



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 18 605 T2 2006.01.19**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 237 916 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/47 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 18 605.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/31698**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 979 200.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/036476**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.09.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.01.2006**

(30) Unionspriorität:

442013 17.11.1999 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:

**Rigel Pharmaceuticals, Inc., South San Francisco,
Calif., US**

(72) Erfinder:

**LUO, Ying, Los Altos, US; XU, Xiang, South San
Francisco, US; LEO, Cindy, San Francisco, US;
HUANG, Betty, San Leandro, US; SHEN, Mary,
Newark, US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: **ING2, EIN MIT IAPS ASSOZIIERTES ZELLYKLUSPROTEIN, SOWIE ZUSAMMENSETZUNGEN,
VERFAHREN UND VERWENDUNGEN**

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

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die in Zellzyklusregulierung eingebunden sind, und Verwendungsverfahren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Gene, die für Proteine kodieren, und Proteine, die in Zellzyklusregulierung eingebunden sind. Verwendungsverfahren umfassen die Verwendung in Tests zum Screenen von Modulatoren des Zellzyklus und die Verwendung in der Therapeutik.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Zellen erleben einen Zyklus verschiedener Wachstumsstadien, beginnend mit der M-Phase, in der Mitose und zytoplasmatische Teilung (Zytokinese) auftreten. Der M-Phase folgt die G1-Phase, in der die Zellen eine hohe Geschwindigkeit der Biosynthese und Wachstum wieder aufnehmen. Die S-Phase beginnt mit DNA-Synthese und endet, wenn sich der DNA-Gehalt des Nucleus verdoppelt hat. Die Zelle tritt dann in Phase G2 ein, die endet, wenn Mitose beginnt, die durch das Auftreten von kondensierten Chromosomen signalisiert wird. Zellen mit Terminus-Differenzierung werden in der G1-Phase angehalten und erfahren keine weitere Zellteilung.

[0003] Das Kennzeichen einer malignen Zelle ist unkontrollierte Vermehrung. Dieser Phänotyp wird durch die Akkumulierung von Genmutationen erhalten, von denen der Großteil das Durchwandern des Zellzyklus fördert. Krebszellen ignorieren Wachstumsregulierungssignale und bleiben im Prozess der Zellteilung hängen. Klassische Onkogene wie beispielsweise ras führen zu einem ungeeigneten Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus, indem sie die extrazellulären Vermehrungssignale nachahmen. Zellzyklus-Kontrollpunkt-Kontrollen stellen zuverlässige Vermehrung und Segregation des Genoms sicher. Der Verlust von Zellzyklus-Kontrollpunkt-Kontrolle führt zu genomischer Instabilität, hoher Beschleunigung der Akkumulierung von Mutationen, die maligne Transformation antreiben. Somit könnten durch Modulieren von Zellzyklus-Kontrollpunkt-Wegen und anderen solchen Wegen mit therapeutischen Mitteln die Unterschiede zwischen normalen und Tumorzellen ausgewertet werden, was die Selektivität von Strahlen- und Chemotherapie verbessern würde und neue Möglichkeiten der Krebsbehandlung eröffnen würde. Weiters würde es nützlich sein, um den Eintritt in die Apoptose zu steuern.

[0004] Andererseits ist es auch manchmal wünschenswert, die Vermehrung von Zellen auf kontrollierte Weise zu steigern. Beispielsweise ist die Vermehrung von Zellen in der Wundheilung nützlich, und auch, wenn Gewebewachstum wünschenswert ist. Somit ist die Identifikation von Modulatoren, die die Vermehrungshemmung fördern, steigern oder unterbinden, wünschenswert.

[0005] Trotz der Erwünschtheit der Identifikation von Zellzykluskomponenten und -modulatoren besteht ein Defizit im Bereich solcher Verbindungen. Demgemäß wäre es von Vorteil, Zusammensetzungen und Verfahren bereitzustellen, die zum Screenen von Modulatoren des Zellzyklus nützlich sind. Es wäre auch von Vorteil, neue Zusammensetzungen bereitzustellen, die in den Zellzyklus eingebunden sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt Zellzyklusproteine und Nucleinsäuren bereit, die für solche Proteine kodieren. Auch werden Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel bereitgestellt, das in der Lage ist, den Zellzyklus zu modulieren. Das Verfahren umfasst das Kombinieren eines Zellzyklusproteins und eines vermutlich bioaktiven Mittels und einer Zelle oder einer Population von Zellen und das Bestimmen der Wirkung auf die Zelle in Gegenwart und Abwesenheit des vermutlich bioaktiven Mittels. Auch werden therapeutische Mittel zur Regulierung oder Modulation des Zellzyklus bereitgestellt.

[0007] In einem Aspekt umfasst eine rekombinante Nucleinsäure, die für ein ING2-Protein der vorliegenden Erfindung kodiert, eine Nucleinsäuresequenz mit zumindest 95 % Identität mit einer Nucleinsäuresequenz, die aus der aus Seq.-ID Nr. 1, 3, 5, 7 und 9 bestehenden Gruppe ausgewählt ist. In einer bevorzugten Ausführungsform bindet sich das hierin bereitgestellte Zellzyklusprotein an zumindest einen Apoptoseprotein-Inhibitor (IAP).

[0008] In einer Ausführungsform wird eine rekombinante Nucleinsäure, die für ein ING2-Protein kodiert, bereitgestellt, die eine Nucleinsäuresequenz, ausgewählt aus der aus Seq.-ID Nr. 1, 3, 5, 7 und 9 bestehenden Gruppe, umfasst. In einer weiteren Ausführungsform wird hierin eine rekombinante Nucleinsäure bereitgestellt,

die für ein ING2-Protein kodiert, worin das ING-2-Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die zumindest 95 % Identität mit einer Aminosäuresequenz aufweist, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

[0009] In einem anderen Aspekt der Erfindung werden Expressionsvektoren bereitgestellt. Die Expressionsvektoren umfassen eine oder mehrere der hierin bereitgestellten rekombinanten Nucleinsäuren, die operabel an Regulationssequenzen gebunden sind, die durch eine mit der Nucleinsäure transformierte Wirtszelle erkannt werden. Weiters werden hierin Wirtszellen bereitgestellt, die die hierin bereitgestellten Vektoren und rekombinanten Nucleinsäuren umfassen. Darüber hinaus werden hierin Verfahren zur Herstellung eines Zellzyklusproteins bereitgestellt, das das Kultivieren einer Wirtszelle wie hierin beschrieben unter geeigneten Bedingungen zur Expression eines ING2-Proteins umfasst. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren das Gewinnen des ING2-Proteins.

[0010] Auch werden hierin rekombinante ING2-Proteine bereitgestellt, die von den Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung kodiert werden. In einem Aspekt wird ein rekombinantes ING2-Polypeptid bereitgestellt, das eine Aminosäuresequenz mit zumindest 95 % Sequenzidentität mit einer Sequenz, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist, umfasst. In einer Ausführungsform wird ein rekombinantes ING2-Protein bereitgestellt, das eine aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz umfasst.

[0011] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung isolierte Polypeptide bereit, die sich spezifisch an ein Zellzyklusprotein wie hierin beschrieben binden. Solche isolierten Polypeptide sind Antikörper. Solch ein Antikörper kann ein monoklonaler Antikörper sein. In einer Ausführungsform reduziert oder eliminiert solch ein Antikörper die biologische Funktion des Zellzyklusproteins.

[0012] Weiters werden hierin Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel bereitgestellt, das in der Lage ist, sich an ein Zellzyklusprotein zu binden. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren das Kombinieren eines ING2-Proteins der Erfindung und eines vermutlich bioaktiven Mittels sowie das Bestimmen der Bindung dieses vermutlich bioaktiven Mittels an das ING2-Protein.

[0013] In einem anderen Aspekt wird hierin ein Verfahren zum Screenen eines bioaktiven Mittels bereitgestellt, das in der Lage ist, die Bindung eines ING2-Proteins und eines IAP zu stören, worin das Verfahren das Kombinieren eines ING2-Proteins der Erfindung, eines vermutlich bioaktiven Mittels und eines IAP sowie das Bestimmen der Bindung des ING2-Proteins an den IAP umfasst. Sofern erwünscht können das Zellzyklusprotein und die IAP zuerst kombiniert werden.

[0014] Weiters werden hierin Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel zur Modulation der Aktivität eines ING2-Proteins bereitgestellt, worin das Verfahren das Zusetzen eines vermutlich bioaktiven Mittels zu einer Zelle, die eine rekombinante Nucleinsäure der Erfindung umfasst, und das Bestimmen der Wirkung des vermutlich bioaktiven Mittels auf die Zelle umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bibliothek von vermutlich bioaktiven Mitteln zu einer Vielzahl von Zellen, die eine rekombinante Nucleinsäure umfassen, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, zugeetzt.

[0015] In einem anderen Aspekt wird hierin ein Verfahren zur Modulation des Wachstums einer Säugetierzelle in vitro bereitgestellt, das das Verabreichen einer rekombinanten Nucleinsäure der Erfindung an die Zelle in einer wirksamen Menge umfasst.

[0016] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird hierin die Verwendung einer rekombinanten Nucleinsäure der Erfindung oder eines ING2-Proteins der Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zur Modulation von Tumorwachstum bereitgestellt.

[0017] Andere Aspekte der Erfindung werden Fachleuten nach Lektüre der anschließenden Beschreibung der Erfindung verständlich werden.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] [Fig. 1](#) zeigt die Nucleinsäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 1, die für ein Zellzyklusprotein ING2, Isoform 1, kodiert.

[0019] [Fig. 2](#) zeigt die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 2, die die Sequenz eines Zellzyklusproteins ING2,

Isoform 1, umfasst.

[0020] [Fig. 3](#) zeigt die Nucleinsäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 3, die für ein Zellzyklusprotein ING2, Isoform 2, kodiert.

[0021] [Fig. 4](#) zeigt die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 4, die die Sequenz eines Zellzyklusproteins ING2, Isoform 2, umfasst.

[0022] [Fig. 5](#) zeigt die Nucleinsäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 5, die für ein Zellzyklusprotein ING2, Isoform 3, kodiert.

[0023] [Fig. 6](#) zeigt die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 6, die die Sequenz eines Zellzyklusproteins ING2, Isoform 3, umfasst.

[0024] [Fig. 7](#) zeigt die Nucleinsäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 7, die für ein Zellzyklusprotein ING2, Isoform 4, kodiert.

[0025] [Fig. 8](#) zeigt die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 8, die die Sequenz eines Zellzyklusproteins ING2, Isoform 4, umfasst.

[0026] [Fig. 9](#) zeigt die Nucleinsäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 9, die für ein Zellzyklusprotein ING2, Isoform 5, kodiert.

[0027] [Fig. 10](#) zeigt die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 10, die die Sequenz eines Zellzyklusproteins ING2, Isoform 5, umfasst.

[0028] [Fig. 11](#) zeigt eine Abgleichung von ING2- und ING1-Proteinen.

[0029] [Fig. 12](#) zeigt ein Diagramm, das p53-Aktivierung durch ING2 darstellt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0030] Die vorliegende Erfindung stellt Zellzyklusproteine und Nucleinsäuren bereit, die für solche Proteine kodieren. Auch werden Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel bereitgestellt, das in der Lage ist, den Zellzyklus zu modulieren. Das Verfahren umfasst das Kombinieren eines Zellzyklusproteins und eines vermutlich bioaktiven Mittels und einer Zelle oder einer Population von Zellen und das Bestimmen der Wirkung auf die Zelle in Gegenwart und Abwesenheit des vermutlichen Mittels. Andere Screeningtests, umfassend Bindungstests, werden auch hierin wie nachstehend beschrieben bereitgestellt. Therapeutische Mittel zur Regulierung oder Modulation des Zellzyklus werden ebenfalls hierin bereitgestellt und beschrieben. Weiters werden hierin, wie nachstehend näher beschrieben, Diagnostiken bereitgestellt.

[0031] Ein Zellzyklusprotein der vorliegenden Erfindung kann auf verschiedene Weisen identifiziert werden. "Protein" in diesem Sinn umfasst Proteine, Polypeptide und Peptide. Die Zellzyklusproteine der Erfindung fallen in zwei allgemeine Klassen: Proteine, die völlig neu sind, d.h. die zum Zeitpunkt der Entdeckung noch nicht Teil einer öffentlichen Datenbank sind, obwohl sie Homologie zu bekannten Proteinen oder Peptiden, die durch exprimierte Sequenz-Markierungen (EST) kodiert werden, aufweisen können. Alternativ dazu sind die Zellzyklusproteine bekannte Proteine, von denen jedoch nicht bekannt war, dass sie in den Zellzyklus eingebunden sind; d.h. dass sie hierin als Proteine identifiziert wurden, die eine neue biologische Funktion aufweisen. Demgemäß kann ein Zellzyklusprotein anfänglich durch seine Assoziation mit einem Protein identifiziert werden, das für seine Einbindung in den Zellzyklus bekannt ist. Für die neuen Zellzyklusproteine und Nucleinsäuren werden hierin Zusammensetzungen und Verfahren zur Verwendung bereitgestellt. Für den Fall von Zellzyklusproteinen und Nucleinsäuren, die bekannt waren, jedoch nicht dafür, dass sie in hierin beschriebene Zellzyklusaktivität eingebunden sind, werden Verwendungsverfahren, d.h. funktionelle Screens, bereitgestellt.

[0032] In einer hierin bereitgestellten Ausführungsform weist ein wie hierin definiertes Zellzyklusprotein eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften auf: Bindung an zumindest einen IAP; Homologie mit einem p33ING1-Protein; und Zellzyklusprotein-Aktivität wie hierin beschrieben. Die Homologie zu solchen p33INGF1-Proteinen kann wie nachstehend beschrieben festgestellt werden. In einer Ausführungsform wird Homologie unter Verwendung der folgenden Datenbank und Parametern ermittelt: Datenbank: Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+SPupdate+PIR; Lambda = 0,316, K = 0,133 und H = 0; gespal-

tenes Lambda = 0,27, K = 0,047 und H = 4.94e-324; Matrix ist BLOSUM62; Spaltabzüge: Existenz: 11, Extension: 1.

[0033] Das Zellzyklusprotein wird hierin als ING2 bezeichnet. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ING2 jede beliebige der in den Figuren gezeigten Isoformen. Die nachstehend beschriebenen Eigenschaften können auf jedes beliebige hierin bereitgestellte Zellzyklusprotein angewandt werden, wobei jedoch ING2 zur Veranschaulichung verwendet wird. ING2 weist Ähnlichkeit zu Proteinen auf, die zu einer Familie von Tumorsuppressoren gehören. Geeignete Wachstumshemmung oder apoptotische Regulierung erleichtert Zelltod und Tumorsuppression. Vorzugsweise bindet sich ING2 an zumindest einen IAP. Studien lieferten Ergebnisse zu IAP, beispielsweise berichtet eine Studie darüber, dass die Einführung von IAP (cIAP), cIAP1 und cIAP2, in apoptotische Gene (Reaper und Grim) physikalische Wechselwirkung und Hemmung von Apoptose nachwies. McCarthy & Dixit, J. Biol. Chem. 273(37), 24009-24015 (1998). Reaper und Grim nehmen über irreversibles Blockieren der spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle an Apoptose-Funktion teil, wodurch Zelltod hervorgerufen wird. Avdonin et al., PNAS USA 95(20), 11703-11708 (1998). Auch wird von IAP berichtet, dass sie mit HID wechselwirken. Vucic et al., Mol. Cell Biol. 18(6), 3300-3309 (1998). In Bezug auf IAP siehe beispielsweise auch Vucic, PNAS USA 94(19), 10183-10188 (1997); Hay et al., Cell 83(7), 1253-1262 (1995).

[0034] Darüber hinaus aktiviert in einer bevorzugten Ausführungsform ING2 p53-Bindungsstellen-gesteuerte Promotoren in Gegenwart oder Abwesenheit von p53. In einer bevorzugteren Ausführungsform ist ING2-Aktivierung synergistisch mit p53. Am meisten bevorzugt unterdrückt ING2 Tumorstadium, vorzugsweise in Gegenwart von p53.

[0035] ING1-Familienmitglieder, mit denen ING2 Homologie aufweist, sind Tumorsuppressoren. Die neuen hierin bereitgestellten Zellzyklusproteine weisen größere Homologie mit den in den Figuren gezeigten ING2-Sequenzen auf als die hierin beschriebenen ING1-Familienmitglieder oder andere bekannte Proteine. Eine Studie zeigt auf, dass das ING1-Gen für p33ING1, ein Zellkernprotein, kodiert. Die Eigenschaften von ING1 weisen auf mehrere Regulationsfunktionen des Zellzyklus hin. ING1 kann mit negativer Regulation von Zellvermehrung, der Steuerung von Zellalterung, Verankerungsabhängigkeit und Apoptose verbunden sein. Garkavtsev et al., Nature 391(6664), 295-298 (1998). Die Funktion von ING1 kann von der Aktivität von p53, einem Tumor-Suppressionsgen, abhängen. Es wird angenommen, dass die zur Wachstumshemmung und Tumorsuppression kodierten Proteine über ING1 und p53 miteinander verbunden sind und von der gegenseitigen Aktivität abhängen. Weiters zeigte sich, dass Transkriptionsaktivierung von p53 von der Expression von ING1 abhängt; Studien zur Immunfällung weisen darauf hin, dass zwischen p33ING1 und Proteinen, für die p53 kodiert, eine physikalische Verbindung besteht. In Bezug auf ING1-Gene und -Proteine siehe auch beispielsweise Helbing et al., Cancer Res. 57(7), 1255-1258 (1997); Garkavtsev et al., Nat. Genet. 14(4), 415-420 (1996); Shimada et al., Cytogenet. Cell Genet. 83(3-4), 232-235 (1998).

[0036] In einer Ausführungsform können Zellzyklus-Nucleinsäuren oder Zellzyklusproteine anfänglich durch wesentliche Nucleinsäure- und/oder Aminosäure-Sequenzidentität oder -ähnlichkeit zu der/den hierin bereitgestellten Sequenzen) identifiziert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform weisen Zellzyklus-Nucleinsäuren oder Zellzyklusproteine Sequenzidentität oder -ähnlichkeit zu den hierin bereitgestellten Sequenzen wie nachstehend beschrieben und eine oder mehrere der Zellzyklusprotein-Bioaktivitäten wie nachstehend näher beschrieben auf. Solche Sequenzidentität oder -ähnlichkeit kann auf der gesamten Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz beruhen.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein Protein ein "Zellzyklusprotein" wie hierin definiert, sofern die gesamte Sequenzidentität der Aminosäuresequenz aus [Fig. 2](#), [Fig. 4](#), [Fig. 6](#), [Fig. 8](#) oder [Fig. 10](#) vorzugsweise größer als etwa 75 %, noch bevorzugter größer als etwa 80 %, sogar noch bevorzugter größer als etwa 85 % und am meisten bevorzugt größer als 90 % ist. In manchen Ausführungsformen beläuft sich die Sequenzidentität sogar auf etwa 93 bis 95 oder 98 %.

[0038] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform weist ein Zellzyklusprotein eine gesamte Sequenzähnlichkeit mit der Aminosäuresequenz aus [Fig. 2](#), [Fig. 4](#), [Fig. 6](#), [Fig. 8](#) oder [Fig. 10](#) von mehr als etwa 80 %, noch bevorzugter von mehr als etwa 85 %, sogar noch bevorzugter von mehr als etwa 90 % und am meisten bevorzugt von mehr als 93 %, auf. In manchen Ausführungsformen beläuft sich die Sequenzidentität sogar auf etwa 95 bis 98 oder 99 %.

[0039] 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 herkömmlichen, auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren bestimmt, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, den lokalen Sequenzidentitäts-Algorithmus von Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981), den Sequenzidentitätsabgleichungs-Algorithmus von Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443 (1970), das Verfahren zur Ähnlichkeitssuche von Pearson & Lipman, PNAS USA 85, 2444 (1988), die computergestützten Durchführungen dieser Algorithmen (GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA im Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), das Best-Fit-Sequenzprogramm von Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387–395 (1984), vorzugsweise unter Verwendung der Standardeinstellungen, oder durch Überprüfung. Vorzugsweise wird prozentuelle Identität durch FastDB, basierend auf den folgenden Parametern, berechnet: Abzug für Nichtübereinstimmung von 1; Spaltabzug von 1; Spaltgrößenabzug von 0,33; und Bindungsabzug von 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, 127–149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

[0040] Ein Beispiel für einen nützlichen Algorithmus ist PILEUP. PILEUP schafft eine multiple Sequenzabgleichung von einer Gruppe verwandter Sequenzen unter Verwendung von progressiven paarweisen Abgleichungen. Er kann auch einen Baum abbilden, der die Cluster-Beziehungen zeigt, die für die Abgleichung verwendet wurden. PILEUP verwendet eine Vereinfachung des progressiven Abgleichungsverfahrens 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-Spaltgewichtung von 3,00, eine Standard-Spaltlänge von 0,10 und gewichtete Endspalten.

[0041] Ein anderes Beispiel für einen nützlichen Algorithmus ist der BLAST-Algorithmus, beschrieben in Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403–410 (1990), und Karlin et al., PNAS USA 90, 5873–5787 (1993). 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 sind mit den folgenden Werten eingestellt: Überlappungsspannweite = 1, Überlappungsfraction = 0,125, Wortgrenzwert (T) = 11. Die HSP-S- und HSP-S2-Parameter sind dynamische Werte und werden durch das Programm selbst je nach der Zusammensetzung der bestimmten Sequenz und Zusammensetzung der bestimmten Datenbank, gegen die die Sequenz von Interesse untersucht wird, eruiert; dennoch können die Werte zur Erlangung einer höheren Empfindlichkeit eingestellt werden.

[0042] Ein weiterer nützlicher Algorithmus ist gespaltener BLAST, wie Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402, beschreiben. Gespaltener BLAST verwendet BLOSUM-62-Substitutionsergebnisse; Grenzwert-T-Parameter, eingestellt auf 9; das Zwei-Treffer-Verfahren zur Auslösung nicht gespaltener Extensionen; berechnet bei Spaltlängen von k einen Betrag von $10+k$; X_u eingestellt auf 16, und X_g eingestellt auf 40 für die Datenbanken-Untersuchungsphase und auf 67 für die Ergebnisphase der Algorithmen. Gespaltene Abgleichungen werden durch ein Menge, die ~ 22 bits entspricht, ausgelöst.

[0043] Ein %-Aminosäuresequenz-Identitätswert wird durch die Anzahl übereinstimmender identischer Reste, dividiert durch die Gesamtanzahl an Resten der "längeren" Sequenz in der abgeglichenen Region berechnet. Die "längere" Sequenz ist diejenige, die die meisten tatsächlichen Reste in der abgeglichenen Region aufweist (Lücken, die durch WU-BLAST-2 eingeführt wurden, um das Abgleichungsergebnis zu maximieren, werden ignoriert).

[0044] Auf ähnliche Weise ist "prozentuelle (%-) Nucleinsäure-Sequenzidentität" in Bezug auf die Codiersequenz der hierin identifizierten Polypeptide als der Prozentsatz von Nucleotidresten in einer vermutlichen Sequenz definiert, die mit den Nucleotidresten in der Codiersequenz des Zellzyklusproteins identisch sind. Ein bevorzugtes Verfahren verwendet das BLASTN-Modul von WU-BLAST-2, eingestellt auf die Standardparameter, wobei Überlappungsspannweite und Überlappungsfraction auf 1 bzw. 0,125 eingestellt werden.

[0045] Die Abgleichung kann die Einführung von Lücken in die abzugleichenden Sequenzen umfassen. Zuzüglich gilt für Sequenzen, die entweder mehr oder weniger Aminosäuren als das von den in den Figuren gezeigten Sequenzen kodierte Protein enthalten, dass in einer Ausführungsform der Prozentsatz der Sequenzidentität auf Grundlage der Anzahl identischer Aminosäuren in Verbindung mit der Gesamtanzahl an Aminosäuren bestimmt wird. Somit wird in einer Ausführungsform Sequenzidentität von Sequenzen, die kürzer als jene in der Fig. gezeigten sind, wie nachstehend erläutert, unter Verwendung der Anzahl von Aminosäuren in der kürzeren Sequenz bestimmt. In den Berechnungen der prozentuellen Identität wird das relative Gewicht nicht verschiedenen Manifestationen von Sequenzvariationen, wie beispielsweise Insertionen, Deletionen, Substitutionen usw., zugeschrieben.

[0046] In einer Ausführungsform werden nur Identitäten positiv (+1) bewertet, und alle Formen von Sequenzvariation, umfassend Lücken, werden mit einem Wert von "0" versehen, was den Bedarf an einer gewichteten Skala oder an Parametern erübrigt, wie nachstehend für Sequenzähnlichkeits-Berechnungen beschrieben. Prozentuelle Sequenzidentität kann beispielsweise durch Dividieren der Anzahl von übereinstimmenden identischen Resten durch die Gesamtanzahl von 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.

[0047] Fachleuten wird bekannt sein, dass die Sequenzen der vorliegenden Erfindung Sequenzierfehler enthalten können. Dies bedeutet, dass inkorrekte Nucleoside, Rasterverschiebungen, unbekannte Nucleoside oder andere Arten von Sequenzierfehlern in jeder der Sequenzen vorhanden sein können; die korrekten Sequenzen fallen allenfalls in den Bereich der hierin gegebenen Homologie- und Stringenzdefinitionen.

[0048] Zellzyklusproteine der vorliegenden Erfindung können länger als die Aminosäuresequenz sein, die von der in der Fig. gezeigten Nucleinsäure kodiert wird.

[0049] Darüber hinaus, wie auch nachstehend noch näher erläutert wird, können Zellzyklusproteine hergestellt werden, die länger als jene sind, die in der Fig. abgebildet sind; beispielsweise durch Zusatz von Epitop- oder Reinigungsmarkierungen, Zusatz anderer Fusionssequenzen oder Aufklärung von zusätzlichen Codier- und Nicht-Codiersequenzen. Wie nachstehend beschrieben, ist die Fusion eines Zellzykluspeptids an ein fluoreszierendes Peptid wie beispielsweise Grün Fluoreszierendes Peptid (GFP) besonders bevorzugt.

[0050] Zellzyklusproteine können auch durch Zellzyklus-Nucleinsäure kodierte Proteine identifiziert werden, die an die in der Fig. abgebildete Sequenz oder das Komplement davon wie hierin erläutert hybridisieren. Hybridisierungsbedingungen werden nachstehend näher beschrieben.

