptophan stammen. Promotoren aus Bakteriophagen können auch verwendet werden und sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Weiters sind synthetische Promotoren und Hybridpromotoren ebenfalls nützlich; der tac-Promotor beispielsweise ist ein Hybrid aus trp- und lac-Promotorsequenzen. Darüber hinaus kann ein Bakterienpromotor natürlich vorkommende Promotoren nichtbakteriellen Ursprungs umfassen, die die Fähigkeit besitzen, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und Transkription zu initiieren.

[0076] Zusätzlich zu einer funktionierenden Promotorsequenz ist eine effiziente Ribosomen-Bindungsstelle wünschenswert. In *E. coli* wird die Ribosomen-Bindungsstelle die Shine-Delgarno-(SD-)Sequenz genannt und umfasst ein Initiationscodon und eine Sequenz mit einer Länge von etwa 3–9 Nucleotiden, die etwa 3–11 Nucleotide stromauf des Initiationscodons angeordnet ist.

[0077] Der Expressionsvektor kann auch eine Signalpeptidsequenz umfassen, die für die Sekretion des HDAC8-Proteins in Bakterien sorgt. Die Signalsequenz kodiert typischerweise für ein Signalpeptid, das aus hydrophoben Aminosäuren besteht, die die Sekretion des Proteins aus der Zelle steuern, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist. Das Protein wird entweder in das Wachstumsmedium (grampositive Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum, der zwischen der inneren und äußeren Membran der Zelle angeordnet ist (gram-negative Bakterien), sekretiert.

[0078] Der Bakterienexpressionsvektor kann auch ein selektierbares Markergen umfassen, um die Selektion von Bakterienstämmen zu ermöglichen, die transformiert wurden. Geeignete Selektionsgene umfassen Gene, die die Bakterien gegen Wirkstoffe wie Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin resistent machen. Selektierbare Marker umfassen auch biosynthetische Gene, wie beispielsweise jene in den biosynthetischen Histidin-, Tryptophan- und Leucin-Stoffwechselwegen.

[0079] Diese Komponenten werden zu Expressionsvektoren assembliert. Expressionsvektoren für Bakterien sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und umfassen u.a. Vektoren für *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Streptococcus cremoris* und *Streptococcus lividans*.

[0080] Die Bakterienexpressionsvektoren werden unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren, wie Calciumchloridbehandlung, Elektroporation und dergleichen in Bakterienwirtszellen transformiert.

[0081] In einer Ausführungsform werden HDAC8-Proteine in Insektenzellen gebildet. Expressionsvektoren für die Transformation von Insektenzellen, und insbesondere Baculovirus-basierte Expressionsvektoren, sind auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt.

[0082] In einer bevorzugten Ausführungsform wird HDAC8-Protein in Hefezellen produziert. Hefeexpressionssysteme sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und umfassen Vektoren für *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* und *C. maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* und *K. lactis*, *Pichia guillermondii* und *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Yarrowia lipolytica*. Bevorzugte Promotorsequenzen zur Expression in Hefe umfassen den induzierbaren GAL1,10-Promotor, die Promotoren aus Alkohol-dehydrogenase, Enolase, Glucokinase, Glucose-6-phosphat-Isomerase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Phosphofructokinase, 3-Phosphoglycerat-Mutase, Pyruvat-Kinase und aus Genen saurer Phosphatase. Selektierbare Hefe-Marker umfassen ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 und ALG7, das Resistenz

gegenüber Tunicamycin verleiht; das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das Resistenz gegenüber G418 verleiht; und das CUP1-Gen, das ermöglicht, dass Hefe in der Gegenwart von Kupferionen wächst.

[0083] Das HDAC8-Protein kann unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, auch als ein Fusionsprotein gebildet werden. So können beispielsweise zur Schaffung monoklonaler Antikörper, sofern das erwünschte Epitop klein ist, das HDAC8-Protein an ein Trägerprotein fusioniert werden, um ein Immunogen zu bilden. Alternativ dazu kann das HDAC8 als ein Fusionsprotein gebildet werden, um Expression zu steigern, oder auch aus anderen Gründen. Ist das HDAC8-Protein beispielsweise ein HDAC8-Peptid, so kann die für das Peptid kodierende Nucleinsäure zu Expressionszwecken an eine andere Nucleinsäure gebunden werden. In ähnlicher Weise können HDAC8-Proteine der Erfindung an Proteinmarkierungen wie grün fluoreszierendes Protein (GFP), rot fluoreszierendes Protein (RFP), blau fluoreszierendes Protein (BFP), gelb fluoreszierendes Protein (YFP) und dergleichen gebunden werden.

[0084] HDAC8-Nucleinsäuren, -Proteine und -Antikörper können markiert sein. Unter "markiert" wird hierin verstanden, dass eine Verbindung zumindest ein Element, Isotop oder chemische Verbindung, an sich gebunden aufweist, um die Detektion der Verbindung zu ermöglichen. Im Allgemeinen sind Markierungen drei Klassen zuzuordnen: a) Isotopenmarkierungen, die radioaktiv oder schwere Isotopen sein können; b) Immunmarkierungen, die Antikörper oder Antigene sein können; und c) farbige oder fluoreszierende Farbstoffe. Die Markierungen können in die Verbindung an jeder beliebigen Position inkorporiert sein.

[0085] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das HDAC8-Protein nach Expression gereinigt oder isoliert. HDAC8-Proteine können auf zahlreiche verschiedene Arten, die Fachleuten bekannt sind, isoliert oder gereinigt werden, je nachdem, welche anderen Komponenten noch in der Probe vorhanden sind. Herkömmliche Reinigungsverfahren umfassen Elektrophorese-, Molekular-, Immunologie- und Chromatographieverfahren, einschließlich Ionenaustausch-, Hydrophobieaffinitäts- und Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie sowie Chromatofokussierung. Das HDAC8-Protein kann beispielsweise unter Verwendung einer herkömmlichen Anti-HDAC8-Antikörpersäule gereinigt werden. Ultrafiltrations- und Diafiltrationsverfahren, in Verbindung mit Proteinkonzentration, sind ebenfalls nützlich. Einen allgemeinen Leitfaden zu geeigneten Reinigungsverfahren bietet R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, NY (1982). Der erforderliche Reinigungsgrad variiert je nach der Verwendung des HDAC8-Proteins. In manchen Fällen ist auch keine Reinigung erforderlich.

[0086] Nachdem HDAC8-Proteine und -Nucleinsäuren exprimiert und gereinigt wurden, sind sie in zahlreichen Anwendungen nützlich.

[0087] Die Nucleotidsequenzen (oder ihr Komplement), die für HDAC8-Proteine kodieren, finden auf dem Gebiet der Molekularbiologie verschiedene Anwendungsformen, einschließlich Verwendungen als Hybridisierungssonden, bei Chromosom- und Genkartierung und bei der Bildung von Antisense-RNA und -DNA. HDAC8-Proteinnucleinsäure ist auch zur Herstellung von HDAC8-Proteinen mittels der hierin beschriebenen Rekombinationsverfahren nützlich.

[0088] Das Nativsequenz-HDAC8-Proteingen voller Länge, oder Teile davon, können als Hybridisierungssonden für eine cDNA-Bibliothek verwendet werden, um andere Gene (beispielsweise jene, die für natürlich vorkommende Varianten von HDAC8-Protein oder HDAC8 aus anderen Spezies kodieren) zu isolieren, die eine erwünschte Sequenzidentität zur HDAC8-Proteinkodiersequenz aufweisen. Gegebenenfalls umfasst die Länge der Sonden etwa 20 bis etwa 50 Basen. Die Hybridisierungssonden können aus den Nucleotidsequenzen hierin oder aus genomischen Sequenzen, einschließlich Promotoren, Enhancerelementen und Introns von Nativsequenzen, wie hierin bereitgestellt, abgeleitet werden. Ein Screening-Verfahren umfasst beispielsweise das Isolieren der Kodierregion des HDAC8-Proteingens unter Verwendung der bekannten DNA-Sequenz, um eine selektierte Sonde aus etwa 40 Basen zu synthetisieren. Hybridisierungssonden können mittels zahlreicher verschiedener Markierungen markiert werden, umfassend Radionukleotide wie ^{32}P oder ^{35}S oder enzymatische Markierungen wie alkalische Phosphatase, gebunden an die Sonde über Avidin/Biotin-Bindungssysteme. Markierte Sonden mit einer Sequenz, die komplementär zu jener des HDAC8-Proteingens der vorliegenden Erfindung ist, können verwendet werden, um Bibliotheken von menschlicher cDNA, genomicscher DNA oder mRNA zu scannen, um zu bestimmen, an welche Elemente solcher Bibliotheken die Sonde hybridisiert.

[0089] Nucleotidsequenzen, die für ein HDAC8-Protein kodieren, können auch verwendet werden, um Hybridisierungssonden zum Kartieren des Gens, das für dieses HDAC8-Protein kodiert, und zur genetischen Analyse von Individuen mit genetischen Störungen zu konstruieren. Die hierin bereitgestellten Nucleotidsequenzen können unter Anwendung bekannter Verfahren, wie mittels In-situ-Hybridisierung, Bindungsanalyse gegen bekannte Chromosomenmarker und Hybridisierungsscreening mit Bibliotheken, zu einem Chromosom und spe-

zifischen Regionen kartiert werden.

[0090] Nucleinsäuren, die für HDAC8-Protein oder seine modifizierten Formen kodieren, können auch verwendet werden, um entweder nichtmenschliche transgene Tiere oder "Knockout"-Tiere zu bilden, die wiederum zur Entwicklung und zum Screenen von therapeutisch nützlichen Reagenzien nützlich sind. Ein nichtmenschliches transgenes Tier (z.B. eine Maus oder Ratte) ist ein Tier mit Zellen, die ein Transgen enthalten, worin dieses Transgen in das Tier oder einen Vorläufer des Tiers in einem pränatalen, z.B. einem embryonalen, Stadium eingeführt wurde. Ein Transgen ist eine DNA, die in das Genom einer Zelle integriert ist, aus der sich ein transgenes Tier entwickelt. In einer Ausführungsform kann für ein HDAC8-Protein kodierende cDNA verwendet werden, um genomische DNA, die für ein HDAC8-Protein kodiert, gemäß anerkannten Verfahren zu klonieren, und die genomischen Sequenzen können verwendet werden, um nichtmenschliche transgene Tiere zu bilden, die Zellen enthalten, welche die erwünschte DNA exprimieren. Verfahren zur Bildung von transgenen Tieren, insbesondere Tieren wie Mäusen oder Ratten, sind mittlerweile auf dem Gebiet der Erfindung Standard und werden beispielsweise in den US-Patenten Nr. 4.736.866 und 4.870.009 beschrieben. Typischerweise werden zur HDAC8-Proteintransgen-Inkorporation gewebespezifische Enhancer auf bestimmte Zellen gerichtet. Nichtmenschliche transgene Tiere, die eine Kopie eines Transgens umfassen, das für ein HDAC8-Protein kodiert und das in einem embryonalen Stadium in die Keimplanation des Tiers eingeführt wurde, können verwendet werden, um die Wirkung von erhöhter Expression der erwünschten Nucleinsäure zu untersuchen. Solche Tiere können als Testtiere für Reagenzien verwendet werden, von denen angenommen wird, dass sie Schutz vor beispielsweise pathologischen Leiden, die mit deren Überexpression assoziiert sind, verleihen. Gemäß diesem Aspekt der Erfindung wird ein nichtmenschliches Tier mit dem Reagens behandelt, und eine reduzierte Inzidenz des pathologischen Leidens im Vergleich mit nicht behandelten Tieren, die auch das Transgen in sich tragen, würde auf eine mögliche therapeutische Wirkung auf das pathologische Leiden hinweisen.

[0091] Alternativ dazu können nichtmenschliche Homologe des HDAC8-Proteins verwendet werden, um ein nichtmenschliches HDAC8-Protein-"Knockout"-Tier zu konstruieren, das infolge von homologer Rekombination zwischen dem endogenen, für ein HDAC8-Protein kodierenden Gen und veränderter genomischer DNA, die für ein HDAC8-Protein kodiert, eingeführt in eine Embryonenzelle des Tiers, ein defektes oder verändertes, für ein HDAC8-Protein kodierendes Gen aufweist. Für ein HDAC8-Protein kodierende cDNA kann beispielsweise verwendet werden, um genomische DNA, die für ein HDAC8-Protein kodiert, gemäß anerkannten Verfahren zu klonieren. Ein Teil der genomischen DNA, der für ein HDAC8-Protein kodiert, kann mit einem anderen Gen zerstört oder durch dieses ersetzt werden, wie beispielsweise mit bzw. durch ein Gen, das für einen selektierbaren Marker kodiert, der zur Beobachtung von Integration verwendet werden kann. Typischerweise sind mehrere kb von unveränderter flankierender DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) in den Vektor eingebunden (siehe z.B. Thomas & Capecchi, Cell 51, 503 (1987), für eine Beschreibung von homologen rekombinanten Vektoren). Der Vektor wird in eine nichtmenschliche embryonale Stammzelllinie (z.B. durch Elektroporation) eingeführt, und Zellen, in denen sich die eingeführte DNA homolog mit der endogenen DNA kombinierte, werden selektiert (siehe z.B. Li et al., Cell 69, 915 (1992)). Die selektierten Zellen werden dann in eine Blastozyste eines nichtmenschlichen Tiers (z.B. einer Maus oder Ratte) injiziert, um Aggregationschimären zu bilden (siehe z.B. Bradley, in: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson (Hrsg.), IRL, Oxford, 113–152 (1987)). Ein chimärischer Embryo kann dann in ein geeignetes, schein-schwangeres, weibliches Ammentier implantiert und ausgetragen werden, um ein nichtmenschliches "Knockout"-Tier zu bilden. Nachkommenschaft, die die homolog rekombinierte DNA in ihren Keimzellen enthält, kann mittels Standardverfahren identifiziert werden und verwendet werden, um Tiere zu züchten, in denen alle Zellen des Tiers die homolog rekombinierte DNA enthalten. Nichtmenschliche Knockout-Tiere können beispielsweise basierend auf ihrer Fähigkeit, bestimmte pathologische Leiden abzuwehren, und auf ihrer Entwicklung pathologischer Leiden aufgrund von nicht vorhandenem HDAC8-Protein charakterisiert werden.

[0092] Es versteht sich, dass die hierin beschriebenen Modelle variieren können. Es können beispielsweise "Knock-in"-Modelle gebildet werden, oder die Modelle können zellbasiert und keine Tiermodelle sein.

[0093] Nucleinsäure, die für die HDAC8-Palypeptide, Antagonisten oder Agonisten davon kodiert, kann auch in Gentherapie verwendet werden. In Gentherapieanwendungen können Gene in Zellen eingeführt werden, um In-vivo-Synthese eines therapeutisch wirksamen, genetischen Produkts, beispielsweise als Ersatz eines defekten Gens, zu erzielen. "Gentherapie" umfasst sowohl herkömmliche Gentherapie, bei der durch eine einzelne Behandlung eine anhaltende Wirkung erzielt wird, und die Verabreichung von therapeutischen Genmitteln, die eine einmalige oder mehrmalige Verabreichung einer therapeutisch wirksamen DNA oder mRNA umfasst. Antisense-RNAs und -DNAs können als therapeutische Mittel zum Blockieren der Expression bestimmter Gene in vivo verwendet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass kurze Antisense-Oligonukleotide in Zellen importiert werden können, wo sie trotz ihrer geringen intrazellulären Konzentrationen, die durch ihre einge-

schränkte Aufnahme durch die Zellmembran verursacht wird, als Inhibitoren wirken (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143–4146 (1986)). Die Oligonucleotide können modifiziert werden, um ihre Aufnahme zu fördern, z.B. durch Substituieren ihrer negativ geladenen Phosphodiestergruppen durch ladungsfreie Gruppen.

[0094] Zahlreiche verschiedene Verfahren sind zum Einführen von Nucleinsäuren in lebensfähige Zellen verfügbar. Die Verfahren variieren je nachdem, ob die Nucleinsäure in kultivierte Zellen *in vitro* oder *in vivo* in die Zellen des beabsichtigten Wirts eingeführt wird. Verfahren, die zum Transfer von Nucleinsäure in Säugetierzellen *in vitro* geeignet sind, umfassen die Verwendung von Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion, Zellfusion, DEAE-Dextran, das Calciumphosphat-Ausfällungsverfahren und dergleichen. Die zur Zeit bevorzugten *In-vitro*-Gentransferverfahren umfassen Transfektion mit viralen (typischerweise retroviralen) Vektoren und virale Hüllproteinliposomenvermittelte Transfektion (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205–210 (1993)). In manchen Situationen ist es wünschenswert, die Nucleinsäurequelle mit einem Mittel zu versehen, das sich auf die Targetzellen richtet, wie beispielsweise mit einem Antikörper, der für ein Zelloberflächenmembranprotein oder die Targetzelle spezifisch ist, mit einem Liganden für einen Rezeptor an der Targetzelle und dergleichen. Werden Liposomen verwendet, so können Proteine, die sich an ein Zelloberflächenmembranprotein in Verbindung mit Endozytose binden, zum Targeting und/oder zur Erleichterung von Aufnahme verwendet werden, z.B. Capsidproteine oder Fragmente davon, die für einen bestimmten Zelltyp tropisch sind, Antikörper gegen Proteine, die beim Zyklieren Internalisierung erfahren, Proteine, die auf intrazelluläre Lokalisierung gerichtet sind und intrazelluläre Halbwertszeit verlängern. Das Verfahren für Rezeptorvermittelte Endozytose wird beispielsweise von Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429–4432 (1987); und Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 341–3414 (1990), beschrieben. Einen Überblick zu Genmarkierung und Gentherapie-Arbeitsvorschriften liefert Anderson et al., Science 256, 808–813 (1992).

[0095] HDAC8-Proteine, Nucleinsäuren, Varianten, modifizierte Proteine, Zellen und/oder nichtmenschliche transgene Organismen, die die Nucleinsäuren der Erfindung oder Proteine enthalten, werden in Screeningtests verwendet. Identifikation des hierin bereitgestellten HDAC8-Proteins ermöglicht den Entwurf von Wirkstoff-Screeningtests auf Verbindungen, die das HDAC8-Protein binden oder Bindung daran stören, und auf Verbindungen, die HDAC8-Aktivität modulieren.

[0096] Die hierin beschriebenen Tests verwenden vorzugsweise das menschliche HDAC8-Protein, obwohl auch andere Säugetierproteine verwendet werden können, einschließlich aus Nagetieren (Mäusen, Ratten, Hamstern, Meerschweinchen usw.), Nutztieren (Rindern, Schafen, Schweinen, Pferden usw.) und Primaten. Diese letztgenannten Ausführungsformen können zur Entwicklung von Tiermodellen von menschlichen Erkrankungen bevorzugt werden. In manchen Ausführungsformen können, wie hierin erläutert, HDAC8-Proteinvarianten oder -derivate verwendet werden, einschließlich Deletions-HDAC8-proteine wie zuvor erwähnt.

