



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată  
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: <b>145730</b>	(61) Perfecționare la brevet: Nr.
(22) Data de depozit: <b>09.02.1989</b>	(62) Divizată din cererea: Nr.
(30) Prioritate: <b>10.02.1988 US 07/154.206</b>	(86) Cerere internațională PCT: Nr. <b>US 89/00462 09.02.1989</b>
(41) Data publicării cererii: BOPI nr.	(87) Publicare internațională: Nr. <b>WO 89/07654 24.08.1989</b>
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: <b>30.05.2003</b> BOPI nr. <b>5/2003</b>	(56) Documente din stadiul tehnicii: <b>US 4980281; 5688655</b>
(45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr.	

(71) Solicitant:	<b>HOUSEY M. GERARD, NEW YORK 10032, US</b>
(73) Titular:	<b>HOUSEY M. GERARD, NEW YORK 10032, US</b>
(72) Inventatori:	<b>HOUSEY M. GERARD, NEW YORK 10032, US</b>
(74) Mandatar:	<b>ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI</b>

(54) **METODĂ DE DETERMINARE A CARACTERULUI UNEI SUBSTANȚE,  
DE INHIBITOR SAU ACTIVATOR AL UNEI PROTEINE**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o metodă de determinare a caracterului unei substanțe, de inhibitor sau activator al unei proteine, și are aplicabilitate în domeniul terapiei genice. Metoda conform invenției constă în aceea că proteina produsă de o celulă determină o modificare reactivă a unei caracteristici de fenotip diferită de nivelul de producere a proteinei în celula ca atare și cuprinde următoarele etape: a) asigurarea unei prime linii de celule care produce proteina și prezintă răspunsul fenotipic la proteină; b) asigurarea unei a doua linii de celule care produce proteina la un

nivel mai scăzut decât prima linie de celule sau nu produce deloc proteină și care prezintă răspunsul fenotipic la proteină într-un grad mai scăzut sau deloc; c) incubarea substanței cu prima și a doua linie de celule; și d) compararea răspunsului fenotipic al primei linii de celule, la substanță, cu răspunsul fenotipic al celei de-a doua linii de celule, față de substanță.

Revendicări: 22  
Figuri: 7

RO 118452 B1



Invenția se referă la o metodă de determinare a caracterului de inhibitor sau activator de proteină, al unei substanțe.

Metoda prezintă aplicabilitate în domeniul terapiei genice.

Un număr de sisteme de studiere sunt în prezent utilizate pentru descoperirea noilor modulatori de creștere a celulei și în particular, în căutarea noilor medicamente împotriva cancerului care sunt în mod specific toxice față de celulele canceroase dar nu și pentru celulele normale. Pot exista o varietate de modificări fenotipice de schimbare, dintre acestea, cele mai reprezentative fiind inversarea fenotipului transformat, schimbări semnificative în morfologia celulei sau citotoxicitatea. Studiile includ: (1) studii de citotoxicitate *in vitro*; (2) studii de formare a coloniilor celulare pe modiu cu agar moale; (3) studii antimicrobiene *in vitro*; și (4) studii care detectează schimbări în morfologia celulei.

Studiile de citotoxicitate *in vitro* cuprind măsurarea parametrilor celulei, care constituie indicatori pentru inhibarea creșterii celulei sau pentru citotoxicitate. Acestea includ, de exemplu, măsurarea inhibării unor precursori ai metabolismului celular, ca răspuns la tratamentul cu agenți citostatici. Lucrările lui Von Boff și colab. (1985), (Von Hoff D.D., Forseth B. and Warfel L.e. (1985) *Use of a Radiometric System to Screen for Antineoplastic Agents: Correlation with a Human Tumor Cloning System. Cancer Res.* 45, 4032-4036) și Catino și colab. (1985) (Catino J.J., Francher D.M., Edinger K.J. and Stringfellow, D.A. (1985) *A microtitre cytotoxicity assay useful for the discovery of fermentation-derived antitumor agents. Cancer Chemother. Pharmacol.* 15, 240-243) descriu metode caracteristice, care utilizează această tehnică. Aceste tehnici sunt tehnici complexe într-o oarecare măsură și, în anumite cazuri, necesită utilizarea trasorilor radioactivi. Mai mult, rezultatele sunt nespecifice, deoarece orice agent care afectează proprietățile de creștere ale celulei va fi considerat pozitiv în aceste sisteme de studiu.

De asemenea, agenții au fost testați, pentru a vedea abilitatea lor în ceea ce privește inhibarea celulelor transformate (canceroase) din creșterea pe agar moale. Această metodă este bazată pe descoperirea lui Freedman și Shin (1974). (Freedman V.H. and Shin S. (1974) *Cellular Tumorigenicity in nude Mice: correlation with Cell Growth in Semi-Solid Medium. Cell* 3, 355-359) conform căruia transformarea coloniilor de celule în agar moale se realizează *in vitro* și demonstrează faptul că celulele vor fi tumorigene la un animal experimental.

Această metodă este relativ simplă de efectuat, deoarece creșterea coloniei va fi, după două sau trei săptămâni, în general suficient de mare ca să se vadă cu ochiul liber.

Totuși, în forma sa prezentă, această metodă este nespecifică, din motivele descrise mai sus. Cu alte cuvinte, orice agent ce prezintă creștere celulară în orice mod, cu activitate inhibitoare, va fi socotit pozitiv în acest sistem de studiere așa cum se utilizează în mod curent, indiferent dacă inhibă sau nu proteina care interesează.

*In vitro*, testele antimicrobiene cuprind utilizarea tulpinilor de bacterii sau drojdii ca organisme de testare pentru sortarea agenților cu creștere generală și proprietăți de inhibare a creșterii (de asemenea descrise de Catino, și colab., 1985) (Catino J.J., Francher D.M., Edinger K.J. and Stringfellow, D.A. (1985) *A microtitre cytotoxicity assay useful for the discovery of fermentation-derived antitumor agents. Cancer Chemother. Pharmacol.* 15, 240-243). În această metodă, tulpina de bacterie sau drojdie este crescută pe mediu standard, în cutii Petri, și agenții potențiali sunt aplicați pe diferite locuri (spoturi) în cutiile Petri. Dacă un agent are proprietăți inhibitoare de creștere, la locul aplicării sale pe placă (cutie) rezultă o zonă clară, ce derivă din incapacitatea tulpinii de testat de a crește în acea zonă. Această metodă este rapidă și poate fi executată de un tehnician care nu are experiență în tehnicile de creștere a țesuturilor, dar rezultatele sunt în general nespecifice, datorită agenților care sunt eficienți față de tulpinile de bacterii sau drojdii, sunt frecvent mai puțin efectivi

## RO 118452 B1

(sau complet inefectivi) în modularea creșterii celulelor mamare, așa cum se arată în lucrarea lui Catino și colab. (1985) (Catino J.J., Francher D.M., Edinger K.J. and Stringfellow D.A. (1985) *A microtitre cytotoxicity assay useful for the discovery of fermentation-derived antitumor agents. Cancer Chemother. Pharmacol.* 15, 240-243). 50

Un alt sistem de evaluare depinde de alterarea morfologiei celulelor de testat prin expunerea la agenții potențiali, în scopul de a determina eficiența agentului dat. Această metodă este în mod curent cea mai eficientă pentru dezvoltarea agenților specifici care interacționează cu o proteină dată sau care alterează o proprietate celulară specifică, așa cum se evidențiază în reprezentativa lucrare a lui Uehara și colab. (1985) (Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1985) *Screening of Agents Which Convert 'Transformed Morphology' of Rous Sarcoma Virus-Infected Rat Kidney Cells to 'Normal Morphology': Identification of an Active Agent as Herbimycin and its Inhibition of Intracellular src Kinase, Jpn. J.Cancer Res.* 76, 672-675). Totuși, aceste sisteme de evaluare (sortare) sunt dintre cele mai dificile pentru aplicarea în practică, deoarece efectul morfologic al fiecărui agent individual asupra celulelor de testare poate fi studiat la microscop. Totuși, această metodă necesită observații extinse asupra celulelor, prin intermediul unui om de știință antrenat. 55 60 65

Prezenta metodă înlătură dezavantajele prezentate în alte metode, prin combinarea rapidității cu ușurința executării testului pe agar moale (geloză moale), cu specificitate pentru detectarea unui agent activ care iese din cadrul testului morfologic. Metoda de determinare a caracterului de inhibitor sau activator de proteine, al unei substanțe, constă în aceea că proteina produsă de o celulă determină o modificare reactivă a unei caracteristici de fenotip, diferită de nivelul de producere a proteinei în celula ca atare, și cuprinde următoarele etape: 70

a) asigurarea unei prime linii de celule care produce proteina și prezintă răspunsul fenotipic la proteină;

b) asigurarea unei a doua linii de celule care produce proteina la un nivel mai scăzut decât prima linie de celule sau nu produce deloc proteină și care prezintă răspunsul fenotipic la proteină într-un grad mai scăzut sau deloc; 75

c) incubarea substanței cu prima și a doua linie de celule; și

d) compararea răspunsului fenotipic al primei linii de celule la substanță cu răspunsul fenotipic al celei de-a doua linii de celule față de substanță. 80

Prezenta invenție asigură un sistem rapid, dar totodată puternic, de selecționare pentru descoperirea și identificarea atât a inhibitorilor, cât și a activatorilor proteinelor. Procedeu poate fi aplicat virtual la orice tip de proteină, inclusiv la enzime, receptori sau proteine ARN-legate, sau la altele care sunt direct sau indirect cuprinse în reglarea creșterii celulare. 80

Invenție se bazează pe observarea faptului că, dacă o proteină ("proteina de interes" sau POI) care este cuprinsă într-o oarecare măsură în controlul creșterii celulare este supra-produsă în celule, atunci agenții farmacologici ce pot activa sau inhiba POI pot duce la proprietăți de creștere alterate ale celulelor. 85

Sensibilitatea celulelor este dependentă de producerea proteinei de interes (POI), un fenomen la care aici se face referire prin "răspunsul celular gradat" față de agentul activ farmacologic. 90

Metoda cuprinde inserarea unei molecule ADN (sau cADN), secvența de codificare a proteinei de interes (POI) în vectorul corespunzător și generarea liniilor de celule care conțin fie (1) vectorul de expresie singur ("controlul" - liniile celulare), fie (2) vectorul de expresie conținând secvențele de codificare ADN (sau cADN) ale POI ("liniile celulei "test"). Utilizând sistemul vectorial corespunzător, liniile celulei recipient și condițiile de creștere, liniile celulei test pot fi generate astfel, încât să producă într-o cantitate corespunzătoare proteină de interes (POI). În condiții de creștere corespunzătoare, aceste linii celulare vor prezenta un "răspuns celular gradat" față de activatorii sau inhibitorii proteinei de interes. 95

100 Un sistem de sortare poate fi astfel fixat prin controlul liniilor celulelor-test care sunt propagate în condițiile definite de creștere a țesutului din cutiile de cultură (sau chiar la animalele experimentale) și, astfel, un mare număr de compuși (sau substanțe brute ce pot conține compuși activi) pot fi sortați prin efectul lor asupra proteinei de interes.