[0051] Sofern ein Zellzyklusprotein zu verwenden ist, um Antikörper zu bilden, muss in einer bevorzugten Ausführungsform ein Zellzyklusprotein zumindest ein Epitop oder eine Determinante mit dem Volllängenprotein gemein haben. Unter "Epitop" oder "Determinante" wird hierin ein Abschnitt eines Proteins verstanden, der einen Antikörper bildet und/oder bindet. Somit sind in den meisten Fällen Antikörper, die zu einem kleineren Zellzyklusprotein gebildet wurde, in der Lage, das Volllängenprotein zu binden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Epitop einzigartig; dies bedeutet, dass Antikörper, die für ein einzigartiges Epitop gebildet wurden, nur geringe oder keine Kreuzreaktivität aufweisen. Die Bezeichnung "Antikörper" umfasst Antikörperfragmente, wie sie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, umfassend Fab, Fab₂, einkettige Antikörper (Fv beispielsweise), chimäre Antikörper usw., die entweder durch Modifikation ganzer Antikörper oder durch De-novo-Synthese unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren gebildet wurden.

[0052] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper gegen ein Zellzyklusprotein in der Lage, die biologische Funktion der hierin beschriebenen Zellzyklusproteine wie nachstehend beschrieben zu reduzieren oder zu eliminieren. Dies bedeutet, dass der Zusatz von Anti-Zellzyklusprotein-Antikörpern (entweder polyklonal oder vorzugsweise monoklonal) zu Zellzyklusproteinen (oder Zellen, die Zellzyklusproteine enthalten) die Zellzyklusaktivität reduzieren oder eliminieren können. Im Allgemeinen wird zumindest ein 25%iger Rückgang der Aktivität bevorzugt, wobei ein Rückgang von zumindest etwa 50 % besonders bevorzugt und von etwa 95–100 % ganz besonders bevorzugt wird.

[0053] Die Zellzyklusantikörper der Erfindung binden sich spezifisch an Zellzyklusproteine. In einer bevorzugten Ausführungsform binden sich die Antikörper spezifisch an Zellzyklusproteine. Mit "spezifisch binden" wird hierin ausgedrückt, dass sich die Antikörper an das Protein mit einer Bindungskonstante im Bereich von zumindest 10^{-4} – 10^{-6} M⁻¹ bindet, wobei ein bevorzugter Bereich von 10^{-7} – 10^{-9} M⁻¹ reicht. Antikörper werden nachstehend näher beschrieben.

[0054] Im Fall der Nucleinsäure entspricht die Gesamtsequenzidentität der Nucleinsäuresequenz der Aminosäure-Sequenzidentität, wobei jedoch die Degeneration des genetischen Codes und die Codonbevorzugung bei verschiedenen Organismen in Betracht gezogen wird. Demgemäß kann die Nucleinsäuresequenzidentität entweder geringer oder höher als jene der Proteinsequenz sein. Somit liegt die Sequenzidentität der Nucleinsäuresequenz im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz der Figuren vorzugsweise über 75 %, noch bevorzugter über etwa 80 %, besonders bevorzugt über etwa 85 %, und am meisten bevorzugt über 90 %. In manchen Ausführungsformen liegt die Sequenzidentität sogar bei etwa 93 bis 95 oder 98 %.

[0055] In einer bevorzugten Ausführungsform kodiert eine Zellzyklus-Nucleinsäure für ein Zellzyklusprotein.

Fachleuten wird bekannt sein, dass aufgrund der Degeneration des genetischen Codes eine äußerst große Anzahl an Nucleinsäuren gebildet werden kann, die alle für die Zellzyklusproteine der vorliegenden Erfindung kodieren.

[0056] Somit könnten Fachleute nach Identifikation einer bestimmten Aminosäuresequenz jede beliebige Anzahl an verschiedenen Nucleinsäuren durch einfache Modifikation der Sequenz von einem oder mehreren Codons auf eine Weise, die die Aminosäuresequenz des Zellzyklusproteins nicht verändert, herstellen.

[0057] In einer Ausführungsform wird die Nucleinsäure mittels Hybridisierungsstudien bestimmt. Somit werden beispielsweise Nucleinsäuren, die unter hoher Stringenz an die in der Fig. gezeigte Nucleinsäuresequenz hybridisieren, oder deren Komplemente als Zellzyklus-Nucleinsäuren betrachtet. 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.), die beide hierin durch Verweis aufgenommen sind. Stringente Bedingungen sind Sequenz-abhängig und sind unter verschiedenen Umständen auch unterschiedlich. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch 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 im Bereich von etwa 5–10 °C unter dem thermischen Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke, pH ausgewählt. Die T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nucleinsäurekonzentration), bei der 50 % der Sonden, die komplementär zum Ziel sind, an die Zielsequenz im Gleichgewicht hybridisieren (da die Zielsequenzen bei T_m im Überfluss vorhanden sind, sind 50 % der Sonden im Gleichgewicht besetzt). Stringente Bedingungen sind jene, bei denen sich die Salzkonzentration auf weniger als etwa 1,0 Natriumionkonzentration, typischerweise auf etwa 0,01 bis 1,0 M Natriumionkonzentration (oder anderer Salze), bei einem pH von 7,0 bis 8,3 und die Temperatur auf zumindest etwa 30 °C bei kurzen Sonden (z.B. 10 bis 50 Nucleotide) und auf zumindest etwa 60 °C für lange Sonden (z.B. länger als 50 Nucleotide) beläuft. Stringente Bedingungen können auch unter Zusatz von destabilisierenden Mitteln wie beispielsweise Formamid erreicht werden.

[0058] In einer anderen Ausführungsform werden weniger stringente Hybridisierungsbedingungen verwendet; beispielsweise können moderat oder nieder stringente Bedingungen verwendet werden, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind; siehe Maniatis & Ausubel, s.o., und Tijssen, s.o.

[0059] Die Zellzyklusproteine und Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise rekombinant. Wie hierin verwendet und nachstehend näher beschrieben kann sich "Nucleinsäure" entweder auf DNA oder RNA beziehen oder auch auf Moleküle, die sowohl Desoxy- als auch Ribonucleotide umfassen. Die Nucleinsäuren umfassen genomische DNA, cDNA und Oligonucleotide, umfassend Sense- und Antisense-Nucleinsäuren. Solche Nucleinsäuren können auch Modifikationen in der Ribose-Phosphat-Hauptkette enthalten, um Stabilität und Halbwertszeit solcher Moleküle in physiologischen Umgebungen zu verbessern.

[0060] Die Nucleinsäure kann doppelsträngig, einzelsträngig sein oder Abschnitte von sowohl doppelsträngiger als auch einzelsträngiger Sequenz enthalten. Fachleuten wird bekannt sein, dass die Darstellung eines Einzelstrangs ("Watson") auch die Sequenz des anderen Strangs ("Crick") definiert; somit umfassen die in den Fig. dargestellten Sequenzen auch das Komplement der Sequenz. Unter der Bezeichnung "rekombinante Nucleinsäure" wird hierin Nucleinsäure verstanden, die ursprünglich in vitro, im Allgemeinen durch Manipulation von Nucleinsäure durch Endonucleasen, in einer Form gebildet wurde, die in der Natur nicht vorkommt. Somit werden sowohl eine isolierte Zellzyklus-Nucleinsäure in einer nichtverzweigten Form als auch ein Expressionsvektor, der in vitro durch Ligieren von DNA-Molekülen, die normalerweise nicht verbunden sind, gebildet wurde, für die Zwecke dieser Erfindung als rekombinant betrachtet. Es gilt anzumerken, dass, nachdem eine rekombinante Nucleinsäure gebildet und in eine Wirtszelle oder Wirtsorganismus eingeführt wurde, diese sich nicht-rekombinant replizieren wird, d.h. unter Verwendung des In-vivo-Zellmechanismus der Wirtszelle, und nicht durch In-vitro-Manipulationen; dennoch werden solche Nucleinsäuren, die einmal rekombinant hergestellt wurden, für die Zwecke der Erfindung stets als rekombinant definiert, auch wenn sie sich in weiterer Folge nicht-rekombinant replizieren.

[0061] Demähnlich ist ein "rekombinantes Protein" ein Protein, das unter Verwendung von Rekombinationsverfahren hergestellt wurde, d.h. durch die Expression einer rekombinanten Nucleinsäure, wie zuvor dargestellt wurde. Ein rekombinantes Protein wird von natürlich vorkommendem Protein aufgrund von zumindest einer oder mehreren Eigenschaften unterschieden. Beispielsweise kann das Protein von manchen oder allen Proteinen und Verbindungen isoliert oder gereinigt werden, mit denen es in seinem Wildtyp-Wirt normalerweise

assoziiert ist, und kann somit im Wesentlichen rein vorliegen. Beispielsweise ist ein isoliertes Protein mit zumindest manchen der Materialien nicht verbunden, mit denen es normalerweise in seinem natürlichen Zustand assoziiert ist, die sich vorzugsweise auf zumindest etwa 0,5 Gew.-%, noch bevorzugter auf zumindest etwa 5 Gew.-%, des gesamten Proteins in einer bestimmten Probe belaufen. Ein im Wesentlichen reines Protein umfasst zumindest etwa 75 Gew.-% des Gesamtproteins, wobei zumindest etwa 80 % bevorzugt sind und zumindest etwa 90 Gew.-% besonders bevorzugt sind. Die Definition umfasst die Produktion eines Zellzyklusproteins aus einem Organismus in einem anderen Organismus oder einer Wirtszelle. Alternativ dazu kann das Protein durch die Verwendung eines induzierbaren Promotors oder eines starken Expressionspromotors bei einer signifikant höheren Konzentration gebildet werden, als es normalerweise üblich ist, sodass das Protein bei erhöhten Konzentrationsniveaus gebildet wird. Alternativ dazu kann das Protein in einer Form vorliegen, die normalerweise nicht in der Natur gefunden wird, beispielsweise mit dem Zusatz einer Epitopmarkierung oder von Aminosäuresubstitutionen, -insertionen und -deletionen, wie nachstehend noch erläutert wird.

[0062] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Zellzyklusproteinvarianten bereit. Diese Varianten sind einer oder mehreren von drei Klassen zuzuordnen: Substitutions-, Insertions- oder Deletionsvarianten. Diese Varianten werden üblicherweise durch ortsspezifische Mutagenese von Nucleotiden in der DNA, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, unter Verwendung von Kassetten- oder PCR-Mutagenese oder anderer Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, zur Bildung von DNA, die für die Variante kodiert, und anschließendes Exprimieren der DNA in rekombinanter Zellkultur wie zuvor erläutert hergestellt. Variierte Zellzyklusprotein-Fragmente mit bis zu etwa 100–150 Resten können jedoch auch durch In-vitro-Synthese unter Verwendung bekannter Verfahren hergestellt werden. Aminosäuresequenz-Varianten sind durch die vorbestimmte Natur der Variation charakterisiert, eine Eigenschaft, die sie von natürlich vorkommenden Allel- oder Interspezies-Variationen der Zellzyklusprotein-Aminosäuresequenz unterscheidet. Die Varianten weisen typischerweise dieselbe qualitative biologische Aktivität auf wie ihr natürlich vorkommendes Analogon, obwohl auch Varianten ausgewählt werden können, die modifizierte Eigenschaften aufweisen, wie nachstehend noch näher beschrieben wird.

[0063] Während der Ort oder die Region zur Einführung einer Aminosäuresequenz-Variation vorbestimmt ist, muss die Mutation an sich nicht vorbestimmt sein. Beispielsweise kann zufällige Mutagenese am Zielcodon oder der Zielregion durchgeführt werden und die exprimierten Zellzyklusvarianten auf die optimale Kombination erwünschter Aktivität gescreent werden, um die Leistung einer Mutation an einer bestimmten Stelle zu optimieren. Verfahren zur Herstellung von Substitutionsmutationen an vorbestimmten Stellen in DNA mit einer bekannten Sequenz sind bekannt, wie beispielsweise M13-Primer-Mutagenese und PCR-Mutagenese. Das Screening der Mutanten erfolgt unter Verwendung von Tests für Zellzyklusprotein-Aktivitäten.

[0064] Aminosäure-Substitutionen werden typischerweise an einzelnen Resten durchgeführt; Insertionen erfolgen üblicherweise in der Größenordnung von etwa 1 bis 20 Aminosäuren, obwohl wesentlich größere Insertionen toleriert werden können. Deletionen liegen im Bereich von etwa 1 bis etwa 20 Resten, obwohl in manchen Fällen Deletionen sehr viel umfangreicher sein können.

[0065] Substitutionen, Deletionen und Insertionen oder jegliche Kombination davon können verwendet werden, um ein Endderivat zu erlangen. Im Allgemeinen werden diese Veränderungen an ein paar Aminosäuren durchgeführt, um die Änderung des Moleküls so gering wie möglich zu halten. Dennoch können unter bestimmten Umständen umfangreichere Veränderungen toleriert werden. Sind geringe Änderungen der Eigenschaften des Zellzyklusproteins erwünscht, so erfolgen Substitutionen im Allgemeinen gemäß der folgenden Tabelle:

Tabelle I

Ursprünglicher Rest	Beispielhafte 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

[0066] Wesentliche Änderungen von Funktion oder immunologischer Identität erfolgen durch das Auswählen von Substitutionen, die weniger konservativ sind als jene in Tabelle I. Beispielsweise können Substitutionen durchgeführt werden, die: die Struktur der Polypeptidhauptkette im Bereich der Änderung, beispielsweise die Alpha-Helix- oder Beta-Faltblatt-Struktur; die Ladung oder Hydrophobizität des Moleküls am Zielort; oder den Großteil der Seitenkette signifikanter beeinflusst. Die Substitutionen, von denen im Allgemeinen angenommen wird, dass sie die größten Änderungen in Bezug auf die Eigenschaften der Polypeptide hervorrufen, sind jene, in denen (a) ein hydrophiler Rest, z.B. Seryl oder Threonyl, einen hydrophoben Rest, z.B. Leucyl, Isoleucyl, Phenylalanyl, Valyl oder Alanyl, ersetzt (oder umgekehrt); (b) ein Cystein oder Prolin einen anderen Rest ersetzt (oder umgekehrt); (c) ein Rest mit einer elektropositiven Seitenkette, z.B. Lysyl, Arginyl oder Histidyl, einen elektronegativen Rest, z.B. Glutamyl oder Aspartyl, ersetzt (oder umgekehrt); oder (d) ein Rest mit einer sperrigen Seitenkette, z.B. Phenylalanin, einen Rest, der keine Seitenkette aufweist, z.B. Glycin, ersetzt (oder umgekehrt).

[0067] Die Varianten weisen typischerweise dieselbe qualitative biologische Aktivität auf und rufen dieselbe Immunantwort wie natürlich vorkommende Analoga hervor, obwohl Varianten auch ausgewählt werden, um die Eigenschaften der Zellzyklusproteine je nach Bedarf zu modifizieren. Alternativ dazu kann die Variante so beschaffen sein, dass die biologische Aktivität des Zellzyklusproteins verändert wird. Beispielsweise können Glycosylierungsorte geändert oder entfernt werden.

[0068] Kovalente Modifikationen von Zellzykluspolypeptiden sind im Schutzzumfang dieser Erfindung eingeschlossen. Eine Art von kovalenter Modifikation umfasst das Reagieren von Zielaminosäureresten eines Zellzykluspolypeptids mit einem organischen derivatisierenden Mittel, das in der Lage ist, mit ausgewählten Seitenketten oder den N- oder C-terminalen Resten eines Zellzykluspolypeptids zu reagieren. Derivatisierung mit bifunktionellen Mitteln ist nützlich, beispielsweise zum Vernetzen von Zellzyklus mit einer wasserunlöslichen Matrice oder Oberfläche zur Verwendung im Verfahren zur Reinigung von Anti-Zellzyklus-Antikörpern oder für Screeningtests, wie nachstehend noch näher beschrieben wird. Üblicherweise verwendete Vernetzungsmittel umfassen z.B. 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, beispielsweise Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, umfassend Disuccinimidylester wie beispielsweise 3,3'-Dithiobis(succinimidylpropionat), bifunktionelle Maleinimide wie beispielsweise Bis-N-maleinimid-1,8-octan und Mittel wie beispielsweise Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat.

[0069] Andere Modifikationen umfassen Desamidierung von Glutaminy- und Asparaginyresten zu den entsprechenden Glutamyl- bzw. Aspartylresten, Hydroxylierung von Prolin und Lysin, Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonylresten, Methylierung der Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidinseitenketten [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 79–86 (1983)], Acetylierung des N-terminalen Amins und Amidierung jeder beliebigen C-terminalen Carboxylgruppe.

[0070] Eine andere Art von kovalenter Modifikation des Zellzykluspolypeptids, die in den Schutzzumfang dieser Erfindung eingebunden ist, umfasst das Ändern des nativen Glycosylierungsmusters des Polypeptids. "Ändern des nativen Glycosylierungsmusters" bedeutet für den Zweck der vorliegenden Beschreibung das Zerstören einer oder mehrerer Kohlenhydratgruppierung(en), die in Nativsequenz-Zellzykluspolypeptid vorkommt/vorkommen, und/oder das Hinzufügen eines oder mehrerer Glycosylierungsstelle(n), die im Nativsequenz-Zellzykluspolypeptid nicht vorhanden ist/sind.

[0071] Das Hinzufügen von Glycosylierungsorten zu Zellzykluspolypeptiden kann durch Ändern der Aminosäuresequenz davon vollzogen werden. Die Änderung kann beispielsweise durch die Addition von oder Substitution durch einem/einen oder mehreren Serin- oder Threoninrest(en) im Nativsequenz-Zellzykluspolypeptid (für Ogebundene Glycosylierungsorte) durchgeführt werden. Die Zellzyklus-Aminosäuresequenz kann gegebenenfalls durch Änderungen der DNA geändert werden, insbesondere durch Mutieren der DNA, die für das Zellzykluspolypeptid kodiert, an vorbestimmten Basen, sodass Codons gebildet werden, die in die erwünschten Aminosäuren translatieren.

[0072] Ein anderes Mittel zur Steigerung der Anzahl von Kohlenhydratgruppierungen am Zellzykluspolypeptid arbeitet über chemisches oder enzymatisches Binden von Glycosiden 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.

[0073] Das Entfernen von Kohlenhydratgruppierungen, die am Zellzykluspolypeptid vorhanden sind, kann chemisch oder enzymatisch oder durch Mutationssubstitution von Codons erfolgen, die für Aminosäurereste kodieren, die als Ziele für Glycosylierung dienen. Chemische Deglycosylierungsverfahren 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 unter Verwendung einer Vielzahl von Endo- und Exo-Glycosidasen erreicht werden, wie Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138, 350 (1987), beschreiben.

[0074] Eine andere Art kovalenter Modifikation von Zellzyklus umfasst das Binden des Zellzykluspolypeptids an ein aus zahlreichen nichtproteinischen Polymeren ausgewähltes Polymer, z.B. an Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene, auf die in den US-Patenten Nr. 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 oder 4.179.337 beschriebene Weise.

[0075] Zellzykluspolypeptide der vorliegenden Erfindung können auch auf solche Weise modifiziert werden, dass sie chimäre Moleküle bilden, die ein Zellzykluspolypeptid umfassen, das an ein anderes heterologes Polypeptid oder eine andere heterologe Aminosäuresequenz fusioniert ist. In einer Ausführungsform umfasst solch ein chimäres Molekül eine Fusion eines Zellzykluspolypeptids mit einem Markierungspolypeptid, das ein Epitop bereitstellt, an das sich ein Anti-Markierungs-Antikörper selektiv binden kann. Die Epitopmarkierung ist im Allgemeinen am Amino- oder Carboxylterminus des Zellzykluspolypeptids angeordnet. Die Gegenwart von solchen Epitopmarkierten Formen eines Zellzykluspolypeptids kann unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Markierungspolypeptid nachgewiesen werden. Auch ermöglicht das Bereitstellen der Epitopmarkierung, dass das Zellzykluspolypeptid leicht mittels Affinitätsreinigung unter Verwendung eines Anti-Markierungs-Antikörpers oder einer anderen Art von Affinitäts-Matrize, die sich an die Epitopmarkierung bindet, gereinigt werden kann. In einer alternativen Ausführungsform kann das chimäre Molekül eine Fusion eines Zellzykluspolypeptids mit einem Immunglobulin oder einer bestimmten Region eines Immunglobulins umfassen. In einer zweiwertigen Form des chimären Moleküls könnte solch eine Fusion an die Fc-Region eines IgG-Moleküls, wie nachstehend noch näher erläutert wird, erfolgen.

[0076] Verschiedene Markierungspolypeptide und deren jeweilige Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Beispiele umfassen Polyhistidin- (poly-his-) oder Polyhistidinglycin- (poly-his-gly-) Markierungen; das Flu-HA-Markierungspolypeptid und sein Antikörper 12CA5 [Field et al., Mol. Cell Biol. 8, 2159–2165 (1988)]; die cmc-Markierung und die dazugehörigen Antikörper 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 und 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5, 3610–3616 (1985)]; und die Herpes-Simplex-Virus-Glycoprotein-D- (gD-) Markierung und ihren Antikörper [Paborsky et al., Protein Engineering 3(6), 547–553 (1990)]. Andere Markierungspolypeptide umfassen das Flag-Peptid [Hopp et al., BioTechnology 6, 1204–1210 (1988)]; das KT3-Epitoppeptid [Martin et al., Science 255, 192–194 (1992)]; das 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)].

[0077] In einer hierin offenbarten Ausführungsform werden Zellzyklusproteine der Zellzyklusfamilie und Zell-

zyklusproteine aus anderen Organismen wie nachstehend beschrieben kloniert und exprimiert. Somit können Sonden- oder degenerierte Polymerasekettenreaktion- (PCR) Primersequenzen verwendet werden, um andere verwandte Zellzyklusproteine von Menschen oder anderen Organismen zu finden. Fachleuten wird bekannt sein, dass besonders nützliche Sonden- und/oder PCR-Primersequenzen die einmaligen Bereiche der Zellzyklus-Nucleinsäuresequenz umfassen. Wie auf dem Gebiet der Erfindung im Allgemeinen bekannt ist, weisen bevorzugte PCR-Primer eine Länge von etwa 15 bis etwa 35 Nucleotiden auf, wobei etwa 20 bis etwa 30 Nucleotide bevorzugt sind, und können je nach Bedarf Inosin enthalten. Die Bedingungen zur PCR-Reaktion sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Daher ist es selbstverständlich, dass mit den Sequenzen in den hierin gelisteten Sequenzen Abschnitte jener Sequenzen bereitgestellt werden, worin einmalige Abschnitte von 15 Nucleotiden oder mehr besonders bevorzugt werden. Fachleute können routinemäßig eine Nucleotidsequenz zur erwünschten Länge synthetisieren oder schneiden.

[0078] Nachdem sie von ihrer natürlichen Quelle, z.B. innerhalb eines Plasmids oder eines anderen Vektors enthalten oder daraus als ein unverzweigtes Nucleinsäure-Segment exzidiert, isoliert wurde, kann die rekombinante Zellzyklus-Nucleinsäure weiter als eine Sonde verwendet werden, um andere Zellzyklus-Nucleinsäuren zu identifizieren und zu isolieren. Sie kann auch als eine "Vorläufer"-Nucleinsäure verwendet werden, um modifizierte oder variierte Zellzyklus-Nucleinsäuren und -Proteine zu bilden.

[0079] Durch die Verwendung der Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung, die für ein Zellzyklusprotein kodieren, können zahlreiche verschiedene Expressionsvektoren gebildet werden. Die Expressionsvektoren können entweder selbstreplizierende extrachromosomale Vektoren oder Vektoren sein, die sich in ein Wirtsgenom integrieren. Im Allgemeinen umfassen diese Expressionsvektoren Transkriptions- und Translationsregulations-Nucleinsäure, die operabel an die Nucleinsäure gebunden ist, die für das Zellzyklusprotein kodiert. Die Bezeichnung "Kontrollsequenzen" bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die zur Expression einer operabel gebundenen Codiersequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich ist. Die Kontrollsequenzen, die beispielsweise für Prokaryoten geeignet sind, umfassen einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz, und eine Ribosom-Bindungsstelle. Eukaryotische Zellen sind dafür bekannt, Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer zu verwenden.

[0080] Nucleinsäure ist "operabel gebunden", wenn sie in eine funktionelle Beziehung mit einer anderen Nucleinsäuresequenz gestellt wird. Beispielsweise ist DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader an DNA für ein Polypeptid operabel gebunden, wenn sie als ein Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptides teilnimmt; ein Promotor oder Enhancer ist operabel an eine Codiersequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosom-Bindungsstelle ist operabel an eine Codiersequenz gebunden, wenn sie so positioniert ist, dass sie Translation erleichtert. Als ein anderes Beispiel bezieht sich operabel gebunden auf DNA-Sequenzen, die so gebunden sind, dass sie zusammenhängend und im Fall eines Sekretionsleaders zusammenhängend und in Lesephase sind. Enhancer müssen jedoch nicht zusammenhängend sein. Das Binden erfolgt über Ligation an geeigneten Restriktionsstellen. Existieren solche Restriktionsstellen nicht, werden die synthetischen Oligonucleotidadaptoren oder -linker gemäß herkömmlichen Praktiken verwendet. Die Transkriptions- und Translationsregulations-Nucleinsäure ist im Allgemeinen für die Wirtszelle geeignet, die verwendet wird, um das Zellzyklusprotein zu exprimieren; beispielsweise werden vorzugsweise Transkriptions- und Translationsregulations-Nucleinsäuresequenzen von *Bacillus* verwendet, um das Zellzyklusprotein in *Bacillus* zu exprimieren. Zahlreiche Arten von geeigneten Expressionsvektoren und geeigneten Regulationssequenzen sind auf dem Gebiet der Erfindung für zahlreiche verschiedene Wirtszellen bekannt.

[0081] Im Allgemeinen können die Transkriptions- und Translationssequenzen Promotorsequenzen, Ribosom-Bindungsstellen, Transkriptionsstart- und -stoppssequenzen, Translationsstart- und -stoppssequenzen und Enhancer- oder Aktivatorsequenzen umfassen, sind jedoch nicht darauf beschränkt. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Regulationssequenzen einen Promotor und Transkriptionsstart- und -stoppssequenzen.

[0082] Promotorsequenzen kodieren entweder für konstitutive oder induzierbare Promotoren. Die Promotoren können entweder natürlich vorkommende Promotoren oder Hybridpromotoren sein. Hybridpromotoren, die Elemente von mehr als einem Promotor kombinieren, sind auch auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und sind in der vorliegenden Erfindung nützlich.

[0083] Darüber hinaus kann der Expressionsvektor zusätzliche Elemente umfassen. Beispielsweise kann der Expressionsvektor zwei Replikationssysteme aufweisen, die ermöglichen, dass er in zwei Organismen aufrechterhalten wird, beispielsweise in Säugetier- oder Insektenzellen zur Expression und in einem prokaryoti-

schen Wirt zum Klonieren und zur Amplifikation. Weiters enthält im Fall von integrierenden Expressionsvektoren der Expressionsvektor zumindest eine Sequenz, die zum Wirtszellengenom homolog ist, und vorzugsweise zwei homologe Sequenzen, die das Expressionskonstrukt flankieren. Der integrierende Vektor kann durch Auswahl der geeigneten homologen Sequenz zur Einbindung in den Vektor auf einen spezifischen Ort in der Wirtszelle gerichtet werden. Konstrukte für integrierende Vektoren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt.