[0097] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Verfahren das Kombinieren eines HDAC8-Proteins und eines bioaktiven Kandidatenmittels und das Bestimmen der Bindung des Kandidatenmittels an das HDAC8-Protein. In anderen Ausführungsformen, die nachstehend noch näher erläutert werden, wird Bindungsinterferenz oder Bioaktivität bestimmt.

[0098] Die Bezeichnung "bioaktives Kandidatenmittel" oder "exogene Verbindung" wie hierin verwendet beschreibt jegliches Molekül, z.B. Protein, kleines organisches Molekül, Kohlenhydrate (einschließlich Polysaccharide), Polynukleotid, Lipide und dergleichen. Im Allgemeinen werden zahlreiche Testgemische parallel mit verschiedenen Mittelkonzentrationen laufen gelassen, um eine differenzielle Reaktion auf die verschiedenen Konzentrationen zu erhalten. Typischerweise dient eine dieser Konzentrationen als negative Kontrolle, d.h. in einer Konzentration von Null oder unter der Nachweisgrenze. Darüber hinaus können positive Kontrollen, d.h. die Verwendung von Mitteln, die dafür bekannt sind, HDAC-Aktivität zu verändern oder zu modulieren, eingesetzt werden.

[0099] Kandidatenmittel umfassen zahlreiche chemische Klassen, obwohl sie typischerweise organische Moleküle sind, vorzugsweise kleine organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von mehr als etwa 100 Da und weniger als etwa 2.500 Da. Kandidatenmittel umfassen funktionelle Gruppen, die für strukturelle Wechselwirkung mit Proteinen, insbesondere Wasserstoffbindung, erforderlich sind, und umfassen typischerweise eine Amin-, Carbonyl-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppe, vorzugsweise zumindest zwei der funktionellen chemischen Gruppen. Die Kandidatenmittel umfassen häufig zyklische Kohlenstoff- oder heterozyklische Strukturen und/oder aromatische oder poliaromatische Strukturen, die mit einer oder mehreren der obigen funktionellen Gruppen substituiert sind. Kandidatenmittel sind auch unter Biomolekülen einschließlich Peptide, Saccharide, Fettsäuren, Steroiden, Purinen, Pyrimidinen, Derivaten, strukturellen Analoga oder Kombinationen davon zu

finden. Besonders bevorzugt sind Peptide.

[0100] Kandidatenmittel werden aus zahlreichen verschiedenen Quellen, einschließlich Bibliotheken von synthetischen oder natürlichen Verbindungen, gewonnen. Zahlreiche Mittel sind beispielsweise für zufällige oder gerichtete Synthese zahlreicher verschiedener organischer Verbindungen und Biomoleküle verfügbar, einschließlich Expression randomisierter Oligonukleotide. Alternativ dazu sind Bibliotheken natürlicher Verbindungen in Form von Bakterien-, Pilz-, Pflanzen- und Tierextrakten erhältlich oder können leicht hergestellt werden. Darüber hinaus können natürliche oder synthetisch gebildete Bibliotheken und Verbindung mittels herkömmlicher chemischer, physikalischer und biochemischer Mittel leicht modifiziert werden. Bekannte pharmakologische Mittel können gerichteten oder zufälligen chemischen Modifikationen, wie Acylierung, Alkylierung, Veresterung, Amidierung unterzogen werden, um strukturelle Analoga zu bilden.

[0101] In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bibliothek von verschiedenen bioaktiven Kandidatenmitteln verwendet. Vorzugsweise sollte die Bibliothek eine ausreichend strukturell diverse Population randomisierter Mittel bereitstellen, um eine hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit ausreichende Vielfalt zu liefern, um Bindung an ein bestimmtes Target zu ermöglichen. Folglich sollte eine Wechselwirkungsbibliothek ausreichend groß sein, dass zumindest eines ihrer Elemente eine Struktur aufweist, die im Affinität zum Target verleiht. Wenn es auch schwierig ist, die erforderliche absolute Größe einer Wechselwirkungsbibliothek abzuschätzen, liefert die Natur durch die Immunantwort doch einen Hinweis: eine Vielfalt von 10^7 – 10^8 verschiedenen Antikörpern liefert zumindest eine Kombination mit ausreichender Affinität, um mit den meisten potenziellen Antigenen, denen ein Organismus ausgesetzt ist, wechselzuwirken. Veröffentlichte In-vitro-Selektionsverfahren zeigten auch, dass eine Bibliotheksgröße von 10^7 bis 10^8 ausreichend ist, um Strukturen mit Affinität zum Target zu finden. Eine Bibliothek aller Kombinationen eines Peptids mit einer Länge von 7 bis 20 Aminosäuren, wie im Allgemeinen hierin vorgeschlagen, hat das Potenzial, für 20^7 (10^9) bis 20^{20} zu kodieren. Somit ermöglichen die vorliegenden Verfahren mit Bibliotheken mit 10^7 bis 10^8 verschiedenen Molekülen eine "Arbeits"-Untergruppe einer theoretisch vollständigen Wechselwirkungsbibliothek von 7 Aminosäuren und eine Untergruppe von Formen für die 20^{20} -Bibliothek. Somit werden in einer bevorzugten Ausführungsform zumindest 10^6 , vorzugsweise zumindest 10^7 , noch bevorzugt zumindest 10^8 , und am meisten bevorzugt zumindest 10^9 , verschiedene Sequenzen in den vorliegenden Verfahren gleichzeitig analysiert. Bevorzugte Verfahren maximieren Bibliotheksgröße und -vielfalt.

[0102] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die bioaktiven Kandidatenmittel Proteine. Unter "Protein" werden hierin zumindest zwei kovalent gebundene Aminosäuren verstanden, was Proteine, Polypeptide, Oligopeptide und Peptide umfasst. Das Protein kann aus natürlich vorkommenden Aminosäuren und Peptidbindungen oder aus synthetisch peptidmimetischen Strukturen gebildet werden. Somit bezeichnet "Aminosäure" oder "Peptidrest" wie hierin verwendet sowohl natürlich vorkommende als auch synthetische Aminosäuren. Homophenylalanin, Citrullin und Norleucin beispielsweise werden für die Zwecke der Erfindung als Aminosäuren betrachtet. "Aminosäure" umfasst auch Iminosäurereste wie Prolin und Hydroxyprolin. Die Seitenketten können entweder in der (R)- oder der (S)-Konfiguration vorliegen. In der bevorzugten Ausführungsform liegen die Aminosäuren in der (S)- oder L-Konfiguration vor. Werden nicht natürlich vorkommende Seitenketten verwendet, so können Nicht-Aminosäure-Substituenten verwendet werden, beispielsweise um In-vivo-Abbau zu unterbinden oder zu verzögern. Chemische Blockierungsgruppen oder andere chemische Substituenten können auch zugesetzt werden.

[0103] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die bioaktiven Kandidatenmittel natürlich vorkommende Proteine oder Fragmente von natürlich vorkommenden Proteinen. Somit können beispielsweise Zellextrakte, die Proteine enthalten, oder zufällige oder gerichtete Verdaue von proteinartigen Zellextrakten verwendet werden. Auf diese Weise können Bibliotheken von prokaryotischen und eukaryotischen Proteinen zum Screenen in den hierin beschriebenen Systemen erstellt werden. Besonders bevorzugt in dieser Ausführungsform sind Bibliotheken von Bakterien-, Pilz-, Virus- und Säugetierproteinen, worin Letztere bevorzugt sind und menschliche Proteine besonders bevorzugt sind.

[0104] In einer Ausführungsform sind die bioaktiven Kandidatenmittel Peptide aus etwa 5 bis etwa 30 Aminosäuren, wobei etwa 5 bis etwa 20 Aminosäuren bevorzugt sind, und etwa 7 bis etwa 15 besonders bevorzugt sind. Die Peptide können Verdaue von natürlich vorkommenden Proteinen, wie zuvor erläutert, zufällige Peptide oder "vorgegebene" zufällige Peptide sein. Unter "randomisiert" oder grammatischen Entsprechungen davon wird hierin verstanden, dass jede Nucleinsäure und jedes Peptid aus im Wesentlichen zufälligen Nucleotiden bzw. Aminosäuren besteht. Da diese zufälligen Peptide (oder Nucleinsäuren, nachstehend erläutert) im Allgemeinen chemisch synthetisiert werden, können sie jegliches Nucleotid oder jegliche Aminosäure an jeder beliebigen Position einbinden. Das Syntheseverfahren kann so konzipiert sein, dass randomisierte Pro-

teine oder Nucleinsäuren hergestellt werden, um die Bildung aller oder der meisten der möglichen Kombinationen über die Länge der Sequenz zu ermöglichen und dadurch eine Bibliothek aus randomisierten bioaktiven, proteinartigen Kandidatenmitteln zu bilden.

[0105] In einer Ausführungsform ist die Bibliothek vollständig randomisiert und weist an keiner Position Sequenzpräferenzen oder -konstanten auf. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Bibliothek vorgegeben. Das heißt, dass manche Positionen innerhalb der Sequenz entweder konstant gehalten werden oder aus einer eingeschränkten Anzahl an Möglichkeiten ausgewählt sind. In einer bevorzugten Ausführungsform beispielsweise sind die Nucleotide oder Aminosäurereste innerhalb einer definierten Klasse, beispielsweise von hydrophoben Aminosäuren, hydrophilen Resten, sterisch vorgegebenen (entweder kleinen oder großen) Resten, randomisiert, um somit Cysteine zur Vernetzung, Proline für SH-3-Domänen, Serine, Threonine, Tyrosine oder Histidine für Phosphorylierungsstellen und dergleichen oder zu Purinen und dergleichen zu schaffen.

[0106] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die bioaktiven Kandidatenmittel Nucleinsäuren. Unter "Nucleinsäure" oder "Oligonucleotid" oder grammatischen Entsprechungen hierin werden zumindest zwei Nucleotide verstanden, die kovalent aneinander gebunden sind. Eine Nucleinsäure der vorliegenden Erfindung enthält im allgemeinen Phosphodiesterbindungen, wenn auch in manchen Klassen, wie nachstehend erläutert wird, Nucleinsäureanaloga eingebunden sind, die Hauptketten verändern können, umfassend beispielsweise Phosphoramid (Beaucage et al., Tetrahedron 49(10), 1925 (1993), und darin zitierte Verweise; Letsinger, J. Org. Chem. 35, 3800 (1970); Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81, 579 (1977); Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14, 3487 (1986); Sawai et al., Chem. Lett. 805 (1984); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110, 4470 (1988); und Pauwels et al., Chemica Scripta 26, 141 (1986)), Phosphorthioat (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19, 1437 (1991); und US-Patent Nr. 5.644.048), Phosphordithioat (Bruylants et al., J. Am. Chem. Soc. 111, 2321 (1989)), O-Methylphosphoramidit-Bindungen (siehe Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press) und Peptidnucleinsäure-Hauptketten und -Bindungen (siehe Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114, 1895 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31, 1008 (1992); Nielsen, Nature 365, 566 (1993); Carlsson et al., Nature 380, 207 (1996)). Andere analoge Nucleinsäuren umfassen jene mit positiven Hauptketten (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6097 (1995)); nicht-ionische Hauptketten (US-Patent Nr. 5.386.023; 5.637.684; 5.602.240; 5.216.141; und 4.469.863; Kiedrowski et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30, 423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110, 4470 (1988); Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13, 1597 (1994); Kapitel 2 und 3 aus: ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Y. S. Sanghui & P. Dan Cook (Hrsg.); Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4, 395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34, 17 (1994); Tetrahedron Lett. 37, 743 (1996)) und Nicht-Ribose-Hauptketten, einschließlich jener, die in den US-Patenten Nr. 5.235.033 und 5.034.506 und in den Kapiteln 6 und 7 aus: ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Y. S. Sanghui & P. Dan Cook (Hrsg.), beschrieben werden. Nucleinsäuren, die einen oder mehrere carbozyklische Zucker enthalten, sind auch in der Definition von Nucleinsäuren eingebunden (siehe Jenkins et al., Chem. Soc. Rev., 169–176 (1995)). Mehrere Nucleinsäureanaloga werden von Rawls in: C & E News, 35 (2. Juni 1997) beschrieben. Diese Modifikationen der Ribosephosphathauptkette können durchgeführt werden, um den Zusatz weiterer Gruppierungen wie Markierungen zu erleichtern oder um die Stabilität und Halbwertszeit solcher Moleküle in physiologischen Umgebungen zu steigern. Weiters können Gemische aus natürlich vorkommenden Nucleinsäuren und Analoga hergestellt werden. Alternativ dazu können Gemisches aus verschiedenen Nucleinsäureanaloga und Gemische aus natürlich vorkommenden Nucleinsäuren und Analoga hergestellt werden. Die Nucleinsäuren können je nach Erfordernis einzelsträngig oder doppelsträngig sein oder können Teile von sowohl doppelsträngiger als auch einzelsträngiger Sequenz darstellen. Die Nucleinsäure kann DNA, sowohl genomische als auch cDNA, RNA oder ein Hybrid sein, worin die Nucleinsäure jede beliebige Kombination von Desoxyribo- und Ribonucleotiden und jede beliebige Kombination von Basen, einschließlich Uracil, Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin, Inosin, Xanthanin, Hypoxanthanin, Isocytosin, Isoguanin und dergleichen enthält.

[0107] Wie zuvor allgemein für Proteine beschrieben, können bioaktive Nucleinsäure-Kandidatenmittel natürlich vorkommende Nucleinsäuren, zufällige Nucleinsäuren oder "vorgegebene" zufällige Nucleinsäuren sein. Verdaue von prokaryotischen oder eukaryotischen Genomen beispielsweise können wie zuvor für Proteine erläutert verwendet werden.

[0108] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die bioaktiven Kandidatenmittel organische chemische Gruppierungen, von denen zahlreiche verschiedene in der Literatur vorhanden und verfügbar sind.

[0109] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die bioaktiven Kandidatenmittel an einen Fusionspartner gebunden. Unter "Fusionspartner" oder "funktionelle Gruppe" wird hierin eine Sequenz verstanden, die mit dem bioaktiven Kandidatenmittel assoziiert ist und die bei allen Elementen der Bibliothek in dieser Klasse eine

gewöhnliche Funktion oder Fähigkeit verleiht. Fusionspartner können heterolog (d.h. nicht nativ zur Wirtszelle) oder synthetisch (zu keiner Zelle nativ) sein. Geeignete Fusionspartner umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf: a) Präsentationsstrukturen, die die bioaktiven Kandidatenmittel in einer Konformations-eingeschränkten oder stabilen Form bereitstellen; b) Target-Sequenzen, die die Lokalisierung des bioaktiven Kandidatenmittels in einem subzellulären oder extrazellulären Kompartiment ermöglichen; c) Isolierungssequenzen, die die Reinigung oder Isolierung von entweder den bioaktiven Kandidatenmitteln oder den dafür kodierenden Nucleinsäuren ermöglichen; d) Stabilitätssequenzen, die dem bioaktiven Kandidatenmittel oder der dafür kodierenden Nucleinsäure Stabilität oder Schutz vor Abbau verleihen, beispielsweise Resistenz gegen proteolytischen Abbau; e) Dimerisationssequenzen, die Peptiddimerisierung ermöglichen; oder f) jegliche Kombination aus a), b), c), d) und e) sowie, je nach Bedarf, Linkersequenzen.

[0110] In einer Ausführungsform der hierin beschriebenen Verfahren werden Teile von HDAC8-Proteinen verwendet; in einer bevorzugten Ausführungsform werden Teile mit HDAC8-Aktivität verwendet, um Mittel zu identifizieren, die sich an HDAC8 binden. Weiters können die beschriebenen Tests entweder isolierte HDAC8-Proteine oder Zellen, die HDAC8-Proteine enthalten, verwenden.

[0111] Im Allgemeinen ist in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Verfahren, beispielsweise für Bindungstests, das HDAC8-Protein oder das Kandidatenmittel nicht diffusionsfähig an einen unlöslichen Träger gebunden, der isolierte, Proben aufnehmende Bereiche (z.B. eine Mikrotiterplatte, ein Chip usw.) aufweist. Die unlöslichen Träger können aus jeder beliebigen Zusammensetzung hergestellt werden, an die sich die Zusammensetzungen binden können, die leicht von löslichem Material zu trennen ist und sonst mit dem gesamten Screeningverfahren verträglich ist. Die Oberfläche solcher Träger kann fest oder porös sein und jegliche geeignete Form aufweisen. Beispiele für geeignete unlösliche Träger umfassen Mikrotiterplatten, Chips, Membranen und Perlen. Diese bestehen typischerweise aus Glas, Kunststoff (z.B. Polystyrol, Polysacchariden, Nylon oder Nitrocellulose, Teflon™ und dergleichen). Mikrotiterplatten und Chips sind besonders geeignet, da eine große Anzahl an Tests gleichzeitig unter Verwendung geringer Mengen an Reagens und Proben durchgeführt werden kann. In manchen Fällen werden magnetische Perlen und dergleichen eingebunden. Die bestimmte Art der Bindung der Zusammensetzung ist nicht maßgeblich, solange sie mit den Reagenzien und den Verfahren insgesamt der Erfindung kompatibel ist, die Aktivität der Zusammensetzung erhält und nicht diffundierbar ist. Bevorzugte Bindungsverfahren umfassen die Verwendung von Antikörpern (die weder die Liganzenbindungsstelle noch die Aktivierungssequenz sterisch blockieren, wenn das Protein an den Träger gebunden ist), direkte Bindung an "klebrige" oder ionische Träger, chemische Vernetzung, die Synthese des Proteins oder Mittels an der Oberfläche usw. Nach erfolgter Bindung des Proteins oder Mittels wird überschüssiges Material durch Waschen entfernt. Die die Probe aufnehmenden Bereiche können dann durch Inkubation mit Rinderserumalbumin (BSA), Casein oder einem anderen unschädlichen Protein oder einer anderen Gruppierung blockiert werden. Auch umfasst diese Erfindung Screeningtests, worin keine festen Träger verwendet werden; Beispiele hierfür werden nachstehend beschrieben.

[0112] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das HDAC8-Protein an den Träger gebunden, und ein bioaktives Kandidatenmittel wird zum Chip zugesetzt. Alternativ dazu wird das Kandidatenmittel an den Träger gebunden und das HDAC8-Protein zugesetzt. Neue Bindungsmittel umfassen spezifische Antikörper, nicht natürliche Bindungsmittel, die in Screens chemischer Bibliotheken identifiziert werden, Peptidanaloga usw. Von besonderem Interesse sind Screeningtests für Mittel, die eine geringe Toxizität für menschliche Zellen aufweisen. Zahlreiche verschiedene Tests können für diesen Zweck verwendet werden, einschließlich markierte In-vitro-Protein-Protein-Bindungstests, Gelretentionsanalyse, Immuntests für Proteinbindung, funktionelle Tests, vorzugsweise Deacetylierung von kurzen acetylierten Peptiden oder markierten acetylierten Peptiden.