105 Substanțele care inhibă sau activează POI pot afecta caracteristici cum ar fi viteza de creștere, potențialul tumorigen, potențialul antitumorigen, potențialul antimetastazic, morfologia celulară, expresia antigen și/sau capacitatea de creștere independent de stadiul de ancorare. Substanțele care inhibă în mod specific sau inactivează proteina de interes pot fi distinse dintre substanțele care afectează morfologia sau creșterea celulei prin alte mecanisme în care ele au un efect mai mare asupra liniilor-test decât asupra liniilor de control.

110 Sistemul a fost testat utilizând secvențe cADN și câteva linii celulare recipient, și poate fi ușor automatizat.

115 Prezenta metodă este direcționată spre utilizarea și identificarea potențialului chimic al inhibitorilor sau activatorilor enzimelor receptorilor, sau oricăror proteine care au efecte asupra fenotipului celulei. Metoda necesită două linii de celule, preferabil aceleași, cu excepția expresiei lor (producerii) proteinei de interes la diferite nivele (și orice alte diferențe impuse de diferența lor în expresie). Inhibitorii sau activatorii sunt identificați prin efectul lor mai mare asupra fenotipului liniei celulare cu cea mai mare producție.

120 Orice caracteristică fenotipică a celulei care este afectată de expresia proteinei de interes, alta, desigur, decât nivelul proteinei însăși, poate fi studiată (experimentată). Caracteristica fenotipului este, preferabil, una de "cultură" sau "morfologică", a celulei.

125 Caracteristicile de cultură includ, dar nu se limitează la elementele nutritive necesare creșterii, elemente nutritive care, chiar dacă nu sunt necesare pentru creștere, susțin creșterea, mai ales în condițiile fizice (temperatura, pH-ul, mediul gazos înconjurător, starea osmotică și ancorarea dependentă sau independentă) ale culturii care afectează creșterea și substanțele care inhibă creșterea sau chiar distrug celulele.

125 Caracteristicile morfologice includ dimensiunea și forma celulelor, aranjarea lor, diferențierea celulelor și substructurile subcelulare.

130 În cazul în care proteina de interes este implicată în fenomenele de dezvoltare a tumorilor sau legate de ele, caracteristica observată este preferabil una legată de controlul creșterii celulare, diferențierea, separarea diferențelor, transformările carcinogenice, metastaza, generarea tumorii sau angiogeneza.

135 Schimbările fenotipice care sunt observabile cu ochiul liber sunt în special de interes. Schimbările în abilitatea celulelor de a crește în manieră independent de ancorare, creșterea pe agar moale, pentru a forma plaje de culturi de celule, și să se preia tulpinile selectate sunt fenomene particular apropiate pentru observarea și compararea datelor.

140 Producerea mai ridicată a liniei de celule este preferabil obținută prin introducerea unei gene codificatoare a proteinei de interes (POI) în celula-gazdă. Gena poate fi una izolată din genomul organismului, un cADN obținut din transcrierea unui ARN izolat dintr-un organism, sau un duplicat sintetic al unei gene existente în mod natural. Gena poate avea, de asemenea, o secvență care nu apare exact în natură, dar care corespunde mai degrabă unei mutații (simplă sau multiplă) a secvenței apărute natural. Nu există limitări în ce privește maniera în care este obținută mutația acestei secvențe. Gena este operabil legată la un promotor al genei de expresie care este funcțională în gazdă, cum ar fi cea corespunzătoare proteinei de interes (POI), ce este "supraprodusă" în celulele-recipient la diferite grade de expresie. Promotorul poate fi constitutiv sau inductibil. Prin "supraprodus" se înțelege faptul  
145 că proteina de interes este exprimată la nivele mai ridicate în linia celulară manipulată genetic decât în linia celulară originală. Aceasta permite liniilor celulare să se genereze astfel, încât să conțină (sau să secrete) de la puțin, la de câteva ori, până la mai mult de 100 ori nivele ridicate de POI față de celulele de control.

## RO 118452 B1

Orice metodă poate fi utilizată pentru introducerea genei în celula-gazdă, inclusiv transfecția (transfection) cu un vector retroviral, transcripția directă (de exemplu, mediată de fosfatul de calciu sau DEAE-dextran), și electroporarea (electroporation). Preferabil, se utilizează un vector retroviral. 150

Celulele-gazdă prezintă o schimbare fenotipică observabilă ușor ca un rezultat al producerii neschimbate de POI. Preferabil, acest răspuns ar trebui să fie proporțional cu nivelul de producere al POI. În final, celulele ar putea să nu manifeste spontan schimbarea fenotipică dorită. De exemplu, celulele 3T3 formează plaje în mod spontan. Printre liniile preferate se află Rat-6 fibroblaste, C3H10T 1/2 fibroblaste și HL60. (HL60 este o linie celulară umană ce diferențiază în răspuns față de activarea PKC). Celulele 3T3 pot fi utilizate, dar cu rezervele stabilite anterior. 155

În general, este preferabil să se maximizeze raportul producerii prin "supraproducere" de linie de celule, față de producerea utilizând o linie "nativă". Aceasta este facilitată de selectarea celulei-gazde, care produce puțină sau nu produce deloc proteina de interes, și de introducerea copiilor de gene multiple și/sau utilizând promotori de semnal puternic ridicat. 160

Linia celulară de fibroblaste embrionare, Rat 6, este o variantă a liniei celulare a fibroblastei de șobolan stabilită de către Freeman și colab., (1970) (Freeman, A.E., Price, P.J., Igel, H.J., Young, J.C., Maryak, J.M.Huebner, R.J.(1970) *Morphological transformation of rat embryo cells induced by diethylnitrosamine and murine leukemia viruses*. J.Natl.Cancer Inst. 44, pp 65-76). și izolată de Hsiao și colab., 1986. (Hsiao, W.-L. W., T. Wu, Weinstein, I. B., (1986) *Oncogene-Induced Transformation of a Rat Embryo Fibroblast Cell Line is Enhanced by Tumor Promoters*. Mol. Cell. Biol. 6, pp 1943 - 1950). Această linie celulară are o morfologie neobișnuit de plată; chiar și atunci când este menționată în cultură la postconfluență pentru perioade extinse de timp, prezintă ancoraje dependente la creștere, și, până acum, nu a suferit transformări spontane. Faptul a fost ideal pentru aceste studii, deoarece s-a obținut un nivel foarte scăzut de activitate PKC endogenă și un nivel scăzut al afinității ridicate a receptorilor pentru esterii forbolui. 165 170 175

Deși majoritatea autorilor preferă linii celulare gazdă (Catino, J.J., Francher, D.M., Edinger, K.J., and Stringfellow, D.A. (1985) *A microtitre cytotoxicity assay useful for the discovery of fermentation-derived antitumor agents*. Cancer Chemother. Pharmacol. 15, 240-243), autorii prezentei invenții au testat cu această metodă și alte tipuri de celule, inclusiv cele de șoarece - atât linia de celule NIN-3T3, cât și linia de celule C<sub>3</sub>N 10T<sub>1/2</sub>. Tabelele 1(a) și (b) de mai jos arată activitățile specifice, reprezentative, a șapte NIH-3T3 și șase C3H-10T<sub>1/2</sub> linii celulare stabil superproducătoare de PKC. Autorul a făcut, de asemenea, recent experimente cu linia celulară umană HeLa. În fiecare caz, liniile celulare rezultate au prezentat proprietăți de creștere calitativ identice cu cele descrise pentru liniile celulare PKC - exprimate în fibroblastele-Rat-6. Din această cauză, rezultatele demonstrează cu claritate că pot fi utilizate diferite tipuri de celule în această metodă. Procedeele experimentale, utilizate la obținerea liniilor celulare, au fost, de asemenea, identice celor utilizate în legătură cu linia celulară Rat-6. 180 185

O altă linie celulară, de altfel corespunzătoare utilizării ca linie celulară de control, produce excesiv proteina de interes, este posibil să inhibe această producere prin încorporarea unui inhibitor cunoscut în mediul de cultură atât pentru liniile celulelor de control cât și pentru cele ale celulei de testare, astfel atingându-se o viteză mult mai favorabilă de producție. Altfel, dacă nivelul producerii POI prin linia celulei de testare este prea scăzut, se poate încorpora un activator în mediul de cultură. 190

Este de dorit, dar nu necesar, ca inhibitorul sau activatorul suspectat să fie testat pe ambele linii, respectiv pe linia de control și pe linia de superproducere, în paralel. 195

Se determină o creștere în schimbarea fenotipică prezentată de celula care devine mai mare cu creșterea expresiei proteinei de interes. O numim "răspuns celular gradat" și, prin acest răspuns specializat, distingem inhibitorii sau activatorii proteinei de interes de agenții ce acționează asupra altor metaboliți ai celulei pentru efectuarea schimbării fenotipice.