[0084] Zusätzlich enthält der Expressionsvektor in einer bevorzugten Ausführungsform ein selektierbares Markergen, um die Selektion von transformierten Wirtszellen zu ermöglichen. Selektionsgene sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und variieren je nach verwendeter Wirtszelle.

[0085] Ein bevorzugtes Expressionsvektorsystem ist ein Retrovirus-Vektorsystem, wie es im Allgemeinen in der PCT/US97/01019 und der PCT/US97/01048 beschrieben wird, die beide hierdurch ausdrücklich durch Verweis aufgenommen sind.

[0086] Zellzyklusproteine der vorliegenden Erfindung werden durch Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der Nucleinsäure enthält, welche für ein Zellzyklusprotein kodiert, unter den zum Induzieren oder Verursachen von Expression des Zellzyklusproteins geeigneten Bedingungen produziert. Die für Zellzyklusprotein-Expression geeigneten Bedingungen variieren je nach Auswahl des Expressionsvektors und der Wirtszelle und können von Fachleuten mittels Routine-Experimenten leicht bestimmt werden. Beispielsweise erfordert die Verwendung von konstitutiven Promotoren im Expressionsvektor das Optimieren des Wachstums und der Vermehrung der Wirtszelle, während die Verwendung eines induzierbaren Promotors die geeigneten Wachstumsbedingungen für Induktion erfordert. Weiters spielt in manchen Ausführungsformen der Zeitpunkt der Ernte eine wichtige Rolle. Beispielsweise sind die bei Insektenzell-Expression verwendeten Baculovirus-Systeme lytische Viren, wodurch die Auswahl des Zeitpunktes für die Ernte eine maßgebliche Rolle für die Produktausbeute spielen kann.

[0087] Geeignete Wirtszellen umfassen Hefe, Bakterien, Archebakterien, Pilze sowie Insekten- und Tierzellen, umfassend Säugetierzellen. Von besonderem Interesse sind *Drosophila-melanogaster*-Zellen, *Saccharomyces cerevisiae* oder andere Hefen, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, SF9-Zellen, C129-Zellen, 293-Zellen, Neurospora, BHK-, CHO-, COS- und HeLa-Zellen, Fibroblasten, Schwannom-Zelllinien, sich unbegrenzt vermehrende Säugetier-Myeloid- und -Lymphoid-Zelllinien.

[0088] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zellzyklusproteine in Säugetierzellen exprimiert. Säugetier-Expressionssysteme sind auch auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und umfassen Retrovirussysteme. Ein Säugetierpromotor ist eine DNA-Sequenz, die in der Lage ist, sich an Säugetier-RNA-Polymerase zu binden und die Stromab-(3') Transkription einer Codiersequenz für Zellzyklusprotein in mRNA zu initiieren. Ein Promotor weist eine Transkriptions-Startregion auf, die üblicherweise in der Nähe des 5'-Endes der Codiersequenz angeordnet ist, sowie eine TATA-Box unter Verwendung von lokalisierten 25–30 Basenpaaren stromauf der Transkriptions-Startstelle. Es wird angenommen, dass die TATA-Box RNA-Polymerase II so steuert, dass sie RNA-Synthese an der korrekten Stelle beginnt. Ein Säugetierpromotor enthält auch ein Stromauf-Promotorelement (Enhancer-Element), typischerweise etwa 100 bis 200 Basenpaare stromauf von der TATA-Box gelegen. Ein Stromauf-Promotorelement bestimmt die Geschwindigkeit, mit der Transkription initiiert wird, und kann in beide Richtungen wirken. Als Säugetier-Promotoren von besonderer Nützlichkeit sind die Promotoren von Säugetier-Virusgenen, da die Virusgene oft stark exprimiert werden und einen breiten Wirtsbereich aufweisen. Beispiele umfassen den frühen SV40-Promotor, Mausmammatumovirus-LTR-Promotor, später Adenovirus-Hauptpromotor, Herpes-Simplex-Virus-Promotor und den CMV-Promotor.

[0089] Typischerweise sind Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssequenzen, die durch Säugetierzellen erkannt werden, Regulationsregionen, die 3' zum Translationsstoppcodon angeordnet sind und somit, zusammen mit den Promotorelementen, die Codiersequenz flankieren. Der 3'-Terminus der reifen mRNA wird durch ortsspezifische Post-Translations-Spaltung und Polyadenylierung gebildet. Beispiele für Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignale umfassen jene, die von SV40 abgeleitet sind.

[0090] Das Verfahren zur Einführung von exogener Nucleinsäure in Säugetierwirte sowie andere Wirte ist auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und variiert je nach der verwendeten Wirtszelle. Verfahren umfassen Dextran-vermittelte Transfektion, Calciumphosphat-Fällung, Polybren-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, Virusinfektion, Einkapselung des/der Polynucleotide(s) in Liposomen und direkte Mikroinjektion der DNA in Zellkerne.

[0091] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Zellzyklusproteine in Bakteriensystemen exprimiert.

Bakterien-Expressionssysteme sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt.

[0092] Ein geeigneter bakterieller Promotor ist jede beliebige Nucleinsäuresequenz, die in der Lage ist, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und die Stromab-(3')Transkription der Codiersequenz von Zellzyklusprotein in mRNA zu initiieren. Ein bakterieller Promotor weist eine Transkriptionsstartregion auf, die üblicherweise in der Nähe des 5'-Endes der Codiersequenz angeordnet ist. Diese Transkriptionsstartregion umfasst typischerweise eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle und eine Transkriptionsstartstelle. Sequenzen, die für Enzyme des Stoffwechselweges kodieren, liefern besonders nützliche Promotorsequenzen. Beispiele umfassen Promotorsequenzen, die von Zuckerstoffwechselenzymen abgeleitet sind, wie beispielsweise Galactose, Lactose und Maltose, und Sequenzen, die von biosynthetischen Enzymen abgeleitet sind, wie beispielsweise Tryptophan. Promotoren aus Bakteriophagen können auch verwendet werden und sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Weiters sind auch synthetische Promotoren und hybride Promotoren nützlich; beispielsweise ist der tac-Promotor ein Hybrid der trp- und lac-Promotorsequenzen. Darüber hinaus kann ein bakterieller Promotor natürlich vorkommende Promotoren von nichtbakteriellem Ursprung umfassen, die die Fähigkeit aufweisen, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und Transkription zu initiieren.

[0093] Zusätzlich zu einer funktionierenden Promotorsequenz ist eine wirksame Ribosomen-Bindungsstelle wünschenswert. In *E. coli* ist die Ribosomen-Bindungsstelle als die Shine-Delgarno- (SD-) Sequenz bezeichnet und umfasst ein Startcodon und eine Sequenz mit einer Länge von 3–9 Nucleotiden, die 3–11 Nucleotide stromauf vom Startcodon angeordnet ist.

[0094] Der Expressionsvektor kann auch eine Signalpeptidsequenz umfassen, die für Sekretion des Zellzyklusproteins 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 Wachstumsmedium sekretiert (gram-positive Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum, der zwischen der inneren und der äußeren Membran der Zelle angeordnet ist (gram-negative Bakterien).

[0095] Der bakterielle Expressionsvektor kann auch ein selektierbares Markergen umfassen, um die Selektion von bakteriellen Stämmen zu ermöglichen, die transformiert wurden. Geeignete Selektionsgene umfassen Gene, die die Bakterien resistent gegen Wirkstoffe wie Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin machen. Selektierbare Marker umfassen auch biosynthetische Gene wie jene in den Histidin-, Tryptophan- und Leucin-biosynthetischen Wegen.

[0096] Diese Komponenten werden in Expressionsvektoren angeordnet. Expressionsvektoren für Bakterien sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und umfassen unter anderem Vektoren für *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Streptococcus cremoris* und *Streptococcus lividans*.

[0097] Die bakteriellen Expressionsvektoren werden unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, wie beispielsweise Calciumchlorid-Behandlung, Elektroporation und dergleichen, zu bakteriellen Wirtszellen transformiert.

[0098] In einer Ausführungsform werden Zellzyklusproteine in Insektenzellen produziert. Expressionsvektoren zur Transformation von Insektenzellen, und insbesondere Baculovirus-basierte Expressionsvektoren, sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt.

[0099] In einer bevorzugten Ausführungsform wird Zellzyklusprotein in Hefezellen produziert. Hefe-Expressionssysteme sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und umfassen Expressionsvektoren für *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* und *C. maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* und *K. lactis*, *Pichia guillerimondii* und *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Yarrowia lipolytica*. Bevorzugte Promotorsequenzen zur Expression in Hefe umfassen den induzierbaren GAL1,10-Promotor, die Promotoren aus Alkoholdehydrogenase, Enolase, Glucokinase, Glucose-6-phosphat-Isomerase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Phosphofructokinase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase und das saure Phosphatasegen. Selektierbare Hefemarker umfassen ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 und ALG7, die gegenüber Tunicamycin Resistenz verleiht; das Neomycin-Phosphotransferasegen, das Resistenz gegenüber G418 verleiht; und das CUP1-Gen, das Hefe ermöglicht, in Gegenwart von Kupferionen zu wachsen.

[0100] Das Zellzyklusprotein kann unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren auch als ein Fusionsprotein gebildet werden. So kann beispielsweise zur Bildung von monoklonalen Antikörpern, sofern das erwünschte Epitop klein ist, das Zellzyklusprotein an ein Trägerprotein fusioniert werden, um

ein Immunogen zu bilden. Alternativ dazu kann das Zellzyklusprotein als ein Fusionsprotein gebildet werden, um Expression zu steigern, oder auch aus anderen Gründen. Ist beispielsweise das Zellzyklusprotein ein Zellzykluspeptid, kann die Nucleinsäure, die für das Peptid kodiert, für Expressionszwecke an andere Nucleinsäuren gebunden werden. Demähnlich können Zellzyklusproteine der Erfindung an Proteinmarkierungen, wie beispielsweise grün fluoreszierendes Protein (GFP), rot fluoreszierendes Protein (RFP), blau fluoreszierendes Protein (BFP), gelb fluoreszierendes Protein (YFP) usw., gebunden werden.

[0101] In einer Ausführungsform sind die Zellzyklus-Nucleinsäuren, -Proteine und -Antikörper der Erfindung markiert. Unter "markiert" wird hierin verstanden, dass eine Verbindung zumindest ein Element, ein Isotop oder eine chemische Verbindung angebonden hat, um die Detektion der Verbindung zu ermöglichen. Im Allgemeinen sind Markierungen in drei Klassen einzuteilen: a) isotopische Markierungen, die radioaktive oder schwere Isotope sein können; b) Immunmarkierungen, die Antikörper oder Antigene sein können; und c) färbige oder fluoreszierende Farbstoffe. Die Markierungen können in die Verbindung an jeder beliebigen Position eingebunden sein.

[0102] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Zellzyklusprotein nach Expression gereinigt oder isoliert. Zellzyklusproteine können auf zahlreiche verschiedene Arten, die Fachleuten bekannt sind, je nach den anderen Komponenten, die in der Probe vorhanden sind, isoliert oder gereinigt werden. Herkömmliche Reinigungsverfahren umfassen Elektrophorese-, molekulare, immunologische und Chromatographieverfahren, umfassend Ionenaustausch-, Hydrophob-, Affinitäts- und Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie, und Chromatofokussierung. Beispielsweise kann das Zellzyklusprotein unter Verwendung einer herkömmlichen Anti-Zellzyklus-Antikörper-Säule gereinigt werden. Ultrafiltrations- und Diafiltrationsverfahren in Verbindung mit Proteinkonzentration sind ebenfalls nützlich. Für allgemeine Anleitungen für geeignete Reinigungsverfahren siehe R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, NY (1982). Der erforderliche Reinigungsgrad hängt von der Verwendung des Zellzyklusproteins ab. In manchen Fällen ist keine Reinigung erforderlich.

[0103] Nachdem sie exprimiert und gereinigt wurden, sind die Zellzyklusproteine und -nucleinsäuren in zahlreichen Anwendungen nützlich.

[0104] Die Nucleotidsequenzen (oder deren Komplement), die für Zellzyklusproteine kodieren, finden verschiedene Anwendungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie, umfassend Verwendungen als Hybridisierungssonden, zur Chromosom- und Genkartierung und in der Bildung von Antisense-RNA und -DNA. Zellzyklusprotein-Nucleinsäure ist auch nützlich zur Herstellung von Zellzyklusproteinen durch hierin beschriebene Rekombinationsverfahren.

[0105] Das Volllängen-Nativsequenz-Zellzyklusproteingen oder Abschnitte davon können als Hybridisierungssonden für eine cDNA-Bibliothek verwendet werden, um andere Gene (beispielsweise jene, die für natürlich vorkommende Varianten von Zellzyklusprotein oder Zellzyklusprotein von anderen Spezies kodieren) zu isolieren, die eine erwünschte Sequenzidentität mit der Zellzyklusprotein-kodierenden Sequenz aufweisen. Gegebenenfalls beläuft sich die Länge der Sonden auf etwa 20 bis etwa 50 Basen. Die Hybridisierungssonden können von den hierin beschriebenen Nucleotidsequenzen oder von genomischen Sequenzen, umfassend Promotoren, Enhancer-Elemente und Introns von nativen Sequenzen, wie hierin bereitgestellt, abgeleitet sein. Ein Screening-Verfahren umfasst beispielsweise das Isolieren der Codierregion des Zellzyklusproteingens unter Verwendung der bekannten DNA-Sequenz, um eine ausgewählte Sonde von etwa 40 Basen zu synthetisieren. Hybridisierungssonden können durch zahlreiche verschiedene Markierungen markiert werden, umfassend Radionucleotide wie beispielsweise ^{32}P oder ^{35}S , oder enzymatische Markierungen wie beispielsweise alkalische Phosphatase, die über Avidin/Biotin-Bindungssysteme an die Sonde gebunden ist. Markierte Sonden mit einer Sequenzkomplementarität zu jener des Zellzyklusproteingens der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um Bibliotheken von menschlicher cDNA, genomischer DNA oder mRNA zu screenen, um zu bestimmen, an welche Mitglieder solcher Bibliotheken die Sonde hybridisiert.

[0106] Nucleotidsequenzen, die für ein Zellzyklusprotein kodieren, können auch verwendet werden, um Hybridisierungssonden zur Kartierung des Gens, das für dieses Zellzyklusprotein kodiert, und für die genetische Analyse von Personen mit genetischen Defekten zu konstruieren. Die hierin bereitgestellten Nucleotidsequenzen können unter Verwendung bekannter Verfahren, wie beispielsweise In-situ-Hybridisierung, Bindungsanalyse gegen bekannte Chromosomenmarker und Hybridisierungs-Screening mit Bibliotheken, an ein Chromosom und spezifische Regionen eines Chromosoms kartiert werden.

[0107] Nucleinsäuren, die für Zellzyklusprotein oder seine modifizierten Formen kodieren, können auch verwendet werden, um entweder transgene Tiere oder "Knock-out"-Tiere zu bilden, die wiederum in der Entwick-

lung und zum Screenen von therapeutisch nützlichen Mitteln nützlich sind. Ein transgenes Tier (z.B. eine Maus oder Ratte) ist ein Tier, das Zellen aufweist, die ein Transgen enthalten, wobei das Transgen in das Tier oder in einen Vorfahr dieses Tiers im pränatalen, z.B. in 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 cDNA, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, verwendet werden, um genomische DNA, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, gemäß den anerkannten Verfahren zu klonieren, und genomische Sequenzen werden verwendet, um transgene Tiere zu bilden, die Zellen enthalten, die die erwünschte DNA exprimieren. Verfahren zur Bildung von transgenen Tieren, insbesondere von Tieren wie Mäusen oder Ratten, haben sich zu herkömmlichen Verfahren auf dem Gebiet der Erfindung entwickelt und werden beispielsweise in den US-Patenten Nr. 4.736.866 und 4.870.009 beschrieben. Typischerweise werden bestimmte Zellen für die Zellzyklusprotein-Transgeneinbindung mittels Gewebe-spezifischer Enhancer ausgewählt. Transgene Tiere, die eine Kopie eines Transgens einbinden, das für ein Zellzyklusprotein kodiert, das in die Keimlinie des Tieres im Embryonalstadium 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 gegen beispielsweise pathologische Leiden in Verbindung mit deren übermäßiger Expression verleihen. Gemäß diesem Aspekt der Erfindung wird ein Tier mit dem Reagens behandelt, wobei eine reduzierte Inzidenz des pathologischen Leidens im Vergleich mit nichtbehandelten Tieren, die das Transgen in sich tragen, auf einen möglichen therapeutischen Einfluss auf das pathologische Leiden hinweisen würde.

[0108] Alternativ dazu können nichtmenschliche Homologe des Zellzyklusproteins verwendet werden, um ein Zellzyklusprotein-"Knock-out"-Tier zu konstruieren, das ein defektes oder geändertes Gen aufweist, welches als Resultat von homologer Rekombination zwischen dem endogenen Gen, das für ein Zellzyklusprotein kodiert, und geänderter genomischer DNA, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, das in eine embryonale Zelle des Tiers eingeführt wurde, für ein Zellzyklusprotein kodiert. Beispielsweise kann cDNA, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, verwendet werden, um gemäß bekannten Verfahren genomische DNA zu klonieren, die für ein Zellzyklusprotein kodiert. Ein Abschnitt der genomischen DNA, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, kann deletiert oder durch ein anderes Gen, beispielsweise ein Gen, das für einen selektierbaren Marker kodiert, der zur Beobachtung von Integration verwendet werden kann, ersetzt werden. Typischerweise sind mehrere Kilobasen von nicht geänderter Flankierungs-DNA (an den 5'- und 3'-Enden) in den Vektor eingebunden [siehe z.B. Thomas & Capecchi, Cell 51, 503 (1987), für eine Beschreibung homologer Rekombinationsvektoren]. Der Vektor wird in eine embryonale Stammzelllinie (z.B. durch Elektroporation) eingeführt, und Zellen, in denen die eingeführte DNA sich homolog mit der endogenen DNA rekombiniert hat, werden ausgewählt [siehe z.B. Li et al., Cell 69, 915 (1992)]. Die ausgewählten Zellen werden dann in eine Blastozyste eines Tieres (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 chimärer Embryo kann dann in ein geeignetes scheinsschwangeres weibliches Ammentier implantiert werden, und der Embryo kann ausgetragen werden, um ein "Knock-out"-Tier hervorzubringen. Nachkommenschaft, die die homolog rekombinierte DNA in ihren Keimzellen trägt, kann mittels herkömmlicher Verfahren identifiziert werden und verwendet werden, um Tiere zu züchten, in denen alle Zellen des Tiers die homolog rekombinierte DNA enthalten. Knockout-Tiere können beispielsweise aufgrund ihrer Fähigkeit, sich gegen bestimmte pathologische Leiden zu verteidigen, und aufgrund ihrer Entwicklung pathologischer Leiden, die auf die Abwesenheit des Zellzyklusproteins zurückzuführen ist, charakterisiert werden.

[0109] Es gilt zu verstehen, dass die hierin beschriebenen Modelle variiert werden können. Beispielsweise können "Knock-in"-Modelle gebildet werden, oder Modelle können anstatt Tiermodelle zu sein auch zellbasiert sein.

[0110] Nucleinsäure, die für die Zellzykluspolypeptide, Antagonisten oder Agonisten kodieren, können auch im Rahmen der Gentherapie verwendet werden. Bei Anwendungen der Gentherapie werden Gene in Zellen eingeführt, um In-vivo-Synthese eines therapeutisch wirksamen genetischen Produkts, beispielsweise für den Ersatz eines defekten Gens, zu erlangen. "Gentherapie" umfasst sowohl herkömmliche Gentherapie, wobei eine nachhaltige Wirkung durch eine einmalige Behandlung erreicht wird, als auch die Verabreichung von Gentherapiemitteln, die einmalige oder wiederholte Verabreichung einer therapeutisch wirksamen DNA oder mRNA umfasst. Antisense-RNA und -DNA können als therapeutische Mittel zum Blockieren der Expression bestimmter Gene in vivo verwendet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass kurze Antisense-Oligonucleotide in Zellen importiert werden können, in denen sie trotz ihrer geringen intrazellulären Konzentration, die durch die eingeschränkte Aufnahme durch die Zellmembran bedingt 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 steigern, z.B. durch Ersetzen ihrer negativ geladenen Phosphodiestergruppen durch ungeladene

Gruppen.

[0111] Es gibt zahlreiche Verfahren, die zum Einführen von Nucleinsäuren in lebensfähige Zellen erhältlich sind. Die Verfahren variieren je nachdem, ob die Nucleinsäure in kultivierte Zellen in vitro oder in vivo in die Zellen des Zielwirts transferiert wird. Verfahren, die für den Transfer von Nucleinsäure in Säugetierzellen in vitro geeignet sind, umfassen die Verwendung von Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion, Zellfusion, DEAE-Dextran, das Calciumphosphat-Fällverfahren usw. Die derzeit bevorzugten In-vivo-Gentransferverfahren umfassen Transfektion mit viralen (typischerweise retroviralen) Vektoren und Virushüllprotein-Liposom-vermittelte Transfektion (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205–210 [1993]). In manchen Situationen ist es wünschenswert, die Nucleinsäurequelle mit einem Mittel zu versorgen, das auf die Zielzellen gerichtet ist, wie beispielsweise mit einem Antikörper, der für ein Zelloberflächenmembran-Protein oder die Zielzelle spezifisch ist, einem Liganden für einen Rezeptor an der Zielzelle usw. Werden Liposomen eingesetzt, können Proteine, die sich an ein mit Endozytose assoziiertes Zelloberflächenmembran-Protein binden, zum Targeting und/oder dazu verwendet werden, Aufnahme zu erleichtern, z.B. Kapsidproteine oder Fragmente davon, die für einen bestimmten Zelltyp tropisch sind, Antikörper für Proteine, die im Zyklieren Internalisierung erfahren, Proteine, die auf intrazelluläre Lokalisierung gerichtet sind und intrazelluläre Halbwertszeit steigern. Das Verfahren Rezeptor-vermittelter Endozytose wird beispielsweise von Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429–4432 (1987); und Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410–3414 (1990), beschrieben. Für einen Überblick über Genmarkierung und Gentherapie-Arbeitsvorschriften siehe Anderson et al., Science 256, 808–813 (1992).

[0112] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zellzyklusproteine, Nucleinsäuren, Varianten, modifizierten Proteine, Zellen und/oder Transgen-Produkte, die diese Nucleinsäuren oder Proteine enthalten, in Screeningtests verwendet.

[0113] Identifikation des hierin bereitgestellten Zellzyklusproteins ermöglicht den Entwurf von Wirkstoff-Screeningtests für Verbindungen, die das Zellzyklusprotein binden oder die Bindung stören, Zellzyklusprotein-Aktivität modulieren und Zellzyklusaktivität modulieren.

[0114] Die hierin beschriebenen Tests verwenden vorzugsweise das menschliche Zellzyklusprotein, obwohl andere Säugetierproteine auch verwendet werden können, umfassend Nagetiere (Mäuse, Ratten, Hamster, Meerschweinchen usw.), landwirtschaftliche Nutztiere (Rinder, Schafe, Schweine, Pferde usw.) und Primaten. Diese letzten Ausführungsformen können in der Entwicklung von Tiermodellen von menschlichen Erkrankungen bevorzugt werden. In manchen Ausführungsformen können, wie hierin erläutert, Varianten oder Derivate von Zellzyklusproteinen verwendet werden, umfassend Deletions-Zellzyklusproteine, wie zuvor beschrieben.

[0115] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Verfahren das Kombinieren eines Zellzyklusproteins und eines vermutlich bioaktiven Mittels und das Bestimmen der Bindung des vermutlichen Mittels an das Zellzyklusprotein. In anderen Ausführungsformen, die nachstehend näher erläutert werden, wird Bindungsstörung oder Bioaktivität bestimmt.

[0116] Die Bezeichnung "vermutliches bioaktives Mittel" oder "exogene Verbindung" wie hierin verwendet beschreibt jedes beliebige Molekül, z.B. Protein, kleines organisches Molekül, Kohlenhydrate (umfassend Polysaccharide), Polynucleotid, Lipide usw. Im Allgemeinen werden zahlreiche Testgemische parallel mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen durchlaufen gelassen, um eine differenzierte Reaktion auf unterschiedliche Konzentrationen zu erhalten. Typischerweise dient eine dieser Konzentrationen als eine negative Kontrolle, d.h. bei Konzentration = null oder unter der Detektionsgrenze. Zusätzlich können positive Kontrollen, d.h. die Verwendung von Wirkstoffen, von denen bekannt ist, dass sie Zellzyklieren beeinflussen, verwendet werden kann. Beispielsweise ist p21 ein Molekül, von dem bekannt ist, dass es Zellen in der G1-Zellphase durch Binden von G1-Cyclin-CDK-Komplexen anhält.

[0117] Vermutliche Mittel umfassen zahlreiche chemische Klassen, obwohl sie typischerweise organische Moleküle sind, vorzugsweise kleine organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 100 und weniger als 2.500 Da. Vermutliche Mittel umfassen funktionelle Gruppen, die für strukturelle Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere für Wasserstoffbindung, erforderlich sind, und umfassen typischerweise zumindest eine Amin-, Carbonyl-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppe, vorzugsweise zumindest zwei der funktionellen chemischen Gruppen. Die vermutlichen Mittel umfassen oft zyklische Kohlenstoff- oder heterozyklische Strukturen und/oder aromatische oder polyaromatische Strukturen, die mit einer oder mehreren der obigen funktionellen Gruppen substituiert sind. Vermutliche Mittel können auch unter Biomolekülen, umfassend Peptide, Saccharide, Fettsäuren, Steroide, Purine, Pyrimidine, Derivate, strukturelle Analoga oder Kom-

bination davon, gefunden werden. Besonders bevorzugt sind Peptide.

[0118] Vermutliche Mittel werden aus zahlreichen verschiedenen Quellen erhalten, umfassend Bibliotheken synthetischer oder natürlicher Verbindungen. Beispielsweise sind zahlreiche Mittel für Zufalls- und gerichteter Synthese zahlreicher verschiedener organischer Verbindungen und Biomolekülen, umfassend Expression von randomisierten Oligonucleotiden, erhältlich. Alternativ dazu können Bibliotheken von natürlichen Verbindungen in Form von Bakterien-, Pilz-, Pflanzen- und Tierextrakten erhältlich sein oder leicht hergestellt werden. Darüber hinaus können natürlich oder synthetisch hergestellte Bibliotheken und Verbindungen leicht durch herkömmliche chemische, physikalische und biochemische Mittel modifiziert werden. Bekannte pharmakologische Mittel können gerichteten oder zufälligen chemischen Modifikationen, wie beispielsweise Acylierung, Alkylierung, Veresterung, Amidierung, unterzogen werden, um strukturelle Analoga zu bilden.