[0113] Die Bestimmung der Bindung des bioaktiven Kandidatenmittels an das HDAC8-Protein kann auf zahlreiche Arten erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das bioaktive Kandidatengemisch markiert, und Bindung wird direkt bestimmt. Dies kann beispielsweise durch Anbinden des gesamten HDAC8-Proteins oder eines Teils davon an einen festen Träger, Zusetzen eines markierten Kandidatengemisches (beispielsweise einer radioaktiven oder fluoreszierenden Markierung), Abwaschen von überschüssigem Reagens und Bestimmen, ob die Markierung am festen Träger vorhanden ist oder nicht, erfolgen. Verschiedene Blockierungs- und Waschschrifte können verwendet werden, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist.

[0114] Unter "markiert" wird hierin verstanden, dass die Verbindung entweder direkt oder indirekt mit einer Markierung markiert ist, die ein nachweisbares Signal liefert, z.B. ein Radioisotop, Fluoreszenzmittel, Enzym, Antikörper, Partikel wie Magnetpartikel, Chemolumineszenzmittel oder spezifische Bindungsmoleküle und dergleichen. Spezifische Bindungsmoleküle umfassen Paare wie Biotin und Streptavidin, Digoxin und Antidigoxin und dergleichen. Für die spezifischen Bindungselemente würde das komplementäre Element normalerweise

gemäß bekannten Verfahren, wie zuvor erläutert, mit einem Molekül markiert werden, das für Detektion sorgt. Die Markierung kann direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal liefern.

[0115] In manchen Ausführungsformen ist nur eine der Komponenten markiert. Die Proteine (oder proteinarigen Kandidatenmittel) können beispielsweise an Tyrosinpositionen unter Verwendung von ^{125}I oder mit Fluorophoren markiert werden. Alternativ dazu kann mehr als eine Komponente mit verschiedenen Markierungen markiert werden; unter Verwendung von ^{125}I für die Proteine beispielsweise und eines Fluorophors für die Kandidatenmittel.

[0116] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung des bioaktiven Kandidatengemisches unter Verwendung von kompetitiven Bindungstests bestimmt. In dieser Ausführungsform ist der Konkurrent eine Bindungsgruppierung, die dafür bekannt ist, sich an das Targetmolekül (d.h. HDAC8-Protein) zu binden, wie beispielsweise ein Antikörper, Peptid, Bindungspartner, Ligand und dergleichen. Unter bestimmten Bedingungen kann es kompetitive Bindung beispielsweise zwischen dem bioaktiven Mittel und der Bindungsgruppierung geben, wobei die Bindungsgruppierung das bioaktive Mittel verdrängt. Dieser Test kann verwendet werden, um Kandidatenmittel zu bestimmen, die Bindung zwischen HDAC8-Proteinen und Bindungspartner stören. "Störung von Bindung" wie hierin verwendet bedeutet, dass native Bindung des HDAC8-Proteins in Gegenwart des Kandidatenmittels anders ist. Die Bindung kann unterbunden werden oder kann mit reduzierter Affinität stattfinden. Daher wird in einer Ausführungsform eine Störung beispielsweise durch eine Konformationsänderung, und nicht durch direkte Konkurrenz um die native Bindungsstelle, verursacht.

[0117] In einer Ausführungsform ist das bioaktive Kandidatenmittel markiert. Entweder wird das bioaktive Kandidatenmittel oder der Konkurrent zuerst (oder beide gleichzeitig) zum Protein ausreichend lange zugesetzt, um Bindung, sofern vorhanden, zu ermöglichen. Inkubationen können bei jeder beliebigen Temperatur durchgeführt werden, die optimale Aktivität unterstützt, typischerweise bei einer Temperatur zwischen 4 und 40°C. Inkubationsphasen werden so ausgewählt, dass optimale Aktivität gewährleistet ist, können jedoch auch optimiert werden, um rasches Screening bei hohem Durchsatz zu unterstützen. Typischerweise zwischen etwa 0,1 und etwa 1,0 h sind ausreichend. Überschüssiges Reagens wird im Allgemeinen entfernt oder abgewaschen. Die zweite Komponente wird dann zugesetzt, und die Gegenwart oder Abwesenheit der markierten Komponente wird untersucht, um Bindung aufzuzeigen.

[0118] In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Konkurrent zuerst zugesetzt, woraufhin das bioaktive Kandidatengemisch folgt. Die Verdrängung des Konkurrenten ist ein Hinweis darauf, dass sich das bioaktive Kandidatenmittel an das HDAC8-Protein bindet und somit in der Lage ist, sich an das HDAC8-Protein zu binden und möglicherweise seine Aktivität zu modulieren. In dieser Ausführungsform können beide Komponenten markiert werden. Somit weist beispielsweise, wenn der Konkurrent markiert ist, die Gegenwart von Markierung in der Waschlösung auf Verdrängung durch das Mittel hin. Alternativ dazu weist, wenn das bioaktive Kandidatenmittel markiert ist, die Gegenwart von Markierung am Träger auf Verdrängung hin.

[0119] In einer alternativen Ausführungsform wird das bioaktive Kandidatenmittel zuerst zugesetzt, mit Inkubation und Waschen, woraufhin erst der Konkurrent folgt. Nicht vorhandene Bindung durch den Konkurrenten kann darauf hinweisen, dass das bioaktive Mittel an das HDAC8-Protein mit einer höheren Affinität gebunden ist. Somit kann, wenn das bioaktive Kandidatengemisch markiert ist, die Gegenwart der Markierung am Träger, in Verbindung mit fehlender Konkurrentenbindung, darauf hinweisen, dass das Kandidatenmittel in der Lage ist, sich an das HDAC8-Protein zu binden.

[0120] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Verfahren differenzielles Screening, um bioaktive Mittel zu identifizieren, die in der Lage sind, die Aktivität der HDAC8-Proteine zu modulieren. Solche Tests können mit dem HDAC8-Protein oder mit Zellen, die das HDAC8-Protein enthalten, durchgeführt werden. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren das Kombinieren eines HDAC8-Proteins und eines Konkurrenten in einer ersten Probe. Eine zweite Probe umfasst ein bioaktives Kandidatenmittel, ein HDAC8-Protein und einen Konkurrenten. Die Bindung des Konkurrenten wird für beide Proben bestimmt, und eine Veränderung oder ein Unterschied an der Bindung zwischen den zwei Proben weist auf die Gegenwart eines Mittels hin, das zu Bindung an das HDAC8-Protein und möglicherweise zur Modulation seiner Aktivität in der Lage ist. Unterscheidet sich also die Bindung des Konkurrenten in der zweiten Probe von jener der ersten Probe, so ist das Mittel in der Lage, sich an das HDAC8-Protein zu binden.

[0121] Alternativ dazu verwendet eine bevorzugte Ausführungsform differenzielles Screenen zur Identifikation von Wirkstoffkandidaten, die sich an das native HDAC8-Protein binden, sich jedoch nicht an modifizierte HDAC8-Proteine binden können. Die Struktur des HDAC8-Proteins kann modelliert und in rationalem Wirk-

stoffdesign verwendet werden, um Mittel zu synthetisieren, die mit dieser Stelle wechselwirken. Wirkstoffkandidaten, die HDAC8-Bioaktivität beeinflussen, werden auch durch Screenen von Wirkstoffen auf ihre Fähigkeit, die Aktivität des Proteins entweder zu steigern oder zu reduzieren, identifiziert.

[0122] Positive Kontrollen und negative Kontrollen können in den Tests verwendet werden. Vorzugsweise werden alle Kontroll- und Testproben in zumindest dreifacher Ausführung durchgeführt, um statistisch signifikante Resultate zu erhalten. Inkubation von allen Proben erfolgt über einen Zeitraum, der für die Bindung des Mittels an das Protein ausreichend ist. Nach der Inkubation werden alle Proben durch Waschen von sämtlichem, nicht spezifisch gebundenem Material befreit, und die Menge an gebundenem, im Allgemeinen markiertem Mittel wird bestimmt. Wird beispielsweise eine radioaktive Markierung verwendet, so können die Proben in einem Szintillationszähler gezählt werden, um die Menge an gebundener Verbindung zu bestimmen.

[0123] Zahlreiche andere Reagenzien können in die Screening-Tests eingebunden werden. Diese umfassen Reagenzien wie Salze, neutrale Proteine, z.B. Albumin, Tenside und dergleichen, die verwendet werden können, um optimale Protein-Protein-Bindung zu unterstützen und/oder nichtspezifische oder Hintergrund-Wechselwirkungen zu reduzieren. Auch können Reagenzien verwendet werden, die die Effizienz des Tests verbessern, beispielsweise Proteaseinhibitoren, Nucleaseinhibitoren, Antimikrobenmittel und dergleichen. Das Gemisch von Komponenten kann in jeder beliebigen Reihenfolge zugesetzt werden, die für die erforderliche Bindung sorgt.

[0124] Screening auf Mittel, die eine Aktivität eines HDAC8-Proteins modulieren, kann auch durchgeführt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel, das zur Modulation der Aktivität von HDAC8 in der Lage ist, die Schritte des Zusetzens eines bioaktiven Kandidatenmittels zu einer Probe eines HDAC8-Proteins (oder Zellen, die ein HDAC8 umfassen) und des Bestimmens einer Veränderung der biologischen Aktivität des HDAC8-Proteins. "Modulieren der Aktivität eines HDAC8-Proteins" umfasst eine Steigerung der Aktivität, eine Reduktion der Aktivität oder eine Änderung am Typ oder der Art von vorhandener Aktivität. Somit sollte sich in dieser Ausführungsform das Kandidatenmittel sowohl an HDAC8-Protein binden (wenn dies auch nicht notwendig sein kann) als auch seine biologische oder biochemische Aktivität wie hierin definiert verändern. Die Verfahren umfassen sowohl In-vitro-Screeningverfahren, wie sie zuvor allgemein erläutert wurden, als auch In-vivo-Screening von Zellen auf Veränderungen der Gegenwart, Verteilung, Aktivität oder Menge von HDAC8-Protein.

[0125] Somit umfassen in dieser Ausführungsform die Verfahren das Kombinieren einer HDAC8-Probe und eines bioaktiven Kandidatengemisches und das Bewerten der Wirkung auf die HDAC8-Aktivität. Unter "HDAC8-Aktivität" oder grammatischen Entsprechungen davon wird hierin eine der biologischen Aktivitäten des HDAC8-Proteins verstanden, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, seine Fähigkeit, die Chromatinsstruktur, Histonacetylierung, Transkription, den Zellzyklus, Zellreplikation, Zelllebensfähigkeit und dergleichen in vitro oder in vivo zu beeinflussen.

[0126] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Aktivität des HDAC8-Proteins reduziert; in einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die Aktivität des HDAC8-Proteins gesteigert. Somit werden bioaktive Mittel, die Antagonisten sind, in manchen Ausführungsformen bevorzugt, und bioaktive Mittel, die Agonisten sind, in anderen Ausführungsformen bevorzugt.

[0127] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung Verfahren zum Screenen auf bioaktive Mittel bereit, die in der Lage sind, die Aktivität eines HDAC8-Proteins zu modulieren. Die Verfahren umfassen den Zusatz eines bioaktiven Kandidatenmittels wie zuvor definiert zu einer Zelle, die HDAC8-Proteine umfasst. Bevorzugte Zelltypen umfassen beinahe jede beliebige Zelle. Die Zellen enthalten eine rekombinante Nucleinsäure, die für ein HDAC8-Protein kodiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bibliothek von Kandidatenmitteln an zahlreichen Zellen getestet.

[0128] Detektion von HDAC8-Regulation kann auf eine Weise erfolgen, die Fachleuten bekannt ist. In einer Ausführungsform werden Indikatoren der HDAC8-Aktivität verwendet, beispielsweise Deacetylierung von acetylierten synthetischen Peptiden, wie beispielsweise dem Peptid RTKR, in dem Lysin (K) acetyliert ist. Es gibt zahlreiche Parameter, die evaluiert oder getestet werden können, um die Detektion von Veränderungen an HDAC8-Regulation zu ermöglichen, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf Tests zur Zelllebensfähigkeit, Tests zur Bestimmung, ob Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase angehalten werden ("Zellproliferationstests"), und Tests zur Bestimmung, in welchem Zellstadium die Zellen angehalten wurden ("Zellphasentests"). Andere Parameter umfassen mRNA-Synthese, Translation, Deacetylierung von acetylierten Peptiden, wie zuvor beschrieben. Durch Testen oder Messen eines oder mehrerer dieser Parameter ist es möglich, nicht nur

Veränderungen an der HDAC8-Regulierung nachzuweisen, sondern auch Veränderungen verschiedener Schritte des HDAC8-Regulationsstoffwechselweges. Dies kann erfolgen, um native Zellen zu evaluieren, beispielsweise um die Aggressivität eines Tumorzelltyps zu quantifizieren oder um die Wirkung von Kandidatenwirkstoffen zu evaluieren, die auf ihre Wirkung auf HDAC8-Regulierung getestet werden. Auf diese Weise kann rasches, exaktes Screening von Kandidatenmitteln durchgeführt werden, um Mittel zu identifizieren, die HDAC8-Regulation modulieren.

[0129] Somit sind die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren beispielsweise nützlich, um bioaktive Mittel aufzuklären/zu hinterleuchten, die eine Zelle oder eine Population von Zellen dazu führen, ihre Chromatinstruktur, Histonacetylierung, Transkriptionsaktivität zu verändern oder sich entweder aus einer Wachstumsphase hinaus und in eine andere hineinzubewegen oder in einer Wachstumsphase stehen zu bleiben. In manchen Ausführungsformen werden die Zellen in einer bestimmten Wachstumsphase angehalten, und es ist wünschenswert, sie entweder aus dieser Phase herauszubekommen oder in eine neue Phase zu bringen. Alternativ dazu kann es wünschenswert sein, eine Zelle zu zwingen, in einer Phase, beispielsweise G1, stehen zu bleiben und nicht im Zellzyklus voranzuschreiten. In ähnlicher Weise kann es unter bestimmten Umständen wünschenswert sein, eine nicht-angehaltene, doch sich langsam bewegende Population von Zellen rascher in ihre nächste Phase zu bringen oder rascher durch den Zellzyklus insgesamt zu bringen oder aber das Einsetzen der nächsten Phase zu verzögern. Es kann beispielsweise möglich sein, die Aktivitäten bestimmter Enzyme, beispielsweise von Kinasen, Phosphatasen, Proteasen oder überall vorkommenden Enzymen, zu verändern, die an der Initiierung von Zellphasenveränderungen beteiligt sind.

[0130] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die hierin erläuterten Verfahren an Zellen durchgeführt, die in der G1-Phase nicht angehalten werden; d.h., sie wachsen und replizieren rasch und unkontrollierbar, wie z.B. Tumorzellen. Auf diese Weise werden Kandidatenmittel evaluiert, um Mittel zu finden, die Histonacetylierung, Transkription und die Zellzyklusregulierung verändern können, d.h. Zellen dazu veranlassen können, an Zellzyklus-Kontrollpunkten wie in G1 anzuhalten (wenn auch das Anhalten in anderen Phasen wie S, G2 oder M ebenfalls wünschenswert ist). Alternativ dazu werden Kandidatenmittel evaluiert, um Mittel zu finden, die Inhibition von HDAC8 verursachen und zu Proliferation einer Zellpopulation führen, d.h. die es Zellen, die im Allgemeinen in der G1-Phase angehalten wurden, ermöglichen, Zellproliferation erneut aufzunehmen; hierbei handelt es sich beispielsweise um Peripherblutzellen, terminal differenzierte Zellen, Stammzellen in Kultur und dergleichen.

[0131] Folglich stellt die Erfindung Verfahren zum Screenen auf Veränderungen der HDAC8-Regulierung einer Zellpopulation bereit. Unter "Veränderung" oder "Modulierung" (hierin synonym verwendet) wird im Allgemeinen eines von zwei Dingen verstanden. In einer beispielsweise Ausführungsform führt die Veränderung beispielsweise zu einer Veränderung der Histonacetylierung, des Zellzyklus einer Zelle, d.h. eine proliferierende Zelle hält in einer beliebigen Zellzyklusphase an oder eine gehaltene Zelle bewegt sich aus ihrer angehaltenen Phase hinaus und beginnt den Zellzyklus im Vergleich zu einer anderen Zelle oder zu derselben Zelle unter anderen Bedingungen. Alternativ dazu kann die Entwicklung einer Zelle in jeder beliebigen bestimmten Phase verändert werden; d.h., es kann zu einer Verkürzung oder Verlängerung der Zeitspanne kommen, die Zellen benötigen, um eine bestimmte Wachstumsphase zu durchschreiten. Die Zelle kann beispielsweise normalerweise eine G1-Phase in mehreren Stunden durchwandern; der Zusatz eines Mittels kann diese G1-Phase verlängern.

[0132] Die Messungen können bestimmt werden, worin alle Bedingungen für jede Messung die gleichen sind oder verschiedene Bedingungen herangezogen werden, mit oder ohne bioaktives Mittel oder in verschiedenen Phasen des Zellzyklusablaufs. Eine Messung von HDAC8-Regulierung beispielsweise kann in einer Zelle oder Zellpopulation bestimmt werden, wobei ein bioaktives Kandidatenmittel vorhanden ist und wobei das bioaktive Kandidatenmittel nicht vorhanden ist. In einem anderen Beispiel werden die Messungen von HDAC8-Regulierung bestimmt, wobei sich der Zustand oder die Umgebung der Zelle oder Populationen von Zellen von einem bzw. einer anderen unterscheidet. Die Zellen können beispielsweise in der Gegenwart oder Abwesenheit von oder vor oder nach der Aussetzung gegenüber physiologischen Signalen, beispielsweise Hormonen, Antikörpern, Peptiden, Antigenen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Wirkungspotenzialen, pharmakologischen Mitteln einschließlich Chemotherapeutika, Bestrahlung, Kanzerogenen oder anderen Zellen (d.h. Zell-Zell-Kontakte) evaluiert werden. In einem anderen Beispiel werden die Messungen von HDAC8-Regulierung zu bestimmten Phasen des Zellzyklusablaufs bestimmt. In wiederum einem anderen Beispiel werden die Messungen von HDAC8-Regulierung herangezogen, wobei die Bedingungen dieselben sind und die Veränderungen zwischen einer Zelle oder Zellpopulation und einer anderen Zelle oder Zellpopulation auftreten.