Astfel, într-o formă preferată, liniile de celule sunt studiate în ceea ce privește nivelele lor relative față de proteine de interes și abilitatea lor de a crește în sisteme independent-ancorate (de exemplu, matrici cum ar fi cele de agar moale sau methocel) pentru a forma mici "pete" (zone de grupări dense de celule grupate împreună și care cresc deasupra alteia), în țesutul din petriurile de cultură, de a prelua tulpinile selectate sau de a lega un anticorp marcat corespunzător, sau alt receptor, de o suprafață epitopă a celulei. Suplimentar, pentru expunerea acestor anomalități de control al creșterii, astfel de linii de celule vor fi, de asemenea, sensibile în proprietățile lor de creștere față de agenții chimici care s-ar putea lega la sau ar putea modifica efectele biologice ale proteinei de interes.

Metoda de determinare este practic unică prin aceea că poate fi utilizată la căutarea rapidă a oricăruia din activatorii sau inhibitorii unei proteine de interes date, depinzând de necesități. Termenul "activatori", așa cum se utilizează pe parcursul prezentei descrieri, include atât substanțele necesare pentru ca proteina de interes să devină activă în primul loc, cât și substanța care aproape îi accentuează activitatea sa. Termenul de "inhibitor" include atât substanța care reduce activitatea proteinei de interes, cât și pe cea care o elimină. Când proteina de interes are mai mult de o posibilitate în ceea ce privește activitatea posibilă, inhibitorul sau activatorul poate modula oricare din activitățile sale.

Utilizarea acestei metode de sortare (screening) pentru identificarea inhibitorilor sau activatorilor enzimelor este de interes special. În particular, autorii sunt interesați în utilizarea ei la identificarea inhibitorilor sau activatorilor enzimelor cuprinse în generarea tumorilor și a fenomenelor legate de acestea, de exemplu, protein kinaza C, arnitin decarboxilaza, protein kinaza dependentă de AMP-ciclic, domeniile protein kinazei insulinei și receptorilor, EGF și produșii enzimatici ai diferitelor gene onc celulare cum ar fi c-src (PP60<sup>src</sup>) sau c-ras (P20<sup>ras</sup>).

Protein kinaza C (PKC) este o Ca<sup>2+</sup> și serin/treonin protein-kinaza dependentă de fosfolipid, de importanță fundamentală în controlul creșterii celulei. Protein kinaza C este activată la nivel endogen printr-o varietate mare de factori de creștere, hormoni și neurotransmițători, și s-a dovedit a fi un receptor de mare afinitate pentru esterul forbol, promotor de tumoare, cât și pentru alți agenți care posedă activitate de inducere a tumorii (vezi Nishizuka 1986; 1984, (Nishizuka, Y. (1986) *Studies and Perspectives of Protein Kinase C. Science* 233, 305-312, Nishizuka, Y. (1984) *The Role of Protein Kinase C in Cell Surface Transduction and Tumour Promotion. Nature* (London) 308, 693-698. Ashendel, 1984) Ashendel, C. *The Phorbol Ester Receptor: a phospholipid-regulated protein kinase.* (1984) *Biochim. Acta* 822, 219-242). Protein kinaza C s-a dovedit că fosforilează câteva substructuri proteinice intercelulare, inclusiv receptorul factorului de creștere epidermal (EGF) (Hunter, T., Ling, N., Cooper, J.A. (1984) *Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. Nature* 311, 480-3), pp60 rsc (Gould, K.L., Woodgett, J.R., Cooper, J.A., Buss, J.E., Shalloway, D., Hunter, T. (1985) *Protein Kinase C Phosphorylates pp60src et a novel site. Cell* 42, pp 849-957), receptorul insulinei (Bollag, G.E., Roth, R.A., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D., Koshland, D. E. Jr. (1986) *Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. Proc.Natl. Acad Sci. USA* 83, pp 5822-4) p21 ras, (Jeng A.Y., Srivastava, S.W., Lacal, J.C., Blumberg, P.M. (1987) *Phosphorylation of ras oncogene product by protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, pp 782-8) etc.

## RO 118452 B1

- Câteva laboratoare au izolat recent clonii ADNc ce codifică forme distincte de protein kinază C, demonstrând astfel că protein kinaza C este codificată de o familie multigenică (Ono, T., Kikkawa, U., Ogita, K., Tomoko, F., Kurokawa, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K., Nishizuka, T). (1987) *Expression and Properties of Two Types of Protein Kinase C: Alternative Splicing from a Single Gene. Science* 236, pp 1116-1120 1986; Knopf, J. L., Les, M-H, Sultzman, L.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M. & Bell, R. (1986) *Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. Cell* 46, 491-502, Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D., & Ullrich, A. (1986) *The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. Science* 233, 853-858; Coussena și colab., 1986; Coussens, L., Parker, P.J., Rhee L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., & Ullrich, A. (1986) *Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways, Science* 233, 859-866; Makovske, M., Birnbaum, M.J., Ballester, R., Rosen, O.M. (1984) *A cDNA encoding PKC identifies two species of mRNA in brain and GH3 cells. J.Biol.Chem.* 261, pp. 13389-13392; Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokohura, H., Sakoh, T., Hidaka, H. (1987) *Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. Nature (London)* 325, pp 161-6; Housey, G.M., Kirschmeier, P., Garte, S.J., Burns, F., Troll, W., & Weinstein, I.B. (1985) *Expression of long terminal repeat (LTR) sequences in carcinogen-induced murine skin carcinomas. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 391-398). Formele multiple de protein kinază C prezintă specificitate tisulară considerabilă Knopf, J. L., Les, M-H, Sultzman, L.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M. & Bell, R. (1986) *Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. Cell* 46, 491-502; Brandt, S.J., Nidel, J.E., Bell, R.M., Young, W.S. (1987) *Distinct patterns of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues. Cell* 49, pp 57-63), dar pot exista diferențe mici în funcția (funcțiile) fiecăreia din formele distincte. Totuși, toate clonele ADNc care au fost izolate conțin forme distincte de codificare ale protein kinazei C, care prezintă cel puțin 65% omologie dedusă la nivelul amino acidului, iar experimentele transiente ale expresiei la unele dintre aceste clone cADN au arătat că ele codifică activitățile serin/treonin protein kinazei care sunt legate la ei, sau activate de ei, prin esterul forbolic-promotor de tumoare (Knopf, J. L., Les, M-H, Sultzman, L.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M. & Bell, R. (1986) *Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. Cell* 46, 491-502. Ono, T., Kikkawa, U., Ogita, K., Tomoko, F., Kurokawa, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K., Nishizuka, T. (1987) *Expression and Properties of Two Types of Protein Kinase C: Alternative Splicing from a Single Gene. Science* 236, pp. 1116-1120).
- S-a utilizat clona PKCbeta1 ADNc pentru studiile prezente, cu excepția creierului, unde expresia sa este foarte ridicată și este virtual nedetectabilă în fibroblastele Rat 6 (vezi mai jos). Astfel, s-a presupus (crezut) că utilizând această formă s-ar maximiza diferențele fenotipice observate între celulele de control și celulele de superexpresie în forma introdusă a PKC. Forma PKC *beta* 1 este, de asemenea, de interes particular, deoarece, în cadrul familiei de gene PKC, domeniul carboxi terminal prezintă omologie completă față de subunitatea catalitică a protein kinazei AMP-dependente (PKAc) și protein kinazei ciclic GMP-dependente (PKG) (Housey, G.M., O'Brian, C.A., Johnson, M.D., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1987) *Isolation of cDNA clones encoding protein kinase C: Evidence for a protein kinase C-related gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, pp 1065-1069). Ultimele observații sugerează că PKAc, PKG și forma *beta* 1 a PVC pot face parte dintr-un progenitor serin/treonin protein kinază comun ancestrală, și că genele PKG pot fi derivate direct din divergența evoluționară a formei *beta* 1.

295 Agenții care interacționează cu anumite proteine structurale, cum ar fi actina și miozina, prezintă, de asemenea, interes. Mutațiile în aceste gene exprimând aceste proteine pot fi implicate în tumorigeneză și metastază. Astfel de interacțiuni pot conduce la schimbări în fenotipul celulei, care poate fi studiat prin această metodă.

300 S-a produs o linie celulară care superproduce protein kinaza C (PKC). Aceste linii celulare, diferite de celulele de control, cresc pe agar moale chiar și în absența promotorului de tumoare esterul forbilic-12-C-tetradecanoilphorbol-13-acetat (TPA)-TPA s-a dovedit a fi activator potențial PKC. Când TPA este adăugat la mediul de creștere liniile de celule PKC-producătoare cresc chiar mai bine și formează colonii considerabil mai mari pe agarul moale. Mai mult, s-au testat, de asemenea, inhibitorii cunoscuți ai PKC, respectiv activității ei, care, așa cum s-a prevăzut, cauzează celulele PKV-superproducătoare să crească puțin sau chiar deloc pe agarul moale. Astfel, utilizarea directă a acestei metode în identificarea activatorilor și a inhibitorilor unui produs genic, în acest caz PKC, a fost clar demonstrată.