[0119] In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bibliothek verschiedener vermutlicher bioaktiver Mittel verwendet. Vorzugsweise sollte die Bibliothek eine ausreichend strukturell diverse Population randomisierter Mittel bereitstellen, um einen probabilistisch ausreichenden Bereich an Diversität zu erwirken, um Bindung an ein bestimmtes Ziel zu ermöglichen. Demgemäß sollte eine Wechselwirkungsbibliothek groß genug sein, sodass zumindest einer ihrer Teile eine Struktur aufweist, die ihm Affinität zum Ziel verleiht. Obwohl es schwierig ist, die erforderliche absolute Größe einer Wechselwirkungsbibliothek zu bemessen, liefert die Natur mit der Immunantwort einen gewissen Hinweis: eine Diversität von 10^7 – 10^8 unterschiedlichen Antikörpern führt zumindest zu einer Kombination mit ausreichender Affinität, um mit den meisten potentiellen Antigenen, denen ein Organismus ausgesetzt wird, wechselzuwirken. Veröffentlichte In-vitro-Selektionsverfahren konnten auch zeigen, 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 sie im Allgemeinen hierin vorgeschlagen wird, hat das Potential, für 20^7 (10^9) bis 20^{20} zu kodieren. Somit ermöglicht mit Bibliotheken von 10^7 bis 10^8 unterschiedlichen Molekülen das vorliegende Verfahren eine "funktionierende" Untermenge einer theoretisch vollständigen Wechselwirkungsbibliothek von 7 Aminosäuren und eine Untermenge von Formen für die 20^{20} -Bibliothek. Somit werden in einer bevorzugten Ausführungsform zumindest 10^6 , vorzugsweise zumindest 10^7 , noch bevorzugter zumindest 10^8 und am meisten bevorzugt zumindest 10^9 , unterschiedliche Sequenzen im Rahmen der vorliegenden Verfahren gleichzeitig analysiert. Bevorzugte Verfahren maximieren Bibliotheksgröße und -diversität.

[0120] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die vermutlich bioaktiven Mittel Proteine. Unter "Protein" werden hierin zumindest zwei kovalent gebundene Aminosäuren verstanden, die Proteine, Polypeptide, Oligopeptide und Peptide umfassen. Das Protein kann aus natürlich vorkommenden Aminosäuren und Peptidbindungen oder aus synthetischen Peptid-nachahmenden Strukturen bestehen. Somit bedeutet "Aminosäure" oder "Peptidrest", wie hierin verwendet, sowohl natürlich vorkommende als auch synthetische Aminosäuren. Beispielsweise werden Homophenylalanin, Citrullin und Norleucin als für die Zwecke der Erfindung geeignete Aminosäuren erachtet. "Aminosäure" umfasst auch Iminosäurereste wie beispielsweise Prolin und Hydroxyprolin. Die Seitenketten können entweder die (R)- oder (S)-Konfiguration aufweisen. In der bevorzugten Ausführungsform sind die Aminosäuren in der (S)- oder L-Konfiguration vorhanden. Werden nicht in der Natur vorkommende Seitenketten verwendet, können Nicht-Aminosäuresubstituenten verwendet werden, beispielsweise, um In-vivo-Abbau zu vermeiden oder zu verzögern. Chemische Blockierungsgruppen oder andere chemische Substituenten können auch hinzugefügt werden.

[0121] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die vermutlich bioaktiven Mittel natürlich vorkommende Proteine oder Fragmente von natürlich vorkommenden Proteinen. Somit können beispielsweise Zellextrakte, die Proteine enthalten, oder randomisierte oder gerichtete Verdauung von proteinhaltigen Zellextrakten verwendet werden. Auf diese Weise können Bibliotheken von prokaryotischen und eukaryotischen Proteinen zum Screenen in den hierin beschriebenen Systemen gebildet werden. Besonders bevorzugt in dieser Ausführungsform sind Bibliotheken von Bakterien-, Pilz-, Virus- und Säugetierproteinen, wobei Letztere bevorzugt sind und menschliche Proteine besonders bevorzugt sind.

[0122] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die vermutlich bioaktiven Mittel Peptide mit einer Länge von 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 Verdauung von natürlich vorkommenden Proteinen sein, wie zuvor erläutert, randomisierte Peptide oder "gerichtete" randomisierte Peptide sein. Unter "randomisiert" oder grammatischen Entsprechungen davon wird hierin verstanden, dass jede Nucleinsäure und jedes Peptid aus im Wesentlichen randomisierten Nucleotiden bzw. Aminosäuren besteht. Da diese zufallsveränderten Peptide (oder Nucleinsäuren, nachstehend erläutert) im Allgemeinen chemisch synthetisiert wurden, können sie jedes beliebige Nucleotid oder jede beliebige Aminosäure an jeder beliebigen Position aufweisen. Das Syn-

theseverfahren kann so konzipiert sein, dass randomisierte Proteine oder Nucleinsäuren gebildet werden, die die Bildung aller oder beinahe aller möglichen Kombinationen über die gesamte Länge der Sequenz ermöglichen, wodurch eine Bibliothek randomisierter vermutlicher bioaktiver proteinhaltiger Mittel gebildet wird.

[0123] In einer Ausführungsform ist die Bibliothek zur Gänze randomisiert, ohne Sequenzpräferenzen oder -konstanten an irgendeiner Position. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Bibliothek gerichtet. Das bedeutet, dass manche Positionen innerhalb der Sequenz entweder konstant gehalten werden oder aus einer limitierten Anzahl an Möglichkeiten ausgewählt sind. Beispielsweise sind in einer bevorzugten Ausführungsform die Nucleotide oder Aminosäurereste innerhalb einer definierten Klasse, beispielsweise jener von hydrophoben Aminosäuren, hydrophilen Resten, sterisch gerichteten (entweder kleinen oder großen) Resten, in Hinblick auf die Bildung von Cysteinen (zum Vernetzen), von Prolinen (für SH-3-Domänen), Serinen, Threoninen, Tyrosinen oder Histidinen (für Phosphorylierungsstellen) usw., randomisiert oder auf Purine eingeschränkt usw.

[0124] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die vermutlich bioaktiven Mittel Nucleinsäuren. "Nucleinsäure" oder "Oligonucleotide" oder grammatische Entsprechungen hierin bezeichnet zumindest zwei Nucleotide, die kovalent gebunden sind. Eine Nucleinsäure der vorliegenden Erfindung enthält im Allgemeinen Phosphodiesterbindungen, obwohl in manchen Fällen, wie nachstehend erläutert wird, Nucleinsäureanaloge eingebunden sind, die abwechselnde Hauptketten aufweisen können, umfassend beispielsweise Phosphoramid (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10), 1925 (1993), und die Verweise darin; 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)), Thiophosphat (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 1437 (1991); und US-Patent Nr. 5.644.048), Dithiophosphat (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2321 (1989)), O-Methylphosphoramidit-Bindungen (siehe Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press) und Peptid-Nucleinsäure-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), wovon alle hierin durch Verweis aufgenommen sind). Andere analoge Nucleinsäuren umfassen jene mit positiven Hauptketten (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6097 (1995)); nichtionischen Hauptketten (US-Patent Nr. 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 und 4.469.863; Kiedrowshi 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, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Y.S. Sanghui & P. Dan Cook (Hrsg.) (1994); 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, umfassend jene, die in den US-Patenten Nr. 5.235.033 und 5.034.506 und den Kapiteln 6 und 7 aus *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Y.S. Sanghui & P. Dan Cook (Hrsg.) (1994), beschrieben werden. Nucleinsäuren, die einen oder mehrere carbozyklische(n) Zucker enthalten, sind in der Definition von Nucleinsäuren auch inbegriffen (siehe Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.*, 169–176 (1995)). Mehrere Nucleinsäureanaloge werden in Rawls, C. & E. *News*, 35 (2. Juni 1997) beschrieben. Alle diese Verweise sind hierdurch ausdrücklich über Verweis aufgenommen. Diese Modifikationen der Ribose-Phosphat-Hauptkette können durchgeführt werden, um die Addition zusätzlicher Gruppierungen wie beispielsweise Markierungen zu erleichtern oder um die Stabilität und die Halbwertszeit solcher Moleküle in physiologischen Umgebungen zu steigern. Weiters können Gemische von natürlich vorkommenden Nucleinsäuren und Analoga hergestellt werden. Alternativ dazu können Gemische verschiedener Nucleinsäureanaloge und Gemische natürlich vorkommender Nucleinsäuren und Analoga gebildet werden. Die Nucleinsäuren können, wie spezifiziert, einzelsträngig oder doppelsträngig sein oder Abschnitte sowohl von doppel- als auch einzelsträngigen Sequenzen enthalten. Die Nucleinsäure kann DNA, sowohl genomische als auch cDNA, RNA oder ein Hybrid sein, worin die Nucleinsäure jede mögliche Kombination von Desoxyribo- und Ribonucleotiden und jede mögliche Kombination von Basen, umfassend Uracil, Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin, Inosin, Xanthin, Hypoxanthin, Isocytosin, Isoguanin usw., enthält.

[0125] Wie zuvor im Allgemeinen für Proteine beschrieben, können vermutliche Nucleinsäure-Bioaktivmittel natürlich vorkommende Nucleinsäuren, randomisierte Nucleinsäuren oder "gerichtete" randomisierte Nucleinsäuren sein. Beispielsweise können Verdäue von prokaryotischen oder eukaryotischen Genomen wie zuvor für Proteine beschrieben verwendet werden.

[0126] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die vermutlich bioaktiven Mittel organische chemische Gruppierungen, wovon eine Vielzahl in der Literatur vorhanden sind.

[0127] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die vermutlich bioaktiven Mittel an einen Fusionspartner

gebunden. Unter "Fusionspartner" oder "funktionelle Gruppe" wird hierin eine Sequenz verstanden, die mit dem vermutlich bioaktiven Mittel assoziiert ist und allen Teilen der Bibliothek in dieser Klasse eine gemeinsame 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 vermutlich bioaktiven Mittel in einer in Bezug auf ihre Konformation eingeschränkten oder stabilen Form bereitstellen; b) Targeting-Sequenzen, die die Anordnung des vermutlich bioaktiven Mittels in einem subzellulären oder extrazellulären Kompartiment ermöglicht; c) Rettungssequenzen, die die Reinigung oder Isolierung entweder der vermutlich bioaktiven Mittel oder der Nucleinsäuren, die für diese kodieren, ermöglichen; d) Stabilitätssequenzen, die dem vermutlich bioaktiven Mittel oder der Nucleinsäure, die dafür kodiert, Stabilität oder Schutz vor Abbau, z.B. Resistenz gegen proteolytischen Abbau, verleiht; e) Dimerisierungssequenzen, die dem Peptid Dimerisierung ermöglichen; oder f) jede beliebige Kombination aus a), b), c), d) und e) sowie Linkersequenzen je nach Bedarf.

[0128] In einer Ausführungsform der hierin beschriebenen Verfahren werden Abschnitte von Zellzyklusproteinen verwendet; in einer bevorzugten Ausführungsform werden Proteine mit Zellzyklusaktivität verwendet. Zellzyklusaktivität wird nachstehend näher beschrieben und umfasst Bindungsaktivität zu zumindest einem IAP oder zu Zellzyklusproteinmodulatoren, wie nachstehend noch näher beschrieben. Weiters können die hierin beschriebenen Tests entweder isolierte Zellzyklusproteine oder Zellen, die Zellzyklusproteine umfassen, verwenden.

[0129] Im Allgemeinen ist in einer bevorzugten Ausführungsform der hierin beschriebenen Verfahren, beispielsweise für Bindungstests, das Zellzyklusprotein oder das vermutliche Mittel nicht-diffundierend an einen unlöslichen Träger, der isolierte Probenaufnehmende Bereiche aufweist (z.B. Mikrotiterplatte, Matrix usw.), gebunden. Die unlöslichen Träger können aus jeder beliebigen Zusammensetzung hergestellt sein, an die die Zusammensetzungen gebunden werden können, ist leicht von löslichem Material zu trennen und ist andererseits mit dem gesamten Screeningverfahren kompatibel. Die Oberfläche solcher Träger kann fest oder porös und von jeder beliebigen Form sein. Beispiele solcher unlöslicher Träger umfassen Mikrotiterplatten, Matrizen, Membranen und Kügelchen. Diese sind typischerweise aus Glas, Kunststoff (z.B. Polystyrol), Polysacchariden, Nylon oder Nitrozellulose, Teflon™ usw. hergestellt. Mikrotiterplatten und Matrizen sind besonders praktisch, da zahlreiche Tests gleichzeitig unter Verwendung geringer Mengen an Reagenzien und Proben durchgeführt werden können. In manchen Fällen werden magnetische Kügelchen und dergleichen eingebunden. Die besondere Weise, die Zusammensetzung zu binden, ist nicht maßgeblich, solange sie mit den Reagenzien und den gesamten Verfahren der Erfindung kompatibel ist, die Aktivität der Zusammensetzung aufrechterhält und nicht-diffundierend ist. Bevorzugte Bindungsverfahren umfassen die Verwendung von Antikörpern (die weder die Ligandenbindungsstelle noch die Aktivierungssequenz sterisch blockieren, wenn das Protein an den Träger gebunden wird), direkte Bindung an "klebrige" oder ionische Träger, chemisches Vernetzen, die Synthese des Proteins oder Mittels an der Oberfläche usw. In manchen Ausführungsformen können IAP verwendet werden. Nach der Bindung des Proteins oder Mittels wird überschüssiges, nicht gebundenes Material durch Waschen entfernt. Die Proben aufnehmenden Bereiche können dann durch Inkubation mit Rinderserumalbumin (BSA), Casein oder anderen unschädlichen Proteinen oder anderen Gruppierungen blockiert werden. Auch in diese Erfindung eingebunden sind Screeningtests, worin feste Träger nicht verwendet werden; Beispiele dafür werden nachstehend beschrieben.

[0130] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Zellzyklusprotein an den Träger gebunden, und ein vermutliches bioaktives Mittel wird dem Test zugesetzt. Alternativ dazu wird das vermutliche Mittel an den Träger gebunden, und das Zellzyklusprotein wird zugesetzt. Neue Bindungsmittel umfassen spezifische Antikörper, nicht in der Natur vorkommende Bindungsmittel, die in Screens chemischer Bibliotheken identifiziert werden, Peptidanaloga usw. Von besonderem Interesse sind Screeningtests für Mittel, die eine geringe Toxizität gegenüber menschlichen Zellen aufweisen. Zahlreiche verschiedene Tests können für diesen Zweck verwendet werden, umfassend markierte In-vitro-Protein-Protein-Bindungstests, Gelretentionsanalyse, Immuntests für Proteinbindung, funktionelle Tests (Phosphorylierungstests usw.) und dergleichen.

[0131] Die Bestimmung der Bindung des vermutlich bioaktiven Mittels an das Zellzyklusprotein kann auf zahlreiche verschiedene Weisen erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das vermutlich bioaktive Mittel markiert, und Bindung wird direkt bestimmt. Beispielsweise kann dies durch Binden des gesamten oder eines Teils des Zellzyklusproteins an einen festen Träger, Hinzufügen eines markierten vermutlichen Mittels (beispielsweise mit einer fluoreszierenden Markierung), Abwaschen überschüssiger Reagenzien und Bestimmen, ob die Markierung am festen Träger vorhanden ist oder nicht, erfolgen. Verschiedene Blockierungs- und Waschschritte können gemäß dem auf dem Gebiet der Erfindung vorhandenen Wissen verwendet werden.

[0132] Unter "markiert" wird hierin verstanden, dass die Verbindung entweder direkt oder indirekt mit einer Markierung markiert ist, die ein nachweisbares Signal bereitstellt, z.B. Radioisotop, Fluoreszenzmittel, Enzym, Antikörper, Teilchen wie magnetische Teilchen, Chemilumineszenzmittel oder spezifisch bindende Moleküle usw. Spezifisch bindende Moleküle umfassen Paare, wie Biotin und Streptavidin, Digoxin und Antidigoxin usw. Für die spezifischen Bindungsteile würden die komplementären Teile normalerweise mit einem Molekül markiert werden, das für Detektion sorgt, und dies wie zuvor beschrieben gemäß bekannten Verfahren. Die Markierung kann direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal bereitstellen.

[0133] In manchen Ausführungsformen wird nur eine der Komponenten markiert. Beispielsweise können die Proteine (oder proteinhaltigen vermutlichen Mittel) an Tyrosinpositionen unter Verwendung von ^{125}I oder mit Fluorophoren markiert werden. Alternativ dazu kann mehr als eine Komponente mit verschiedenen Markierungen, unter Verwendung von ^{125}I für die Proteine beispielsweise und eines Fluorophors für die vermutlichen Mittel, markiert werden.

[0134] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung des vermutlich bioaktiven Mittels durch kompetitive Bindungstests bestimmt. In dieser Ausführungsform ist der Konkurrent eine Bindungsgruppierung, von der bekannt ist, dass sie das Zielmolekül (d.h. Zellzyklusprotein), wie beispielsweise Antikörper, Peptid, Bindungspartner, Ligand usw., bindet. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Konkurrent IAP. Unter bestimmten Bedingungen kann kompetitive Bindung beispielsweise zwischen dem bioaktiven Mittel und der Bindungsgruppierung auftreten, wobei die Bindungsgruppierung das bioaktive Mittel verdrängt. Dieser Test kann verwendet werden, um vermutliche Mittel zu bestimmen, die die Bindung zwischen Zellzyklusproteinen und IAP stören. "Bindungsstörung" wie hierin verwendet bedeutet, dass sich die native Bindung des Zellzyklusproteins bei Gegenwart des vermutlichen Mittels verändert. Die Bindung kann aufgehoben werden oder kann reduzierte Affinität aufweisen. Daher wird in einer Ausführungsform Störung beispielsweise durch eine Konformationsänderung verursacht und nicht durch direkte Konkurrenz gegenüber der nativen Bindungsstelle.

[0135] In einer Ausführungsform ist das vermutliche bioaktive Mittel markiert. Entweder das vermutliche bioaktive Mittel oder der Konkurrent oder beide wird/werden zuerst dem Protein ausreichend lange zugesetzt, dass Bindung, sofern vorhanden, ermöglicht wird. Inkubationen können bei jeder beliebigen Temperatur, die die optimale Aktivität erleichtert, durchgeführt werden, typischerweise zwischen 4 und 40 °C. Inkubationszeiten werden für optimale Aktivität ausgewählt, können jedoch auch so optimiert werden, dass rasches Screenen mit hohem Durchsatz ermöglicht wird. Typischerweise ist eine Dauer von zwischen 0,1 und 1 Stunde ausreichend. Überschüssiges Reagens wird im Allgemeinen entfernt oder gewaschen. Die zweite Komponente wird dann zugesetzt, und es wird auf Gegenwart oder Abwesenheit der markierten Komponente untersucht, um Bindung nachzuweisen.

[0136] In einer bevorzugten Ausführung wird der Konkurrent zuerst zugesetzt, woraufhin das vermutliche bioaktive Mittel folgt. Verdrängung des Konkurrenten ist ein Hinweis darauf, dass das vermutliche bioaktive Mittel sich an das Zellzyklusprotein bindet und somit in der Lage ist, die Aktivität des Zellzyklusproteins zu binden und gegebenenfalls zu modulieren. In dieser Ausführungsform können beide Komponenten markiert werden. Somit weist beispielsweise, sofern der Konkurrent markiert ist, die Gegenwart von Markierung in der Waschlösung auf Verdrängung durch das Mittel hin. Alternativ dazu weist, sofern das vermutliche bioaktive Mittel markiert ist, die Gegenwart der Markierung auf dem Träger auf Verdrängung hin.

[0137] In einer alternativen Ausführungsform wird das vermutlich bioaktive Mittel zuerst, unter Inkubation und Waschen, zugesetzt, woraufhin der Konkurrent folgt. Die Abwesenheit von Bindung durch den Konkurrent kann darauf hinweisen, dass das bioaktive Mittel an das Zellzyklusprotein mit einer höheren Affinität gebunden ist. Somit kann, sofern das vermutliche bioaktive Mittel markiert ist, die Gegenwart der Markierung am Träger, in Verbindung mit fehlender Konkurrentenbindung, darauf hinweisen, dass das vermutliche Mittel in der Lage ist, sich an das Zellzyklusprotein zu binden.

[0138] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Verfahren differenzielles Screening zur Identifikation von bioaktiven Mitteln, die in der Lage sind, die Aktivität der Zellzyklusproteine zu modulieren. Solche Tests können mit dem Zellzyklusprotein oder mit Zellen, die das Zellzyklusprotein enthalten, durchgeführt werden. In einer Ausführungsform umfassen die Verfahren das Kombinieren eines Zellzyklusproteins und eines Konkurrenten in einer ersten Probe. Eine zweite Probe umfasst ein vermutliches bioaktives Mittel, ein Zellzyklusprotein und einen Konkurrenten. Die Bindung des Konkurrenten wird in beiden Proben bestimmt, und eine Änderung oder ein Unterschied der Bindung zwischen den zwei Proben weist auf die Gegenwart eines Mittels hin, das in der Lage ist, sich an das Zellzyklusprotein zu binden und möglicherweise seine Aktivität zu modulieren. Dies bedeutet, dass, sofern die Bindung des Konkurrenten Unterschiede zwischen zweiter Probe und

erster Probe aufweist, das Mittel in der Lage ist, das Zellzyklusprotein zu binden.

[0139] Alternativ dazu verwendet eine bevorzugte Ausführungsform differenzielles Screening zur Identifikation von Wirkstoffkandidaten, die sich an das native Zellzyklusprotein binden, sich jedoch nicht an modifizierte Zellzyklusproteine binden können. Die Struktur des Zellzyklusproteins kann modelliert und in rationellem Wirkstoffdesign verwendet werden, um Mittel zu synthetisieren, die mit dieser Stelle wechselwirken. Wirkstoffkandidaten, die Zellzyklusbioaktivität beeinflussen, können auch durch das Screenen von Wirkstoffen auf ihre Fähigkeit identifiziert werden, die Aktivität des Proteins entweder zu steigern oder zu reduzieren.

[0140] 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 erzielen. Inkubation von allen Proben erfolgt über eine Zeitspanne hinweg, die für die Bindung des Mittels an das Protein ausreichend ist. Nach Inkubation werden alle Proben von nichtspezifisch gebundenem Material freigespült, und die Menge von gebundenem, im Allgemeinen markiertem Mittel wird bestimmt. Beispielsweise können die Proben bei Verwendung einer radioaktiven Markierung in einem Szintillationszähler gezählt werden, um die Menge gebundener Verbindung zu bestimmen.

[0141] Zahlreiche andere Reagenzien können in die Screening-Tests eingebunden werden. Diese umfassen Reagenzien wie Salze, neutrale Proteine, z.B. Albumin, Detergenzien usw., die verwendet werden können, um optimale Protein-Protein-Bindung zu erleichtern und/oder nichtspezifische oder Hintergrundwechselwirkungen zu reduzieren. Auch können Reagenzien, die auf andere Weise die Wirksamkeit des Tests verbessern, wie beispielsweise Proteaseinhibitoren, Nucleaseinhibitoren, antimikrobielle Mittel usw., verwendet werden. Das Komponentengemisch kann in jeder Reihenfolge zusammengesetzt werden, die zur erforderlichen Bindung führt.

[0142] Das Screenen auf Mittel, die die Aktivität eines Zellzyklusproteins modulieren, kann auch durchgeführt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen Verfahren zum Screenen auf ein bioaktives Mittel, das in der Lage ist, die Aktivität eines Zellzyklusproteins zu modulieren, die Schritte des Zusetzens eines vermutlich bioaktiven Mittels zu einer Probe eines Zellzyklusproteins (oder Zellen, die ein Zellzyklusprotein umfassen) und des Bestimmens einer Veränderung der biologischen Aktivität des Zellzyklusproteins. "Modulieren der Aktivität eines Zellzyklusproteins" umfasst eine Steigerung der Aktivität, eine Senkung der Aktivität oder eine Veränderung der Art oder Beschaffenheit der vorliegenden Aktivität. Somit kann in dieser Ausführungsform das vermutliche Mittel sich an ein Zellzyklusprotein binden (obwohl dies nicht notwendig sein muss) und sollte seine biologische oder biochemische Aktivität wie hierin definiert verändern. Die Verfahren umfassen sowohl In-vitro-Screeningverfahren, wie im Allgemeinen zuvor bereits erläutert, als auch In-vivo-Screening von Zellen auf Veränderungen bezüglich der Gegenwart, Verteilung, Aktivität oder Menge von Zellzyklusprotein.

[0143] Somit umfassen in dieser Ausführungsform die Verfahren das Kombinieren einer Zellzyklusproteinprobe und eines vermutlich bioaktiven Mittels und das Bewerten der Wirkung auf die Aktivität des Zellzyklusproteins. Unter "Zellzyklusproteinaktivität" oder grammatischen Entsprechungen davon wird hierin zumindest eine der Aktivitäten von Zellzyklusproteinen verstanden, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, seine Fähigkeit, den Zellzyklus zu beeinflussen, sich an IAP zu binden, Tumorstadium zu unterdrücken, Zellvermehrung zu stimulieren oder zu fördern, p53-Bindungsstellen-kontrollierte Promotoren zu aktivieren, Apoptose zu modulieren und/oder Zellreaktionen auf Stress zu modulieren.

[0144] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Aktivität des Zellzyklusproteins herabgesetzt; in einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die Aktivität des Zellzyklusproteins verstärkt. Somit sind bioaktive Mittel, die Antagonisten darstellen, in manchen Ausführungsformen bevorzugt, während bioaktive Mittel, die Agonisten sind, in manchen anderen Ausführungsformen bevorzugt werden können.

[0145] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung Verfahren zum Screenen von bioaktiven Mitteln bereit, die in der Lage sind, die Aktivität eines Zellzyklusproteins zu modulieren. Die Verfahren umfassen den Zusatz eines vermutlichen bioaktiven Mittels wie zuvor definiert zu einer Zelle, die Zellzyklusproteine umfasst. Bevorzugte Zelltypen umfassen beinahe jede beliebige Zelle. Die Zellen enthalten eine rekombinante Nucleinsäure, die für ein Zellzyklusprotein kodiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bibliothek von vermutlichen Mitteln an zahlreichen verschiedenen Zellen getestet.