[0133] Unter "Zellpopulation" oder "Zellbibliothek" werden hierin zumindest zwei Zellen verstanden, wobei zu-

mindest etwa 10^3 bevorzugt werden, zumindest etwa 10^6 besonders bevorzugt werden und zumindest etwa 10^8 bis 10^9 insbesondere bevorzugt werden. Die Population oder Probe kann ein Gemisch von verschiedenen Zelltypen entweder aus primären oder sekundären Kulturen enthalten, wenn auch Proben, die nur einen einzelnen Zelltyp enthalten, bevorzugt werden, beispielsweise kann die Probe aus einer Zelllinie, insbesondere einer Tumorzelllinie, wie nachstehend erläutert wird, stammen. Die Zellen können sich in jeder beliebigen Zellphase, entweder synchron oder nicht, befinden, einschließlich M, G1, S und G2. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Zellen, die replizieren oder proliferieren, verwendet; dies kann die Verwendung von Retrovirusvektoren zur Einführung von bioaktiven Kandidatenmitteln ermöglichen. Alternativ dazu können nicht replizierende Zellen und andere Vektoren (wie Adenovirus- und Lentivirusvektoren) verwendet werden. Darüber hinaus, auch wenn dies nicht erforderlich ist, sind die Zellen mit Farbstoffen und Antikörpern kompatibel.

[0134] Bevorzugte Zelltypen zur Verwendung in der Erfindung umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Säugetierzellen, einschließlich Tier-(Nagetier, einschließlich Mäuse, Ratten, Hamster und Wüstenrennmäuse), Primaten- und menschlicher Zellen, insbesondere Tumorzellen aller Typen, einschließlich Brust-, Haut-, Lungen-, Zervix-, Kolorektal- und Gehirntumor sowie Leukämie usw., umfassend.

[0135] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Verfahren das Testen eines oder mehrerer verschiedener Parameter, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Zelllebensfähigkeit, Zellproliferation und Zellphase.

[0136] In einer bevorzugten Ausführungsform wird Zelllebensfähigkeit getestet, um sicher zu stellen, dass ein Mangel an zellulärer Änderung auf Versuchsbedingungen (d.h. das Einführen eines bioaktiven Kandidatenmittels) zurückzuführen ist, und nicht auf Zelltod. Es gibt zahlreiche geeignete Tests zur Zelllebensfähigkeit, die verwendet werden können, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Lichtstreuung, Lebensfähigkeits-Farbstofffarben und Ausschluss-Farbstofffarben.

[0137] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Lichtstreuungstest als Test zur Lebensfähigkeit, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt, verwendet. Im FACS beobachtet weisen Zellen beispielsweise bestimmte Eigenschaften auf, die durch ihre Vorwärts- und 90°-(Seitwärts-)Lichtstreuungseigenschaften bemessen werden. Diese Streuungseigenschaften stehen für die Größe, Form und den Granulatgehalt der Zellen. Diese Eigenschaften zählen für zwei Parameter, die als Signal für die Lebensfähigkeit gemessen werden können. Kurz zusammengefasst verdichtet sich die DNA von sterbenden oder toten Zellen im Allgemeinen, was die 90°-Streuung verändert; in ähnlicher Weise kann Bläschenbildung an Membranen die Vorwärtsstreuung verändern. Änderungen an der Intensität von Lichtstreuung oder der Zellbrechungsindex weisen auf Veränderungen der Lebensfähigkeit hin.

[0138] Somit wird im Allgemeinen für Lichtstreuungstests eine Lebendzellpopulation eines bestimmten Zelltyps evaluiert, um ihre Vorwärts- und Seitwärts-Streuungseigenschaften zu bestimmen. So wird ein Standard bezüglich Lichtstreuung festgesetzt, der in weiterer Folge verwendet werden kann.

[0139] In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet der Lebensfähigkeitsfarbstoff einen Lebensfähigkeitsfarbstoff. Es gibt zahlreiche bekannte Lebensfähigkeitsfarbstoffe, die tote oder sterbende Zellen färben, jedoch nicht wachsende Zellen färben. Annexin V beispielsweise ist ein Mitglied einer Proteinfamilie, die spezifische Bindung an Phospholipid (Phosphatidylserin) in einer zweiwertigen, ionenabhängigen Weise aufweist. Dieses Protein wurde umfassen für die Messung von Apoptose (programmierten Zelltod) verwendet, da Zelloberflächenaussetzung von Phosphatidylserin ein kennzeichnendes frühes Signal für diesen Prozess ist. Geeignete Lebensfähigkeitsfarbstoffe umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Annexin, Ethidiumhomodimer-1, DEAD Red, Propidiumiodid, SYTOX Green und dergleichen, sowie weitere, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind; siehe das Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Haugland, 6. Auflage, hierin durch Verweis aufgenommen; siehe insbesondere Kapitel 16, S. 285, "Apoptosis Assay".

[0140] Arbeitsvorschriften für Lebensfähigkeitsfarbstoffe für Zelllebensfähigkeit sind bekannt, siehe Molecular Probes Catalog, s.o. In dieser Ausführungsform ist der Lebensfähigkeitsfarbstoff wie Annexin, entweder direkt oder indirekt, markiert und mit einer Zellpopulation kombiniert. Annexin ist im Handel erhältlich, d.h. bei Pharmingen, San Diego, Kalifornien, oder bei den Caltag Laboratories, Millbrae, Kalifornien. Vorzugsweise wird der Lebensfähigkeitsfarbstoff in einer Lösung bereitgestellt, worin der Farbstoff in einer Konzentration von etwa 100 ng/ml bis etwa 500 ng/ml, vorzugsweise etwa 500 ng/ml bis etwa 1 µg/ml, und am meisten bevorzugt etwa 1 µg/ml bis etwa 5 µg/ml, vorliegt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Lebensfähigkeitsfarbstoff direkt markiert; Annexin kann beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Alexa-Farbstoffen, TRITC, AMCA, APC, TriColor, Cy-5 und anderen Farbstoffen, die auf dem Gebiet

der Erfindung bekannt oder im Handel erhältlich sind, markiert sein. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform ist der Lebensfähigkeitsfarbstoff mit einer ersten Markierung, wie beispielsweise einem Hapten wie Biotin, markiert, und eine zweite Fluoreszenzmarkierung wie fluoreszierendes Streptavidin wird verwendet. Andere erste und zweite Markierungspaare können, wie Fachleuten bekannt ist, verwendet werden.

[0141] Nachdem er zugesetzt wurde, wird der Lebensfähigkeitsfarbstoff mit den Zellen über eine bestimmte Zeitspanne hinweg inkubieren gelassen und wird, sofern erforderlich, gewaschen. Die Zellen werden anschließend wie nachstehend erläutert sortiert, um die lebensunfähigen Zellen zu entfernen.

[0142] In einer bevorzugten Ausführungsform wird Ausschlussfarbstofffärbung als Lebensfähigkeitstest verwendet. Ausschlussfarbstoffe sind jene, die von Lebendzellen ausgeschlossen werden, d.h. sie werden nicht passiv aufgenommen (sie dringen nicht in die Zellmembran einer Lebendzelle ein). Aufgrund der Durchlässigkeit von toten oder sterbenden Zellen werden sie jedoch von toten Zellen aufgenommen. Im Allgemeinen, jedoch nicht immer, binden sich die Ausschlussfarbstoffe an DNA, beispielsweise mittels Interkalation. Vorzugsweise fluoresziert der Ausschlussfarbstoff nicht oder fluoresziert nur schwach in Abwesenheit von DNA; dies umgeht den Bedarf an einem Waschschritt. Alternativ dazu können auch Ausschlussfarbstoffe verwendet werden, die die Verwendung einer zweiten Markierung erfordern. Bevorzugte Ausschlussfarbstoffe umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Ethidiumbromid; Ethidiumhomodimer-1; Propidiumiodin; SYTOX grüne Nucleinsäurefärbung; Calcein AM, BCECF AM; Fluoresceindiacetat; TOTO® und TO-PRO™ (aus Molecular Probes, s.o., Kapitel 16) sowie andere, auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Farbstoffe.

[0143] Arbeitsvorschriften zu Ausschlussfarbstofffärbung für Zelllebensfähigkeit sind bekannt, siehe den Molecular Probes Catalog, s.o. Im Allgemeinen wird der Ausschlussfarbstoff den Zellen in einer Konzentration von etwa 100 ng/ml bis etwa 500 ng/ml, noch bevorzugter etwa 500 ng/ml bis etwa 1 µg/ml, und am meisten bevorzugt etwa 0,1 µg/ml bis etwa 5 µg/ml, zugesetzt, wobei etwa 0,5 µg besonders bevorzugt sind. Die Zellen und der Ausschlussfarbstoff werden eine gewisse Zeit lang inkubiert, gewaschen, sofern erforderlich, und dann werden die Zellen wie nachstehend erläutert sortiert, um lebensunfähige Zellen aus der Population zu entfernen.

[0144] Darüber hinaus gibt es andere Tests zur Zelllebensfähigkeit, die durchgeführt werden können, einschließlich beispielsweise enzymatischer Tests, die extrazelluläre enzymatische Aktivität entweder von Lebendzellen (d.h. sekretierte Proteasen usw.) oder von toten Zellen (d.h. die Gegenwart von intrazellulären Enzymen im Medium; beispielsweise intrazelluläre Proteasen, Mitochondrienenzyme usw.) messen können. Siehe das Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Haugland, 6. Auflage, hierin durch Verweis aufgenommen; siehe insbesondere Kapitel 16.

[0145] In einer bevorzugten Ausführungsform wird zumindest ein Zelllebensfähigkeitstest durchgeführt, wobei zumindest zwei verschiedene Zelllebensfähigkeitstests bevorzugt werden, wenn die Fluoreszenz kompatibel ist. Wird nur ein Lebensfähigkeitsstest durchgeführt, so verwendet eine bevorzugte Ausführungsform Lichtstreuungstests (sowohl zu Vorwärts- als auch Seitwärtsstreuung). Werden zwei Lebensfähigkeitsstests durchgeführt, so verwenden bevorzugte Ausführungsformen Lichtstreuung und Farbstoffausschluss, wobei Lichtstreuung und Lebensfähigkeitsfarbstofffärbung auch möglich sind und auch alle drei in manchen Fällen verwendet werden können. Lebensfähigkeitsstests ermöglichen somit die Trennung zwischen lebensfähigen Zellen und lebensunfähigen oder strebenden Zellen.

[0146] Zusätzlich zu einem Zelllebensfähigkeitsstest verwendet eine bevorzugte Ausführungsform einen Zellproliferationstest. Unter "Proliferationstest" wird hierin ein Test verstanden, der es ermöglicht zu bestimmen, ob eine Zellpopulation proliferierend, d.h. replizierend, oder nicht replizierend ist.

[0147] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Proliferationstest ein Farbstofffeinschlusstest. Ein Farbstofffeinschlusstest beruht auf Verdünnungswirkungen, um zwischen einzelnen Zellphasen zu unterscheiden. Kurz zusammengefasst wird ein Farbstoff (im Allgemeinen ein Fluoreszenzfarbstoff, wie nachstehend erläutert) in Zellen eingeführt und von den Zellen aufgenommen. Nachdem er aufgenommen wurde, wird der Farbstoff in der Zelle eingefangen und diffundiert nicht aus der Zelle heraus. Teilt sich die Zellpopulation, wird der Farbstoff proportional verdünnt. Das heißt, dass nach Einführung des Einbindungsfarbstoffs die Zellen eine bestimmte Zeitspanne lang inkubieren gelassen werden; Zellen, die Fluoreszenz im Laufe der Zeit verlieren, sind sich teilende Zellen, und die Zellen, die Fluoreszenz beibehalten, sind in einer Nicht-Wachstumsphase angehalten.

[0148] Im Allgemeinen kann die Einführung des Einschlusses auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Entwe-

der kann der Farbstoff nicht passiv in die Zellen eindringen (z.B. wenn er geladen ist), und die Zellen müssen behandelt werden, sodass sie den Farbstoff aufnehmen; durch die Verwendung eines elektrischen Impulses ist dies beispielsweise möglich. Alternativ dazu kann der Farbstoff passiv in die Zellen eindringen, nachdem er jedoch aufgenommen wurde, wird er so modifiziert, dass er nicht aus den Zellen diffundieren kann. Enzymatische Modifikation des Einschlusfarbstoffes kann in beispielsweise in einen geladenen Zustand versetzen und so die Fähigkeit entziehen, aus den Zellen zu diffundieren. Die Molecular Probes Cell-Tracker™-Farbstoffe beispielsweise sind fluoreszierende Chlormethylderivate, die frei in Zellen diffundieren, und anschließend bildet eine Glutathion-S-Transferasevermittelte Reaktion membranundurchdringende Farbstoffe.

[0149] Geeignete Einschlusfarbstoffe umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf die Molecular Probes-Linie der CellTracker™-Farbstoffe, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf CellTracker™ Blue, CellTracker™ Yellow-Green, CellTracker™ Green, CellTracker™ Orange, PKH26 (Sigma) und andere Farbstoffe, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind; siehe das Molecular Probes Handbook, s.o.; insbesondere Kapitel 15.

[0150] Im Allgemeinen werden Einschlusfarbstoffe Zellen in einer Konzentration im Bereich von etwa 100 ng/ml bis etwa 5 µg/ml zugesetzt, wobei etwa 500 ng/ml bis etwa 1 µg/ml bevorzugt werden. Ein Waschschnitt kann verwendet werden oder nicht. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein bioaktives Kandidatenmittel mit den hierin beschriebenen Zellen kombiniert. Die Zellen und der Einschlusfarbstoff werden eine bestimmte Zeit lang inkubiert, um Zellteilung und somit Farbstoffverdünnung zu ermöglichen. Die Zeitspanne hängt von der Zellzyklusdauer der bestimmten Zellen ab; im Allgemeinen werden zumindest etwa 2 Zellteilungen bevorzugt, wobei zumindest 3 besonders bevorzugt und zumindest etwa 4 insbesondere bevorzugt werden. Die Zellen werden dann wie nachstehend erläutert sortiert, um Zellpopulationen zu schaffen, die replizieren, und solche, die nicht replizieren. Fachleuten wird bekannt sein, dass in manchen Fällen, beispielsweise wenn auf Anti-Proliferationsmittel gescreent wird, die hellen (d.h. fluoreszierenden) Zellen abgenommen werden; in anderen Ausführungsformen, beispielsweise beim Screenen auf Proliferationsmittel, werden die gering fluoreszierenden Zellen abgenommen. Veränderungen werden durch Messen der Fluoreszenz entweder zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder in verschiedenen Zellpopulationen und durch Vergleichen der Resultate mit einem anderen Ergebnis oder mit Standardwerten bestimmt.

[0151] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Proliferationstest ein Antimetabolit-Test. Im Allgemeinen finden Antimetabolit-Tests die häufigste Anwendung, wenn Mittel, die das Anhalten von Zellen in G1- oder G2-Ruhephase verursachen, erwünscht sind. In einem Antimetabolit-Proliferationstest führt die Verwendung eines toxischen Antimetabolits, der sich teilende Zellen tötet, zum Überleben von ausschließlich jenen Zellen, die sich nicht teilen. Geeignete Antimetabolite umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, herkömmliche chemotherapeutische Mittel wie Methotrexat, Cisplatin, Taxol, Hydroxyharnstoff, Nucleotidanaloga wie AraC und dergleichen. Darüber hinaus können Antimetabolit-Tests die Verwendung von Genen umfassen, die bei Expression Zelltod verursachen.

[0152] Die Konzentration, in der der Antimetabolit zugesetzt wird, hängt von der Toxizität des bestimmten Antimetabolits ab und wird, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, bestimmt. Der Antimetabolit wird zugesetzt, und die Zellen werden im Allgemeinen eine bestimmte Zeit lang inkubiert; die exakte Dauer hängt wiederum von den Eigenschaften und der Identität des Antimetaboliten sowie von der Zellzyklusdauer der bestimmten Zellpopulation ab. Im Allgemeinen handelt es sich um die Zeitspanne, die für das Auftreten von zumindest einer Zellteilung ausreichend ist.

[0153] In einer bevorzugten Ausführungsform wird zumindest ein Proliferationstest durchgeführt, wobei mehr als einer bevorzugt wird. Somit führt ein Proliferationstest zu einer Population von proliferierenden Zellen und einer Population von angehaltenen Zellen. Darüber hinaus können andere Proliferationstests verwendet werden, d.h. kolorimetrische Tests, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind.

[0154] In einer bevorzugten Ausführungsform wird, entweder nach einem oder mehreren der zuvor erläuterten Proliferationstests oder gleichzeitig damit, zumindest ein Zellphasentest durchgeführt. Ein "Zellphasen"-Test bestimmt, in welcher Zellphase die Zellen angehalten sind, M, G1, S oder G2.

[0155] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Zellphasentest ein DNA-Bindungsfarbstofftest. Kurz zusammengefasst wird ein DNA-Bindungsfarbstoff in die Zellen eingeführt und passiv aufgenommen. Sobald er sich innerhalb der Zellen befindet, bindet sich der DNA-Bindungsfarbstoff an DNA, im Allgemeinen durch Interkalation, obwohl in manchen Fällen die Farbstoffe auch Bindungsverbindungen entweder der großen oder der kleinen Furche sein können. Die Menge an Farbstoff korreliert somit unmittelbar mit der Menge an DNA in der Zelle, die in den verschiedenen Zellphasen variiert; G2- und M-Phasen-Zellen weisen einen doppelt so ho-

hen DNA-Gehalt wie G1-Phasen-Zellen auf, und S-Phasen-Zellen weisen eine Menge an DNA auf, die dazwischen liegt und davon abhängt, an welchem Punkt in der S-Phase sich die Zellen befinden. Geeignete DNA-Bindungsfarbstoffe sind durchlässig und umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Hoechst 33342 und 33258, Acridinorange, 7-AAD, LDS 751, DAPI und SYTO 16, Molecular Probes Handbook, s.o.; insbesondere Kapitel 8 und 16.

[0156] Im Allgemeinen werden die DNA-Bindungsfarbstoffe in Konzentrationen im Bereich von etwa 1 µg/ml bis etwa 5 µg/ml zugesetzt. Die Farbstoffe werden zu den Zellen zugesetzt und eine bestimmte Zeit lang inkubieren gelassen; die Dauer hängt teilweise vom ausgewählten Farbstoff ab. In einer Ausführungsform werden Messungen unmittelbar nach Zusatz des Farbstoffs abgenommen. Die Zellen werden dann wie nachstehend erläutert sortiert, um Zellpopulationen zu bilden, die unterschiedliche Mengen an Farbstoff und somit unterschiedliche Mengen an DNA enthalten; auf diese Weise werden Zellen, die replizieren, von jenen, die sich nicht replizieren, getrennt. Wie Fachleuten bekannt sein wird, können in manchen Fällen, beispielsweise, wenn auf Antiproliferationsmittel gescreent wird, Zellen mit der geringsten Fluoreszenz (und somit einer einzelnen Kopie des Genoms) von jenen getrennt werden, die replizieren und somit mehr als ein einzelnes DNA-Genom enthalten. Veränderungen werden durch Messen der Fluoreszenz entweder zu verschiedenen Zeitpunkten oder in verschiedenen Zellpopulationen und Vergleichen der Resultate mit anderen oder mit Standardwerten bestimmt.