310 Studii suplimentare cu alte gene, mai caracteristic cu oncogenele C-H-ras, subunitatea catalitică a proteinkinazei A ciclic AMP-dependentă, omogenei c-myc și unor clone ADNc codificatoare ale proteinelor inductibile ale esterului forbol, au dus la obținerea unor rezultate similare. Astfel, este, de asemenea, clar că metoda poate fi utilizată la o varietate largă de gene codificatoare de proteine care sunt implicate în controlul creșterii celulare în numeroase tipuri de celule. Mai întâi a fost testată capacitatea vectorilor de expresie bazați pe pMV7 (pMV7 este vectorul de transfer preferat) de a produce câteva tipuri diferențiale de proteine, în linii celulare diferite. S-a utilizat secvența de codificare cADN a următoarelor proteine: hipoxantin/guanin fosforibosiltrenerferază (HGPRT), antigenul celulei de suprafață limfocitar T<sub>4</sub> uman, antigenul celulei de suprafață limfocitar T<sub>8</sub> uman, și ornitin carboxilaza (ODC). În fiecare caz, vectorul pKV7 a fost capabil de producere, la nivele înalte, a expresiei genei relevante, prin aceasta rezultând superproducția produsului proteinic corespunzător.

315 S-a verificat că vectorul de expresie derivat de la PMV7 poate genera reproductibil linii celulare care, stabil, superproduc proteinele I, apoi genele suplimentare testate care codifică proteinele, altele decât protein kinaza C, care sunt, de asemenea, cuprinse în controlul de creștere celular.

320 În primul caz, s-a descris o clonă ADNc care, în colaborare cu alte clone, au fost izolate și caracterizate. Această clonă ADNc, desemnată TPA-S1, codifică o proteină a cărei funcție nu este încă cunoscută. Astfel, s-a ales această clonă pentru experimentarea metodei în condițiile la care este utilizată o genă care codifică o proteină de o funcție necunoscută. După cum s-a demonstrat anterior, transcrierea genei TPA-S1 este rapidă și puternic indusă, urmând tratamentul celulelor cu promotori de tumoare cum ar fi TPA (Johnson, M.D., Housey, G.M., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1987) *Molecular Cloning of Gene Sequences Regulated by Tumor Promoters Through Protein Kinase C. Mol. Cell Biol.* 7, 2821-2829), produsul genei TPA-S1 - și joacă un rol important în controlul creșterii celulare, dar nu avem date suplimentare referitoare la funcția sa. Astfel, pentru a încerca în continuare metoda, ADNc TPA-S1 a fost clonat în vectorul de expresie pMV7, rezultând o plasmidă pMV1-TPA-S<sub>1</sub>, și linii de celule generate care superexprimă stabil clona ADNc-TPA-S<sub>1</sub>.  
330 Aceste linii de celule au fost generate exact așa cum s-a descris pentru liniile de celule RG-PKC de mai jos.

335 În acest caz, rezultatele au fost, de asemenea, identice, din punct de vedere calitativ, cu liniile de celule NIH/3T3-tpa-al, care au fost generatoare de superprodus tpa-ul, ce codifică pentru proteine care au fost găsite de asemenea ca prezentând o creștere independentă de ancorare la medium cu agar moale. Această creștere, în continuare, a fost dependentă de nivelul de proteină TPA-S<sub>1</sub>, ARNm și TPA-S<sub>1</sub>, care a fost sintetizată în fiecare linie de celule. Aceste linii de celule pot fi utilizate în manieră strict analoagă liniilor celulelor seriilor R<sub>6</sub>-PKCx, pentru dezvoltarea fie a unui inhibitor fie a unui activator al proteinei TPA-S<sub>1</sub>, utilizând  
340

# RO 118452 B1

- metoda conform prezentei invenții. De notat, suplimentar, că în aceste experiențe s-au putut obține linii de celule superproducătoare de TPA-S<sub>1</sub> care prezintă eficiențe de placare în agar moale în exces de 80%, chiar și când gena TPA-S<sub>1</sub> nu apare ca fiind oncogenă prin definiția standard a ultimului termen. 345
- În celelalte experimente, s-a testat metoda utilizând oncogena activată c-M-ras (T24), din nou în manieră analoagă tehnicilor descrise în prezenta specificație și din nou cu rezultate analoage celor descrise aici, atât pentru clone ADNc PKC, cât și pentru ADNc TPA-S<sub>1</sub>. Astfel, metoda poate fi, de asemenea, utilizată pentru dezvoltarea rapidă a inhibitorului p21 ras. Luate împreună, rezultatele descrise în această specificație demonstrează direct că procedeul descris aici este clar generalizabil la orice genă care este implicată în orice măsură în controlul creșterii celulare. 350
- Metoda de determinare a caracterului de inhibitor/activator de proteină al unei substanțe (medicament) cuprinde următoarele etape. 355
1. Construirea unui vector de expresie care este capabil să exprime proteina de interes în gazda selectată prin inserarea unei gene de codificare a proteinei în vectorul de transfer. Gena poate fi inserată la capătul 3, într-un promotor deja prezent în vectorul de transfer, sau o genă sau un promotor poate fi inserată secvențial sau simultan. 360
  2. Introducerea vectorului de expresie (a) în celulele care produc particule retrovirale recombinante, sau (b) direct în celulele gazdă care vor fi utilizate pentru testele de evaluare a medicamentului ulterior (celulele rezultate sunt denumite celule "test"). 365
- În paralel, vectorul de transfer (de exemplu, vectorul căruia îi lipsește gena de interes și posibil un promotor legat, dar altfel identic vectorului de expresie) este preferabil, de asemenea, pentru introducerea în celulele-gazdă. Liniile celulei derivate de la acest ultim caz vor fi utilizate ca și controale negative în testele subsecvente de evaluare a medicamentului. Alternativ, celulele-gazdă nemodificate pot fi utilizate ca și control. 370
- Dacă se utilizează 2a, după un timp corespunzător (de obicei 48 h), media particulelor virusului recombinant se transferă în celulele-gazdă, astfel încât să se obțină celulele de testare sau celulele de control. 375
3. Celulele de control și test sunt transferate în mediul de creștere selectiv, conținând medicamentul corespunzător, care va permite numai acelor celule, pe jumătate ancorate vectorului de expresie conținând o genă marker selectabilă (cum ar fi gena sau ADNc de interes experimental), să crească. După timpul de selecție corespunzător (de obicei 7-10 zile), clonele individuale ale celulelor (liniile celulelor derivate) sunt izolate și propagate separat. 380
  4. Fiecare linie celulară independentă este testată pentru nivelul de producție al proteinei de interes. Prin această metodă, un domeniu de linii de celule este generat pentru a superproduce de la câteva ori la mai mult de 100 ori nivelele de proteină de interes. 385
- În paralel, liniile de celule de control care conțin numai vectorul de transfer singur (cu gena marker selectabilă) sunt, de asemenea, studiate pentru nivelele endogene ale proteinei de interes. 390
5. Fiecare linie independentă este apoi testată pentru capacitatea sa de creștere în agar moale (sau methocel, sau orice altă matrice similară) de diferite procente și conținând diferite tipuri de medii de creștere până ce liniile de celule sunt identificate ca posedând caracteristicile dorite de creștere, comparativ cu liniile celulare de control. 395
  6. Fiecare linie de celule este, de asemenea, testată pentru abilitatea sa de a forma "pete", sau zone de creștere celulară densă, în plăcile de cultură a țesutului utilizând variate procente ce conțin mediul și tipuri de ser (20%, 10%, 5% ser, ser total de vițel ser de vițel, ser de cal etc.) și diferite condiții de creștere (de exemplu, de alți hormoni, factori de creștere sau alți suplimentari de creștere în mediu, temperatura și umiditatea etc.). În aceste teste, 400

395 celulele sunt menținute la postconfluență pe perioade extinse de timp (de la două la opt săptămâni), cu schimbarea mediului la fiecare trei zile sau când se cere. Asemenea parametri de creștere sunt variați până ce liniile ce posedă plajele dorite, formate, se obțin față de liniile celulelor de control, în condiții identice.

400 7. După ce o linie de celule posedând caracteristicile de creștere cerute este identificată, celulele sunt crescute în condiții determinate în (5) cele descrise mai sus în medii de creștere suplimentate fie cu substanțe brute, fie cu substanțe purificate, care pot conține agenți biologici specifici pentru proteine de interes. Astfel, substanțele brute sau purificate, posedând ultimele proprietăți pot fi rapid identificate prin abilitatea lor de a altera diferențial proprietățile de creștere ale celulelor experimentale (care supraproduc proteina de interes) față de celulele de control (care nu o produc). Acest lucru se poate face rapid chiar prin simpla observare cu ochiul liber, deoarece coloniile care cresc pe agar moale după 2 săptămâni sunt ușor de văzut fără colorare, deși pot fi colorate pentru o mai ușoară detectare.

405 Similar, dacă formarea plajelor postconfluență este aleasă pentru încercare, plajele care rezultă după aproximativ două săptămâni pot fi ușor văzute cu ochiul liber, sau aceste plaje pot fi, de asemenea, colorate. Pentru sortarea unui mare număr de compuși (zece sau sute sau chiar mai mult) întregul procedeu poate fi efectuat pe 96 dispozitive-plăci pentru cultura țesuturilor. Aceasta se aplică la fel de bine atât pentru studiul creșterii pe agar moale, cât și pentru studiul formării plajelor de cultură pe țesut. Rezultatele studiilor pot fi rapid determinate prin măsurarea absorbției relative a celulelor de testare, comparativ cu celulele de control la 500 nm, sau cu altă lungime de undă apropiată). Citirile de absorbție pot fi rapid efectuate în 96- dispozitive plăci de citire a absorbției cum ar fi cel al "Titer-Tek" dispozitiv de citire, sau oricare aparat obișnuit, disponibil în mod curent. În această manieră, pot fi sortați sute de compuși pe lună, pentru activitatea lor biologică, cu foarte puțină muncă și consum de material.