[0146] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Zellzyklusprotein und eine Zellzyklusnucleinsäure, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, bereit, wobei diese Proteine Apoptose in einer eukaryotischen Zelle, noch bevorzugter in einer Säugertierzelle, modulieren. Diese Modulation von Apoptose um-

fasst vorzugsweise Wechselwirkung zwischen einem Zellzyklusprotein und einem IAP, und noch bevorzugter bindet sie Modulation des Ubiquitinierungszustandes eines IAP durch ein Zellzyklusprotein ein. In einer Ausführungsform tritt diese Modulierung von Ubiquitinierung durch Modulation von Ubiquitin-Proteinligaseaktivität oder Ubiquitin-Konjugationsaktivität eines IAP (die Aktivitäten werden von Yang et al., Science 288, 874–877 (2000), und Hauser et al., JCB 141, 1415–1422 (2000), beschrieben, die beide hierin durch Verweis vollständig aufgenommen sind) durch ein Zellzyklusprotein ein. In einer bevorzugten Ausführungsform beeinflusst die Modulation des Ubiquitinierungszustandes eines IAP durch ein Zellzyklusprotein den Abbau des IAP.

[0147] In einer bevorzugten Ausführungsform bindet Modulation von Apoptose durch ein Zellzyklusprotein die Modulation von Caspaseaktivität ein. Die Modulation von Caspaseaktivität durch ein Zellzyklusprotein tritt vorzugsweise durch Modulation des Ubiquitinierungszustandes einer Caspase durch ein Zellzyklusprotein ein, vorzugsweise durch Modulation von Ubiquitin-Proteinligaseaktivität oder Ubiquitin-Konjugationsaktivität eines IAP in Bezug auf ein Caspasesubstrat durch ein Zellzyklusprotein, und noch bevorzugter bewirkt solche Modulation des Ubiquitinierungszustandes einer Caspase ihren Abbau.

[0148] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Zellzyklusprotein und eine Zellzyklusnucleinsäure, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, bereit, worin diese Proteine Apoptose modulieren, worin die Modulation die Aufnahme eines IAP in p53 oder ein p53-hältiges Proteinkonglomerat einbindet. Unter Proteinkonglomerat wird eine Anordnung von Proteinen verstanden, worin diese Proteine auf Molekülebene mit zumindest einem der Teile der Anordnung wechselwirken und die Anordnung eine funktionelle oder multifunktionelle Einheit bildet, jedoch nicht ganz anders im Vergleich zu Anordnungen von Protein-Untereinheiten, die Holoenzyme bilden. In einer bevorzugten Ausführungsform moduliert der aufgenommene IAP die Ubiquitinierung einer Komponente eines p53-hältigen Proteinkonglomerats. In einer bevorzugten Ausführungsform moduliert der aufgenommene IAP die Ubiquitinierung von p53. In einer Ausführungsform moduliert ein Zellzyklusprotein die Ubiquitinierung von p53 als Reaktion auf ein von außen kommendes Signal, wie beispielsweise bei der Reaktion von Thymozyten auf ein extrinsisches Signal, worin die Reaktion durch Apoptose gekennzeichnet ist. In einer Ausführungsform moduliert ein Zellzyklusprotein die Ubiquitinierung von p53 als Reaktion auf ein intrinsisches Signal, beispielsweise als Reaktion auf Aktivierung des ras-Signaltransduktionsweges und Veränderungen des Phosphorylierungszustandes von intrazellulären Molekülen. In einer bevorzugten Ausführungsform beeinflusst die Modulation von p53-Ubiquitinierung durch ein Zellzyklusprotein den p53-Abbau. In einer bevorzugten Ausführungsform schließt Modulation von Apoptose durch ein Zellzyklusprotein Zellzyklusproteinmodulation von p53-Abbau und Expression von p53-Zielgenen ein. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen p53-Zielgene den cdk-Inhibitor p27 und Mitglieder der Bcl2-Genfamilie.

[0149] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Zellzyklusprotein und eine Zellzyklusnucleinsäure, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, bereit, worin die Proteine Apoptose durch Aufnahme einer Caspase in den Nucleus moduliert, vorzugsweise über Assoziation mit einem IAP. In einer bevorzugten Ausführungsform bewirkt die aufgenommene Caspase zumindest eine proteolytische Reaktion im Nucleus, wobei diese Reaktion charakteristisch für Apoptose ist.

[0150] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Zellzyklusprotein und eine Zellzyklusnucleinsäure, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, bereit, worin die Proteine das Fortschreiten durch den Zellzyklus modulieren, worin die Modulation die Aufnahme eines IAP in p53 oder in ein p53-hältiges Proteinkonglomerat umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform moduliert der aufgenommene IAP Ubiquitinierung einer Komponente eines p53-hältigen Proteinkonglomerats. In einer bevorzugten Ausführungsform moduliert der aufgenommene IAP Ubiquitinierung von p53. In einer Ausführungsform moduliert ein Zellzyklusprotein Ubiquitinierung von p53 als Reaktion auf ein extrinsisches Signal, beispielsweise als Reaktion auf Bindung eines extrazellulären Liganden an einen Rezeptor an der Zelloberfläche. In einer Ausführungsform moduliert ein Zellzyklusprotein Ubiquitinierung von p53 als Reaktion auf ein intrinsisches Signal, beispielsweise als Reaktion auf Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges und Veränderungen des Phosphorylierungszustandes von intrazellulären Molekülen. In einer bevorzugten Ausführungsform beeinflusst die Modulation von p53-Ubiquitinierung durch ein Zellzyklusprotein p53-Abbau. In einer bevorzugten Ausführungsform schließt die Modulation des Fortschritts durch den Zellzyklus durch ein Zellzyklusprotein die Zellzyklusprotein-Modulation von p53-Abbau und Expression von p53-Zielgenen ein. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen p53-Zielgene den cdk-Inhibitor p27 und Teile der Bcl2-Genfamilie.

[0151] Auch kann Screenen auf Mittel, die Fortschreiten durch den Zellzyklus modulieren oder Zellzyklusaktivität modulieren, durchgeführt werden. Der Nachweis von Zellzyklusregulierung kann wie Fachleuten bekannt ist erfolgen. In einer Ausführungsform werden Indikatoren des Zellzyklus verwendet. Es gibt zahlreiche Parameter, die ausgewertet oder ausgetestet werden können, um den Nachweis von Veränderungen der Zellzyk-

lusregulierung zu ermöglichen, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, Tests zur Zellebensfähigkeit, Tests zur Bestimmung, ob Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase stehen geblieben sind ("Zellvermehrungstests"), und Tests zur Bestimmung, in welcher Zellphase die Zellen stehen geblieben sind ("Zellphasentest"). Durch Testen oder Messen eines oder mehrerer dieser Parameter ist es möglich, nicht nur Veränderungen der Zellzyklusregulierung festzustellen, sondern auch Veränderungen verschiedener Schritte des Zellzyklusregulierungsweges. Dies kann erfolgen, um native Zellen, beispielsweise zur Quantifizierung der Aggressivität eines Tumorzelltyps, oder um die Wirkung von vermutlichen Wirkstoffen zu bewerten, die auf ihre Wirkung auf Zellzyklusregulierung getestet werden. Auf diese Weise kann rasches, exaktes Screenen auf vermutliche Mittel durchgeführt werden, um Mittel zu identifizieren, die Zellzyklusregulierung modulieren.

[0152] Somit sind die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren nützlich, um bioaktive Mittel zu untersuchen, die eine Zelle oder eine Zellpopulation dazu bringen können, entweder von einer zu einer anderen Wachstumsphase überzugehen oder in einer Wachstumsphase stehen zu bleiben. In manchen Ausführungsformen sind die Zellen in einer bestimmten Wachstumsphase angehalten, und es ist wünschenswert, sie entweder aus dieser Phase heraus oder in eine neue Phase zu bringen. Alternativ dazu kann es wünschenswert sein, eine Zelle zu zwingen, in einer Phase, beispielsweise in G1, stehen zu bleiben und sich im Zellzyklus nicht weiter zu bewegen. Demähnlich kann es unter bestimmten Umständen wünschenswert sein, eine nicht stehen gebliebene, jedoch sich langsam bewegende Zellpopulation entweder in die nächste Phase oder durch den Zellzyklus zu beschleunigen oder das Einsetzen der nächsten Phase zu verzögern. Beispielsweise kann es möglich sein, die Aktivitäten bestimmter Enzyme, beispielsweise von Kinasen, Phosphatasen, Proteasen oder Ubiquitinierungsenzymen, die zum Einsetzen von Zellphasenänderungen beitragen, zu ändern.

[0153] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die hierin beschriebenen Verfahren an Zellen durchgeführt, die nicht in der G1-Phase stehen geblieben sind; das bedeutet, dass sie rasch oder unkontrollierbar wachsen und sich vermehren, wie beispielsweise Tumorzellen. So werden vermutliche Mittel ausgewertet, um Mittel zu _ finden, die die Zellzyklusregulierung verändern können, d.h. die Zellen dazu veranlassen können, an Zellzykluskontrollpunkten wie beispielsweise in G1 stehen zu bleiben (wobei das Stehenbleiben in anderen Phasen wie S, G2 oder M auch wünschenswert ist). Alternativ dazu werden vermutliche Mittel ausgewertet, um Mittel zu finden, die Vermehrung einer Zellpopulation verursachen, d.h. die Zellen, die im Allgemeinen in G1 stehen geblieben sind, ermöglichen, sich neuerlich zu vermehren; beispielsweise betrifft dies periphere Blutzellen, terminal differenzierte Zellen, Stammzellen in Kultur usw.

[0154] Demgemäß stellt die Erfindung Verfahren zum Screenen auf Veränderungen der Zellzyklusregulierung einer Zellpopulation bereit. Unter "Änderung" oder "Modulation" (die hierin austauschbar verwendet werden) werden im Allgemeinen eines von zwei Dingen verstanden. In einer bevorzugten Ausführungsform resultiert die Änderung in einer Veränderung des Zellzyklus einer Zelle, d.h. eine sich vermehrende Zelle bleibt in einer beliebigen der Zyklusphasen stehen oder stehen gebliebene Zellen bewegen sich aus ihrer angehaltenen Phase heraus und beginnen den Zellzyklus, im Vergleich zu einer anderen Zelle oder innerhalb derselben Zelle unter anderen Bedingungen. Alternativ dazu kann der Fortschritt einer Zelle durch jede beliebige Phase verändert werden; das heißt, dass eine Beschleunigung oder Verlängerung der Zeitspanne auftreten kann, die Zellen benötigen, um eine bestimmte Wachstumsphase zu durchwandern. Beispielsweise kann die Zelle normalerweise eine G1-Phase von mehreren Stunden durchwandern, und der Zusatz eines Mittels kann diese G1-Phase verlängern.

[0155] Die Messungen können bestimmt werden, worin alle Messungen unter denselben Bedingungen oder unter unterschiedlichen Bedingungen, mit oder ohne bioaktive Mittel, oder in verschiedenen Phasen des Zellzyklusprozesses, vorgenommen werden können. Beispielsweise kann eine Messung von Zellzyklusregulation in einer Zelle oder einer Zellpopulation bestimmt werden, worin ein vermutliches bioaktives Mittel vorhanden ist und worin das vermutliche bioaktive Mittel nicht vorhanden ist. In einem anderen Beispiel werden die Messungen von Zellzyklusregulierung bestimmt, worin sich die Bedingungen oder Umgebungen der Zellen oder der Zellpopulationen voneinander unterscheiden. Beispielsweise können die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von vorangehender oder anschließender Aussetzung gegenüber physiologischen Signalen, beispielsweise Hormonen, Antikörpern, Peptiden, Antigenen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Aktionspotentialen, pharmakologischen Mitteln umfassend Chemotherapeutika, Strahlung, karzinogenen Mitteln oder anderen Zellen (d.h. Zell-Zell-Kontakten), ausgewertet werden. In einem anderen Beispiel werden die Messungen von Zellzyklusregulierung in verschiedenen Phasen des Zellzyklusprozesses gemessen. In wiederum einem anderen Beispiel werden die Messungen von Zellzyklusregulierung abgenommen, worin die Bedingungen dieselben sind und die Änderungen zwischen einer Zelle oder Zellpopulation und einer anderen Zelle oder Zellpopulation vorhanden sind.

[0156] Unter einer "Zellpopulation" oder "Bibliothek von Zellen" werden hierin zumindest zwei Zellen verstanden, wobei zumindest etwa 10^3 bevorzugt sind, zumindest etwa 10^6 besonders bevorzugt sind und zumindest etwa 10^8 bis 10^9 insbesondere bevorzugt sind. Die Population oder Probe kann ein Gemisch aus verschiedenen Zelltypen von entweder primären oder sekundären Kulturen enthalten, obwohl Proben mit nur einem einzelnen Zelltyp bevorzugt werden, beispielsweise kann die Probe aus einer Zelllinie, insbesondere Tumorzelllinien, stammen, wie nachstehend beschrieben wird. Die Zellen können sich in jeder Zellphase, entweder synchron oder nicht, umfassend M, G1, S und G2, befinden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Zellen, die sich replizieren oder proliferieren, verwendet; dies kann die Verwendung von retroviralen Vektoren zur Einführung von vermutlichen bioaktiven Mitteln ermöglichen. Alternativ dazu können nicht-replizierende Zellen und andere Vektoren (wie beispielsweise Adenovirus- und Lentivirus-Vektoren) verwendet werden. Darüber hinaus sind die Zellen, auch wenn dies nicht erforderlich ist, mit Farbstoffen und Antikörpern kompatibel.

[0157] Bevorzugte Zelltypen zur Verwendung in der Erfindung umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Säugetierzellen, umfassend Tierzellen (Nagetiere, umfassend Mäuse, Ratten, Hamster und Wüstenrennmäuse), Primatenzellen und menschliche Zellen, insbesondere umfassend Tumorzellen aller Typen, umfassend Brust, Haut, Lungen, Zervix, Kolorektal, Leukämie, Gehirn usw.

[0158] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Verfahren das Testen eines oder mehrerer von verschiedenen Zellparametern, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, Zelllebensfähigkeit, Zellvermehrung und Zellphase. Andere Parameter umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, die Fähigkeit, den Zellzyklus zu beeinflussen, die Bindung an zumindest einen IAP, Suppression von Tumorwachstum, Aktivierung von p53-Bindungsstellen-kontrollierten Promotoren, Modulation von Apoptose und/oder Modulation von Zellreaktionen auf Stress.

[0159] In einer bevorzugten Ausführungsform wird Zelllebensfähigkeit getestet, um sicherzustellen, dass ein Mangel an Zellveränderungen auf experimentelle Bedingungen (d.h. die Einführung eines vermutlichen bioaktiven Mittels) und nicht auf Zelltod zurückzuführen ist. Es gibt viele verschiedene geeignete Zelllebensfähigkeitstests, die verwendet werden können, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, Lichtstreuung, Lebensfähigkeit-Farbstofffärbungen und Ausschlussfarbstoff-Färbungen.

[0160] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Lichtstreuungstest als Lebensfähigkeitstest verwendet, wie er auf dem Gebiet der Erfindung gut bekannt ist. Beispielsweise weisen Zellen, wenn sie im FACS betrachtet werden, bestimmte Eigenschaften auf, die durch ihre Lichtstreu-Eigenschaften nach vorne und bei 90° (zur Seite) gemessen werden. Diese Streu-Eigenschaften stehen für die Größe, Form und Körnchengehalt der Zellen. Diese Eigenschaften sind für zwei Parameter verantwortlich, die als eine Anzeige für die Lebensfähigkeit zu messen sind. Kurz beschrieben kondensiert die DNA von absterbenden oder abgestorbenen Zellen im Allgemeinen, was die 90° -Streuung verändert; demähnlich kann Bläschenbildung in der Membran die Vorwärtsstreuung verändern. Änderungen in der Intensität der Lichtstreuung oder der Zellbrechungsindex weisen auf Änderungen der Lebensfähigkeit hin.

[0161] Somit wird im Allgemeinen in Lichtstreuungs-Tests eine lebende Zellpopulation eines bestimmten Zelltyps ausgewertet, um ihre Vorwärts- und Seitwärts-Streueigenschaften zu bestimmen. Dies legt einen Standard für Streuung fest, der in weiterer Folge verwendet werden kann.

[0162] In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet der Lebensfähigkeitstest einen Lebensfähigkeits-Farbstoff. Es gibt zahlreiche bekannte Lebensfähigkeitsfarbstoffe, die abgestorbene oder absterbende Zellen färben, jedoch nicht wachsende Zellen färben. Beispielsweise ist Annexin V ein Mitglied einer Proteinfamilie, die spezifische Bindung an Phospholipid (Phosphatidylserin) auf eine von zweiwertigen Ionen abhängige Weise aufweist. Dieses Protein wurde umfassend zur Messung von Apoptose (programmiertem Zelltod) verwendet, da Zelloberflächenexposition von Phosphatidylserin ein kennzeichnendes frühes Signal für diesen Prozess ist. Geeignete Lebensfähigkeits-Farbstoffe umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Annexin, Ethidiumhomodimer-1, DEAD Red, Propidiumiodid, SYTOX Green usw. und andere, 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 Apoptosis Assay auf Seite 285 und Kapitel 16.

[0163] Arbeitsvorschriften für Lebensfähigkeits-Farbstofffärbungen auf Zelllebensfähigkeit sind bekannt, siehe Katalog von Molecular Probes, s.o. In dieser Ausführungsform ist der Lebensfähigkeits-Farbstoff wie Annexin entweder direkt oder indirekt markiert und mit einer Zellpopulation kombiniert. Annexin ist im Handel erhältlich, d.h. von Phar-Mingen, San Diego, Kalifornien, oder Caltag Laboratories, Millbrae, Kalifornien. Vorzugsweise

wird der Lebensfähigkeits-Farbstoff in einer Lösung geliefert, worin der Farbstoff in einer Konzentration von etwa 100 ng/ml bis etwa 500 ng/ml, noch bevorzugter von etwa 500 ng/ml bis etwa 1 µg/ml, und am meisten bevorzugt von etwa 1 µg/ml bis etwa 5 µg/ml, vorliegt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Lebensfähigkeits-Farbstoff direkt markiert; beispielsweise kann Annexin mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Alexa-Farbstoffen, TRITC, AMCA, APC, Triolor, Cy-5 und anderen, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt oder im Handel erhältlich sind, markiert sein. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist der Lebensfähigkeits-Farbstoff mit einer ersten Markierung, wie beispielsweise einem Hapten wie Biotin, markiert, und eine zweite fluoreszierende Markierung, wie fluoreszierendes Streptavidin, wird verwendet. Wie Fachleuten bekannt sein wird, können andere erste und zweite Markierungspaare verwendet werden.

[0164] Nachdem er zugesetzt wurde, wird der Lebensfähigkeits-Farbstoff mit den Zellen eine Zeit lang inkubieren gelassen und, sofern erforderlich, gewaschen. Die Zellen werden dann wie nachstehend erläutert sortiert, um die nicht-lebensfähigen Zellen zu entfernen.

[0165] In einer bevorzugten Ausführungsform wird Ausschlussfarbstoff-Färben als Lebensfähigkeitstest verwendet. Ausschlussfarbstoffe sind jene, die von lebenden Zellen ausgeschlossen werden, d.h. dass sie passiv nicht aufgenommen werden (sie durchdringen die Zellmembran einer lebenden Zelle nicht). Dennoch werden sie aufgrund der Durchlässigkeit von abgestorbenen oder absterbenden Zellen von toten Zellen aufgenommen. Im Allgemeinen, jedoch nicht immer, binden sich die Ausschlussfarbstoffe an DNA, beispielsweise über Interkalation. Vorzugsweise fluoreszieren die Ausschlussfarbstoffe in Abwesenheit von DNA nicht oder nur leicht; dies erübrigt den Bedarf eines Waschschrittes. Alternativ dazu können auch Ausschlussfarbstoffe, die die Verwendung einer zweiten Markierung erfordern, verwendet werden. Bevorzugte Ausschlussfarbstoffe umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Ethidiumbromid; Ethidiumhomodimer-1; Propidiumiod; SYTOX Green Nucleinsäurefärbung; Calcein AM, BCECF AM; Fluoresceindiacetat; TOTO® und TO-PRO™ (aus Molecular Probes; s.o., siehe Kapitel 16) und andere auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Farbstoffe.

[0166] Arbeitsvorschriften für Ausschlussfarbstoff-Färben auf Zelllebensfähigkeit sind bekannt, siehe den Katalog von Molecular Probes, s.o. Im Allgemeinen wird der Ausschlussfarbstoff den Zellen bei einer Konzentration von etwa 100 ng/ml bis etwa 500 ng/ml, noch bevorzugter von etwa 500 ng/ml bis etwa 1 µg/ml und am meisten bevorzugt von etwa 0,1 µg/ml bis etwa 5 µg/ml, zugesetzt, wobei etwa 0,5 µg/ml besonders bevorzugt sind. Die Zellen und der Ausschlussfarbstoff werden über eine bestimmte Zeitspanne hinweg inkubiert, gewaschen, sofern erforderlich, und anschließend werden die Zellen wie nachstehend beschrieben sortiert, um nichtlebensfähige Zellen aus der Population zu entfernen.

[0167] Darüber hinaus gibt es noch andere Tests zur Zelllebensfähigkeit, die durchgeführt werden können, umfassend beispielsweise enzymatische Tests, die extrazelluläre enzymatische Aktivität entweder von lebenden Zellen (d.h. sekretierten Proteasen usw.) oder 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.

[0168] In einer bevorzugten Ausführungsform wird zumindest ein Zelllebensfähigkeitstest durchgeführt, wobei zumindest zwei unterschiedliche Zelllebensfähigkeitstests bevorzugt sind, sofern die Fluophore kompatibel sind. Wird nur ein Lebensfähigkeitstest durchgeführt, so verwendet eine bevorzugte Ausführungsform Lichtstreuungstests (sowohl Vorwärts- als auch Seitwärtsstreuung). Werden zwei Lebensfähigkeitstests durchgeführt, so verwenden bevorzugte Ausführungsformen Lichtstreuung und Farbstoffausschluss, wobei auch Lichtstreuung und Lebensfähigkeitsfarbstoff-Färbung möglich sind, und darüber hinaus können in manchen Fällen auch alle drei durchgeführt werden. Lebensfähigkeitstests ermöglichen somit die Trennung von lebensfähigen Zellen von nicht-lebensfähigen oder absterbenden Zellen.

[0169] Zusätzlich zu einem Zelllebensfähigkeitstest verwendet eine bevorzugte Ausführungsform einen Zellvermehrungstest. Als "Vermehrungstest" wird hierin ein Test bezeichnet, der die Bestimmung ermöglicht, ob sich eine Zellpopulation entweder vermehrt, d.h. repliziert, oder nicht repliziert.

[0170] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vermehrungstest ein Farbstoff-Einbindungstest. Ein Farbstoff-Einbindungstest basiert auf Verdünnungseffekten, um zwischen einzelnen Zellphasen zu unterscheiden. Kurz beschrieben wird ein Farbstoff (im Allgemeinen ein fluoreszierender Farbstoff, wie nachstehend beschrieben) in Zellen eingeführt und von den Zellen aufgenommen. Nachdem er aufgenommen wurde, ist der Farbstoff in der Zelle eingeschlossen und diffundiert nicht aus der Zelle heraus. Teilt sich die Zellpopulation,

wird der Farbstoff proportional verdünnt. Dies bedeutet, dass nach der Einführung des Einbindungsfarbstoffes die Zellen eine bestimmte Zeitspanne lang inkubieren gelassen werden; Zellen, die im Laufe der Zeit an Fluoreszenz verlieren, teilen sich, und die Zellen, die fluoreszierend bleiben, werden in einer Nichtwachstumsphase angehalten.

[0171] Im Allgemeinen kann die Einführung des Einschluss-Farbstoffes auf eine von zwei verschiedenen Weisen erfolgen. Entweder kann der Farbstoff nicht passiv in die Zellen eindringen (d.h. er ist geladen), und die Zellen müssen behandelt werden, um den Farbstoff aufzunehmen; beispielsweise durch die Verwendung eines elektrischen Impulses. Alternativ dazu kann der Farbstoff passiv in die Zellen eindringen, wobei er jedoch, sobald er aufgenommen ist, so modifiziert wird, dass er nicht aus den Zellen herausdiffundieren kann. Beispielsweise kann enzymatische Modifikation des Einschluss-Farbstoffes diesem Farbstoff Ladung verleihen und ihm so die Fähigkeit entziehen, aus den Zellen herauszudiffundieren. Beispielsweise sind die Molecular-Probes-CellTracker™-Farbstoffe fluoreszierende Chlormethylderivate, die frei in Zellen hinein diffundieren, und anschließend produziert Glutathion-S-Transferase-vermittelte Reaktion Membran-undurchlässige Farbstoffe.

[0172] Geeignete Einschluss-Farbstoffe umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, die Molecular-Probes-CellTracker™-Farbstoffe, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, CellTracker™-Blau, CellTracker™-Gelb-Grün, CellTracker™-Grün, CellTracker™-Orange, PKH26 (Sigma) und andere, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind; siehe das Molecular Probes Handbook, s.o., insbesondere Kapitel 15.

[0173] Im Allgemeinen werden Einschluss-Farbstoffe den Zellen bei einer Konzentration im Bereich von etwa 100 ng/ml bis etwa 5 µg/ml zugeführt, wobei etwa 500 ng/ml bis etwa 1 µg/ml bevorzugt sind. Ein Waschschriff kann verwendet werden oder nicht. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein vermutliches bioaktives Mittel mit den hierin beschriebenen Zellen kombiniert. Die Zellen und der Einschluss-Farbstoff werden eine gewisse Zeit lang inkubiert, um Zellteilung und somit Farbstoffverdünnung zu ermöglichen. Die Dauer hängt von der Dauer des Zellzyklus der bestimmten Zellen ab; im Allgemeinen werden zumindest etwa 2 Zellteilungen bevorzugt, wobei zumindest etwa 3 Zellteilungen besonders bevorzugt und zumindest etwa 4 Zellteilungen ganz besonders bevorzugt sind. Die Zellen werden dann wie nachstehend beschrieben sortiert, um Zellpopulationen zu schaffen, die replizierend sind, und solche, die dies nicht sind. Fachleuten wird bekannt sein, dass in manchen Fällen, beispielsweise beim Screening auf Anti-Proliferationsmittel, die hellen (d.h. fluoreszierenden) Zellen gesammelt werden; in anderen Ausführungsformen, beispielsweise beim Screening auf Proliferationsmittel, werden die gering fluoreszierenden Zellen gesammelt. Veränderungen werden durch Messen der Fluoreszenz zu einzelnen verschiedenen Zeitpunkten oder in verschiedenen Zellpopulationen und Vergleichen der Bestimmungen miteinander oder mit Standards bestimmt.