[0157] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Zellphasentest ein Cyclinzerstörungstest. In dieser Ausführungsform wird vor dem Screenen (und im Allgemeinen vor dem Einführen eines bioaktiven Kandidatenmittels, wie nachstehend erläutert) eine Fusionsnucleinsäure in die Zellen eingeführt. Die Fusionsnucleinsäure umfasst Nucleinsäure, die für eine Cyclinzerstörungsbox kodiert, und eine Nucleinsäure, die für ein nachweisbares Molekül kodiert. "Cyclinzerstörungsboxen" sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und sind Sequenzen, die Zerstörung über den Stoffwechselweg der Ubiquitinierung von Proteinen, die die Boxen während bestimmter Zellphasen enthalten, verursachen. Das heißt, dass G1-Cycline beispielsweise während der G1-Phase stabil sein können, während der S-Phase jedoch aufgrund der Gegenwart von einer G1-Cyclinzerstörungsbox abgebaut werden. Somit kann durch Binden einer Cyclinzerstörungsbox an ein nachweisbares Molekül, beispielsweise grün fluoreszierendes Protein, die Gegenwart oder Abwesenheit des nachweisbaren Moleküls dazu dienen, die Zellphase der Zellpopulation zu identifizieren. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Mehrfachboxen verwendet, wobei vorzugsweise jede unterschiedliche Fluoreszenz enthält, sodass das Erkennen der Zellphase möglich ist.

[0158] Zahlreiche Cyclinzerstörungsboxen sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt, beispielsweise weist Cyclin A eine Zerstörungsbox auf, die die Sequenz RTVLGVIGD (Seq.-ID Nr. 7) umfasst; die Zerstörungsbox von Cyclin B1 umfasst die Sequenz RTALGDIGN (Seq.-ID Nr. 8). Siehe Glotzer et al., Nature 349, 132–138 (1991). Auch andere Zerstörungsboxen sind bekannt:

YMTVSIIDRFMQDSCVPKKMLQLVGVT	(Seq.-ID Nr. 9; Ratten-Cyclin B);
KFRLLQETMYMTVSIIDRFMQNSCPKK	(Seq.-ID Nr. 10; Maus-Cyclin B);
RAILIDWLIQVQMKFRLLQETMYMTVS	(Seq.-ID Nr. 11; Maus-Cyclin B1);
DRFLQAQLVCRKKLQVVGITALLASK	(Seq.-ID Nr. 12; Maus-Cyclin B2); und
MSVLRGKLQLVGTAAAML	(Seq.-ID Nr. 13; Maus-Cyclin A2).

[0159] Die für die Cyclinzerstörungsbox kodierende Nucleinsäure ist operabel an Nucleinsäure, die für ein nachweisbares Molekül kodiert, gebunden. Die Fusionsproteine werden mittels auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren konstruiert. Die für die Zerstörungsbox kodierenden Nucleinsäuren werden beispielsweise an eine Nucleinsäure ligiert, die für ein nachweisbares Molekül kodiert. Unter "nachweisbares Molekül" wird hierin ein Molekül verstanden, das es ermöglicht, eine Zelle oder Verbindung, die das nachweisbare Molekül umfasst, von einer zu unterscheiden, die es nicht enthält, d.h. ein Epitop, manchmal auch als eine Antigen-TAG bezeichnet, ein spezifisches Enzym oder ein Fluoreszenzmolekül. Bevorzugte Fluoreszenzmoleküle umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf grün fluoreszierendes Protein (GFP), blau fluoreszierendes Protein (BFP), gelb fluoreszierendes Protein (YFP), rot fluoreszierendes Protein (RFP) und Enzyme einschließlich Luciferase und β-Galactosidase. Werden Antigen-TAGs verwendet, so setzen bevorzugte Ausführungsformen Zelloberflächenantigene ein. Das Epitop ist vorzugsweise jegliches nachweisbare Peptid, das im Allgemeinen nicht an der zytoplasmatischen Membran zu finden ist, wenn auch unter gewissen Umständen, wenn das Epitop eines ist, das normalerweise an den Zellen vorkommt, Steigerungen nachgewiesen werden können, wobei

dies jedoch im Allgemeinen nicht bevorzugt wird. In ähnlicher Weise können auch enzymatische nachweisbare Moleküle verwendet werden; ein Enzym beispielsweise, das ein neues oder chromogenes Produkt bildet.

[0160] Folglich führen die Resultate des Sortierens nach den Zellphasentests im Allgemeinen zu zumindest zwei Populationen von Zellen, die sich in unterschiedlichen Zellphasen befinden.

[0161] Die hierin bereitgestellten Proteine und Nucleinsäuren können auch für Screeningzwecke verwendet werden, worin die Protein-Protein-Wechselwirkungen der HDAC8-Proteine identifiziert werden können. Es wurden bereits genetische Systeme beschrieben, die Protein-Protein-Wechselwirkungen nachweisen. Die erste Arbeit wurde an Hefesystemen durchgeführt, am sogenannten "Hefe-Zwei-Hybrid"-System. Das grundlegende System erfordert eine Protein-Protein-Wechselwirkung, um Transkription eines Reportergens hervorzu rufen. Spätere Forschungsarbeiten wurden an Säugetierzellen durchgeführt. Siehe Fields et al., Nature 340, 245 (1989); Vasavada et al., PNAS USA 88, 10686 (1991); Fearon et al., PNAS USA 89, 7958 (1992); Dang et al., Mol. Cell. Biol. 11, 954 (1991); Chien et al., PNAS USA 88, 9578 (1991); und die US-Patente Nr. 5.283.173, 5.667.973; 5.468.614; 5.525.490 und 5.637.463. Ein bevorzugtes System wird in den Seriennummern 09/050.863, eingereicht am 30. März 1998, und 09/359.081, eingereicht am 22. Juli 1999, mit dem Titel "Mammalian Protein Interaction Cloning System" beschrieben. Zur Verwendung in Verbindung mit diesen Systemen wird ein bestimmter nützlicher Shuttle-Vektor in der Seriennummer 09/133.944, eingereicht am 14. August 1998, mit dem Titel "Shuttle Vectors" beschrieben.

[0162] Im Allgemeinen werden zwei Nucleinsäuren in eine Zelle transformiert, worin eine ein "Köder" ist, wie beispielsweise das Gen, das für ein HDAC8-Protein kodiert, oder einen Teil davon, und die andere für einen Testkandidaten kodiert. Nur wenn sich die zwei Expressionsprodukte aneinander binden, wird ein Indikator, wie z.B. ein fluoreszierendes Protein, exprimiert. Expression des Indikators zeigt an, wann sich ein Testkandidat an das HDAC8-Protein bindet und als ein HDAC8-Protein identifiziert werden kann. Unter Verwendung desselben Systems und der identifizierten HDAC8-Proteine kann der Vorgang umgekehrt durchgeführt werden. Die hierin bereitgestellten HDAC8-Proteine können nämlich verwendet werden, um neue Köder zu identifizieren, oder Mittel, die mit HDAC8-Proteinen wechselwirken. Darüber hinaus kann das Zwei-Hybrid-System verwendet werden, wobei ein Testkandidat zusätzlich zum Köder und zu den für HDAC8-Protein kodierenden Nucleinsäuren zugesetzt wird, um Mittel zu bestimmen, die die Wechselwirkungen von Köder und HDAC8-Protein stören.

[0163] In einer Ausführungsform wird ein Säugetier-Zwei-Hybrid-System bevorzugt. Säugetiersysteme liefern posttranskriptionale Modifikationen von Proteinen, die signifikant zu ihrer Fähigkeit zur Wechselwirkung beitragen können. Darüber hinaus kann ein Säugetier-Zwei-Hybrid-System an zahlreichen verschiedenen Säugetierzelltypen verwendet werden, um Regulierung, Induktion, Verarbeitung und dergleichen von spezifischen Proteinen mit einem bestimmten Zelltyp nachzuahmen. Proteine beispielsweise, die mit einem Erkrankungszustand (d.h. Krebs, mit Apoptose verbundene Erkrankungen) in Verbindung stehen, könnten in den relevanten Erkrankungszellen getestet werden. In ähnlicher Weise ergibt beim Testen von zufälligen Proteinen das Testen dieser unter den relevanten Zellbedingungen die höchsten positiven Resultate. Darüber hinaus können die Säugetierzellen unter zahlreichen verschiedenen Versuchsbedingungen getestet werden, die intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen, wie beispielsweise in der Gegenwart von Hormonen, Wirkstoffen, Wachstumsfaktoren und Cytokinen, Bestrahlung, Chemotherapeutika, zellulärer und chemischer Stimulation und dergleichen, die zu Bedingungen beitragen können, die Protein-Protein-Wechselwirkungen, insbesondere jene, die in Krebs eingebunden sind, beeinflussen können.

[0164] Tests, die Bindung wie das Zwei-Hybrid-System einbinden, können nichtspezifische Bindungsproteine (NSB) berücksichtigen.

[0165] Expression in verschiedenen Zelltypen und Tests auf HDAC8-Aktivität wurden vorangehend beschrieben. Die Aktivitätstests, wie beispielsweise jene, die eine Wirkung auf beispielsweise Chromatinstruktur, Histona cetylierung, Transkription und dergleichen haben, können durchgeführt werden, um die Aktivität von HDAC8-Proteinen zu bestätigen, die bereits durch ihre Sequenzidentität/-ähnlichkeit oder Bindung ein HDAC8 identifiziert wurden, sowie um die Aktivität von Leitverbindungen ausführlicher zu bestätigen, die als Modulatoren von HDAC8 identifiziert wurden.

[0166] Die hierin bereitgestellten Komponenten für die hierin bereitgestellten Tests können auch zu Sets kombiniert werden. Die Sets können auf der Verwendung des Proteins und/oder der für die HDAC8-Proteine kodierenden Nucleinsäure basieren. In einer Ausführungsform werden andere Komponenten im Set bereitgestellt. Solche Komponenten umfassen eines oder mehrere von Verpackung, Gebrauchsanweisungen, Antikör-

per und Markierungen. Zusätzliche Tests wie jene, die in Diagnoseverfahren verwendet werden, werden nachstehend noch näher beschrieben.

[0167] Auf diese Weise werden bioaktive Mittel identifiziert. Verbindungen mit pharmazeutischer Aktivität sind in der Lage, die Aktivität des HDAC8-Proteins zu steigern oder zu stören. Die Verbindungen mit der erwünschten pharmazeutischen Aktivität können einem Wirt in einem physiologisch annehmbaren Träger verabreicht werden, wie nachstehend noch näher beschrieben wird.

[0168] Die vorliegende Entdeckung in Bezug auf die Rolle von HDAC8-Proteinen in der Zelle stellt somit Verfahren zur Induktion oder Prävention von Zellproliferation in Zellen bereit. Die HDAC8-Proteine, und insbesondere HDAC8-Proteinfragmente, sind zur Untersuchung oder Behandlung von Leiden nützlich, die durch die HDAC8-Proteine vermittelt werden, d.h. sie sind nützlich, um HDAC8-assoziierte Störungen zu diagnostizieren, behandeln oder vermeiden. Somit umfassen "HDAC8-assoziierte Störungen" oder "Erkrankungszustände" Leiden, die sowohl unzureichende oder überschüssige Zellproliferation einbinden. Beispiele für unzureichende und überschüssige Zellproliferation umfassen Altern, Apoptose, Nekrose, Krebs und dergleichen, wobei Krebs bevorzugt ist. Krebs umfasst jeglichen Mechanismus in Verbindung mit Krebs, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, Kanzerogenese, Tumormetastase und Angiogenese.

[0169] In Folge wird HDAC8-Regulierung in Zellen oder Organismen beschrieben. Die Verfahren können das Verabreichen eines HDAC8-Proteins in einer therapeutischen Menge an eine Zelle oder ein Individuum, das dieses Proteins bedarf, umfassen. Alternativ dazu wird ein Anti-HDAC8-Antikörper, der die biologische Aktivität des endogenen HDAC8-Proteins reduziert oder vollständig unterbindet, verabreicht. Alternativ dazu wird ein bioaktives Mittel, das durch die hierin bereitgestellten Verfahren identifiziert wurde, verabreicht. Alternativ dazu umfassen die Verfahren die Verabreichung einer rekombinanten Nucleinsäure, die für ein HDAC8-Protein kodiert, an eine Zelle oder ein Individuum. Wie Fachleuten bekannt sein wird, kann dies auf zahlreichen Wegen erfolgen. Die Aktivität von HDAC8 kann durch Erhöhen der Menge von HDAC8 in der Zelle gesteigert werden, beispielsweise durch Überexprimieren des endogenen HDAC8-Proteins oder durch Verabreichen eines für ein HDAC8-Proteins kodierenden Gens unter Verwendung bekannter Gentherapieverfahren beispielsweise. Die Gentherapieverfahren umfassen die Einbindung des exogenen Gens unter Verwendung gesteigerter homologer Rekombination (EHR), wie beispielsweise in der PCT/US93/03868 beschrieben wird.

[0170] Ohne hier eine Einschränkung auf eine bestimmte Theorie zu beabsichtigen, scheint es, dass HDAC8-Protein ein wichtiges Protein zur Regulierung von Transkription und HDAC8 ist. Folglich können Störungen, die auf mutierten oder variablen HDAC8-Genen basieren, bestimmt werden. Hierin beschrieben werden Verfahren zur Identifikation von Zellen, die variable HDAC8-Gene enthalten, worin die Verfahren das Bestimmen der gesamten Sequenz oder eines Teils davon von zumindest einem endogenen HDAC8-Gen in einer Zelle umfasst. Wie Fachleuten bekannt sein wird, kann dies unter Verwendung jedes beliebigen und beliebig vieler Sequenzierungsverfahren erfolgen. Verfahren zur Identifikation des HDAC8-Genotyps eines Individuums, die das Bestimmen der gesamten Sequenz oder eines Teils davon von zumindest einem HDAC8-Gen des Individuums umfassen, werden beschrieben. Dies erfolgt im Allgemeinen in zumindest einem Gewebe des Individuums und kann die Bewertung zahlreicher Gewebe oder verschiedener Proben aus demselben Gewebe umfassen. Das Verfahren kann das Vergleichen der Sequenz des sequenzierten HDAC8-Gens mit einem bekannten HDAC8-Gen, d.h. einem Wildtyp-Gen, umfassen.

[0171] Die Sequenz vom gesamten HDAC8-Gen oder eines Teils davon kann dann mit der Sequenz eines bekannten HDAC8-Gens verglichen werden, sofern Unterschiede vorhanden sind. Dies kann unter Verwendung jeder beliebigen Anzahl an Sequenzidentitätsprogrammen, wie z.B. Bestfit usw., erfolgen. Die Gegenwart eines Unterschieds in der Sequenz zwischen dem HDAC8-Gen des Patienten und dem bekannten HDAC8-Gen ist ein Hinweis auf einen Erkrankungszustand oder eine Neigung zu einem Erkrankungszustand. Folglich werden Verfahren zur Bestimmung der Gegenwart oder Abwesenheit einer genetischen Läsion in einer HDAC8-Nucleinsäure beschrieben, gekennzeichnet durch beispielsweise eine Veränderung, die die Integrität eines Gens beeinflusst; eine eingeführte Substitution; eine chromosomale Neuanordnung; ein abweichendes Spleißmuster einer mRNA.

[0172] Ebenfalls werden hierin Verfahren zur Diagnose eines mit HDAC8 verbundenen Leidens in einem Individuum beschrieben. Die Verfahren umfassen das Messen der Aktivität von HDAC8 in einer Probe wie beispielsweise einem Gewebe oder einer Körperflüssigkeit aus dem Individuum oder Patienten. Die Aktivität von HDAC8 wird vorzugsweise durch Testen auf die Fähigkeit einer Probe, bekanntes Substrat von HDAC8 zu deacetylieren, gemessen. Beispielsweise durch einen Radioimmuntest unter Verwendung spezifischer Antiseren, die gegen acetylierte vs. nicht-acetylierte Peptide gerichtet sind. Alternativ dazu könnte eine HDAC8-Probe

aus dem Patienten auf ihre Fähigkeit getestet werden, ein radioacetyliertes natürliches oder synthetisches Substrat in vitro zu deacetylieren. Diese Aktivität wird mit der Aktivität von HDAC8 entweder aus einem nicht erkrankten Individuum oder aus einem nicht beeinträchtigten Gewebe aus dem ersten Individuum verglichen. Unterscheiden sich diese Aktivitäten, so kann das erste Individuum gefährdet sein, an einer mit HDAC8 verbundenen Störung zu erkranken. Krebszellen "können" beispielsweise HDAC8 als ein Mittel zur Unterdrückung von Transkription von Genen, die in terminale Differenzierung eingebunden sind, hochregulieren, was die Zellen in einen proliferativen Zustand drängen würde. Inhibieren von HDAC8 würde daher Transkription von Genen ermöglichen, was terminale Differenzierung einer Krebszelle zu einem Nicht-Erkrankungszustand induzieren würde. Auf diese Weise kann beispielsweise das Beobachten verschiedener Erkrankungszustände durch Beobachten der Proteinkonzentrationen oder der Expression von mRNA hierfür erfolgen. In ähnlicher Weise können Expressionsniveaus mit der Prognose korrelieren.

[0173] In einem Aspekt werden die Expressionsniveaus von HDAC8-Proteingenen in verschiedenen Patientenproben oder Zellen bestimmt, für die entweder diagnostische oder prognostische Information erwünscht ist. Beobachtung von Genexpression erfolgt an Genen, die für HDAC8-Proteine kodieren. In einem Aspekt werden die Expressionsniveaus von HDAC8-Proteingenen für verschiedene Zellstadien bestimmt, beispielsweise für normale Zellen und für Zellen, die Apoptose oder Transformation erfahren. Durch Vergleichen von HDAC8-Proteingen-Expressionsniveaus in Zellen in verschiedenen Stadien wird Information einschließlich Hinauf- und Herabregulierung von HDAC8-Proteingenen gewonnen, die auf zahlreiche Weisen verwendet werden kann. Die Bewertung eines bestimmten Behandlungsplans beispielsweise kann vollzogen werden: Wirkt ein chemotherapeutisches Mittel zur Verbesserung der langfristigen Prognose in einem bestimmten Patienten? In ähnlicher Weise kann eine Diagnose durch Vergleichen von Patientenproben durchgeführt oder bestätigt werden. Weiters ermöglichen diese Genexpressionsniveaus das Screenen von Wirkstoffkandidaten, wobei besonders auf Nachahmung oder Veränderung eines bestimmten Expressionsniveaus beobachtet wird. Dies kann durch Bilden von Mikrochips, die Reihen von wichtigen HDAC8-Proteingenen wie jene der vorliegenden Erfindung umfassen, die dann in diesen Screens verwendet werden können, erfolgen. Diese Verfahren können auch auf Proteinbasis durchgeführt werden; das heißt, dass Proteinexpressionsniveaus der HDAC8-Proteine für diagnostische Zwecke oder, um Kandidatenmittel zu screenen, bewertet werden können. Darüber hinaus können die HDAC8-Protein-Nucleinsäuresequenzen zu Gentherapiezwecken verabreicht werden, einschließlich der Verabreichung von Antisense-Nucleinsäuren, oder die HDAC8-Proteine können als therapeutische Wirkstoffe verabreicht werden.