410 Mai mult, dacă variază expresia antigenului la celulele de test teh exprimând nivele ridicate de proteină de interes față de celulele de control, se poate face un simplu studiu de imunoabsorbție a enzimei legate (ELISA) pe un anticorp specific antigenului.

415 În timp ce studiul poate fi efectuat cu o linie de control și cu o linie de celulă de testare, este posibil să se utilizeze și linii suplimentare, linii de testări cu diferite nivele ale proteinei de interes. De asemenea, seturi de linii de control/test, rezultate de la alte gazde, pot fi testate.

420 În continuare, se prezintă exemplele de realizare a invenției și figurile ce însoțesc descrierea:

425 - fig.1A prezintă o secvență ADN<sub>c</sub> de lungime completă și secvența aminoacidului dedusă, secvențe ale uneia din cele câteva forme a PKC care a fost anterior izolată (cADN clona RP58), și a cărei secvență parțială a fost raportată (Housey. G.M., O'Brian, C.A., Johnson, M.D., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1987) *Isolation of cDNA clones encoding protein kinase C: Evidence for a protein kinase C-related gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, pp 1065-1069). Îi corespunde la PFC beta 1 conform nomenclurii lui Ono, și colaboratorii (1987) (Ono, T., Kikkawa, U., Ogita, K., Tomoko, F., Kurokawa, T., Asaoka, Y, Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K., Nishizuka, T. (1987) *Expression and Properties of Two Types of Protein Kinase C: Alternative Splicing from a Single Gene. Science* 236, pp 1116-1120). Secvența dedusă a aminoacidului începe cu primul codon metionină la poziția nucleotidei 91 și codifică proteina aminoacidului 671 cu greutatea moleculară prescrisă, de 76,8 kd. Este subliniat un semnal de poliedenilare consens;

435 - fig.1B arată vectorul de expresie retroviral - derivat cADN obținut în laborator, care a fost utilizat pentru prezentele studii. Întreaga lungime RP58 cADN codificatoare PKC beta 11 arătată în fig. 1A) a fost clonată la situsul Eco RI al plasmidei pM7. Regiunea umbră reprezintă secvența de codificare. "E" și "p" desemnează locusurile restrictive Eco RI și respectiv Pst I. Locusurile indicate între situsurile de restricție în RP58 cADN sunt date în kilobaze.

# RO 118452 B1

- Locusurile indicate între situsurile de restricție în RP58 cAdN sunt date în kilobaze. "LTR" desemnează repetiții terminale lungi, la capătul 5' (stânga) și 3' (dreapta), ale virusului leucemiei Moloney (Molonei murine leukemia virus), și TK-neo" desemnează regiunea promotoare a genei timidinkinazei HBV, legată la capătul 5' al neomicin fosfotransferazei bacteriene (neo); 445
- fig.1-C subliniază forma schematică a întregii strategii utilizate pentru obținerea liniilor de celule stabile ce supraproduc PKC; 450
- fig.2, purificarea și autofosforilarea PKC. Activitatea PKC din fiecare linie de celule a constat în purificarea și supunerea PKC condițiilor de reacție favorizând autofosforilarea PKC. După reacția de autofosforilare, probele de proteină au fost separate prin electroforeza discontinuă pe gel de poliacrilamidă. În locurile de trecere purtând numere fără soț, amestecurile de reacție conțin 1mM Ca<sup>2+</sup> și fosfatidilserină, pentru activarea PKC, și în locurile purtând numere cu soț, amestecurile de reacție conțin 1mM EGTA, 100 mg/ml TPA, și fosfatidilserină. Numerele din marginea stângă indică locurile markerilor de greutate moleculară, în kd. Săgețile indică poziția a 75kd autofosforilat PKC; 455
- fig.3, analizele de hibridizare Northern Blot. Poli A<sup>+</sup> ARN a fost izolat din liniile celulare indicate și separată prin electroforeză pe 6% formaldehidă 1% gel de agaroză, transferat pe membrane de nylon și hibridizat cu probă 32-P marcată pe toată lungimea RP58 cAdN, așa cum s-a descris anterior (Housey, și colab.), Davis, R.J., and Czech, M.P.(1985) *Platelet-derived growth factor mimics phorbol diester action on epidermal growth factor receptor phosphorylation at threonine 654. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 4080-4084*). Numerele din marginea dreaptă indică dimensiunile în kb ale markerilor ARN legați pe autoradiografia originală; 460
- fig.4, răspunsurile morfologice ale liniilor celulare la tratamentul cu forbol-ester. În apropierea confluenței culturilor celor trei linii indicate, care au fost expuse la 100 ng/ml TPA în 0,1% dimetilsulfoxid (DMSO) solvent ("+TPA") sau 0,1% dimetilsulfoxid singur ("-TPA"), în DMEM plus 10% CS. 470
- Fotografiile au fost luate 24 h mai târziu, (panourile A și D) și 48 h mai târziu (panourile B și E). Mediul proaspăt plus sau minus de TOA a fost apoi adăugat, și fotografiile făcute după 24 h (panourile C și F) (Mărire: 100 X);
- fig.5, curbele de creștere ale liniilor celulare de control și supraproducție PKC. Liniile celulare indicate au fost însămânțate la 1 x 10<sup>4</sup> per cm placă în DMEF plus 10% CS, în prezența ("+TPA") și absența ("-TPA") a 100 ng/ml TPA. Numărul celulelor a fost determinat în plăci replicate pe parcursul a următoarelor 11 zile de creștere. Valorile date indică mijloacele determinărilor de triplicare, care au variat cu mai puțin de 10%; 475
- fig.6, formarea postconfluentă plajelor. Celulele de control R6-C2 (panoul A) și R6-PEC3 (panoul B și C) au fost crescute la confluență și apoi menținute pentru încă 28 zile suplimentar în DMEM plus 10% CS (fără TRA), cu adăugare de mediu proaspăt la fiecare trei zile. Fotografiile au fost efectuate la sfârșitul perioadei de 28 zile. Mărirea a fost de: 40X; 480
- fig.7, creșterea pe agar (geloză) moale. Liniile de celule R6-C1, R6-PKC3, și R6-PKC5 au fost însămânțate în cutii Petri de 60 mm în 0,3% agar conținând DMEM plus 20% FBS și 50 I g&ml G 418, plus minus 100 ng/ml TPA. Fotografiile au fost luate după 21 zile de creștere. A) R6-C1 + TPA (putere scăzută în c9mp); B) R-6-CI + TPA (câmp de putere medie); C) R6-PKC3 + TPA 3) R6-PKC5 F) R6-PKC5 + TPAF sau detalii suplimentare vezi în procedeele experimentele. (Mărirea: 100 X în panoul B; 40 X în celelalte panouri). 485
- Exemplul 1.** În cazul în care ne interesează sortarea unui inhibitor de protein kinaze C (PKC), liniile de celule vor fi generate și selectate din cadrul celor ce cresc bine pe agar moale (ca rezultat al superproducerii oricărei forme de protein kinază C) și care prezintă și o îmbogățire a creșterii, când compușii ce sunt cunoscuți ca stimulatori ai protein kinazei C 490

495 sunt adăugați în mediul de cultură. Celulele control corespunzătoare, desigur, nu vor prezenta nici una din aceste caracteristici. Evaluarea (screeningul) potențial al inhibitorului de protein kinază C poate fi apoi efectuat prin căutarea acelor substanțe care pot inhiba selectiv creșterea (independent de ancorare) pe agar moale, a liniilor de celule producătoare de PKC. Alternativ, cum celulele producătoare PKC de asemenea, formează plaje mici, dense în țesutul de cultură, se pot evalua substanțele ce inhibă aceste formări de plaje.

500 Mai jos se descrie în detaliu tehnicile utilizate și metoda aplicată pentru principiile invenției în legătură cu dezvoltarea unui sistem util pentru evaluarea inhibitorilor potențiali ai protein kinazei C (PKC), un receptor de mare afinitate pentru agenții producători de tumoare. Liniile celulare care rezultă din aplicarea acestei metode sunt foarte sensibile și răspund atât la agenții care activează protein kinaza C, cât și la cei care inhibă protein kinaza C.

505 *Construirea plasmidei pMV7*

Construirea plasmidei pMV7 s-a realizat începând de la plasmida pPyori care conține originea de replicare a virusului polyoma clonată în situsul unic BamHI al pML-1 (Lisky și Botchan, 1981)(Lusky M., and Botchan, M. (1981). *Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. Nature 293. 74-81*). Această plasmidă se replică în celulele murine care conțin antigenul polynom T (Dailey. L., and Basilico, C.(1985), *Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. L. Virol, 54, 739-749*). Plasmida pMV Perkins, A.S., Kirschmeier, P.T., Gattioni-Celli, S., and Weinstein, I.B. (1983), *Design of a retrovirus-derived vector for expression and transduction of exogenous genes in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 3, 1123-1132*), a fost apoi clivată cu Hinc II și BglI. A fost izolat apoi fragmentul de 2,29 kb ce conține repetițiile terminale lungi, ale virusului leucemiei Moloney (LTR), situsul de împachetare al ARN<sup>+</sup> pentru polimer, situsul donor de îmbinare, situsul de legare.

515 Pe parcursul obținerii constructului pMV (Perkins, A.S., Kirschmeier, P.T., Gattioni-Celli, S., and Weinstein, I.B. (1983), *Design of a retrovirus-derived vector for expression and transduction of exogenous genes in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 3, 1123-1132*), fragmentul de 3,95 kb a fost îndepărtat din genomul MBV prin clivare cu PstI. Acesta a lăsat un loc PstI situat 380 bps 3' din situsul de legare a ARN<sup>t</sup> și 308 bps din capătul 5' al 3' LTR. S-au adăugat linkerii Xho I la fragmentul Hinc II-BglI, și la pPyori după ce acesta a fost clivat cu EcoRI și Hind III. Cele două fragmente au fost ligate, după activarea linkerilor, și plasmidei, desemnate pMV-3, ce a conținut elementele virusului de control Moloney ce au fost izolate.