[0174] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vermehrungstest ein Antimetabolittest. Im Allgemeinen finden Antimetabolittests ihren größten Anwendungsbereich, wenn Mittel erwünscht, sind, die zelluläres Anhalten in G1- oder G2-Haltesthase verursachen. In einem Antimetabolit-Vermehrungstest resultiert die Verwendung eines toxischen Antimetaboliten, der sich teilende Zellen abtötet, im Überleben lediglich jener Zellen, die sich nicht teilen. Geeignete Antimetaboliten umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, herkömmliche chemotherapeutische Mittel wie beispielsweise Methotrexat, Cisplatin, Taxol, Hydroxyharnstoff, Nucleotidanaloge wie beispielsweise AraC usw. Zusätzlich können Antimetabolittests die Verwendung von Genen einbinden, die Zelltod bei Expression verursachen.

[0175] Die Konzentration, bei der der Antimetabolit zugesetzt wird, hängt von der Toxizität des bestimmten Antimetaboliten ab und wird wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt bestimmt. Der Antimetabolit wird zugesetzt, und die Zellen werden im Allgemeinen eine bestimmte Zeit lang inkubiert; die genaue Zeitspanne hängt wiederum von den Eigenschaften und der Identität des Antimetaboliten sowie von der Zellzyklusdauer der bestimmten Zellpopulation ab. Im Allgemeinen ist die Zeitspanne ausreichend, die erforderlich ist, um zumindest eine Zellteilung auftreten zu lassen.

[0176] In einer bevorzugten Ausführungsform wird zumindest ein Vermehrungstest durchgeführt, wobei mehr als einer bevorzugt ist. Somit resultiert ein Vermehrungstest in einer Population von sich vermehrenden 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.

[0177] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt entweder nach oder gleichzeitig mit einem oder mehreren Vermehrungstests, wie zuvor erläutert, zumindest ein Zellphasentest. Ein "Zellphasen"-Test bestimmt, in welcher Zellphase die Zellen angehalten wurden, in M, G1, S oder G2.

[0178] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Zellphasentest ein DNA-Bindungsfarbstofftest. Kurz beschrieben wird ein DNA-Bindungsfarbstoff in die Zellen eingeführt und passiv aufgenommen. Nachdem er sich in der Zelle befindet, bindet sich der DNA-Bindungsfarbstoff an DNA, im Allgemeinen durch Interkalation, obwohl in manchen Fällen die Farbstoffe entweder große oder kleine Furchenbindungs-Verbindungen sein können. Die Menge an Farbstoff hängt somit direkt mit der Menge an DNA in der Zelle zusammen, die je Zellphase variiert; G2- und M-Phase-Zellen haben einen doppelt so hohen DNA-Gehalt wie G1-Phase-Zellen, und S-Phase-Zellen haben eine mittlere Menge, je nachdem, in welchem Abschnitt 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.

[0179] Im Allgemeinen werden die DNA-Bindungsfarbstoffe mit Konzentrationen im Bereich von etwa 1 µg/ml bis etwa 5 µg/ml zugesetzt. Die Farbstoffe werden den Zellen zugesetzt und eine bestimmte Zeit lang inkubieren gelassen; die Dauer hängt teilweise vom ausgewählten Farbstoff ab. In einer Ausführungsform werden die Messungen unverzüglich nach Zusatz des Farbstoffes vorgenommen. Die Zellen werden dann wie nachstehend beschrieben sortiert, um Populationen von Zellen zu schaffen, die verschiedene Mengen an Farbstoff und somit verschiedene Mengen an DNA enthalten; so werden Zellen, die sich replizieren, von jenen, die dies nicht tun, getrennt. Fachleuten wird bekannt sein, dass in manchen Fällen, beispielsweise beim Screenen von Anti-Proliferationsmitteln, Zellen mit der geringsten Fluoreszenz (und somit mit einer einzelnen Kopie des Genoms) von jenen getrennt werden können, die sich replizieren und somit mehr als ein einzelnes Genom der DNA enthalten. Veränderungen können durch Messen der Fluoreszenz zu jedem unterschiedlichen Zeitpunkt oder in unterschiedlichen Zellpopulationen und Vergleichen der Bestimmungen miteinander oder mit Standards bestimmt werden.

[0180] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Zellphasentest ein Cyclinabbautest. In dieser Ausführungsform wird vor dem Screenen (und im Allgemeinen vor der Einführung eines vermutlichen bioaktiven Mittels, wie nachstehend erläutert) eine Fusionsnucleinsäure in die Zellen eingeführt. Die Fusionsnucleinsäure umfasst Nucleinsäure, die für eine Cyclinabbaubox kodiert, und eine Nucleinsäure, die für ein nachweisbares Molekül kodiert. "Cyclinabbauboxen" sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und sind Sequenzen, die Abbau über den Ubiquitinierungsweg von Proteinen, die die Boxen während bestimmter Zellphasen enthalten, verursachen. Das heißt beispielsweise, dass G1-Cycline während G1-Phase stabil sein können, jedoch aufgrund der Gegenwart einer G1-Cyclinabbaubox während S-Phase abgebaut werden. Somit kann durch Binden einer Cyclinabbaubox an ein nachweisbares Molekül, beispielsweise ein grün fluoreszierendes Protein, die Gegenwart oder Abwesenheit des nachweisbaren Moleküls dazu dienen, die Zellphase der Zellpopulation zu identifizieren. In einer bevorzugten Ausführungsform werden multiple Boxen verwendet, vorzugsweise jeweils mit einem anderen Fluorophor, sodass Detektion der Zellphase stattfinden kann.

[0181] Zahlreiche Cyclinabbauboxen sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt, beispielsweise weist Cyclin A eine Abbaubox auf, die die Sequenz RTVLGVIGD umfasst; die Abbaubox von Cyclin B1 umfasst die Sequenz RTALGDIGN. Siehe Glotzer et al., Nature 349, 132–138 (1991). Andere Abbauboxen sind ebenfalls bekannt:

YMTVSIIDRFMQDSCVPKMLQLVGVT (Ratten-Cyclin B);
 KFRLLQETMYMTVSIIDRFMQNSCVPKK (Maus-Cyclin B);
 RAILIDWLIQVQMKFRLLQETMYMTVS (Maus-Cyclin B1);
 DRFLQAQLVCRKKLQVVGITALLLASK (Maus-Cyclin B2); und
 MSVLRGKLQLVGTAAMLL (Maus-Cyclin A2).

[0182] Die Nucleinsäure, die für die Cyclinabbaubox kodiert, ist operabel an Nucleinsäure gebunden, die für ein nachweisbares Molekül kodiert. Die Fusionsproteine werden mittels auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren konstruiert. Beispielsweise wird die Nucleinsäure, die für die Abbaubox kodiert, mit einer Nucleinsäure verbunden, die für ein nachweisbares Molekül kodiert. Als "nachweisbares Molekül" wird hierin ein Molekül bezeichnet, das es ermöglicht, eine Zelle oder Verbindung, die das nachweisbare Molekül umfasst, von einer zu unterscheiden, die dieses nicht enthält, d.h. ein Epitop, manchmal auch als Antigen TAG bezeichnet, ein spezifisches Enzym oder ein fluoreszierendes Molekül.

[0183] Bevorzugte fluoreszierende Moleküle umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, grün fluoreszierendes Protein (GFP), blau fluoreszierendes Protein (BFP), gelb fluoreszierendes Protein (YFP), rot fluoreszierendes Protein (RFP) und Enzyme, umfassend Luciferase und β -Galactosidase. Werden Antigen-TAG verwendet, werden in bevorzugten Ausführungsformen Zelloberflächen-Antigene verwendet. Das Epitop ist vorzugsweise jedes beliebige nachweisbare Peptid, das im Allgemeinen nicht an der zytoplasmatischen Membran gefunden

wird, obwohl in manchen Fällen, sofern das Epitop eines ist, das normalerweise an den Zellen vorkommt, Anstiege nachgewiesen werden können, wobei dies jedoch im Allgemeinen nicht bevorzugt ist. Demähnlich können enzymatische nachweisbare Moleküle verwendet werden; beispielsweise ein Enzym, das ein neues oder chromogenes Produkt produziert.

[0184] Demgemäß führen die Resultate des Sortierens nach Zellphasentests im Allgemeinen zu zumindest zwei Zellpopulationen, die sich in unterschiedlichen Zellphasen befinden.

[0185] Die hierin bereitgestellten Proteine und Nucleinsäuren können auch für Screeningverwendungen eingesetzt werden, worin die Protein-Protein-Wechselwirkungen der Zellzyklusproteine identifiziert werden können. Genetische Enzyme wurden bisher zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben. Die ersten Arbeiten wurden an Hefesystemen, nämlich am "Hefe-Zwei-Hybrid"-System, durchgeführt.

[0186] Das basische System erfordert eine Protein-Protein-Wechselwirkung, um Transkription eines Reportergens in Gang zu setzen. Nachfolgende Studien 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, wobei ein bevorzugtes System 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 wird. Zur Verwendung in Verbindung mit diesen Systemen wird ein besonders nützlicher Shuttle-Vektor in der Seriennummer 09/133.944, eingereicht am 14. August 1998, mit dem Titel "Shuttle Vectors" beschrieben.

[0187] Im Allgemeinen werden zwei Nucleinsäuren in eine Zelle transformiert, worin eine ein "Köder" wie beispielsweise das Gen; das für ein Zellzyklusprotein oder einen Abschnitt davon kodiert, ist und die andere für einen Testkandidaten kodiert. Nur wenn sich die zwei Expressionsprodukte aneinander binden, wird ein Indikator, wie beispielsweise ein fluoreszierendes Protein, exprimiert. Expression des Indikators weist darauf hin, wann sich ein Testkandidat an das Zellzyklusprotein bindet und als ein Zellzyklusprotein identifiziert werden kann. Unter Verwendung desselben Systems und der identifizierten Zellzyklusproteine kann der umgekehrte Vorgang durchgeführt werden. Die hierin bereitgestellten Zellzyklusproteine können also verwendet werden, um neue Köder, oder Mittel, die mit den Zellzyklusproteinen wechselwirken, zu identifizieren. Darüber hinaus kann das Zwei-Hybrid-System verwendet werden, wobei ein Testkandidat zusätzlich zum Köder und dem Zellzyklusprotein, das für die Nucleinsäuren kodiert, zugesetzt werden, um Mittel zu bestimmen, die den Köder, z.B. IAP oder p53, und das Zellzyklusprotein stören.

[0188] In einer Ausführungsform wird ein Säugetier-Zwei-Hybrid-System bevorzugt. Säugetiersysteme stellen Post-Translations-Modifikationen von Proteinen bereit, die signifikant zu deren Fähigkeit beitragen können, wechselzuwirken. Darüber hinaus kann ein Säugetier-Zwei-Hybrid-System für einen großen Bereich an Säugetier-Zelltypen verwendet werden, um die Regulierung, Induktion, Verarbeitung usw. von spezifischen Proteinen innerhalb eines bestimmten Zelltyps nachzuahmen. Beispielsweise könnten Proteine, die in einen Krankheitszustand (d.h. Krebs, Störungen in Verbindung mit Apoptose) eingebunden sind, in den relevanten Erkrankungszellen getestet werden. Demähnlich ergibt beim Testen von randomisierten Proteinen das Testen unter den relevanten zellulären Bedingungen die höchsten positiven Ergebnisse. Weiters können die Säugetierzellen unter zahlreichen Experimentbedingungen getestet werden, die intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinträchtigen können, wie beispielsweise in Gegenwart von Hormonen, Wirkstoffen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, Strahlung, Chemotherapeutika, zellulären und chemischen Stimuli usw., die zu Leiden beitragen können, die Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen können, insbesondere jene, die bei Krebs eine Rolle spielen.

[0189] Tests, die Bindung wie beispielsweise das Zwei-Hybrid-System einbinden, können nicht-spezifische Bindungsproteine (NSB) in Betracht ziehen.

[0190] Expression in verschiedenen Zelltypen und Tests auf Zellzyklusaktivität wurden vorangehend beschrieben. Die Aktivitätstests wie beispielsweise solche, die einen Einfluss auf IAP-Bindung oder p53-Aktivierung haben, können durchgeführt werden, um die Aktivität von Zellzyklusproteinen zu bestätigen, die bereits durch ihre Sequenzidentität/-ähnlichkeit oder Bindung an zumindest einen IAP identifiziert wurden, sowie um die Aktivität von Leitverbindungen zu bestätigen, die als Modulatoren von ING2 identifiziert wurden.

[0191] Die hierin bereitgestellten Komponenten für die hierin bereitgestellten Tests können auch zur Bildung von Sets kombiniert werden. Die Sets können auf der Verwendung des Proteins und/oder der Nucleinsäure,

die für die Zellzyklusproteine kodiert, basieren. In einer Ausführungsform werden andere Komponenten im Set bereitgestellt. Solche Komponenten umfassen eine oder mehrere Komponenten, ausgewählt aus Verpackung, Anweisungen, Antikörpern und Markierungen. Zusätzliche Tests wie jene, die in Diagnoseverfahren verwendet werden, werden nachstehend näher beschrieben.

[0192] Auf diese Weise werden bioaktive Mittel identifiziert. Verbindungen mit pharmakologischer Aktivität sind in der Lage, die Aktivität des Zellzyklusproteins zu verstärken oder zu stören. Die Verbindungen mit der erwünschten pharmakologischen Aktivität können in einem physiologisch annehmbaren Träger einem Wirt verabreicht werden, wie nachstehend noch näher beschrieben wird.

[0193] Die vorliegende Entdeckung, die sich auf die Rolle von Zellzyklusproteinen im Zellzyklus bezieht, stellt somit Verfahren zum Veranlassen oder Unterbinden von Zellvermehrung in Zellen bereit. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Zellzyklusproteine, und insbesondere Zellzyklusproteinfragmente, zur Untersuchung oder Behandlung von Leiden nützlich, die durch die Zellzyklusproteine vermittelt werden, d.h. zur Diagnose, Behandlung oder Vorkehrung von Zellzyklusverbundenen Erkrankungen. Somit umfasst der Begriff "Zellzyklus-verbundene Erkrankungen" oder "Erkrankungszustände" Leiden, die sowohl unzureichende als auch übermäßige Zellvermehrung einbinden, und vorzugsweise Krebs.

[0194] Somit wird in einer Ausführungsform Zellzyklusregulierung in Zellen oder Organismen bereitgestellt. In einer Ausführungsform umfassen die Verfahren die Verabreichung eines Zellzyklusproteins in einer therapeutischen Menge an eine Zelle oder eine Person, die Bedarf daran hat. Alternativ dazu wird ein Anti-Zellzyklus-Antikörper verabreicht, der die biologische Aktivität des endogenen Zellzyklusproteins reduziert oder zur Gänze aufhebt. In einer anderen Ausführungsform 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 Zellzyklusprotein kodiert, an eine Zelle oder eine Person. Wie Fachleuten bekannt sein wird, kann dies auf zahlreiche verschiedene Weisen erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Zellzyklusaktivität durch Erhöhen der Menge von Zellzyklus in der Zelle gesteigert, beispielsweise durch Überexprimieren des endogenen Zellzyklus oder durch Verabreichen eines Gens, das für ein Zellzyklusprotein kodiert, unter Verwendung bekannter Gentherapieverfahren beispielsweise. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Gentherapieverfahren die Einbindung des exogenen Gens unter Verwendung von verstärkter homologer Rekombination (EHR), wie beispielsweise in der PCT/US93/03868, hierin zur Gänze durch Verweis aufgenommen, beschrieben wird.

[0195] Ohne hier auf eine bestimmte Theorie Bezug zu nehmen, scheint es, dass Zellzyklusprotein ein wichtiges Protein im Zellzyklus ist. Demgemäß können Erkrankungen, die auf mutierten oder variierten Zellzyklusgenen basieren, bestimmt werden. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung Verfahren zur Identifikation von Zellen bereit, die variierte Zellzyklusgene enthalten, umfassend das Bestimmen der gesamten oder eines Teils der Sequenz von zumindest einem endogenen Zellzyklusgen in einer Zelle. Fachleuten wird bekannt sein, dass dies unter Verwendung zahlreicher Sequenzierungsverfahren erfolgen kann. In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung Verfahren zur Identifikation des Zellzyklus-Genotyps einer Person bereit, umfassend das Bestimmen der gesamten oder eines Teils der Sequenz von zumindest einem Zellzyklusgen der Person. Dies erfolgt im Allgemeinen in zumindest einem Gewebe der Person und kann die Bewertung zahlreicher Gewebe oder unterschiedlicher Proben desselben Gewebes umfassen. Das Verfahren kann das Vergleichen der Sequenz des sequenzierten Zellzyklusgens mit einem bekannten Zellzyklusgen, d.h. einem Wildtyp-Gen, umfassen.

[0196] Die Sequenz des gesamten oder eines Teils des Zellzyklusgens kann anschließend mit der Sequenz eines bekannten Zellzyklusgens verglichen werden, um zu bestimmen, ob Unterschiede bestehen. Dies kann unter Verwendung jeder beliebigen Anzahl an bekannten Sequenzidentitätsprogrammen, wie beispielsweise Bestfit usw., erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Gegenwart eines Unterschieds in der Sequenz zwischen dem Zellzyklusgen des Patienten und dem bekannten Zellzyklusgen ein Hinweis auf einen Erkrankungszustand oder eine Neigung zu einem Erkrankungszustand.

[0197] Zellzyklusproteinsequenzen, die an Biochips gebunden sind, umfassen sowohl Nucleinsäure- als auch Aminosäuresequenzen wie zuvor definiert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nucleinsäuresonden für Zellzyklusprotein-Nucleinsäuren (sowohl Nucleinsäuresequenzen mit den in den Fig. dargestellten Sequenzen und/oder Komplemente davon) hergestellt. Die Nucleinsäuresonden, die an den Biochip gebunden sind, werden so entworfen, dass sie im Wesentlichen komplementär zu den Zellzyklusprotein-Nucleinsäuren, d.h. der Zielsequenz (entweder zur Zielsequenz der Probe oder zu anderen Sondensequenzen, beispielsweise in Sandwich-Tests), sind, sodass Hybridisierung der Zielsequenz und der Sonden der vorliegenden Erfindung

eintritt. Wie unten erläutert muss diese Komplementarität nicht perfekt sein; es können beliebig viele Basenpaar-Fehlpaarungen vorhanden sein, die Hybridisierung zwischen der Zielsequenz und den einzelsträngigen Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung stören. Ist jedoch die Anzahl an Mutationen so groß, dass sogar unter weniger stringenten Hybridisierungsbedingungen keine Hybridisierung eintreten kann, dann ist die Sequenz keine komplementäre Zielsequenz. Somit bedeutet hierin "im Wesentlichen komplementär", dass die Sonden ausreichend komplementär zu den Zielsequenzen sind, um unter normalen Reaktionsbedingungen, insbesondere unter hochstringenten Bedingungen, wie hierin definiert, zu hybridisieren.

[0198] Eine "Nucleinsäuresonde" ist im Allgemeinen einzelsträngig, kann jedoch auch teilweise einzel- und teilweise doppelsträngig sein. Die Beschaffenheit der Stränge der Sonde wird durch Struktur, Zusammensetzung und Eigenschaften der Zielsequenz festgelegt. Im Allgemeinen weisen die Nucleinsäuresonden eine Länge im Bereich von etwa 8 bis etwa 100 Basen auf, wobei etwa 10 bis etwa 80 Basen bevorzugt und etwa 30 bis etwa 50 Basen besonders bevorzugt sind. In manchen Ausführungsformen können viel längere Nucleinsäuren, bis hinauf zu Hunderten von Basen (z.B. ganze Gene), verwendet werden.

[0199] Fachleuten wird bekannt sein, dass Nucleinsäuren an einen festen Träger auf zahlreiche verschiedene Arten gebunden oder an ihn immobilisiert werden können. Unter "immobilisiert" und grammatischen Entsprechungen wird hierin verstanden, dass die Assoziation oder Bindung zwischen der Nucleinsäuresonde und dem festen Träger ausreichend ist, um unter den Bedingungen zum Binden, Waschen, Analysieren und Entfernen, wie nachstehend beschrieben, stabil zu sein. Das Binden kann kovalent oder nichtkovalent erfolgen. Unter "nichtkovalente Bindung" und grammatischen Entsprechungen werden hierin eine oder mehrere von entweder elektrostatischen, hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen verstanden. Zu nichtkovalenter Bindung gehört auch die kovalente Bindung eines Moleküls, wie beispielsweise Streptavidin, an den Träger und die nichtkovalente Bindung der biotinylierten Sonde an Streptavidin. Unter "kovalente Bindung" und grammatischen Entsprechungen wird hierin verstanden, dass die zwei Gruppierungen, der feste Träger und die Sonde, über zumindest eine Bindung, umfassend Sigma-Bindungen, Pi-Bindungen und Koordinationsbindungen, miteinander verbunden sind. Kovalente Bindungen können direkt zwischen der Sonde und dem festen Träger erfolgen oder können durch einen Vernetzer oder durch Einbindung einer spezifischen reaktiven Gruppe entweder am festen Träger oder an der Sonde oder an beiden Molekülen gebildet werden. Immobilisierung kann auch eine Kombination aus kovalenter und nichtkovalenter Wechselwirkung einbinden.

[0200] Wie Fachleuten bekannt ist, werden die Sonden im Allgemeinen auf viele verschiedene Weisen an den Biochip gebunden. Wie hierin beschrieben können die Nucleinsäuren entweder zuerst synthetisiert werden, woraufhin Bindung an den Biochip erfolgt, oder sie können direkt am Biochip synthetisiert werden.

[0201] Der Biochip umfasst ein geeignetes festes Substrat. Unter "Substrat" oder "fester Träger" oder anderen grammatischen Entsprechungen davon wird jedes beliebige Material verstanden, das so modifiziert werden kann, dass es getrennte einzelne Stellen aufweist, die zur Bindung oder Assoziation der Nucleinsäuresonden geeignet sind, und zumindest für ein Nachweisverfahren zugänglich ist. Fachleuten wird bekannt sein, dass die Anzahl möglicher Substrate sehr groß ist und Glas und modifiziertes oder funktionalisiertes Glas, Kunststoffe (umfassend Acryle, Polystyrol und Copolymere aus Styrol und anderen Materialien, Polypropylen, Polyethylen, Polybutylen, Polyurethane, TeflonJ usw.), Polysaccharide, Nylon oder Nitrocellulose, Harze, Siliciumdioxid oder Siliciumdioxid-basierte Materialien, umfassend Silicium und modifiziertes Silicium, Kohlenstoff, Metalle, anorganische Gläser, Kunststoffe usw. umfassen, jedoch nicht darauf beschränkt sind. Im Allgemeinen ermöglichen diese Substrate optische Detektion und zeigen keine nennenswerte Fluoreszenz.

[0202] In einer bevorzugten Ausführungsform können die Oberfläche des Biochips und die Sonde mit chemischen funktionellen Gruppen für darauf folgende Bindung der zwei derivatisiert werden. Somit wird der Biochip beispielsweise mit einer chemischen funktionellen Gruppe, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, Aminogruppen, Carboxylgruppen, Oxogruppen und Thiolgruppen, wobei Aminogruppen besonders bevorzugt sind, derivatisiert. Unter Verwendung dieser funktionellen Gruppen können die Sonden unter Verwendung funktioneller Gruppen auf den Sonden gebunden werden. Beispielsweise können Nucleinsäuren, die Aminogruppen enthalten, an Oberflächen, umfassend Aminogruppen, beispielsweise unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Linkern gebunden werden; solche Linker sind beispielsweise homo- oder heterobifunktionelle Linker, wie sie bekannt sind (siehe Katalog der Pierce Chemical Company 1994, technischer Abschnitt über Vernetzer, Seiten 155–200, hierin durch Verweis aufgenommen). Weiters können in manchen Fällen zusätzliche Linker wie beispielsweise Alkylgruppen (umfassend substituierte und Heteroalkylgruppen) verwendet werden.

[0203] In dieser Ausführungsform werden Oligonucleotide, die der Nucleinsäuresonde entsprechen, wie auf

dem Gebiet der Erfindung bekannt synthetisiert und anschließend an die Oberfläche des festen Trägers gebunden. Fachleuten wird bekannt sein, dass entweder der 5'- oder der 3'-Terminus an den festen Träger gebunden werden oder dass Bindung über ein inneres Nucleosid erfolgen kann.

[0204] In einer zusätzlichen Ausführungsform kann die Immobilisierung am festen Träger sehr stark und dennoch nichtkovalent sein. Beispielsweise können biotinylierte Oligonucleotide hergestellt werden, die sich an mit Streptavidin kovalent beschichtete Oberflächen binden, was in Bindung resultiert.

[0205] Alternativ dazu können die Oligonucleotide auf der Oberfläche synthetisiert werden, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist. Beispielsweise werden Photoaktivierungsverfahren unter Verwendung von Photopolymerisations-Verbindungen und -Verfahren verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform können die Nucleinsäuren in situ unter Verwendung bekannter photolithographischer Verfahren synthetisiert werden, die beispielsweise in der WO 95/25116; WO 95/35505; den US-Patenten Nr. 5.700.637 und 5.445.934; und in Verweisen, die darin zitiert werden, beschrieben werden, wobei alle zuvor genannten Beschreibungen hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen sind; diese Bindungsverfahren bilden die Grundlage für die Affimetrix-GeneChip™-Technologie.

[0206] "Differenzielle Expression" oder grammatische Entsprechungen davon bezieht sich, wie hierin verwendet, sowohl auf qualitative als auch auf quantitative Unterschiede bei den temporären und/oder zellulären Expressionsmustern von Genen innerhalb von und zwischen verschiedenen Zellen. Somit kann ein differenziert exprimiertes Gen eine qualitative Änderung in seiner Expression aufweisen, umfassend eine Aktivierung oder Inaktivierung, beispielsweise in normalen gegenüber apoptotischen Zellen. Das bedeutet, dass Gene in einer bestimmten Phase im Vergleich zu einer anderen Phase angeschaltet oder abgeschaltet sein können. Fachleuten wird bekannt sein, dass jeder beliebige Vergleich zwischen zwei oder mehr Phasen angestellt werden kann. Solch ein qualitativ reguliertes Gen weist ein Expressionsmuster innerhalb einer Phase oder eines Zelltyps auf, das durch herkömmliche Verfahren in einer solchen Phase oder einem solchen Zelltyp nachweisbar ist, jedoch nicht in beiden. Alternativ dazu ist die quantitative Bestimmung dadurch charakterisiert, dass Expression ansteigt oder abnimmt; das bedeutet, dass die Expression des Gens entweder nach oben reguliert wird, was zu einer erhöhten Menge an Transkript führt, oder nach unten reguliert wird, was in einer geringeren Menge an Transkript resultiert. Der Grad des Expressionsunterschieds muss nur groß genug sein, um mittels herkömmlichen Charakterisierungsverfahren, wie nachstehend beschrieben wird, wie beispielsweise unter Verwendung von Affymetrix-GeneChip™-Expressionstests, Lockhart, Nature Biotechnology 14, 1675–1680 (1996), hierin durch Verweis aufgenommen, quantifizieren zu können. Andere Verfahren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, quantitative reverse Transkriptase-PCR, Northern-Analyse und RNase-Schutz.