[0174] HDAC8-Proteinsequenzen, die an Biochips gebunden sind, umfassen sowohl Nucleinsäure- als auch Aminosäuresequenzen wie zuvor definiert. Vorzugsweise werden Nucleinsäuresonden zu HDAC8-Proteinnucleinsäuren (die Nucleinsäuresequenzen mit den in den Figuren dargestellten Sequenzen und/oder deren Komplemente) gebildet. Die an den Biochip gebundenen Nucleinsäuresonden sind so entworfen, dass sie im Wesentlichen komplementär zu den HDAC8-Proteinnucleinsäuren, d.h. zur Targetsequenz sind (entweder zur Targetsequenz der Probe oder zu anderen Sondensequenzen, beispielsweise in Sandwich-Tests), sodass Hybridisierung der hierin beschriebenen Targetsequenz und Sonden eintritt. Wie nachstehend erläutert, muss diese Komplementarität nicht perfekt sein; es kann jede beliebige Anzahl an Basenpaar-Fehlpaarungen vorhanden sein, die Hybridisierung zwischen der Targetsequenz und den hierin beschriebenen, einzelsträngigen Nucleinsäuren stören. Ist die Anzahl der Mutationen jedoch so hoch, dass sogar unter den geringst stringenten Hybridisierungsbedingungen keine Hybridisierung eintritt, so ist die Sequenz keine komplementäre Targetsequenz. Somit wird hierin unter "im Wesentlichen komplementär" verstanden, dass die Sonden ausreichend komplementär zu den Targetsequenzen sind, um unter normalen Reaktionsbedingungen, insbesondere unter hochstringenten Bedingungen, wie hierin erläutert, zu hybridisieren.

[0175] Eine "Nucleinsäuresonde" ist im Allgemeinen einzelsträngig, kann jedoch auch teilweise einzel- und teilweise doppelsträngig sein. Die Strangbeschaffenheit der Sonde wird durch Struktur, Zusammensetzung und Eigenschaften der Targetsequenz angezeigt. Im Allgemeinen weisen die Nucleinsäuresonden eine Länge im Bereich von etwa 8 bis etwa 100 Basen auf, wobei etwa 10 bis etwa 80 Basen besonders bevorzugt werden, und etwa 30 bis etwa 50 Basen insbesondere bevorzugt sind. In manchen Ausführungsformen können sehr viel längere Nucleinsäuren verwendet werden, bis hin zu Hunderten von Basen (z.B. ganze Gene).

[0176] Fachleuten wird bekannt sein, dass Nucleinsäuren auf zahlreiche verschiedene Arten an einen festen Träger gebunden oder daran immobilisiert werden können. Unter "immobilisiert" und grammatischen Entsprechungen wird hierin die Assoziation oder Bindung zwischen der Nucleinsäuresonde und dem festen Träger verstanden, die ausreichend ist, um unter den Bedingungen von Bindung, Waschen, Analyse und Entfernung, wie nachstehend näher erläutert, stabil zu sein. Die Bindung kann kovalent oder nichtkovalent sein. Unter "nichtkovalenter Bindung" und grammatischen Entsprechungen wird hierin eine oder mehrere von elek-

trostatischen, hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen verstanden. Zu nichtkovalenter Bindung gehört kovalente Anbindung eines Moleküls, wie Streptavidin, an den Träger und die nichtkovalente Bindung der biotinylierten Sonde an Streptavidin. Unter "kovalenter Bindung" und grammatischen Entsprechungen davon wird hierin verstanden, dass die zwei Gruppierungen, der feste Träger und die Sonde, durch zumindest eine Bindung, einschließlich sigma-Bindungen, pi-Bindungen und Koordinationsbindungen, verbunden sind. Kovalente Bindungen können direkt zwischen der Sonde und dem festen Träger gebildet werden oder können über einen Vernetzer oder durch Einschluss einer spezifischen reaktiven Gruppe entweder am festen Träger oder an der Sonde oder an beiden Molekülen gebildet werden. Immobilisierung kann auch eine Kombination von kovalenten und nichtkovalenten Wechselwirkungen umfassen.

[0177] Im Allgemeinen werden die Sonden auf zahlreiche verschiedene Arten an den Biochip gebunden, wie Fachleuten bekannt ist. Wie hierin beschrieben werden die Nucleinsäuren entweder zuerst synthetisiert und daraufhin an den Biochip gebunden, oder sie können direkt am Biochip synthetisiert werden.

[0178] Der Biochip umfasst ein geeignetes festes Substrat. Unter "Substrat" oder "fester Träger" oder anderen grammatischen Entsprechungen davon wird jegliches Material verstanden, das so modifiziert werden kann, dass es unterschiedliche einzelne Stellen enthält, die für die Anbindung oder Assoziation der Nucleinsäuresonden geeignet sind, und zumindest für ein Detektionsverfahren geeignet ist. Fachleuten wird bekannt sein, dass die Anzahl an möglichen Substraten sehr groß ist, die Glas und modifiziertes oder funktionalisiertes Glas, Kunststoffarten (einschließlich Acrylarten, Polystyrol und Copolymeren von Styrol und anderen Materialien, Polypropylen, Polyethylen, Polybutylen, Polyurethane, TeflonJ usw.), Polysaccharide, Nylon oder Nitrocellulose, Harze, Siliciumdioxid oder auf Siliciumdioxid basierende Materialien, einschließlich Silicium und modifiziertes Silicium, Kohle, Metalle, anorganische Glasarten, Kunststoffe usw. umfassen, jedoch nicht darauf beschränkt sind. Im Allgemeinen ermöglichen die Substrate die Detektion per Sichtprüfung und zeigen keine erkennbare Fluoreszenz.

[0179] In einem Aspekt kann die Oberfläche des Biochips und der Sonde zur darauf folgenden Bindung der zwei mit chemischen funktionellen Gruppen derivatisiert werden. So wird beispielsweise der Biochip mit einer chemischen funktionellen Gruppe, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf Aminogruppen, Carboxygruppen, Oxogruppen und Thiolgruppen, wobei Aminogruppen besonders bevorzugt werden, derivatisiert. Unter Verwendung dieser funktionellen Gruppen können die Sonden unter Verwendung funktioneller Gruppen an den Sonden gebunden werden. Nucleinsäuren beispielsweise, die Aminogruppen enthalten, können an Oberflächen, die Aminogruppen umfassen, gebunden werden, beispielsweise unter Verwendung von Linkern, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind; homo- oder heterobifunktionelle Linker beispielsweise sind durchwegs bekannt (siehe im Pierce Chemical Company Catalog den Abschnitt über Vernetzer, S. 155–200 (1994)). Darüber hinaus können in manchen Fällen zusätzliche Linker wie Alkylgruppen (einschließlich substituierter und Heteroalkylgruppen) verwendet werden.

[0180] In einem Aspekt werden Oligonucleotide, die der Nucleinsäuresonde entsprechen, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt synthetisiert und dann an die Oberfläche des festen Trägers gebunden. Wie Fachleuten bekannt sein wird, wird entweder der 5'- oder der 3'-Terminus an den festen Träger gebunden oder kann die Bindung über ein internes Nucleosid erfolgen.

[0181] In einem zusätzlichen Aspekt kann die Immobilisierung an den festen Träger sehr stark, und dennoch nichtkovalent sein. Biotinylierte Oligonucleotide können gebildet werden, die sich an Oberflächen binden, die kovalent mit Streptavidin beschichtet sind, was zur Bindung führt.

[0182] Alternativ dazu können die Oligonucleotide an der Oberfläche synthetisiert werden, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist. Photoaktivierungsverfahren, die Photopolymerisationsverbindungen und -verfahren einsetzen, können beispielsweise verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform können die Nucleinsäuren *in situ* unter Verwendung durchwegs bekannter photolithographischer Verfahren, wie sie in der WO 95/25116; WO 95/35505; den US-Patenten Nr. 5.700.637 und 5.445.934; und den darin zitierten Verweisen beschrieben werden, synthetisiert werden, worin diese Bindungsverfahren die Grundlage der Affimetrix GeneChip™-Technologie bilden.

[0183] "Differentielle Expression" oder grammatischen Entsprechungen davon, wie hierin verwendet, beziehen sich sowohl auf qualitative als auch auf quantitative Unterschiede in den zeitlichen und/oder zellulären Expressionsmustern von Genen innerhalb und unter den Zellen. Somit kann ein differentiell exprimiertes Gen eine qualitativ veränderte Expression aufweisen, einschließlich einer Aktivierung oder Deaktivierung von beispielsweise normaler gegenüber apoptotischer Zelle. Das bedeutet, dass Zellen in einer bestimmten Phase im

Vergleich zu einer anderen Phase an- oder abgeschaltet werden können. Wie Fachleuten bekannt ist, kann jeder beliebige Vergleich von zwei oder mehreren Phasen durchgeführt werden. Solch ein qualitativ reguliertes Gen weist ein Expressionsmuster innerhalb einer Phase oder eines Zelltyps auf, das mittels Standardverfahren in einer solchen Phase oder einem solchen Zelltyp nachweisbar ist, jedoch nicht in beiden nachweisbar ist. Alternativ dazu ist die Bestimmung quantitativer Art, d.h. die Expression ist erhöht oder reduziert; das bedeutet, dass die Expression des Gens entweder hochreguliert ist, was zu einer erhöhten Menge an Transkript führt, oder herabreguliert ist, was zu einer reduzierten Menge an Transkript führt. Der Grad, zu dem sich Expression unterscheidet, muss nur ausreichend groß sein, um mittels herkömmlicher Charakterisierungsverfahren, wie nachstehend erläutert, wie beispielsweise unter Verwendung von Affymetrix Gene-Chip™-Expressionstests, Lockhart, Nature Biotechnology 14, 1675–1680 (1996), quantifiziert werden zu können. Andere Verfahren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf quantitative Umkehrtranskriptase-PCR, Northern-Analyse und RNAse-Schutz.

[0184] Fachleuten wird klar sein, dass dies durch eine Bewertung entweder des Gentranskripts oder der Proteinkonzentration erfolgen kann; das heißt, die Menge an Genexpression kann unter Verwendung von Nucleinsäuresonden zu der DNA oder RNA, die dem Gentranskript entspricht, beobachtet werden, und die Quantifizierung von Genexpressionsniveaus oder, alternativ dazu, des Endgenprodukts selbst (Protein) kann beispielsweise durch die Verwendung von Antikörpern gegen das HDAC8-Protein und von herkömmlichen Immuntests (ELISAs usw.) oder anderen Verfahren, einschließlich Massenspektrometietests, 2D-Gelelektrophoresetesten und dergleichen verfolgt werden.

[0185] In einem anderen Verfahren erfolgt die Detektion der mRNA *in situ*. In diesem Verfahren werden permeabilisierte Zellen oder Gewebeproben mit einer nachweisbar markierten Nucleinsäuresonde ausreichend lange kontaktiert, um zu ermöglichen, dass die Sonde an die Target-mRNA hybridisiert. Nach dem Waschen zur Entfernung der nichtspezifisch gebundenen Sonde wird die Markierung nachgewiesen. Eine mit Digoxigenin markierte Ribosonde (RNA-Sonde), die zur mRNA, die für ein HDAC8-Protein kodiert, komplementär ist, wird beispielsweise durch Bindung von Digoxigenin an einen sekundären Anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen und mit Nitroblautetrazolium und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat entwickelt.

[0186] In einem anderen bevorzugten Verfahren wird Expression von HDAC8-Protein unter Verwendung von *In-situ*-Bildgebungsverfahren mittels Antikörper gegen HDAC8-Proteine durchgeführt. In diesem Verfahren werden Zellen mit einer oder mehreren Antikörpern gegen das/die HDAC8-Protein(e) kontaktiert. Nach dem Waschen zur Entfernung nichtspezifischer Antikörperbindung wird die Gegenwart des Antikörpers oder der Antikörper nachgewiesen. In einer Ausführungsform wird der Antikörper durch Inkubieren mit einem sekundären Antikörper, der eine nachweisbare Markierung enthält, nachgewiesen. In einem anderen Verfahren enthält der primäre Antikörper gegen das/die HDAC8-Protein(e) eine nachweisbare Markierung. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform enthält jeder der zahlreichen primären Antikörper eine unterschiedliche und nachweisbare Markierung. Dieses Verfahren findet bei gleichzeitigem Screenen von HDAC8-Proteinen besondere Verwendung. Die Markierung kann in einem Fluorometer nachgewiesen werden, das die Fähigkeit besitzt, Emissionen verschiedener Wellenlängen nachzuweisen und zu unterscheiden. Darüber hinaus kann ein fluoressenzaktivierter Zellsortierer (FACS) in diesem Verfahren verwendet werden. Fachleuten wird bekannt sein, dass zahlreiche andere histologische Bildgebungsverfahren in der Erforschung nützlich sind und dass die Antikörper in ELISA, Immunblotting (Western-Blotting), Immunfällung, BIACORE-Verfahren und dergleichen verwendet werden können.

[0187] Die HDAC8-Proteine der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um polyklonale und monoklonale Antikörper gegen HDAC8-Proteine zu bilden, die wie hierin beschrieben nützlich sind. In ähnlicher Weise können die HDAC8-Proteine unter Verwendung herkömmlicher Verfahren an Affinitätschromatographiesäulen gebunden werden. Diese Säulen können dann verwendet werden, um HDAC8-Antikörper zu reinigen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Antikörper gegen Epitope gebildet, die für das HDAC8-Protein einmalig sind; das heißt, der Antikörper zeigt mit anderen Proteinen wenig oder keine Kreuzreakтивität. Diese Antikörper finden in zahlreichen Anwendungen Verwendung. Die HDAC8-Antikörper können beispielsweise an herkömmliche Affinitätschromatographiesäulen gebunden und verwendet werden, um HDAC8-Proteine, wie nachstehend noch näher beschrieben wird, zu reinigen. Die Antikörper können auch als Blockierungspolypeptide verwendet werden, wie zuvor erläutert wurde, da sie sich spezifisch an das HDAC8-Protein binden.

[0188] Die Anti-HDAC8-Proteinantikörper können polyklonale Antikörper umfassen. Verfahren zur Herstellung polyklonaler Antikörper sind Fachleuten bekannt. Polyklonale Antikörper können in einem Säugetier, beispielsweise durch eine oder mehrere Injektionen eines immunisierenden Mittels und, sofern erwünscht, eines Adjuvans gezüchtet werden. Typischerweise wird das immunisierende Mittel und/oder das Adjuvan in das

Säugetier durch mehrfache subkutane oder intraperitoneale Injektionen injiziert. Das immunisierende Mittel kann das HDAC8-Protein oder ein Fusionsprotein davon umfassen. Es kann nützlich sein, das immunisierende Mittel an ein Protein zu konjugieren, das dafür bekannt ist, im zu immunisierenden Tier immunogen zu sein. Beispiele für solche immunogenen Proteine umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyroglobulin und Sojabohnentrypsininhitor. Beispiele für Adjuvanzien, die verwendet werden können, umfassen komplettes Freundsches Adjuvans und MPL-TDM-Adjuvans (Monophosphoryl-Lipid A, synthetisches Trehalosedicorynomycolat). Die Arbeitsvorschrift zur Immunisierung kann von Fachleuten ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden.

[0189] Die Anti-HDAC8-Protein-Antikörper können alternativ dazu monoklonale Antikörper sein. Monoklonale Antikörper können unter Verwendung von Hybridomverfahren, wie beispielsweise jenen, die von Kohler & Milstein, Nature 256, 495 (1975), beschrieben werden, hergestellt werden. In einem Hybridomverfahren wird eine Maus, ein Hamster oder ein anderes geeignetes Wirtstier typischerweise mit einem Immunisierungsmittel immunisiert, um Lymphozyten zu aktivieren, die Antikörper bilden oder in der Lage sind, diese zu bilden, die sich spezifisch an das Immunisierungsmittel binden. Alternativ dazu können die Lymphozyten *in vitro* immunisiert werden.

[0190] Das immunisierende Mittel umfasst typischerweise das HDAC8-Protein oder ein Fusionsprotein davon. Im Allgemeinen werden entweder periphere Blutzlymphozyten ("PBLs") verwendet, wenn Zellen menschlichen Ursprungs erwünscht sind, oder es werden Milzzellen oder Lymphknotenzellen verwendet, wenn nicht-menschliche Säugetierquellen erwünscht sind. Die Lymphozyten werden dann mit einer sich unbegrenzt vermehrenden Zelllinie unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittel wie beispielsweise Polyethylenglykol fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 59–103 (1986)). Sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind üblicherweise transformierte Säugertierzellen, insbesondere Myelomzellen aus Nagetieren, Rindern oder menschlichen Ursprungs. Üblicherweise werden Ratten- oder Maus-Myelomzelllinien verwendet. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben von nicht fusionierten, sich unbegrenzt vermehrenden Zellen inhibieren. Fehlt den parentalen Zellen beispielsweise das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT), so umfasst das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin ("HAT-Medium"), Substanzen, die das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen unterbinden.

[0191] Bevorzugte, sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind jene, die effizient fusionieren, stabile, hochkonzentrierte Expression von Antikörper durch die selektierten, Antikörperproduzierenden Zellen unterstützen und empfindlich gegenüber einem Medium wie HAT-Medium sind. Noch bevorzugtere, sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind murine Myelomlinien, die beispielsweise vom Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, und von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, erhalten werden können. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelom-Zelllinien wurden auch bereits zur Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern beschrieben (Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 51–63 (1987)).

[0192] Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Gegenwart von monoklonalen Antikörpern, die gegen HDAC8-Protein gerichtet sind, getestet werden. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität monoklonaler Antikörper, die von Hybridomzellen produziert werden, durch Immunfäällung oder durch einen In-vitro-Bindungstest wie Radioimmunttest (RIA) oder enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA) bestimmt. Solche Verfahren und Tests sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise durch die Scatchard-Analyse von Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980), bestimmt werden.

[0193] Nachdem die erwünschten Hybridomzellen identifiziert wurden, können die Klone durch Grenzwert-Verdünnungsverfahren subkloniert und mittels herkömmlicher Verfahren gezüchtet werden (Goding, s.o.). Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium und RPMI-1640-Medium. Alternativ dazu können die Hybridomzellen *in vivo* als Ascites in einem Säugetier gezüchtet werden.