520 Singurul situs EcoRI a fost îndepărtat din acest vector prin digerarea plasmidei cu EcoRI și tratarea moleculelor lineare cu polimerază T4. Aceste molecule au fost recirculizate și a fost izolată o plasmidă, pMV4, lipsită de situsul EcoRI. Linkerul EcoRI a fost inserat în această plasmidă la locul PatI între LTRa Moloney; plasmida rezultată a fost desemnată pMV-5.

530 Markerul de selecție dominant (neo) a fost adăugat la pMV-5. Prima etapă a fost izolarea unui fragment de 1,9 kb BamHIBall din pIPB1. Acest fragment conținând o regiune promotoare a virusului Herpes simplex timidin-kinazic (+K) și secvența de codificare a genei bacteriene (neomicin fosfotransferaza). Acest fragment a fost tăiat la capete cu polimerază T4, s-au adăugat linkerii ClaI și fragmentul a fost clonat în situsul Cla I 165 bps 3' la locusul EcoRI în pMV - 5, între LTRs. Această plasmidă a fost desemnată neo pMV-5-tk. Promotorul tk a avut un situs EcoRI 70 bps 5' la începutul transcrierii. Acest situs EcoRI a fost îndepărtat prin digerarea parțială pMV5-tkneo cu EcoTI, izolarea speciilor digerate pe întreaga lungime lineară, umplerea capetelor cu polimerază T4 și recircularea moleculei. A fost utilizată plasmida în care situsul EcoRI anterior prezent în secvența promotorului tk a fost îndepărtat dar situsul EcoRI 537 bps "3'" de la startul transcrierii LTR 5'-ului a fost reținută. Această plasmidă a fost desemnată pMV7, și o hartă a acestei plasmide este dată în fig. 1B.

## RO 118452 B1

Acest vector constă din LTR-urile 5' - 3' ale virusului leucemiei murine Moloney (MoMuLV) LTRs, situsul de umplere al MoNuLV ARN de la 3' - 5' LTR, locusul de clonare Eco RI, promotorul modificat al timidinkinazei (tk) al virusului herpes simplex) (lipsa unui situs de 796 p al Eco RI, și gena marker selectabilă neo Clona ADNc inserată la nivelul situsului de clonare EcoRI, este transcrisă sub controlul transcripțional al 5' LTR, în timp ce gena neo este independent transcrisă prin promotorul tk. Această structură favorizează menținerea integrității funcționale a markerului de soluție fără interferarea cu expresia secvenței 5' (neselectată) ADN. Se cunoaște (Maddon și colab., 1986 (32) că atunci când diferite secvențe ADNc sunt inserate în situsul EcoRI al lui pMV7, acestea pot fi ușor transferate în celulele-recipient, prin trecerea virusului mediat, care este stabil exprimat, și dau producții ridicate, cu randament ridicat, de proteină corespunzătoare.

*Sucesiunea nucleotidică și construcția vectorului de expresie* 555

Sucesiunea nucleotidică a PKC a clonei ADNc a RP58, a clonei de lungime completă izolată dintr-o bancă ADNc provenită din creier de șobolan care corespunde clonei raportată anterior RP41, a fost efectuată conform descrierii anterioare (Housey, G.M., Kirschmeier, P., Garte, S.J., Burns, F., Troll, W., & Weinstein, I.B. (1985) *Expression of long terminal repeat (LTR) sequences in carcinogen-induced murine skin carcinomas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 391-398*). Întreaga lungime a secvenței ADNc a RP58, care codifică PKCbeta1 (fig. 1A), a fost subclonată în situsul EcoRI al plasmidei pMV7 utilizând metodologia standard. Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J, eds. (1983) in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.). Structura generală a pMV7 este prezentată în fig.1B. Constructul rezultat din inserarea genei PKCbeta1 este desemnat ca pMV7-PKCbeta1.

*Izolarea liniilor de celule stabil superexprimate PKC*

Au fost transfectate 20  $\mu$ g de CaCl plasmidei ADN, legată pMV7 sau pMV7-PKC beta 1; Gould, K.L., Woodgett, J.R., Cooper, J.A., Buss, J.E., Shalloway, D., Hunter, T. (1985) *Protein Kinase C Phosphorylates pp60src et a novel site. Cell 42, pp 849-957*) așa cum s-a modificat de către Wigler și colab. 1977, (Wigler, M., Silverstien, S., Lee, L.-S., Pellicer, A., Cheng, Y.-C, and Axel, R.(1977, *Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell 11, 223-232*), în subconfluentul celulelor "Psi-2" Mann, R., Mulligan, R.C., and Baltimore, D.(1983) *Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. Cell 33, 153-159*). După 48 h, mediul de cultură a fost colectat, filtrat prin filtru de 0,45  $\mu$ m și stocat la -70°C. Fibroblastele Rat-6 din recipientul subconfluent au fost ( $5 \times 10^5$  per 10 cm placă) infectate cu mediu conținând virus în 2  $\mu$ g per mililitru polibren timp de 48 ore. Celulele, crescute la confluență au fost apoi tripsinizate și replasate în mediu Dulbecco-modificat Eagle (DMEM) suplimentat cu 10% ser de vițel de bovină (CS) (Flow Laboratories) cu 200  $\mu$ g/ml de derivat de neomicină G 418 (Genet cin). Coloniile rezistente au fost clonate prin izolarea inelului după 1 săptămână de selecție G 418.

După aproximativ 10 zile de creștere în mediu selectiv, 10 clone individuale au fost izolate (G 418 - rezistente) și menținute independent în mediul conținând G418. Aceste linii au fost desemnate R<sub>6</sub>-PKCbeta1 prin R6-PKCbeta10 (prescurtate ca R6-pKC1 la R6-pKC10). În paralel, un set de linii Rat 6 au fost generate prin transformarea plasmidei pMV7 (căreia îi lipsea inserția FKC ADNc) pe celulele W-2, infectarea celulelor Rat-6 recipient, și selectarea pentru rezistența G418 descrisă mai sus pentru plasmida pMV7-PKCbeta1. Similar, după 10 zile de creștere în mediul G418 - conținând G418, cinci colonii individuale de clone G418, au fost izolate și menținute independent. Aceste linii de control au fost desemnate R6-C1 la R6-C5.

*Izolarea ARN și analiza hibridizării (blotting) (blot)*

Izolarea poli A(+) a ARN, electroforeza în gel și analizele de hibridizare (transfer pe membrană) au fost efectuate conform descrierilor anterioare Housey, G.M., Kirschmeier, P., Garte, S.J., Burns, F., Troll, W., & Weinstein, I.B. (1985) *Expression of long terminal repeat (LTR) sequences in carcinogen-induced murine skin carcinomas. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 391-398). Markerii greutatei moleculare a ADN au fost obținuți de la Bethesda Research Laboratories.

Insertul ADN-ul 2,7kb a RP58 (vezi mai departe) a fost subclonat în plasmida pKS(+) (Stratagene Cloning System) pentru a da o plasmidă desemnată pS2-RP58. S-a preparat o probă marcată cu <sup>32</sup>P din pS2-RP58 și utilizată în condiții de hibridizare de stringență ridicată cum s-a descris anterior Housey. G.M., O'Brian, C.A., Johnson, M.D., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1987) *Isolation of cDNA clones encoding protein kinase C: Evidence for a protein kinase C-related gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, pp. 1065-1069).

605 *Purificarea și studierea activității pKC din țesuturile celulelor cultivate*

Controlul activității totale pKC (membrană-asociată plus citosol) prezente în celulele cultivate a fost făcut după purificarea parțială a extractelor după cum urmează.

Trei plăci de 10 cm, de celule conflente, au fost spălate de două ori cu 10 ml de soluție salină fosfat tampon, răcită cu gheață (PBS), și 10 ml de tampon omogenizat (20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoetanol, 10 μg/ml inhibitor de tripsină de soia, 10 μg/ml leupeptină, 40 μg/ml fenilmetilsulfonil fluorură), conținând 0,1% Triton X-100. Celulele au fost apoi desprinse de pe fiecare din plăci, trase și rupte ca 25 mișcări în omogenizator Dounce. Omogenizatul a fost transferat la 2000 x g timp de 5 min la 4°C, și supernatantul a fost încărcat într-o coloană de 1 ml Sephacel DEAE anterior echilibrată cu 10 ml de tampon omogenizat, la 4°C. Coloana a fost spălată cu 10 ml de tampon omogenizat și apoi enzima legată a fost eluată cu 3 ml de tampon omogenizat conținând 0,5 M clorură de sodiu. Concentrațiile totale de proteină sunt determinate prin metoda lui Bradford (1976).

620 Activitatea prezentă PKC în extractele celulare mai sus descrise și purificate a fost studiată imediat după izolare. Peptida sintetică R-K-R-T-L-R-R-L, corespunzând amino acizilor 651-658 al receptorului factorului de creștere epidermal (Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Les, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.E., and Seeburg, P.H. *Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature* 309, 418-425), s-a sintetizat pe un model de biosisteme aplicate (Applied Biosystems model 430) de sintetizator de peptidă, purificat prin cromatografie de înaltă performanță (cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță), liofilizat, și stocat la -20°C. Treonina la poziția 654 este un substrat *in vivo* pentru PKC (Hunter, T., Ling, N., Cooper, J.A. (1984) *Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. Nature* 311, 480-3. Davis, R.J., and Czech, M.P. (1985) *Platelet-derived growth factor mimics phorbol diester action on epidermal growth factor receptor phosphorylation at threonine 654. Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4080-4084). Peptida sintetică este un substrat înalt specific pentru activitatea pKC *in vitro*. (Woodgett, J.R., Gould, K.L., and Hunter, T. (1986) *Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. Eur.J.Biochem.* 141 177-184).