[0207] Fachleuten wird bekannt sein, dass dies durch Auswertung entweder des Gentranskripts oder der Proteinkonzentration erfolgen kann; das heißt, dass die Menge von Genexpression unter Verwendung von Nucleinsäuresonden zur DNA oder RNA, die dem Gentranskript entspricht, beobachtet werden kann und die Quantifizierung von Genexpressionskonzentrationen oder alternativ dazu des End-Genprodukts selbst (Protein) beobachtet werden kann, beispielsweise mittels Antikörpern gegen das Zellzyklusprotein und herkömmlichen Immuntests (ELISA usw.) oder anderen Verfahren, umfassend Massenspektroskopietests, 2D-Gelelektrophoretetests usw.

[0208] In einem anderen Verfahren wird Detektion der mRNA in situ durchgeführt. In diesem Verfahren werden permeabilisierte Zellen oder Gewebeproben mit einer nachweisbar markierten Nucleinsäuresonde ausreichend lang kontaktiert, um Hybridisieren der Sonde an die Ziel-mRNA zu ermöglichen. Nach dem Waschen zur Entfernung der nicht-spezifisch gebundenen Sonde wird die Markierung nachgewiesen. Beispielsweise wird eine Digoxigenin-markierte Ribosonde (RNA-Sonde), die komplementär zur mRNA ist, die für ein Zellzyklusprotein kodiert, durch Binden des Digoxigenin mit einem Anti-Digoxigenin-Sekundärantikörper nachgewiesen und mit Nitroblautetrazolium und 5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat entwickelt.

[0209] In einem anderen bevorzugten Verfahren wird Expression von Zellzyklusprotein unter Verwendung von In-situ-Bildgebungsverfahren unter Einsatz von Antikörpern gegen Zellzyklusproteine durchgeführt. In diesem Verfahren werden Zellen mit einem bis mehreren Antikörpern gegen Zellzyklusprotein(e) kontaktiert. Nach dem Waschen zur Entfernung nicht-spezifischer Antikörperbindung wird die Gegenwart des Antikörpers oder der Antikörper nachgewiesen. In einer Ausführungsform wird der Antikörper durch Inkubieren mit einem Sekundärantikörper, der eine nachweisbare Markierung aufweist, nachgewiesen. In einem anderen Verfahren enthält der Primärantikörper gegen die Zellzyklusproteine eine nachweisbare Markierung. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform enthält jeder von zahlreichen Primärantikörpern eine unterschiedliche und nachweisbare Markierung. Dieses Verfahren findet besondere Anwendung beim gleichzeitigen Screenen zahl-

reicher Zellzyklusproteine. Die Markierung kann in einem Fluorimeter nachgewiesen werden, das die Fähigkeit hat, Emissionen verschiedener Wellenlängen nachzuweisen und zu unterscheiden. Darüber hinaus kann ein fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (FACS) in diesem Verfahren verwendet werden. Durchschnittlichen Fachleuten wird bekannt sein, dass zahlreiche andere histologische Bildgebungsverfahren für die Erfindung nützlich sind und dass die Antikörper in ELISA, Immunblotting (Western-Blotting), Immunfällung, BIACORE-Technologie und dergleichen verwendet werden können.

[0210] In einer Ausführungsform können die Zellzyklusproteine der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um polyklonale und monoklonale Antikörper gegen Zellzyklusproteine zu bilden, die wie hierin beschrieben nützlich sind. Demähnlich können die Zellzyklusproteine unter Verwendung von Standardverfahren an Affinitätschromatographiesäulen gebunden werden. Diese Säulen können dann verwendet werden, um Zellzyklusantikörper zu reinigen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Antikörper zu Epitopen gebildet, die für das Zellzyklusprotein einmalig sind; das heißt, dass die Antikörper nur geringe oder keine Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen aufweisen. Diese Antikörper finden in zahlreichen Anwendungen Einsatz. Beispielsweise können die Zellzyklusantikörper an herkömmliche Affinitätschromatographiesäulen gebunden und verwendet werden, um Zellzyklusproteine wie nachstehend näher beschrieben wird zu reinigen. Die Antikörper können auch als blockierende Polypeptide, wie nachstehend erläutert, verwendet werden, da sie sich spezifisch an das Zellzyklusprotein binden.

[0211] Die Anti-Zellzyklusprotein-Antikörper können polyklonale Antikörper umfassen. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern 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 Adjuvans dem Säugetier über mehrfache subkutane oder intraperitoneale Injektionen injiziert. Das immunisierende Mittel kann das Zellzyklusprotein oder ein Fusionsprotein davon umfassen. Es kann auch nützlich sein, das immunisierende Mittel an ein Protein zu binden, von dem bekannt ist, dass es im zu immunisierenden Säugetier immunogen wirkt. Beispiele für solche immunogenen Proteine umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyreoglobulin und Sojabohnentrypsininhibitor. Beispiele für Adjuvantien, die verwendet werden können, umfassen Freundesches komplettes Adjuvans und MPL-TDM-Adjuvans (Monophosphoryl-Lipid a, synthetisches Trehalosedicorynomycolat). Die Arbeitsvorschrift zur Immunisierung kann von Fachleuten ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden.

[0212] Die Anti-Zellzyklusprotein-Antikörper können alternativ dazu monoklonale Antikörper sein. Monoklonale Antikörper können unter Verwendung von Hybridomverfahren hergestellt werden, wie jene, die von Kohler & Milstein, Nature 256, 495 (1975), beschrieben werden. In einem Hybridomverfahren wird eine Maus, ein Hamster oder ein anderes geeignetes Wirtstier typischerweise mit einem immunisierenden Mittel immunisiert, um Lymphozyten zu aktivieren, die Antikörper produzieren oder in der Lage sind, sie zu produzieren, die sich spezifisch an das immunisierende Mittel binden. Alternativ dazu können die Lymphozyten in vitro immunisiert werden.

[0213] Das immunisierende Mittel umfasst typischerweise das Zellzyklusprotein oder ein Fusionsprotein davon. Im Allgemeinen werden periphere Blutlymphozyten ("PBL") verwendet, sofern Zellen menschlichen Ursprungs erwünscht sind, oder Milzzellen oder Lymphknotenzellen, sofern nichtmenschliche Säugetierquellen erwünscht sind. Die Lymphozyten werden dann mit einer sich unbegrenzt vermehrenden Zelllinie unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, 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 Säugetierzellen, insbesondere Myelomzellen, die von Nagetieren, Rindern oder Menschen abstammen. Üblicherweise werden Ratten- oder Mausmyelomzelllinien verwendet. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder das Überleben der nichtfusionierten, sich unbegrenzt vermehrenden Zellen hemmt. Beispielsweise umfasst das Kulturmedium für die Hybridomen typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin ("HAT-Medium"), Substanzen, die das Wachstum von HGPRTdefizienten Zellen unterbinden, sofern den Elternzellen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT) fehlt.

[0214] Bevorzugte, sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind solche, die wirksam fusionieren, stabile starke Expression von Antikörper durch ausgewählte Antikörperproduzierende Zellen unterstützen und gegenüber einem Medium wie beispielsweise HAT-Medium empfindlich sind. Noch bevorzugtere, sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind Maus-Myelomzelllinien, die beispielsweise vom Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, und der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, erhalten werden können.

nen. Menschliche Myelomzelllinien und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien wurden auch für die Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern beschrieben [Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Decker, Inc., New York, 51–63 (1987)].

[0215] Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Anwesenheit monoklonaler Antikörper, die gegen Zellzyklusprotein gerichtet sind, getestet werden. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität monoklonaler Antikörper, die durch die Hybridomzellen produziert werden, durch Immunfällung oder durch einen In-vitro-Bindungstest, wie beispielsweise 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.

[0216] Nachdem die erwünschten Hybridomzellen identifiziert wurden, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und mittels herkömmlicher Verfahren [Goding, s.o.] gezüchtet werden. 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.

[0217] Die von den Subklonen sekretierten monoklonalen Antikörper können aus dem Kulturmedium oder der Ascites-Flüssigkeit durch herkömmliche Immunglobulin-Reinigungsverfahren, wie beispielsweise Protein-a-Sepharose, Hydroxylapatit-Chromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, isoliert oder gereinigt werden.

[0218] Die monoklonalen Antikörper können auch durch DNA-Rekombinationsverfahren, wie jenem, das im US-Patent Nr. 4.816.567 beschrieben wird, hergestellt werden. DNA, die für die monoklonalen Antikörper der Erfindung kodiert, kann leicht 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 Mausantikörpern kodieren) 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 platziert werden, die dann in Wirtszellen wie beispielsweise 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 erhalten. Die DNA kann auch beispielsweise durch Substituieren der Codiersequenz für menschliche Schwerketten- und Leichtketten-Konstantdomänen anstelle der homologen Mausequenzen [US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., s.o.] oder durch kovalentes Binden der gesamten Codiersequenz für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid oder einen Teil davon an die Immunglobulin-Codiersequenz modifiziert werden. Die konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung oder die variablen Domänen einer Antigen-kombinierenden Stelle eines Antikörpers der Erfindung können durch solch ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid substituiert werden, um einen chimären zweiwertigen Antikörper zu schaffen.

[0219] Die Antikörper können einwertige Antikörper sein. Verfahren zur Herstellung einwertiger Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Beispielsweise umfasst ein Verfahren rekombinante Expression von Immunglobulin-Leichtkette und modifizierter Schwereketten. Die schwere Kette ist im Allgemeinen an jedem beliebigen Punkt in der Fc-Region trunkiert, sodass Schwerekettenvernetzung unterbunden wird. Alternativ dazu sind relevante Cysteinreste durch einen anderen Aminosäurerest substituiert oder deletiert, um Vernetzung zu vermeiden.

[0220] In-vitro-Verfahren sind auch zur Herstellung einwertiger Antikörper geeignet. Verdau von Antikörpern zur Bildung von Fragmenten davon, insbesondere von Fab-Fragmenten, kann unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, erfolgen.

[0221] Die Anti-Zellzyklusprotein-Antikörper der Erfindung können weiters humanisierte Antikörper oder menschliche Antikörper umfassen. Humanisierte Formen von nichtmenschlichen (z.B. Maus-) Antikörpern sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie beispielsweise Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ oder andere Antigen-bindende Subsequenzen von Antikörpern), die Minimalsequenzen, abgeleitet von nichtmenschlichem Immunglobulin, enthalten. Humanisierte Antikörper umfassen menschliche Immunglobuline (Empfängerantikörper), in denen Reste aus einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Empfängers durch Reste aus einer CDR einer nichtmenschlichen Spezies (Spendeantikörper) wie von Maus, Ratte oder Kaninchen mit der erwünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In manchen Fällen

sind Fv-Gerüstreste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nichtmenschliche Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können auch Reste umfassen; die weder im Empfängerantikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen zu finden sind. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen die vollständige von zumindest einer, und typischerweise zwei, variablen Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nichtmenschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene aus einer menschlichen Immunglobulin-Consensussequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst Idealerweise auch zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jene 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)].

[0222] Verfahren zum Humanisieren nichtmenschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die von einer Quelle, die nichtmenschlich ist, in ihn eingeführt werden. Diese nichtmenschlichen Aminosäurereste werden oft als "Import"-Reste bezeichnet, die typischerweise aus einer variablen "Import"-Domäne entnommen werden. Humanisierung kann im Wesentlichen gemäß dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern durchgeführt werden [Jones et al., Nature 321, 522–525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323–327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534–1536 (1988)], durch Substituieren der entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durch Nagetier-CDR oder -CDR-Sequenzen. Demgemäß sind solche "humanisierten" Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin im Wesentlichen weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz einer nichtmenschlichen Spezies ersetzt 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 von Nagetier-Antikörpern ersetzt wurden.

[0223] Menschliche Antikörper können auch unter Verwendung verschiedener, auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren, umfassend Phagendisplaybibliotheken [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 auch zur Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern verfügbar [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, S. 77 (1985), und Boerner et al., J. Immunol. 147(1), 86–95 (1991)]. Demähnlich können menschliche Antikörper durch Einführen menschlicher Immunglobulin-Loci in transgene Tiere, z.B. Mäuse, in denen die endogenen Immunglobulingene teilweise oder vollständig inaktiviert wurden, hergestellt werden. Bei Exposition wird die Produktion von menschlichen Antikörpern beobachtet, die solchen, die bei Menschen gesehen wurden, in jeder Hinsicht sehr stark ähnlich sind, umfassend Genneuregulation, Anordnung und Antikörperrepertoire. 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 und in den folgenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen 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).

[0224] Bispezifische Antikörper sind monoklonale, vorzugsweise menschliche oder humanisierte, Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei unterschiedliche Antigene aufweisen. Im vorliegenden Fall betrifft eine der Bindungsspezifitäten das Zellzyklusprotein, die andere ein anderes Antigen und vorzugsweise ein Zelloberflächenprotein oder einen -Rezeptor oder eine -Rezeptoruntereinheit.

[0225] Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Herkömmlicherweise basiert die rekombinante Produktion von bispezifischen Antikörpern auf der Co-Expression von zwei Immunglobulin-Schwerketten/Leichtketten-Paaren, worin die zwei schweren Ketten unterschiedliche Spezifitäten aufweisen [Milstein & Cuello, Nature 305, 537–539 (1983)]. Aufgrund der zufälligen Auswahl von Immunglobulin-Schwer- und -Leichtketten produzieren diese Hybridome (Quadrome) ein potentiell Gemisch aus zehn unterschiedlichen 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), offenbart.

[0226] Variable Antikörperdomänen mit den erwünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Kombinationsstellen) können an Sequenzen von Immunglobulin-Konstantdomänen fusioniert werden. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit einer Immunglobulin-Schwerketten-Konstantdomäne, umfassend zumindest Teile der Gelenks-, CH2- und CH3-Regionen. Vorzugsweise enthält die erste konstante Schwerkettenregion (CH1) die

Stelle, die für Leichtkettenbindung, welche in zumindest einer der Fusionen vorhanden ist, erforderlich ist. DNA, die für die Immunglobulin-Schwerkettenfusionen und, sofern erwünscht, für die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in getrennte Expressionsvektoren eingeführt und in einen geeigneten Wirtsorganismus co-transfiziert. Für weitere Details für das Bilden von bispezifischen Antikörpern siehe beispielsweise Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

[0227] Heterokonjugierte Antikörper liegen auch innerhalb des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung. Heterokonjugierte Antikörper setzen sich aus zwei kovalent gebundenen Antikörpern zusammen. Solche Antikörper wurden beispielsweise zum Richten von Immunsystemzellen gegen unerwünschte Zellen [US-Patent Nr. 4.676.980] und zur Behandlung von HIV-Infektion [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089] vorgeschlagen. Es wird erwogen, dass die Antikörper in vitro unter Verwendung bekannter Verfahren der synthetischen Proteinchemie, umfassend jene, die Vernetzer einbinden, gebildet werden können. Beispielsweise können Immuntoxine unter Verwendung einer Disulfid-Austauschreaktion oder durch Bildung einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele für geeignete Reagenzien für diesen Zweck umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptobutyrimidat sowie jene, die beispielsweise im US-Patent Nr. 4.676.980 offenbart sind.

[0228] Die Anti-Zellzyklusprotein-Antikörper der Erfindung haben verschiedene Einsatzbereiche. Beispielsweise können Anti-Zellzyklusprotein-Antikörper in Diagnosetests für ein Zellzyklusprotein verwendet werden, z.B. zum Nachweisen seiner Expression in spezifischen Zellen, Geweben oder Serum. Verschiedene Diagnosetestverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, können verwendet werden, wie beispielsweise Konkurrenz-Bindungstests, direkte oder indirekte Sandwich-Tests und Immunfällungs-Tests, die entweder in heterogenen oder homogenen Phasen durchgeführt werden [Zola, *Monoclonal Antibodies: a Manual of Techniques*, CRC Press Inc. (1987), 147–158]. Die in den Diagnosetests verwendeten Antikörper können mit einer nachweisbaren Gruppierung markiert werden. Die nachweisbare Gruppierung sollte in der Lage sein, entweder direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal zu produzieren. Beispielsweise kann die nachweisbare Gruppierung ein Radioisotop, wie beispielsweise ^3H , ^{14}C , ^{35}P , ^{35}S oder ^{125}I , eine fluoreszierende oder chemilumineszierende Verbindung, wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin, oder ein Enzym, wie alkalische Phosphatase, β -Galactosidase oder Meerrettichperoxidase, sein. Jedes beliebige Verfahren, das auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, um den Antikörper an die nachweisbare Gruppierung zu konjugieren, kann verwendet werden, umfassend jene 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.

[0229] Anti-Zellzyklusprotein-Antikörper sind auch nützlich für die Affinitätsreinigung von Zellzyklusprotein aus rekombinanter Zellkultur oder natürlichen Quellen. In diesem Verfahren werden die Antikörper gegen Zellzyklusprotein auf einem geeigneten Träger, wie beispielsweise Sephadex-Harz oder Filterpapier, unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren immobilisiert. Die immobilisierten Antikörper werden dann mit einer Probe kontaktiert, die das zu reinigende Zellzyklusprotein enthält, und hiernach wird der Träger mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das im Wesentlichen das gesamte Material in der Probe entfernt, unter Ausnahme des Zellzyklusproteins, das an den immobilisierten Antikörper gebunden ist. Schließlich wird der Träger mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das das Zellzyklusprotein aus dem Antikörper freisetzt.

[0230] Die Anti-Zellzyklusprotein-Antikörper können auch bei der Behandlung verwendet werden. In einer Ausführungsform werden Gene, die für die Antikörper kodieren, bereitgestellt, sodass sich diese Antikörper an das Zellzyklusprotein binden und es innerhalb der Zelle modulieren.

[0231] In einer Ausführungsform wird eine therapeutisch wirksame Dosis eines Zellzyklusproteins, Agonisten oder Antagonisten an einen Patienten verabreicht. Unter "therapeutisch wirksame Dosis" wird eine Dosis verstanden, die die Wirkungen erzeugt, für die sie verabreicht wird. Die exakte Dosis hängt vom Zweck der Behandlung ab und kann von Fachleuten unter Verwendung bekannter Verfahren ermittelt werden. Wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, können Anpassungen in Bezug auf Zellzyklusprotein-Abbau, systemischer gegenüber lokalisierter Verabreichung sowie Alter, Körpergewicht, allgemeinen Gesundheitszustand, Geschlecht, Ernährung, Dauer der Verabreichung, Wirkstoffwechselwirkung und Ausmaß der Erkrankung notwendig sein und können von Fachleuten durch Routine-Experimente festgelegt und durchgeführt werden.

[0232] Ein "Patient" für die Zwecke der vorliegenden Erfindung umfasst sowohl Menschen als auch andere Tiere, insbesondere Säugetiere, und Organismen. Somit sind die Verfahren sowohl für Therapien an Menschen als auch in veterinären Anwendungen einsetzbar. In der bevorzugten Ausführungsform ist der Patient ein Säugetier, und in der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist der Patient ein Mensch.

[0233] Die Verabreichung des Zellzyklusproteins, Agonisten oder Antagonisten der vorliegenden Erfindung kann auf zahlreiche verschiedene Arten erfolgen, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf, subkutane, intravenöse, intranasale, transdermale, intraperitoneale, intramuskuläre, intrapulmonale, vaginale, rektale oder intrakokale Verabreichung. In manchen Fällen, beispielsweise bei der Behandlung von Wunden und Entzündungen, kann die Zusammensetzung direkt in Form einer Lösung oder eines Sprays verabreicht werden. Je nach der Art der Zuführung können die Verbindungen auf zahlreiche verschiedene Arten formuliert werden. Die Konzentration therapeutisch aktiver Verbindungen in der Formulierung kann von etwa 0,1–100 Gew.-% variieren.

[0234] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen ein Zellzyklusprotein, einen Agonisten oder Antagonisten (umfassend Antikörper und bioaktive Mittel wie hierin beschrieben) in einer zur Verabreichung an einen Patienten geeigneten Form. In der bevorzugten Ausführungsform liegen die pharmazeutischen Zusammensetzungen in einer wasserlöslichen Form vor, wie beispielsweise als pharmazeutisch annehmbare Salze, was sowohl Säure- als auch Basenadditionssalze umfasst. Die Bezeichnung "pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze" bezieht sich auf jene Salze, die die biologische Wirksamkeit der freien Basen beibehalten und die nicht biologisch oder anders unerwünscht sind und die mit anorganischen Säuren, wie beispielsweise Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure und dergleichen, und organischen Säuren, wie beispielsweise Essigsäure, Propionsäure, Glykolsäure, Brenztraubensäure, Oxasäure, Maleinsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Benzoesäure, Zimtsäure, Mandelsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Salicylsäure und dergleichen, gebildet werden. "Pharmazeutisch annehmbare Basenadditionssalze" umfassen jene, die von anorganischen Basen abgeleitet sind, wie Natrium-, Kalium-, Lithium-, Ammonium-, Calcium-, Magnesium-, Eisen-, Zink-, Kupfer-, Mangan-, Aluminiumsalze und dergleichen. Besonders bevorzugt sind die Ammonium-, Kalium-, Natrium-, Calcium- und Magnesiumsalze. Salze, die von pharmazeutisch annehmbaren, organischen, nicht-toxischen Basen abgeleitet sind, umfassen Salze von primären, sekundären und tertiären Aminen, substituierte Amine umfassend natürlich vorkommende substituierte Amine, zyklische Amine und basische Ionenaustauschharze wie beispielsweise Isopropylamin, Trimethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Tripropylamin und Ethanolamin.

[0235] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auch eines oder mehrere der folgenden Elemente beinhalten: Trägerproteine wie Serumalbumin; Puffer; Füllstoffe wie mikrokristalline Cellulose, Lactose, Mais- und andere Stärken; Bindungsmittel; Süßstoffe und andere Geschmacksstoffe; Farbmittel; und Polyethylenglykol. Additive sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden in zahlreichen Formulierungen verwendet.

[0236] Kombinationen der Zusammensetzungen können verabreicht werden. Darüber hinaus können die Zusammensetzungen in Kombination mit anderen Therapeutika verabreicht werden, umfassend Wachstumsfaktoren oder Chemotherapeutika und/oder Bestrahlung. Targeting-Mittel (z.B. Liganden für Rezeptoren auf Krebszellen) können auch mit den hierin bereitgestellten Zusammensetzungen kombiniert werden.

[0237] In einer hierin bereitgestellten Ausführungsform werden die Antikörper zur Immuntherapie verwendet, womit Verfahren für Immuntherapie bereitgestellt werden. Unter "Immuntherapie" wird eine Behandlung von mit Zellzyklusprotein in Verbindung stehenden Erkrankungen mit einem Antikörper, der gegen ein Zellzyklusprotein gezüchtet wurde, verstanden. Wie hierin verwendet kann Immuntherapie passiv oder aktiv sein. Passive Immuntherapie, wie hierin definiert, ist der passive Transfer von Antikörper zu einem Empfänger (Patienten). Aktive Immunisierung ist die Induktion von Antikörper- und/oder T-Zell-Antworten in einem Empfänger (Patienten). Die Induktion einer Immunantwort kann die Konsequenz des Versorgens des Empfängers mit einem Zellzyklusprotein-Antigen sein, gegen das die Antikörper gezüchtet wurden. Fachleuten wird bekannt sein, dass das Zellzyklusprotein-Antigen durch Injizieren eines Zellzyklusproteins, gegen das die Antikörper wünschenswerterweise gezüchtet wurden, in einen Empfänger oder durch Kontaktieren des Empfängers mit einer Zellzyklusprotein-Nucleinsäure, die in der Lage ist, das Zellzyklusprotein-Antigen zu exprimieren, unter für Expression des Zellzyklusprotein-Antigens geeigneten Bedingungen bereitgestellt werden kann.

[0238] In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine therapeutische Verbindung an einen Antikörper, vorzugsweise einen Zellzyklusprotein-Antikörper, konjugiert. Die therapeutische Verbindung kann ein zytotoxisches Mittel sein. In diesem Verfahren resultiert das Richten des zytotoxischen Mittels gegen apoptotische Zellen oder Tumorgewebe oder -zellen in einer Reduktion der Anzahl erkrankter Zellen, wodurch die mit Apoptose oder mit Krebszellzyklusprotein-verbundenen Erkrankungen verbundenen Symptome reduziert werden. Zytotoxische Mittel sind zahlreich und mannigfaltig und umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, zytotoxische Wirkstoffe oder Toxine oder aktive Fragmente solcher Toxine. Geeignete Toxine und deren entsprechende Fragmente umfassen Diphtherie-A-Kette, Exotoxin-A-Kette, Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Curcin, Crocin, Phe-

nomycin, Enomycin und dergleichen. Zytotoxische Mittel umfassen auch Radiochemikalien, hergestellt durch Konjugieren von Radioisotopen an Antikörper, die gegen Zellzyklusproteine gezüchtet wurden, oder durch Binden eines Radionuklids an einen Chelatbildner, der kovalent an den Antikörper gebunden wurde.

[0239] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Zellzyklusproteingene als DNA-Vakzine, entweder einzelne Nucleinsäuren oder Kombinationen von Zellzyklusproteingenen, verabreicht. Nackte DNA-Vakzine sind im Allgemeinen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt; siehe Brower, Nature Biotechnology 16, 1304–1305 (1998). Verfahren zur Verwendung von Nucleinsäuren als DNA-Vakzine sind durchschnittlichen Fachleuten bekannt und umfassen das Einführen eines Zellzyklusproteingens oder eines Teils einer Zellzyklusprotein-Nucleinsäure unter der Steuerung eines Promotors zur Expression in einen Patienten. Das für DNA-Vakzine verwendete Zellzyklusproteingen kann für Vollängen-Zellzyklusproteine kodieren, doch noch bevorzugter kodiert es für Abschnitte der Zellzyklusproteine, umfassend Peptide, die vom Zellzyklusprotein abgeleitet sind. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Patient mit einer DNA-Vakzine, die zahlreiche Nucleotidsequenzen umfasst, die von einem Zellzyklusproteingen abgeleitet sind, immunisiert. Demähnlich ist es möglich, einen Patienten mit zahlreichen Zellzyklusproteingenen oder Abschnitten davon, wie hierin definiert, zu immunisieren. Ohne hier auf eine bestimmte Theorie beschränkt zu sein, werden nach Expression des Polypeptids, das durch die DNA-Vakzine kodiert wird, zytotoxische T-Zellen, Helfer-T-Zellen und Antikörper induziert, die Zellen, die Zellzyklusproteine exprimieren, erkennen und zerstören oder eliminieren.