[0194] Die von den Subklonen sekretierten, monoklonalen Antikörper können aus dem Kulturmedium oder der Ascites-Flüssigkeit mittels herkömmlicher Immunglobulin-Reinigungsverfahren, wie beispielsweise Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, isoliert oder gereinigt werden.

[0195] Die monoklonalen Antikörper können auch mittels DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden, wie beispielsweise jenen, die im US-Patent Nr. 4.816.567 beschrieben werden. Die für die monoklonalen Antikörper der Erfindung kodierende DNA kann unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren (z.B. unter Verwendung von Oligonucleotidsonden, die in der Lage sind, sich spezifisch an Gene zu binden, die für die Schwer- und Leichtketten von murinen Antikörpern kodieren) leicht isoliert und sequenziert werden. Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als eine bevorzugte Quelle für solche DNA. Nachdem sie isoliert wurde, kann die DNA in Expressionsvektoren eingeführt werden, die dann in Wirtszellen wie Affen-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock-(CHO)-Zellen oder Myelomzellen transfiziert werden, die sonst kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese monoklonaler Antikörper in den rekombinanten Wirtszellen zu erreichen. Die DNA kann auch beispielsweise durch Einsetzen der Kodiersequenz für menschliche, konstante Schwer- und Leichtkettendomänen anstelle der homologen murinen Sequenzen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., s.o.) oder durch kovalentes Binden der gesamten Kodiersequenz für ein Nicht-Immunglobulinpolypeptid oder eines Teils davon an die Immunglobulin-Kodiersequenz modifiziert werden. Solch ein Nicht-Immunglobulinpolypeptid kann anstelle der konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung eingesetzt werden oder kann anstelle der variablen Domänen der Antigen-Kombinationsstelle eines Antikörpers der Erfindung eingesetzt werden, um einen chimären zweiseitigen Antikörper zu schaffen.

[0196] Die Antikörper können einwertige Antikörper sein. Verfahren zur Herstellung einwertiger Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt. Ein Verfahren umfasst beispielsweise die rekombinante Expression von Immunglobulinleichtkette und modifizierter Schwerkette. Die Schwerkette ist im Allgemeinen an jeder beliebigen Stelle in der Fc-Region trunkiert, um Schwerkettenvernetzung zu unterbinden. Alternativ dazu sind die relevanten Cysteinreste durch einen anderen Aminosäurerest substituiert, oder sie sind deletiert, um Vernetzung zu unterbinden.

[0197] In-vitro-Verfahren sind zur Herstellung einwertiger Antikörper ebenfalls geeignet. Verdau von Antikörpern zur Bildung von Fragmenten, insbesondere Fab-Fragmenten, davon kann unter Verwendung von Routinerverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, erfolgen.

[0198] Die Anti-HDAC8-Protein-Antikörper können weiters humanisierte Antikörper oder menschliche Antikörper umfassen. Humanisierte Formen von nicht-menschlichen (z.B. murinen) Antikörpern sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ oder andere Antigen-bindende Subsequenzen von Antikörpern), die eine Minimalsequenz enthalten, die von nicht-menschlichem Immunglobulin abstammt. Humanisierte Antikörper umfassen menschliche Immunglobuline (Rezipienten-Antikörper), in denen Reste aus einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Rezipienten durch Reste aus einer CDR einer nicht-menschlichen Spezies (Donor-Antikörper) wie z.B. Maus, Ratte oder Kaninchen mit der erwünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt werden. In manchen Fällen werden Fv-Gerüstregionreste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können auch Reste umfassen, die weder im Rezipientenantikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen zu finden sind. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von zumindest einer, vorzugsweise zwei, variablen Domäne(n), in der/denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nicht-menschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulin-Consensussequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst im Optimalfall auch zumindest einen Teil einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jenen eines menschlichen Immunglobulins (Jones et al., Nature 321, 522–525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323–329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol: 2, 593–596 (1992)).

[0199] Verfahren zur Humanisierung nicht-menschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die in ihn aus einer nicht-menschlichen Quelle eingeführt wurden. Diese nicht-menschlichen Aminosäurereste werden häufig als "Import"-Reste bezeichnet, die typischerweise aus einer variablen "Import"-Domäne stammen. Humanisierung kann im Wesentlichen gemäß dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al., Nature 321, 522–525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323–327 (1988); Verhoeven et al., Science 239, 1534–1536 (1988)), durch Substituieren von Nagetier-CDRs- oder -CDR-Sequenzen anstelle der entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers, erfolgen. Folglich sind solche "humanisierte" Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin wesentlich weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nicht-menschlichen Spezies substituiert wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, in denen manche CDR-Reste und möglicherweise manche FR-Reste durch Reste aus analogen Stellen in Nagetier-Antikörpern substituiert wurden.

[0200] Menschliche Antikörper können auch unter Verwendung verschiedener Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, einschließlich Phagendisplay-Bibliotheken (Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)), hergestellt werden. Die Verfahren von Cole et al. und Boerner et al. sind zur Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern ebenfalls geeignet (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77 (1985), und Boerner et al., J. Immunol. 147(1), 86–95 (1991)). In ähnlicher Weise können menschliche Antikörper durch Einführen von menschlichen Immunglobulin-Loci in nicht-menschliche, transgene Tiere, z.B. Mäuse, in denen die endogenen Immunglobulogene teilweise oder vollständig deaktiviert wurden, hergestellt werden. Bei Provokation wird die Produktion menschlicher Antikörper beobachtet, die jener, die an Menschen zu beobachten ist, in jeglicher Hinsicht sehr ähnlich ist, einschließlich Genneuanordnung, Assemblierung und Antikörper-Repertoire. Dieser Ansatz wird beispielsweise in den US-Patenten Nr. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 sowie in den folgenden Publikationen beschrieben: Marks et al., Bio/Technology 10, 779–783 (1992); Lonberg et al., Nature 368, 856–859 (1994); Morrison, Nature 368, 812–813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845–851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65–93 (1995).

[0201] Bispezifische Antikörper sind monoklonale, vorzugsweise menschliche oder humanisierte, Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei verschiedene Antigene aufweisen. Im vorliegenden Fall ist eine der Bindungsspezifitäten für das HDAC8-Protein vorhanden, die andere für jedes beliebige andere Antigen, und vorzugsweise für ein Zelloberflächenprotein oder einen Zelloberflächenrezeptor oder eine Rezeptoruntereinheit.

[0202] Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Üblicherweise basierte die rekombinante Produktion bispezifischer Antikörper auf der Co-Expression von zwei Immunglobulin-Schwerkette/Leichtketten-Paaren, worin die zwei Schwerketten verschiedene Spezifitäten aufweisen (Milstein & Cuello, Nature 305, 537–539 (1983)). Aufgrund der zufälligen Auswahl von Immunglobulin-Schwer- und -Leichtketten bilden diese Hybridome (Quadrome) ein potenzielles Gemisch aus zehn verschiedenen Antikörpermolekülen, von denen nur eines die korrekte bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des korrekten Moleküls erfolgt üblicherweise durch Affinitätschromatographieschritte. Ähnliche Verfahren sind in der WO 93/08829, veröffentlicht am 13. Mai 1993, und in Traunecker et al., EMBO J. 10, 3655–3659 (1991), beschrieben.

[0203] Variable Antikörperdomänen mit den erwünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Kombinationsstellen) können an Sequenzen konstanter Immunglobulindomänen fusioniert werden. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit einer konstanten Immunglobulin-Schwerkettendomäne, die zumindest einen Teil der Gelenks-, CH2- und CH3-Regionen umfasst. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Schwerkettenregion (CH1) die Stelle enthält, die für Leichtkettenbindung erforderlich ist, die in zumindest einer der Fusionen vorhanden ist. DNAs, die für die Immunglobulin-Schwerkettenfusionen und, sofern erwünscht, die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in getrennte Expressionsvektoren insertiert und werden in einen geeigneten Wirtsorganismus co-transfiziert. Nähere Details zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind in Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210 (1986), zu finden.

[0204] Nun werden Heterokonjugat-Antikörper beschrieben. Heterokonjugat-Antikörper bestehen aus zwei kovalent verbundenen Antikörpern. Solche Antikörper wurden beispielsweise vorgeschlagen, um Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen zu richten (US-Patent Nr. 4.676.980), sowie zur Behandlung von HIV-Infektion (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Es wird erwogen, dass die Antikörper in vitro unter Verwendung bekannter Verfahren auf dem Gebiet der synthetischen Proteinchemie, einschließlich jener, die Vernetzer einbinden, hergestellt werden können. Immunotoxine können beispielsweise unter Verwendung einer Disulfidaustauschreaktion oder durch Bildung einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele für geeignete Reagenzien für diesen Zweck umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptoputyrimidat sowie jene, die beispielsweise im US-Patent Nr. 4.676.980 offenbart sind.

[0205] Die Anti-HDAC8-Protein-Antikörper haben verschiedene Verwendungszwecke. Anti-HDAC8-Protein-Antikörper können beispielsweise in Diagnosetests für ein HDAC8-Protein verwendet werden, z.B. zur Detektion seiner Expression in spezifischen Zellen, Geweben oder Serum. Verschiedene Diagnosetestverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, können verwendet werden, beispielsweise kompetitive Bindungstests, direkte oder indirekte Sandwichtests und Immunfällungstests, die entweder in heterogenen oder in homogenen Phasen durchgeführt werden (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., 147–158 (1987)). Die in den Diagnosetests verwendeten Antikörper können mit einer nachweisbaren Gruppierung markiert werden. Die nachweisbare Gruppierung sollte in der Lage sein, entweder auf direkte

oder indirekte Weise ein nachweisbares Signal zu produzieren. Die nachweisbare Gruppierung kann beispielsweise ein Radioisotop sein, wie beispielsweise ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S oder ^{125}I , eine fluoreszierende oder chemolumineszierende Verbindung, wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin, oder ein Enzym wie alkalische Phosphatase, β -Galactosidase oder Meerrettichperoxidase. Jedes beliebige Verfahren, das auf dem Gebiet der Erfindung zum Konjugieren des Antikörpers an die nachweisbare Gruppierung bekannt ist, kann verwendet werden, einschließlich jener Verfahren, die von Hunter et al., Nature 144, 945 (1962); David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981); und Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982), beschrieben werden.

[0206] Anti-HDAC8-Protein-Antikörper sind auf für die Affinitätsreinigung von HDAC8-Protein aus rekombinanter Zellkultur oder natürlichen Quellen nützlich. In diesem Verfahren werden die Antikörper gegen HDAC8-Protein unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, an einem geeigneten Träger wie einem Sephadex-Harz oder Filterpapier immobilisiert. Der immobilisierte Antikörper wird anschließend mit einer Probe, die das zu reinigende HDAC8-Protein enthält, kontaktiert, und hiernach wird der Träger mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das im Wesentlichen das gesamte Material in der Probe außer dem HDAC8-Protein, das an den immobilisierten Antikörper gebunden ist, entfernt. Schließlich wird der Träger mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das das HDAC8-Protein vom Antikörper freisetzt.

[0207] Die Anti-HDAC8-Protein-Antikörper können auch in Behandlungen eingesetzt werden. In einem Aspekt werden Gene, die für die Antikörper kodieren, bereitgestellt, sodass sich die Antikörper an das HDAC8-Protein innerhalb der Zelle binden und es modulieren.

[0208] In einem Aspekt wird einem Patienten eine therapeutisch wirksame Dosis an einem HDAC8-Protein, Agonist oder Antagonist, verabreicht. Unter "therapeutisch wirksamer Dosis" wird hierin eine Dosis verstanden, die die Wirkungen hervorruft, für die sie verabreicht wird. Die exakte Dosis hängt vom Zweck der Behandlung ab und kann von Fachleuten mittels bekannter Verfahren festgesetzt werden. Wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, können Anpassungen an HDAC8-Proteinabbau, an systemische gegenüber örtlicher Verabreichung sowie an Alter, Körpergewicht, allgemeinen Gesundheitszustand, Geschlecht, Ernährung, Dauer der Verabreichung, Wirkstoffwechselwirkung und Schwere des Leidens erforderlich sein und können von Fachleuten mittels Routineverfahren festgelegt werden.

[0209] Ein "Patient" für die Zwecke der vorliegenden Erfindung umfasst sowohl Menschen als auch andere Tiere, insbesondere Säugetiere, und Organismen. Somit sind die Verfahren sowohl im Bereich der Humanmedizin als auch der Veterinärmedizin einsetzbar. In der bevorzugten Ausführungsform ist der Patient ein Säugetier, und in der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist der Patient ein Mensch.

[0210] Die Verabreichung des HDAC8-Proteins, Agonist oder Antagonist, kann auf zahlreiche verschiedene Arten erfolgen, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, subkutan, intravenös, intranasal, transdermal, intraperitoneal, intramuskulär, intrapulmonal, vaginal, rektal und intraokular. In manchen Fällen, beispielsweise bei der Behandlung von Wunden und Entzündungen, kann die Zusammensetzung direkt als eine Lösung oder ein Spray angewandt werden. Je nach der Art der Einführung können die Verbindungen auf zahlreiche verschiedene Arten formuliert werden. Die Konzentration der therapeutisch aktiven Verbindung in der Formulierung kann von etwa 0,1–100 Gew.-% variieren.

[0211] Pharmazeutische Zusammensetzungen können ein HDAC8-Protein, Agonist oder Antagonist, (einschließlich hierin beschriebener Antikörper und bioaktiver Mittel) in einer zur Verabreichung an einen Patienten geeigneten Form umfassen. Vorzugsweise liegen die pharmazeutischen Zusammensetzungen in einer wasserlöslichen Form vor, beispielsweise in Form von pharmazeutisch annehmbaren Salzen, wobei dies sowohl Säure- als auch Basenadditionssalze umfasst. "Pharmazeutisch annehmbares Säureadditionssalz" bezieht sich auf jene Salze, die die biologische Wirksamkeit der freien Basen beibehalten und die nicht auf biologische oder sonst unerwünschte Weise mit anorganischen Säuren wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure und dergleichen und organischen Säuren wie Essigsäure, Propansäure, Glykolsäure, Brenztraubensäure, Oxalsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Ameisensäure, Weinsäure, Zitronensäure, Benzoesäure, Zimtsäure, Mandelsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, p-Tolulsulfonsäure, Salicylsäure und dergleichen gebildet werden. "Pharmazeutisch annehmbare Basenadditionsalze" umfassen jene, die von anorganischen Basen wie Natrium-, Kalium-, Lithium-, Ammonium-, Calcium-, Magnesium-, Eisen-, Zink-, Kupfer, Mangan-, Aluminiumsalzen und dergleichen abstammen. Besonders bevorzugt sind Ammonium-, Kalium-, Natrium-, Calcium- und Magnesiumsalze. Salze, die von pharmazeutisch annehmbaren, organischen, nicht toxischen Basen abstammen, umfassen Salze von primären, sekundären

und tertiären Aminen, substituierten Aminen einschließlich natürlich vorkommender, substituierter Amine, zyklischen Aminen und basischen Ionenaustauschharzen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Tripropylamin und Ethanolamin.

[0212] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auch eines oder mehrere der folgenden Elemente umfassen: Trägerproteine wie Serumalbumin; Puffer; Füllstoffe wie Mikrokristallzellulose, Lactose, Maisstärke oder andere Stärken; Bindemittel; Süßstoffe und andere Geschmacksstoffe; Farbstoffe; und Polyethylenglykol. Additive sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden in zahlreichen verschiedenen Formulierungen verwendet.

[0213] Es können Kombinationen der Zusammensetzungen verabreicht werden. Darüber hinaus können die Zusammensetzungen in Kombination mit anderen Therapeutika verabreicht werden, einschließlich Wachstumsfaktoren oder Chemotherapeutika und/oder Bestrahlung. Target-Mittel (d.h. Liganden für Rezeptoren an Krebszellen) können auch mit den hierin bereitgestellten Zusammensetzungen kombiniert werden.

[0214] In einem Aspekt werden die Antikörper für Immuntherapie verwendet, und somit werden Verfahren für Immuntherapie bereitgestellt. Unter "Immuntherapie" wird eine Behandlung von mit HDAC8-Protein in Verbindung stehenden Erkrankungen mit einem Antikörper, der gegen ein HDAC8-Protein gezüchtet wurde, verstanden. Wie hierin verwendet kann Immuntherapie passiv oder aktiv erfolgen. Passive Immuntherapie wie hierin definiert ist der passive Transfer von Antikörper auf einen Rezipienten (Patienten). Aktive Immunisierung ist die Induktion von Antikörper- und/oder T-Zell-Reaktionen in einem Rezipienten (Patienten). Induktion einer Immunantwort kann die Folge der Versorgung des Rezipienten mit einem HDAC8-Proteinantigen, gegen das Antikörper gezüchtet wurden, sein. Durchschnittlichen Fachleuten wird bekannt sein, dass das HDAC8-Proteinantigen durch Injizieren eines HDAC8-Proteins, gegen das Antikörper in einem Rezipienten gezüchtet werden sollen, oder durch Kontaktieren des Rezipienten mit einer HDAC8-Proteinnucleinsäure, die in der Lage ist, das HDAC8-Proteinantigen zu exprimieren, unter Bedingungen, die für die Expression des HDAC8-Proteinantigen geeignet sind, zugeführt werden kann.

[0215] Vorzugsweise ist eine therapeutische Verbindung an einen Antikörper, vorzugsweise einen HDAC8-Proteinantikörper, konjugiert. Die therapeutische Verbindung kann ein zytotoxisches Mittel sein. In diesem Verfahren führt das Richten des zytotoxischen Mittels gegen apoptotische Zellen oder Tumorgewebe oder -zellen zu einer Reduktion der Anzahl an betroffenen Zellen, wodurch die mit Apoptose, Krebs oder HDAC8-Protein-Erkrankungen assoziierten Symptome gemildert werden. Zytotoxische Mittel sind zahlreich und vielfältig und umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, zytotoxische Wirkstoffe oder Toxine oder aktive Fragmente wie Toxine. Geeignete Toxine und ihre entsprechenden Fragmente umfassen Diphtherie-A-Kette, Exotoxin-A-Kette, Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Curcin, Crotin, Phenomycin, Enomycin und dergleichen. Zytotoxische Mittel umfassen auch Radiochemikalien, die durch Konjugieren von Radioisotopen an Antikörper, die gegen HDAC8-Proteine gezüchtet werden, oder durch Binden eines Radionuclids an einen Chelatbildner, der kovalent an den Antikörper gebunden wurde, hergestellt werden.