640 Materialul purificat a fost apoi redizolvat în apă sterilă la o concentrație finală de 100 μM și utilizat ca substrat fosfoacceptor în studiile PKC. Metoda generală de studiu a fost publicată în detaliu (O'Brian și colab., 1985, Leach, K.L., James, M.L., & Blumberg, P.M.,

# RO 118452 B1

(1983) *Characterization of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4208-4212*). În majoritatea cazurilor, cele 100  $\mu\text{M}$  de peptidă sintetică au fost înlocuite cu 2 mg/ml histonă III-S ca substrat fosfoacceptor.

Extracțele celulei au fost preparate 48 h, după ce celulele au atins confluența. Așa cum se arată în tabelul 1(a), opt din zece linii celulare generate prin infectarea cu constructul pMV7-PKCbeta (liniile R6-PKCI, R6-PKC3, și R6-PKC 5 la R6-PKC 10) au conținut creșteri marcate a activității pKC când s-a comparat cu liniile de control (R6-CI, -C2, și C3). Este de remarcat faptul că linia celulară R6-PKC3 a conținut de 53 de ori un nivel mai ridicat de activitate pKC decât cel prezent în celulele de control. Două linii r(-PKC2 și R6-PKC4), totuși, nu au prezentat o creștere semnificativă a activității pKC, deși prezumtiv au fost integrate cu constructul pMV7-PKC, așa cum evidențiază rezistența lor continuă G418. Studii secundare au verificat faptul că aceste două linii celulare conțin deleții în clona ADNc de codificare PKCbeta1. 645

În studiile suplimentare autorul a descoperit că activitatea pKC foarte ridicată în extracțele de R6-PKC3 apare în prezența a 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  și fosfatidilserina s-a putut detecta în prezența a 1 mM EGTA, 100 ng/ml TPA și fosfatidilserină. Această activitate foarte ridicată s-a văzut, de asemenea, când s-a utilizat histidonă III-S, mai degrabă decât peptida sintetică descrisă mai sus, ca substrat pentru fosforilare. Mai mult, chiar după 24 săptămâni de creștere continuă și trecere serială, liniile de celule R6-PKCI la R6-PKC6 au prezentat esențial aceleași nivele pentru activitatea pKC arătată în tabelul 1. 650

## *Autofosforilarea și electroforeza în gel a pKC*

Extracțele celulare, purificate așa cum s-a descris mai sus, au fost incubate în condiții care favorizează autofosforilarea pKC, după cum urmează: 100  $\mu\text{g}$  de particule extract proteic purificat parțial s-a incubat într-un amestec de reacție conținând 80  $\mu\text{g/ml}$  fosfatidilserină, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (sau 1 mM EGTA și 100 ng/ml TPA), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , și 30  $\mu\text{M}$  ATP conținând 100  $\mu\text{Ci/gamma-}^{32}\text{P/ATP}$  (New England Nuclear, NEG035). Puritatea ATP radioactive este caracteristică pentru obținerea reproductibilității autofosforilării pKC. 665

În aceste condiții, s-a arătat anterior că pKC suferă o reacție de autofosforilare care duce la fosforilarea câtorva locuri pe traiectul enzimei (Walton, G.M., Bertics, P.J., Hudson, L.G., Vedvick, T.S., Gill, G.W. (1987) *A Three-Step Purification Procedure for Protein Kinase C: Characterization of the Purified Enzyme. Anal. Biochem. 161, 425-437*; Huang și colab., 1986 Huang, K.P., Nakabayashi, H., Huang, F.L. (1986) *Isozymic forms of rat brain  $\text{Ca}_2^+$  - activated, phospholipid-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 8535-8539*. Woodgett și Hunter, 1986; Woodgett, J.R., Gould, K.L., and Hunter, T. (1986) *Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. Eur. J. Biochem. 141 177-184*. Kikkawa, 1982 Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., and Nishizuka, Y. (1982) *Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. J. Biol. Chem. 257, 13341-13348*. 670

Reacțiile au fost incubate la temperatura camerei timp de 10 min și apoi stopate prin adăugarea de tampon purtând SDS-PAGE conținând 2-mercaptoetanol. Acest material a fost apoi supus la discontinuu SDS-PAGE, prin modificarea metodei lui Laemmli (1970) Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685*, 20  $\mu\text{g}$  de proteină totală au fost încărcate în fiecare godeu. După electroforeză, gelurile au fost fixate în 50% acid acetic, 10% etanol, uscate, și autoradiografiate pe film Kodak XAR-5. 675

Autoradiografiile acestor geluri (fig.2) relevă că extracțele preparate din patru linii celulare ce au activitate pKC ridicată (r6-PKCI, -PKC3, -PKC5 și PKC 6, vezi tabelul 1(a)), prezintă o proteină fosforilată proeminent (bandă) care a fost de aproximativ 75 kb ca

690 dimensiune, corespunzând locului unei preparări de autofosforilare a PKC obținută din creier  
de șobolan (Huang și colab., 1986; Walton, G.M., Bertics, P.J., Hudson, L.G., Vedvick, T.S.,  
Gill, G.W. (1987) *A Three-Step Purification Procedure for Protein Kinase C: Characterization*  
*of the Purified Enzyme. Anal. Biochem.* 161, 425-437. Housey și colab., 1987) Housey, G.M.,  
Kirschmeier, P., Garte, S.J., Burns, F., Troll, W., & Weinstein, I.B. (1985) *Expression of long*  
695 *terminal repeat (LTR) sequences in carcinogen-induced murine skin carcinomas. Biochem.*  
*Biophys. Res. Commun.* 127, 391-398). Când este examinată într-un studiu de imunobloting,  
această bandă de 75 kd reacționează, de asemenea, cu un anticorp la forma *beta* a PKC  
Jaken, S. and Kiley, S. (1997), *Purification and characterization of three types of protein*  
*kinase C from rabbit brain cytosol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, pp 4418-4422). Liniile  
700 celulelor de control R6-C1, -C2, -C3 și liniile celulelor R6-PKC2 și R6-PKC4, care nu au ni-  
vele crescute de PKC (vezi tabelul 1(a)), nu au prezentat această bandă 75 kd fosforilată  
(fig.2), nici nu au conținut vreo bandă ca să fi reacționat cu anticorpul la forma *beta* a PKC.  
Este de interes ca probele obținute din patru linii de celule ce au produs nivele ridicate ca  
PLC să prezinte, de asemenea, benzi distincte de proteină fosforilată, care să fie de apro-  
705 ximativ 73, 60, și 49 kd în dimensiune, care să nu se vadă (sau numai puțin să fie detectată)  
în extractele din celulele ce nu prezintă nivele ridicate de PKC (fig.2). Aceste benzi pot repre-  
zenta fragmente de degradare a moleculelor 75 kd PKC sau proteine celulare specifice ce  
sunt fosforilate prin PKC.

Benzile proteice fosforilate, descrise mai sus, au fost vizualitate fie când s-au utili-  
710 zat 1 mM Ca<sup>2+</sup> plus fosfatidilserina, fie când s-au utilizat 100 ng/ml TPA plus fosfatidilserina  
drept cofactori pentru activarea PKC, comparativ chiar și cu liniile numerotate cu soț în  
fig.(2). Când, totuși, extractele din liniile celulare producătoare de nivele ridicate de PKC au  
fost incubate într-o reacție de autofosforilare în absența unor astfel de cofactori, banda 75 kd  
și benzile mai mici, adiționale, descrise mai sus, nu au fost detectate. Aceste rezultate, luate  
715 împreună cu rezultatele negative obținute cu extractele din celulele de control (fig.2), indică  
în mod clar că benzile de fosforilare reflectă activitatea PKC.

#### *Studiile de legare a esterului forbol (<sup>3</sup>H-PDBU)*

Întrucât s-a arătat că PKC este receptor intracelular cu afinitate mare pentru esterul  
forbolic - promotor de tumoare (Nishizuka, Y. (1986), *Studies and Perspectives of Protein*  
720 *Kinase C. Science* 233, 305-312, Nishizuka, Y. (1984) *The Role of Protein Kinase C in Cell*  
*Surface Transduction and Tumour Promotion. Nature (London)* 308, 693-698). Autorul a  
studiat, de asemenea, un subset de celule ca linii de celule pentru legarea 3H-PDBu  
utilizând studiul celular intact descris anterior. (Horowitz și colab., 1981). (Horowitz, A.D.,  
Greenebaum, E. and Weinstein, I.B. (1981) *Identification of receptors for phorbol ester*  
725 *tumor promoters in intact mammalian cells and of an inhibitor of receptor binding in biologic*  
*fluids. Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78, pp 2335-2319).