[0240] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die DNA-Vakzinen ein Gen, das für ein Adjuvans-Molekül mit der DNA-Vakzine kodiert. Solche Adjuvans-Moleküle umfassen Cytokine, die die immunogene Antwort auf das Zellzyklusprotein, das durch die DNA-Vakzine kodiert wird, steigern. Zusätzliche oder andere Adjuvantien sind durchschnittlichen Fachleuten bekannt und finden in der Erfindung Verwendung.

[0241] Die zuvor beschriebenen Beispiele dienen dazu, die Art der Verwendung der zuvor beschriebenen Erfindung besser zu beschreiben, sowie dazu, die Verfahren, die am besten für die Durchführung verschiedener Aspekte der Erfindung geeignet sind, zu erläutern. Selbstverständlich dienen diese Beispiele in keiner Weise als Einschränkung des wahren Schutzzumfangs dieser Erfindung, sondern sind viel eher zu veranschaulichenden Zwecken dargestellt.

Patentansprüche

1. Rekombinante Nucleinsäure, die für ein ING2-Protein kodiert, umfassend eine Nucleinsäuresequenz mit zumindest 95 % Identität mit einer Nucleinsäuresequenz, die aus der aus Seq.-ID Nr. 1, 3, 5, 7 und 9 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
2. Rekombinante Nucleinsäure nach Anspruch 1, worin die Nucleinsäure eine Nucleinsäuresequenz umfasst, die aus der aus Seq.-ID Nr. 1, 3, 5, 7 und 9 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
3. Rekombinante Nucleinsäure, die für ein ING2-Protein kodiert, worin das ING2-Protein eine Aminosäuresequenz mit zumindest 95 % Identität mit einer Aminosäuresequenz aufweist, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
4. Rekombinante Nucleinsäure nach Anspruch 3, worin das ING2-Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
5. Expressionsvektor, umfassend eine rekombinante Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4, der operabel an regulatorische Sequenzen gebunden ist, die durch eine mit der Nucleinsäure transformierte Wirtszelle erkannt werden.
6. Wirtszelle, umfassend eine rekombinante Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4.
7. Wirtszelle, umfassend einen Vektor nach Anspruch 5.
8. Verfahren zur Herstellung eines Zellzyklusproteins, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle nach Anspruch 6 oder Anspruch 7 unter Bedingungen, die für die Expression eines ING2-Proteins geeignet sind.
9. Verfahren nach Anspruch 8, ferner das Gewinnen des ING2-Proteins umfassend.
10. Rekombinantes ING2-Protein, für das eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4 ko-

dirt.

11. Rekombinantes ING2-Protein, umfassend eine Aminosäuresequenz mit zumindest 95 % Identität mit einer Aminosäuresequenz, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

12. Rekombinantes ING2-Protein nach Anspruch 11, worin das ING2-Protein an einen Inhibitor eines Apoptoseproteins (IAP) bindet.

13. Rekombinantes ING2-Protein nach Anspruch 11, worin das ING2-Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

14. Isoliertes Polypeptid, das spezifisch an ein ING2-Protein nach einem der Ansprüche 10 bis 13 bindet, worin das Polypeptid ein Antikörper ist.

15. Polypeptid nach Anspruch 14, worin der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

16. Polypeptid nach einem der Ansprüche 14 bis 15, worin das Polypeptid die biologische Funktion des ING2-Proteins verringert oder ausschaltet.

17. Verfahren zum Screenen für ein bioaktives Mittel, das zu Bindung an ein Zellzyklusprotein fähig ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- a) Kombinieren eines ING2-Proteins und eines Kandidaten für ein bioaktives Mittel; und
- b) Bestimmen der Bindung des Kandidaten für ein bioaktives Mittel an das ING2-Protein; worin das ING2-Protein eine Aminosäuresequenz mit zumindest 95 % Identität mit einer Aminosäuresequenz aufweist, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

18. Verfahren zum Screenen für ein bioaktives Mittel, dass die Bindung eines ING2-Proteins und eines IAP stören kann, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- a) Kombinieren eines ING2-Proteins, eines Kandidaten für ein bioaktives Mittel und eines IAPs; und
- b) Bestimmen der Bindung des ING2-Proteins an das IAP; worin das ING2-Protein eine Aminosäuresequenz mit zumindest 95 % Identität mit einer Aminosäuresequenz aufweist, die aus der aus Seq.-ID Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, worin zuerst das Zellzyklusprotein und das IAP kombiniert werden.

20. Verfahren zum Screenen für ein bioaktives Mittel, das zur Modulation der Aktivität eines ING2-Proteins fähig ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- a) Zusetzen eines Kandidaten für ein bioaktives Mittel zu einer Zelle, die eine rekombinante Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst; und
- b) Bestimmen der Wirkung des Kandidaten für ein bioaktives Mittel auf die Zelle.

21. Verfahren nach Anspruch 20, worin eine Bibliothek von Kandidaten für bioaktive Mittel zu mehreren Zellen zugesetzt wird, welche die rekombinante Nucleinsäure umfassen.

22. Verfahren zum Modulieren des Wachstums einer Säugetierzelle in vitro, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge einer rekombinanten Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 an die Zelle.

23. Verfahren nach Anspruch 22, worin p53 ebenfalls verabreicht wird.

24. Verwendung einer rekombinanten Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eines ING2-Proteins nach einem der Ansprüche 10 bis 13 zur Herstellung eines Medikaments zur Modulation von Tumorwachstum.

25. Verwendung nach Anspruch 24, worin p53 ebenfalls bei der Herstellung des Medikaments verwendet wird.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

CTGTCTTGGGCAGCTCAGAGAGAGAACATTTCTTTTCTTTTCTTTTTGATTTTTTTTGGGGTGGAGTCT
 CACCCTGTTGCCCAGGTTGGAGGGTGTGATCTCGGCACACTGCGGCCTCCACCTCCCAGGCTCAAGCGATTC
 TCATGCCCTAGCCTCTCGAGTAGCTGGGACTGTAGCTGTGCACCACCACGCCTGGATAGTTTTTGTGTTTTT
 AGTGGAGACGGGGTTTCACCATGTTGGCCGGGCTGGTCTTGAACCTCCTGACCTCAACTGATTTGCCTGCCTT
 GATCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTATCGAGAACCTTCCCTGCGAACTTCAGAGGAACCTCCAGCTGAT
GCGAGAGCTGGACCAGAGGACGGAAGATAAGAAAGCAGAGATTGACATCCTGGCTGCAGAGTACATCTCCAC
 GGTGAAGACGCTGTCTCCAGACCAGCGCGTGGAGCGCCTGCAGAAGATCCAGAACGCCTACAGCAAGTGCAA
 GGAATACAGTGACGACAAAGTGCAGCTGGCCATGCAGACCTACGAGATGGTGGATAAACACATTTCGAAGGCT
 TGATGCAGACCTGGCGCGCTTTGAAGCAGATCTGAAGGACAAGATGGAGGGCAGTGATTTTGAAAGCTCCGG
 AGGGCGAGGGTTAAAAAAGGCCGGGGTCAGAAAGAAAAAAGAGGGTCCCGGGGCGAGGCAGGAGGACATC
 AGAGGAAGACACACCAAAGAAAAAGAAGCACAAAGGAGGGTCTGAGTTCACTGACACCATCCTGTCCGTGCA
 CCCCTCTGATGTGCTGGACATGCCCCGTGGACCCAAACGAACCCACGTACTGCCTGTGCCACCAGGTCTCCTA
 TGGGGAGATGATTGGCTGTGACAATCCAGACTGTCCAATTGAGTGGTTTCACTTTGCCTGCGTGGACCTTAC
 CACGAAACCCAAAGGAAAATGGTTCTGTCCACGGTGTGTCCAGGAAAAGAGGAAGAAGAAGTAGGAGGAGCT
 GTGTGCCCCGATCCGAGGAGCAAGTTAATCTGTCCCTTCATTCGTGTGCAATATTTCCCTTCCTTTTAAAA
 CTACCTTGTTTCGGTTGATACTTAGTAAC

FIG._1

1 MRELDQRTEDKKAIEDILAAEYISTVKTLSPDQRVERLQKIQNAYSKCKEYSDDKVQLAM
 61 QTYEMVDKHIRRLDADLARFEADLKDKMEGSDFESSGGRGLKKGRGQKEKRGSRGRGRRT
 121 SEEDTPKKKKHKGGSEFTDTILSVHPSVDLMPVDPNEPTYCLCHQVSYGEMIGCDNPDC
 181 PIEWFHFACVDLTTKPKGKWFPCPRCVQEKRKKKZ

FIG._2

TGCTGACCTCAGCCCTGGCGTGGGCATAGGAGGGTCTGCGTGGCTGAGCATCCAGTGTCCTTCGTACTGCCA
 CTGACAGCCTCAGGCCTGATTTCCAGCACTGTCTGTCCAGGAGCAATGGGAGCAAGAGTCACTCCACAAGAC
 TCTGGAGGCCTGATAGGTATCGAGAACCTTCCCTGCGAACTTCAGAGGAACTTCCAGCTGATGCGAGAGCTG
 GACCAGAGGACGGAAGATAAGAAAGCAGAGATTGACATCCTGGCTGCAGAGTACATCTCCACGGTGAAGACG
 CTGTCTCCAGACCAGCGCGTGGAGCGCCTGCAGAAGATCCAGAACGCCTACAGCAAGTGCAAGGAATACAGT
 GACGACAAAGTGCAGCTGGCCATGCAGACCTACGAGATGGTGGATAAACACATTCCAAGGCTTGATGCAGAC
 CTGGCGCGCTTTGAAGCAGATCTGAAGGACAAGATGGAGGGCAGTGATTTTGAAAGCTCCGGAGGGCGAGGG
 TTAaaaaaAGGCCGGGGTCAGAAAGAAAAAGAGGGTCCCCGGGGCCGAGGCAGGAGGACATCAGAGGAAGAC
 ACACCAAAGAAAAAGAAGCACAAGGAGGGTCTGAGTTCACTGACACCATCCTGTCCGTGCACCCCTCTGAT
 GTGCTGGACATGCCCCGTGGACCCAAACGAACCCACGTACTGCCTGTGCCACCAGGTCTCCTATGGGGAGATG
 ATTGGCTGTGACAATCCAGACTGTCCAATTGAGTGGTTTCACTTTCCTGCGTGGACCTTACCACGAAACCC
 AAAGGAAAATGGTGA

FIG._3

1 MGARVTPQDSGGLIGIENLPCELQRNFQLMRELDQRTEDKKAIEDILAAEYISTVKTLS
 61 DQVERLQKIQNAYSCKKEYSDDKVQLAMQTYEMVDKHIRRLDADLARFEADLKDKMEGS
 121 DFESSGGRGLKKGRGQKEKRGSRGRGRRTSEEDTPKKKKHKGGSEFTDTILSVHPSDVL
 181 MPVDPNEPTYCLCHQVSYGEMIGCDNPDCPIEFHFACVDLTTPKPGKWZ

FIG._4

TGCTGACCTCAGCCCTGGCGTGGGCATAGGAGGGTCTGCGTGGCTGAGCATCCAGTGTCTTCGTACTGCCA
 CTGACAGCCTCAGGCCTGATTTCCAGCACTGTCTGTCCAGGAGCAATTGGGAGCAAGAGTCACTCCACAAGAC
 TCTGGAGGCCTGATAGGTATCGAGAACCTTCCCTGCGAACTTCAGAGGAACTTCCAGCTGATTGCGAGAGCTG
 GACCAGAGGACGGAAGATAAGAAAGCAGAGATTGACATCCTGGCTGCAGAGTACATCTCCACGGTGAAGACG
 CTGTCTCCAGACCAGCGCGTGGAGCGCCTGCAGAAGATCCAGAACGCCTACAGCAAGTGCAAGGAATACAGT
 GACGACAAAGTGACGCTGGCCATGCAGACCTACGAGATGGTGGATAAACACATTCTGAAGGCTTGATGCAGAC
 CTGGCGCGCTTTGAAGCAGATCTGAAGGACAAGATGGAGGGCAGTGATTTTGAAAGCTCCGGAGGGCGAGGG
 TTAATAAAAGGCCGGGGTCAGAAAGAAAAAGAGGGTCCCGGGGCCGAGGCAGGAGGACATCAGAGGAAGAC
 ACACCAAAGAAAAAGAAGCACAAAGGAGGGTCTGAGTTCACTGACACCATCCTGTCCGTGCACCCCTCTGAT
 GTGCTGGACATGCCCCGTGGACCCAAACGAACCCACGTACTGCCTGTGCCACCAGGTCTCCTATGGGGAGATG
 ATTGGCTGTGACAATCCAGACTGTCCAATTGAGTGGTTTCACTTGCCTGCGTGGACCTTACCACGAAACCC
 AAAGGAAAATGGTGA

FIG._5

1 MGARVTPQDSGGLIGIENLPCELQRNFQLMRELDQRTEDKKAIEIDILAAEYISTVKTLS
 61 DQVERLQKIQNAYSKCKEYSDDKVQLAMQTYEMVDKHIRRLDADLARFEADLKDKMEGS
 121 DFESSGGRGLKKGRGQKEKRGSRGRGRRTSEEDTPKKKKHKGGSEFTDTILSVHPSDVLD
 181 MPVDPNEPTYCLCHQVSYGEMIGCDNPDCPIEFHFACVDLTTPKPGKWZ

FIG._6

1 TTTGCTGACCTCAGCCCTGCGTGGGCGTATTGAGGGTCTGCGTGGCTGAGCATCCAGTGT
 61 CCTTCGTACTGCCACTGACAGCCTCAGGCCTGATTTCCAGCACTGTCTGTCCAGGAGCAA
 121 TGGGAGCAAGAGTCACTCCACGAGACTCTGGAGGCCTGATAGGTATCGAGAACCTTCCCT
 181 GCGAACTTCAGAGGAACTTCCAGCTGATGCGAGAGCTGGACCAGAGGACGGAAGATAAGA
 241 AAGCAGAGATTGACATCCTGGCTGCAGAGTACATCTCCACGGTGAAGACGCTGTCTCCAG
 301 ACCAGCGCGTGGAGCGCCTGCAGAAGATCCAGAACGCCTACAGCAAGTGCAAGGAATACA
 361 GTGACGACAAAGTGACAGCTGGCCATGCAGACCTACGAGATGGTGGATAAACACATTTCGAA
 421 GGCTTGATGCAGACCTGGCGCGCTTTGAAGCAGATCTGAAGGACAAGATGGAGGGCAGTG
 481 ATTTTGAAAGCTCCGGAGGGCGAGGGTTAAAAAAGGCCGGGGTCAGAAAGAAAAAGAG
 541 GGTCCCGGGGCGGAGGCAGGAGGACATCAGAGGAAGACACACCAAAGAAAAAGAAGCACA
 601 AAGGAGGGTCTGAGTTCACTGACACCATCCTGTCCGTGCACCCCTCTGATGTGCTGGACA
 661 TGCCCGTGGACCCAAACGAACCCACGTACTGCCTGTGCCACCAGGTCTCCTATGGGGAGA
 721 TGATTGGCTGTGACAATCCAGACTGTCCAATTGAGTGGTTTCACTTTGCCTGCGTGGACC
 781 TTACCACGAAACCCAAAGGAAAATGGTTCTGTCCACGGTGTGTCCAGGAAAAGAGGAAGA
 841 AGAAGTAGGAGGAGCTGTGTGCCCCGATCCGAGGAGCAAGTTAATCTGTCCCTTCATTCTG
 901 TGTCGCAATATTTCCCTTCCTTTTAAAACTACCTTGTTTCGGTTGATACTTAGTAACAA

FIG._7

1 MGARVTPQDSGGLIGIENLPCELQRNFQLMRELDQRTEDKKAEIDILAAEYISTVKTLSP
 61 DQRVERQQKIQNAYSKCKEYSDDKVQLAMQTYEMVDKHIRRLDADLARFEADLKDKMEGS
 121 DFESSGGRGLKKGRGQKEKRGSRGRGRRTSEEDTPKKKKHKGGSEFTDTILSVHPSDVLD
 181 MPVDPNEPTYCLCHQVSYGEMIGCDNPDCPIEFHFACVDLTTPKPGKWFCPRCVQEKRK
 241 KKZ

FIG._8

CTGTCTTGGGCAGCTCAGAGAGAGAACATTTCTTTTCTTTTCTTTTTTGTTTTTTTTTTGGGGTGGAGTCT
 CACCCTGTTGCCCAGGTTGGAGGGTGTGATCTCGGCACACTGCGGCCTCCACCTCCCAGGCTCAAGCGATTC
 TCATGCCCTAGCCTCTCGAGTAGCTGGGACTGTAGCTGTGCACCACCACGCCTGGATAGTTTTTGTGTTTTT
 AGTGGAGACGGGGTTTCACCATGTTGGCCGGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAACTGATTTGCCTGCCTT
 GATCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTATCGAGAACCTTCCCTGCGAACTTCAGAGGAACTTCAGCTGAT
GCGAGAGCTGGACCAGAGGACGGAAGATAAGAAAGCAGAGATTGACATCCTGGCTGCAGAGTACATCTCCAC
 GGTGAAGACGCTGTCTCCAGACCAGCGCTGGAGCGCCTGCAGAAGATCCAGAACGCCTACAGCAAGTGCAA
 GGAATACAGTGACGACAAAGTGCAGCTGGCCATGCAGACCTACGAGATGGTGGATAAACACATTCGAAGGCT
 TGATGCAGACCTGGCGCGCTTTGAAGCAGATCTGAAGGACAAGATGGAGGGCAGTGATTTTGAAAGCTCCGG
 AGGGCGAGGGTTAAAAAAGGCCGGGGTCAGAAAGAAAAAGAGGGTCCCCGGGGCCGAGGCAGGAGGACATC
 AGAGGAAGACACACCAAAGAAAAAGAAGCACAAAGGAGGGTCTGAGTTCACTGACACCATCCTGTCCGTGCA
 CCCCTCTGATGTGCTGGACATGCCCGTGGACCCAAACGAACCCACGTACTGCCTGTGCCACCAGGTCTCCTA
 TGGGGAGATGATTGGCTGTGACAATCCAGACTGTCCAATTGAGTGGTTTTCACTTGCCTGCGTGGACCTTAC
 CACGAAACCCAAAGGAAAATGA

FIG._9

1 MRELDQRTEDKKAIEDILAAEYISTVKTLSPDQQRVERLQKIQNAYSKCKEYSDDKVQLAM
 61 QTYEMVDKHIRRLDADLARFEADLKDKMEGSDFESSGGRGLKKGRGQKEKRGSRGRGRRT
 121 SEEDTPKKKKHKGGSEFTDTILSVHPSDVLDPVDPNEPTYCLCHQVSYGEMIGCDNPDC
 181 PIEWFHFACVDLTTPKPGKZ

FIG._10

ING2: EINE NEUE FAMILIE VON p33ING-HOMOLOG

1 ING2B
 1 ING2C
 1 ING2A
 1 P33ING-1
 1 P33ING1-2
 1 ING1LP
 1 Consensus

```

-----MGARVTPQDS--GGLIGIENLP-CELQRFQLMR-ELDQR
-----MGARVTPQDS--GGLIGIENLP-CELQRFQLMR-ELDQR
-----MLSPAN--GEQLHLVNY-VEDYDSDSIESLP-FDLQRNVSLMR-ETDAK
MPLCTATRIPTYSSSSDP-GPVARGRC-SSDRLPRPAGPARRQFAASLTLTRGCRWAP
--MLGQQQQLYSSAALLTGERSRLLTTCYVQDYLECVESLP-HDMQRNVSVLR-ELDNK
          s          g r v h          d l i e l p          el q r n          l m r          el d q r

```

37 ING2B
 37 ING2C
 8 ING2A
 44 P33ING-1
 59 P33ING1-2
 56 ING1LP
 61 Consensus

```

TEDKKAIEDIIAAAEYISTVKTLSPDQQRVERLRQKIQNAYSKCKEYSDDKVOQLAMQTYEMVD
TEDKKAIEDIIAAAEYISTVKTLSPDQQRVERLRQKIQNAYSKCKEYSDDKVOQLAMQTYEMVD
TEDKKAIEDIIAAAEYISTVKTLSPDQQRVERLRQKIQNAYSKCKEYSDDKVOQLAMQTYEMVD
YQELILKELDECYERFS--RETGGAQKRRMLHCVQRAALIRSQELGDEKTKQIVSQMVELVE
WKQILKELDECYERFS--RETGGAQKRRMLHCVQRAALIRSQELGDEKTKQIVSQMVELVE
YQETLKELDDVYEKVK--KEDDLNQKKRLQLLQRAALLINSQELGDEKTIQIVTQMLVELVE
tedk Eidil eyistvk l pdQrv rlqkiQ A k E DdkvQl mQ yEmvd

```

97 ING2B
 97 ING2C
 68 ING2A
 101 P33ING-1
 116 P33ING1-2
 113 ING1LP
 121 Consensus

```

KHIRRLDADLARFEADLKD-KMEGSDFESSGGRG-----LKKGRGQK--EKR-
KHIRRLDADLARFEADLKD-KMEGSDFESSGGRG-----LKKGRGQK--EKR-
KHIRRLDADLARFEADLKD-KMEGSDFESSGGRG-----LKKGRGQK--EKR-
NRTRQVDSHVLELFEAQQELGDTVGN SGKVGADRPNGD AVAQSDKPN SKRSRRQRNNENRE
NRTRQVDSHVLELFEAQQELGDTVGN SGKVGADRPNGD AVAQSDKPN SKRSRRQRNNENRE
NRARQMELHSQCFQDDPAES-ERASDKAKMDSSQP-----ER-SSRRPQRRTSES RD
          hir l da larFeadl d kmegsdf ssggr          dk          kkgR Qk          EkRe

```

FIG. 11A

ING2: EINE NEUE FAMILIE VON p33ING-HOMOLOG

ING2B	141	-GSRGRGRR	TSEEDTPKK	KKHKGG	SEFTDT	-ILSV	HP	SDV	LDMP	VDPNEPTYCLCH	QVSY
ING2C	141	-GSRGRGRR	TSEEDTPKK	KKHKGG	SEFTDT	-ILSV	HP	SDV	LDMP	VDPNEPTYCLCH	QVSY
ING2A	112	-GSRGRGRR	TSEEDTPKK	KKHKGG	SEFTDT	-ILSV	HP	SDV	LDMP	VDPNEPTYCLCH	QVSY
P33ING-1	161	NAS	NHDDGASG	TPKEKKA	TSKKKKR	SKAKA	EREAS	PADLP	IDPNEPTYCLCN	QVSY	
P33ING1-2	176	NAS	NHDDGASG	TPKEKKA	TSKKKKR	SKAKA	EREAS	PADLP	IDPNEPTYCLCN	QVSY	
ING1LP	163	LCHM	ANGIEDC	DDQPPK	EKKSK	SAKKKKR	SKAKQ	EREAS	PVEFA	IDPNEPTYCLCN	QVSY
Consensus	181	gsrgrgr	seedtPK	KkhKgg	tk	s	h		ldmpv	DPNEPTYCLC	QVSY

ING2B	199	GEMIGCDN	PDCEPI	EWFFHFA	CVDLT	TKPKGKW					
ING2C	199	GEMIGCDN	PDCEPI	EWFFHFA	CVDLT	TKPKGKW					
ING2A	170	GEMIGCDN	PDCEPI	EWFFHFA	CVDLT	TKPKGKW					
P33ING-1	221	GEMIGCDN	DECP	IEWFFHFS	CVGL	NHHPKGK	WYCPK	CRGENE	KTM	DKAL	EKSKKERAYNR
P33ING1-2	236	GEMIGCDN	DECP	IEWFFHFS	CVGL	NHHPKGK	WYCPK	CRGENE	KTM	DKAL	EKSKKERAYNR
ING1LP	223	GEMIGCDN	EQCP	IEWFFHFS	CVSL	LYKPKGK	WYCPK	CRG	DNEKT	MDKST	EKTKKDRSR-
Consensus	241	GEMIGCDN	pdcPI	EWFFH	F	CvdL	ttkPKGK	Wycp	kcr	genektmdk	ekskker

FIG._11B

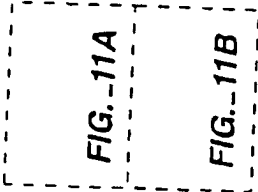


FIG._11

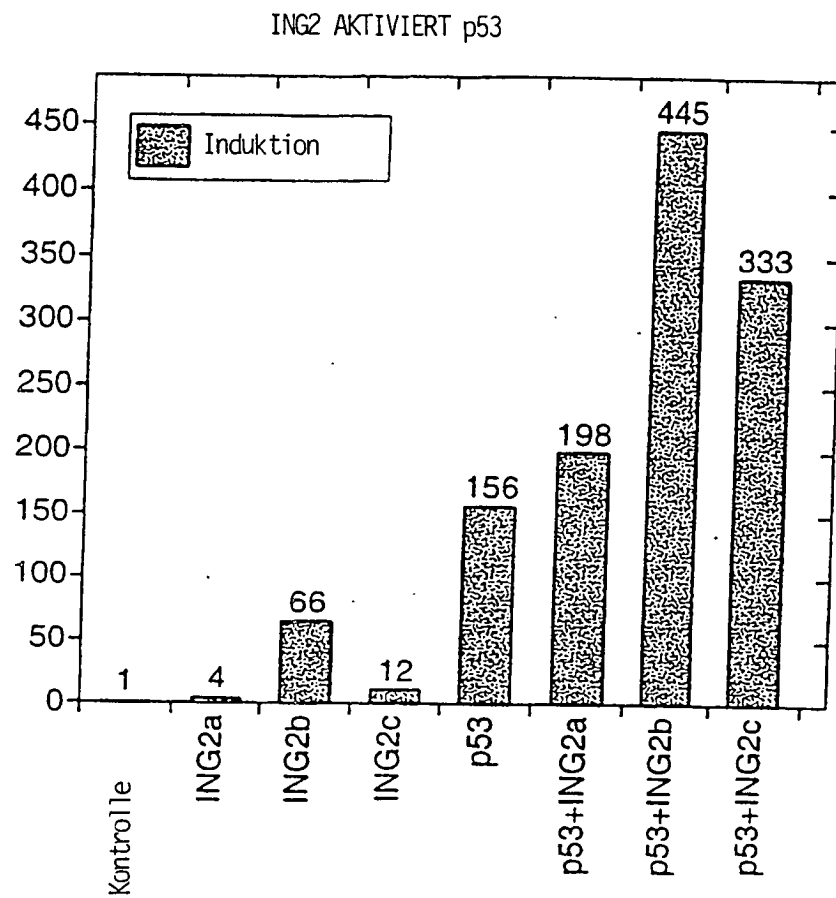


FIG. 12