[0216] Vorzugsweise werden HDAC8-Proteingene als DNA-Immunogene, entweder einzelne Nucleinsäuren oder Kombinationen von HDAC8-Proteingenen, verabreicht. Nackte DNA-Immunogene sind im Allgemeinen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt; siehe Brower, Nature Biotechnology 16, 1304–1305 (1998). Verfahren zur Verwendung von Nucleinsäuren als DNA-Immunogene sind Fachleuten durchwegs bekannt und umfassen das Stellen eines HDAC8-Proteingens oder eines Teils einer HDAC8-Proteinnucleinsäure unter die Steuerung eines Promoters für Expression in einem Tier. Das für DNA-Immunogene verwendete HDAC8-Proteingen kann für HDAC8-Proteine voller Länge kodieren, kodiert jedoch bevorzugter für Teile der HDAC8-Proteine einschließlich Peptide, die vom HDAC8-Protein abstammen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Patient mit einem DNA-Immunogen, das zahlreiche Nucleotidsequenzen umfasst, die aus einem HDAC8-Proteingen stammen, immunisiert. In ähnlicher Weise ist es möglich, ein Tier mit zahlreichen HDAC8-Proteingenen oder Teilen davon, wie hierin definiert, zu immunisieren. Ohne hier auf eine bestimmte Theorie beschränkt zu sein, werden nach der Expression des Polypeptids, für das das DNA-Immunogen kodiert, zytotoxische T-Zellen, Helfer-T-Zellen und Antikörper induziert, die HDAC8-Proteine exprimierende Zellen erkennen und zerstören oder eliminieren.

[0217] Die folgenden Beispiele dienen einer detaillierteren Beschreibung der Verwendung der zuvor beschriebenen Erfindung sowie einer Erläuterung der besten Ausführungsformen, die für die Durchführung verschiedener Aspekte der Erfindung erwogen werden. Es gilt zu verstehen, dass diese Beispiele in keiner Weise dazu dienen, den tatsächlichen Schutzmfang dieser Erfindung einzuschränken, sondern ausschließlich zur Veranschaulichung bereitgestellt werden.

BEISPIELE

Beispiel 1

HDAC8-Nucleinsäure

[0218] Eine Suche in der GenBank-Datenbank nach exprimierten Sequenzmarkierungen (ESTs) unter Verwendung von Basic BLAST, das auf der NCBI-Website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) abrufbar ist, unter Einsatz der Standardparameter führte zu einer EST (40936; Zugriffsnummer AA33308) aus einer Uterus-Bibliothek mit Homologie zum Amino-terminalen Teil von HDAC3. Um einen Klon voller Länge zu erhalten, wurde die Marathon-Ready Human Uterus cDNA-Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) unter Verwendung des Verfahrens 3'-RACE gescreent, worin das 3'-Ende einer cDNA unter Verwendung von PCR amplifiziert wird. Die Marathon-Ready-cDNA-Bibliotheken werden als eine Bibliothek von Volllängen-cDNAs, die durch Adaptorprimer flankiert sind, gebildet. Um 3'-RACE durchzuführen, wird eine PCR-Reaktion unter Verwendung eines Primers, der zur Adaptorregion homolog ist, und eines genspezifischen Primers durchgeführt. Der HDAC8-spezifische Primer war: TCGGAAACGGTTTAAGCGGAG.

[0219] Dieses Verfahren zeigte die Gegenwart von zwei Transkripten mit etwa derselben Häufigkeit: eines mit 1.700 bp und eines mit 800 bp. Sequenzanalyse von beiden Formen zeigte, dass das 800-bp-Transkript mit dem 5'-Ende des 1.700-bp-Transkripts identisch ist und die Amino-terminalen 146 Reste aufweist.

[0220] HDAC8-Protein ist zur RPD3-Klasse (I) von HDACs homolog. Die HDAC1-, HDAC2- und HDAC3-Proteine enthalten eine kurze, Carboxy-terminale Verlängerung in Bezug auf das vorhergesagte, 377 Aminosäuren lange HDAC8-Protein ([Fig. 2](#)). Die Aminosäureidentität in Prozent von HDAC1, 2, 3 und 8 wurden mittels des MacVector Program (Version 6.5r1 für Macintosh, Oxford Molecular Group) bestimmt. Die Resultate lauteten:

HDAC8 vs HDAC1:	146/486 identisch = 30%;
HDAC8 vs HDAC2:	151/491 identisch = 31%;
HDAC8 vs HDAC3:	151/439 identisch = 34%;
HDAC1 vs HDAC2:	410/488 identisch = 84%;
HDAC2 vs HDAC3:	250/491 identisch = 51%;
HDAC1 vs HDAC3:	252/484 identisch = 52%.

[0221] Wie oben gezeigt weisen HDAC1-3 zwischen 51% und 84% Aminosäuresequenzidentität auf. Dahingegen beträgt die Aminosäureidentität, die diese Proteine mit HDAC8 aufweisen, etwa 30% bis 34%. Somit weisen alle der oben genannten HDAC-Proteine Sequenzidentität auf, doch HDAC8 ist mit den anderen HDAC-Proteinen, die eine näher verwandte Gruppe bilden, entfernter verwandt.

Patentansprüche

1. Rekombinante Nucleinsäure, die für ein Histon-Deacetylase-(HDAC-)Protein kodiert, das die in [Fig. 1](#) gezeigte Nucleinsäuresequenz (Seq.-ID Nr. 1) umfasst.
2. Expressionsvektor, der rekombinante Nucleinsäure nach Anspruch 1 umfasst, die operabel an Regulationssequenzen gebunden ist, die von einer mit der Nucleinsäure transformierten Wirtszelle erkannt werden.
3. Wirtszelle, die rekombinante Nucleinsäure nach Anspruch 1 umfasst.
4. Wirtszelle, die den Vektor nach Anspruch 2 umfasst.
5. Verfahren zur Herstellung eines HDAC-Proteins, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle nach Anspruch 3 oder Anspruch 4 unter zur Expression des HDAC-Proteins geeigneten Bedingungen.
6. Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel, das in der Lage ist, die Aktivität des HDAC-Proteins mit Seq.-ID Nr. 2 zu modulieren, umfassend:
 - a) das Zusetzen eines vermutlichen bioaktiven Mittels zu einer Zelle, die die in [Fig. 1](#) gezeigte Nucleinsäuresequenz (Seq.-ID Nr. 1) umfasst; und
 - b) das Bestimmen der Wirkung des vermutlichen bioaktiven Mittels auf die Zelle.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin in Schritt (a) eine Bibliothek von vermutlichen bioaktiven Mitteln zu mehreren, die in [Fig. 1](#) gezeigte Nucleinsäuresequenz (Seq.-ID Nr. 1) umfassenden Zellen zugesetzt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder Anspruch 7, weiters umfassend das Zusetzen eines Markierungsmittels, das die Zelle(n) in einer spezifischen Phase des Zellzyklus markiert.
9. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Zelle(n) (eine) Tumorzelle(n) ist/sind.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1:

10	20	30	40	50
AAGCGGAAG <u>A</u> TGGAGGAGCCGGAGGAACCGGC G <u>G</u> ACAGTGGGCAGTCGCT				
TTCGCCTTCTACCTCCTCGGCCTCCTGGCCGCTGTCACCCGTCA G CGA				
M E E P E E P A D S G Q S L				
60	70	80	90	100
GGTCCC G TTATATCTATAGTCCC G AGTATGTCAGTATGTGTGACTCCC				
CCAGGGCCAATATAGATATCAGGGCTCATACAGTCATA C ACACACTGAGGG				
V P V Y I Y S P E Y V S M C D S				
110	120	130	140	150
TGGCCAAG <u>A</u> GTCCCCAAACGGGCC G AGTATGGTGCATTCTTGATTGAAGCA				
ACC G GTCTAGGGTTTGC C CGGT C ATACCA C GTAAGAA A CTAAC T TCGT				
L A K I P K R A S M V H S L I E A				
160	170	180	190	200
TATGC A CTGCATAAGCAGATGAGGATAGTTAAC C CTAAAGTGGCCTCCAT				
ATACGTGACGTATT C GT T ACTCCTATCAATT C GGATTTCACCGGAGGTA				
Y A L H K Q M R I V K P K V A S M				
210	220	230	240	250
GGAGGAGATGCCACCTCCACACTGATGCTTATCTGCAGCATCTCCAGA				

CCTCCTCTACCGGTGGAAGGTGTGACTACGAATAGACGTCGTAGAGGTCT
 E E M A T F H T D A Y L Q H L Q
 260 270 280 290 300
 AGGTCAAGCCAAGAGGGCGATGATGATCATCCGGACTCCATAGAATATGGG
 TCCAGTCGGTTCTCCCGCTACTACTAGTAGGCCTGAGGTATCTTATAACCC
 K V S Q E G D D D H P D S I E Y G
 310 320 330 340 350
 CTAGGTTATGACTGCCAGCCACTGAAGGGATATTGACTATGCAGCAGC
 GATCCAATACTGACGGGTCGGTGACTTCCCTATAAACTGATACTCGTCG
 L G Y D C P A T E G I F D Y A A A
 360 370 380 390 400
 TATAGGAGGGGCTACGATCACAGCTGCCAATGCCTGATTGACGGAATGT
 ATATCCTCCCCGATGCTAGTGTGACGGGTTACGGACTAACTGCCTTACA
 I G G A T I T A A Q C L I D G M
 410 420 430 440 450
 GCAAAGTAGCAATTAACTGGTCTGGAGGGTGGCATCATGCAAAGAAAGAT
 CGTTCATCGTTAATTGACCAGACCTCCCACCGTAGTACGTTCTTCTA
 C K V A I N W S G G W H H A K K D
 460 470 480 490 500
 GAAGCATCTGGTTTTGTTATCTCAATGATGCTGCTGGAAATATTACG
 CTTCGTAGACCAAAAACAATAGAGTTACTACGACAGGACCCCTATAATGC
 E A S G F C Y L N D A V L G I L R
 510 520 530 540 550
 ATTGCGACGGAAATTGAGCGTATTCTCTACGTGGATTGGATCTGCACC
 TAACGCTGCCCTTAAACTCGCATAAGAGATGCACCTAACCTAGACGTGG
 L R R K F E R I L Y V D L D L H
 560 570 580 590 600
 ATGGAGATGGTGTAGAAGACGCATTCAAGTTCACCTCCAAAGTCATGACC
 TACCTCTACCAACATCTCTCGCTAAGTCAAAGTGGAGGTTCACTACTGG
 H G D G V E D A F S F T S K V M T
 610 620 630 640 650
 GTGTCCCTGCACAAATTCTCCCCAGGATTTCAGGAAACAGGTGACGT
 CACAGGGACGTGTTAAGAGGGTCCCTAAAAGGGTCCCTGTCCACTGCA

FIGUR . 1 (Fortsetzung)

V S L H K F S P G F F P G T G D V
 660 670 680 690 700
 GTCTGATGTTGGCCTAGGGAGGGACGGTACTACAGTGTAAATGTGCCCA
 CAGACTACAACCGGATCCCTCCCTACCATGATGTCACATTACACGGGT
 S D V G L G K G R Y Y S V N V P.
 710 720 730 740 750
 TTCAGGATGGCATACAAGATGAAAAAATATTACCAAGATCTGTGAAAGCGTA
 AAGTCCTACCGTATGTTCTACTTTTATAATGGTCTAGACACTTCGCAT
 I Q D G I Q D E K Y Y Q I C E S V
 760 770 780 790 800
 CTAAAGGAAGTATAACCAAGCCTTAATCCCAAAGCAGTGGTCTTACAGCT
 GATTCCTTCATATGGTCGGAAATTAGGGTTCGTCACCAGAACATGTCGA
 L K E V Y Q A F N P K A V V L Q L
 810 820 830 840 850
 GGGAGCTGACACAATAGCTGGGGATCCCAGTGCTCCTTAACATGACTC
 CCCTCGACTGTGTTATCGACCCCTAGGGTACACGAGGAAATTGTACTGAG
 G A D T I A G D P M C S F N M T
 860 870 880 890 900
 CAGTGGGAATTGGCAAGTGTCTTAAGTACATCCTCAATGGCAGTTGGCA
 GTCACCCCTAACCGTTACAGAATTGATGTAGGAAGTTACCGTCAACCGT
 P V G I G K C L K Y I L Q W Q L A
 910 920 930 940 950
 ACACTCATTTGGGAGGAGGAGGCTATAACCTTGCCAACACGGCTCGATG
 TGTGAGTAAAACCCCTCCTCCGATATTGGAACGGTTGTGCCGAGCTAC
 T L I L G G G G Y N L A N T A R C
 960 970 980 990 1000
 CTGGACATACCTGACCGGGTCATCCTAGGGAAAACACTATCCTCTGAGA
 GACCTGTATGAACCTGGCCCCAGTAGGATCCCTTGTGATAGGAGACTCT
 W T Y L T G V I L G K T L S S E
 1010 1020 1030 1040 1050
 TCCCAGATCATGAGTTTCACAGCATATGGCCTGATTATGTGCTGGAA
 AGGGTCTAGTACTCAAAAGTGTGCTACCCAGGACTAACACGACCTT
 I P D H E F F T A Y G P D Y V L E

FIGUR 1 (Fortsetzung)

1060	1070	1080	1090	1100
ATCACGCCAAGCTGCCGCCAGACCGCAATGAGCCCCACCGAATCCAACA				
TAGTGCAGGGTTCGACGGCCGGTCTGGCGTTACTCGGGGTGGCTTAGGTTGT				
I	T	P	S	C R P D R N E P H R I Q Q
1110	1120	1130	1140	1150
AATCCTCAACTACATCAAAGGGAATCTGAAGCATGAG <u>TGGTCTAGTTGACAG</u>				
TTAGGAGTTGATGTAGTTCCCTAGACTCGTACACCAGATCAACTGTC				
I	L	N	Y	I K G N L K H V V *
1160	1170	1180	1190	1200
AAAGAGATCAGGTTCCAGAGCTGAGGAGTGGTGCCCTATAATGAAGACAG				
TTTCTCTAGTCCAAAGGTCTCGACTCCTCACCGATATTACTCTGTC				
1210	1220	1230	1240	1250
CGTGTATGCAAGCAGTTGTGGAATTGTGACTGCAGGGAAAATTGAGC				
GCACAAATACGTTGTCAAACACCTTAAACACTGACGTCCCTTTAAACT				
1260	1270	1280	1290	1300
AAGAAATTACTCCTGAAAATTCCAAGGGGCATCAAGTGGCAGCTGGCT				
TTCTTAATGAAGGACTTTAAAGGTTCCCGTAGTTCACCGTCGACCGA				
1310	1320	1330	1340	1350
TCCTGGGTGAAGAGGCAGGCACCCCCAGAGTCCTCAACTGGACCTAGGGG				
AGGACCCCACTTCTCCGTGGGTCTCAGGAGTTGACCTGGATCCCC				
1360	1370	1380	1390	1400
AAGAAGGAGATATCCCACATTAAAGTTCTTATTAAAAAACACACAC				
TTCTCCTCTATAGGGTGTAAATTCAAGAATAATTTTTTGTGTGTG				
1410	1420	1430	1440	1450
ACACAAATGAAATTAAATCTTGAAAATTATTTAAAGCGAATTGGGG				
TGTGTTACTTTAAAAATTAGAAACTTTAAATAAAAATTGCTTAACCCC				
1460	1470	1480	1490	1500
AGGGGAGTATTAAATCATCTTAAATGAAACAGATCAGAAGCTGGATGAG				
TCCCTCATAAAATTAGTAGAATTACTTGTCTAGTCTCGACCTACTC				
1510	1520	1530	1540	1550
AGCAGTCACCAGTTGTAGGGCAGGAGGCAGCTGACAGGCAGGGTTGGG				
TCGTCAGTGGTCAAACATCCGTCTCGTCGACTGTCCGTCCAAACCC				

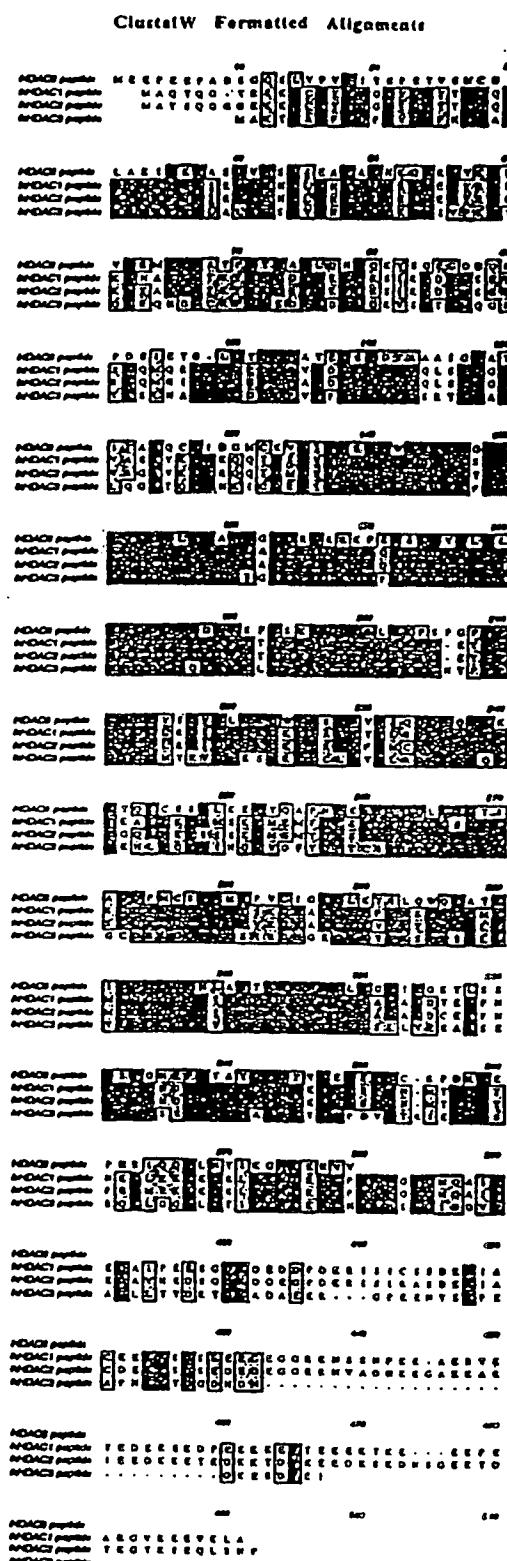
FIGUR 1 (Fortsetzung)

1560 1570 1580 1590 1600
CCTCAGGACCATCCAGGTGGAGCCCTGGGAGAGAGGGTACTGATCAGCAG
GGAGTCCTGGTAGGTCCACCTCGGGACCCTCTCTCCCATGACTAGTCGTC

1610 1620 1630 1640 1650
ACTGGGAGGTGGGGAGAAGTCCGCTGGTGTGTTAGTGTATATATCT
TGACCCCTCCACCCCTCTCAGGCGACCACAACAAAATCACAATATATAGA

1660 1670 1680
TTGGTTTTTAATAAAATCTTGAAAACCTA
AACCAAAAAATTATTTAGAAACTTTGGAT

FIGUR 1 (Fortsetzung)

**FIGUR 2**