Celulele au fost depuse la 1 x 10<sup>5</sup> per canal de 4 cm în ziua întâi, mediul a fost  
schimbat în ziua a doua și celulele au fost studiate în ziua a 3-a. Monostratul a fost spălat  
730 cu 4 ml DMEM (fără ser), apoi cu 2 ml de DMEM conținând 50 nM <sup>3</sup>H-PDBU (New England  
Nuclear; 8,3 ci/nmmol) s-a adăugat și plăcile au fost incubate timp de 1 oră la 37°C pentru  
a determina legarea totală. Frațiunea de legare totală ce a reprezentat legarea specifică  
a fost determinată prin suplimentarea unui exces de 1000 ori de nemarcat PDBU (LC  
Services) <sup>3</sup>H-PDBU stock (Horowitz, A.D., Greenebaum, E. and Weinstein, I.B. (1981)  
735 *Identification of receptors for phorbol ester tumor promoters in intact mammalian cells and*  
*of an inhibitor of receptor binding in biologic fluids. Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78, pp. 2335-  
2319). Plăcile au fost spălate de trei ori cu câte 4 ml de PBS răcit cu gheață. Celulele au fost  
solubilizate în 1 ml 1% SDS/10 mM DTT timp de 2 h, la 37°C. Lizatul a fost transferat la un  
flacon de scintilație și numărat. Plăcile replică au fost utilizate pentru determinarea numărului

## RO 118452 B1

de celule per plăci și datele de legare specific exprimate ca nmoli 3H-PDBu legat/10<sup>6</sup> celule. Analizele Scatchard au fost efectuate cum s-a descris anterior. (Horowitz, A.D., Greenebaum, E. and Weinstein, I.B. (1981) *Identification of receptors for phorbol ester tumor promoters in intact mammalian cells and of an inhibitor of receptor binding in biologic fluids. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78*, pp 2335-2319). 740

S-a descoperit că liniile celulare R6-PKC 1,3,5 și 6 toate având activitate enzimatică PKC ridicată, de asemenea au o creștere marcată în legarea 3H-PDBu, în timp ce linia de celule R6-PMC4, care nu prezintă o creștere semnificativă a activității PKC, nu a prezentat o creștere în legarea 3-H-PDBu când s-a comparat cu liniile celulelor de control R6-C1 și R6-C2 (tabelul 1(a)). Analizele Scatchard ale liniei celulare de control R6-C1 și ale liniei celulare R6-PKC3, efectuate cum s-a descris anterior, au indicat că numărul receptorilor de afinitate ridicată în cele două linii de celule a fost de 1,6 X 10<sup>5</sup> și 1,4 - 10<sup>6</sup> respectiv. Constantele de afinitate au fost aceleași în ambele linii de celule (Kd ; 16 nM). Astfel, în condițiile de studiu utilizate, celulele R6-PKC3 conținând aproximativ de zece ori nivelul locusurilor de legare phorbol-ester de afinitate ridicată ca celule de control. Este aparent că liniile celulare ce exprimă nivele foarte ridicate ale PKC de asemenea au o creștere semnificativă în locurile de legare a esterului phorbol. 745 750 755

### *Analiza transcripților ARN-pentru PKC*

Conform rezultatelor de mai sus, s-a considerat interesant să se analizeze fracțiunea poly A+ARN a câtorva linii celulare descrise în tabelul 1(a) pentru mărirea și abundența liniilor celulare descrise în tabelul 1(a) pentru mărirea transcripților ARN conținând secvențele omoloage PKCbeta1. 760

Poly A+ARN a fost separat pe geluri de 1% agaroză, 6% formaldehidă, prinse în membrana de naylon, hibridizate cu o probă ADN marcată cu 32 P, probă obținută, dintr-un ADNc pentru PKCbeta1, și autoradiografiat, așa cum s-a descris anterior (Housey, G.M., Kirschmeier, P., Garte, S.J., Burns, F., Troll, W., & Weinstein, I.B. (1985) *Expression of long terminal repeat (LTR) sequences in carcinogen-induced murine skin carcinomas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127*, 391-398). După cum s-a arătat în fig.3, liniile ce conțin nivele ridicate de activitate PKC (r<sub>6</sub>-PKC1, -PKC3, -PKC5, și PKC6, vezi tabelul 1(a) au conținut specii proeminente 6,6 kb ARN care corespund la locul prezis pentru ARN transcript ce inițiază constructul în 5'LTR și o termină în 3'LTR în unitatea constructoare pMV7.PKChetal. Această transcriere a fost mai abundentă în linia de celule R6-PKC3 (fig.3) care exprimă, de asemenea, nivelul cel mai ridicat al activității PKC (tabelul 1). 765 770

Pe de altă parte, liniile R6-PKC2 și R6-PKC4, care arată o ridicare nesemnificativă a activității PKC (tabelul 1(a)), a produs un ARN trunchiat de aproximativ 5 kb și respectiv 4,8 kb. Abundența ultimilor transcripitori a fost mult mai scăzută decât cea a transcripților de 6,6 kb prezenți în liniile celulare ce prezentau nivele ridicate de PKC. Neo + fenotipul și lipsa activității PKC în liniile de celule R6-PKC2 și R6-PKC4 sugerează că mRNA trunchiat reflectă delețiile secvențelor de codificare PKC în constructorii integrați, purtați de aceste linii celulare. Într-adevăr, hibridizarea ADN genomic a clonelor R6-PKC2 și R6-PKC4 indică faptul că acestea conțin deleții în secvența PKCbeta1 ADNc. Nici în linia celulară parenterală Rat 6, nici în oricare din celelalte linii celulare experimentale derivate de la aceste celule, nu s-a putut detecta evident omologul transcripator endogen la proba PKCbeta1 (fig.3). Astfel, în aceste celule, este o expresie neglijabilă a genei endogene codificatoare a PRCbeta1. 775 780

### *Studiile de creștere în cultură monostrat și pe agar moale*

Celulele au fost însămânțate la o densitate de 10<sup>4</sup>/placă într-o serie de plăci de 60 mm, în 5 ml DMEM plus 10% CS. După 24 h, celulele în plăcile triplicate au fost tripsinizate și numărate. Acest punct a fost desemnat "ziua zero". Culturile rămase au fost apoi crescute în mediul respectiv (de exemplu, plus sau minus 100 ng/ml TPA) cu mediul proaspăt schimbat de două ori pe săptămână. Celulele numărate pe placă au fost apoi determinate pe plăci triplicate pe parcursul părții rămase din curba de creștere (fig.5). Rezultatele 785

790 obținute au fost analizate pentru timpul de dublare exponențial și densitatea de saturație  
 (tabelul 2). Pentru a evalua creșterea în agar moale (independența de ancorare)  $2 \times$   
 $10^4$  celule au fost suspendate în 2 ml de 0,3% Bacto agar (Difco Laboratories, Detroit, MI)  
 în DMEM conținând 20% ser vițel fetal (PCS) și depus mai sus peste un strat de 5 ml de  
 0,5% agar în același mediu, pe cutii Petri de 60 mm. Celulele au fost apoi acoperite cu  
 795 DMEM plus 20% FCS la fiecare patru zile. La sfârșitul celor 30 de zile, coloniile au fost îm-  
 bibate cu soluții de îmbinare vitală 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolilclorură hidrat  
 (INT) (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) pentru 48 ore la 37°C, într-un incubator cu 5%  
 $CO_2$ . \*i un număr de colonii numărate la putere mică pe un microscop de fază inversată. Da-  
 tele sunt exprimate ca "eficiență de clonare", adică numărul de colonii mai mare de 0,05 mm  
 800 pe placă x 100 împărțit la numărul celulelor originale însămânțate per placă.

#### *Evaluarea unui activator cunoscut al PKC*

S-a descoperit că liniile de celule care superproduc PKC prezintă un răspuns morfo-  
 logic exagerat la 12-0-tetradecanoil phorb-13-acetat (TPA) și alterează controlul creșterii.

#### *Schimbări în morfologie*

805 Pentru a caracteriza schimbările în fenotip ce apar în liniile de celule ca superprodus  
 PKCbeta1, liniile R6-PFC3 și R6-PKC5, care conțin evaluări de 58 și 20 ori a activității PKC,  
 respectiv, au fost mai întâi examinate în detaliu față de morfologia lor, în comparație cu linia  
 de celule de control R6-C1. Așa cum se arată în fig.4, Panoul A, în absența tratamentului  
 TPA toate trei liniile de celule au prezentat morfologic caracteristic fuziformă a culturilor mo-  
 810 nostrat a liniei celulare fibroblastice Rot 6 normal parenterală. După 24 h de la tratament cu  
 100 ng/ml TPA (fig.4, R6-C1; panoul D), linia celulei de control a prezentat o alungire mai  
 mare decât celulele dentritice și modelele criss-cross (încrucișate), schimbările arătate anterior  
 pe scurt după fibroblastele rodenticide sunt tratate cu TPA (Boreiko, C., Mondal, S.,  
 Narayan, S., and Heidelberger, C.(1980) *Effect of 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-acetate on*  
 815 *the Morphology and Growth of C3H/10T1/2 Mouse Embryo Cells. Cancer Res. 40, 4709-*  
*4716*). Aceste schimbări au fost, totuși, mult prea dramatice când celulele R6-PKC8 și R6-  
 PKC5 au fost tratate cu TPA(R6-PKCS și R6-PKc5, panoul D). Acest lucru a fost particular  
 relevantor cu celulele R6-PKC3 (care exprimă cel mai ridicat nivel al PKC) deoarece prezintă  
 procedee citoplasmice foarte lungi și numeroase corpuri de celule refractile.

820 La 48 h după expunerea la TPA morfologia liniei celulare de control R6-C1 s-a reîn-  
 tors la aparența sa normală (fig.4, panoul E). Pe de altă parte, celulele (R6-PKC3, și într-o  
 mai mică măsură, celulele R6-PKC5, au continuat să prezinte o morfologie alterată. Toate  
 liniile celulare au fost apoi expuse la o a doua doză proaspătă de TPA (100 ng/ml) și exami-  
 825 nate după 24 h (fig. 4, panoul F), de exemplu, 72 h după ce s-a administrat prima doză de  
 TPA. Celulele de control nu au răspuns, în termenii de schimbare de morfologie, la a doua  
 doză de TPA, în timp ce celulele RG-PKC3 au continuat să prezinte atât morfologia alterată,  
 cât și o creștere în densitatea celulară. Celulele R6-PKC5 au prezentat numai ușoare schim-  
 bări în morfologie cu răspuns la cea de-a doua doză de TPA.

830 Probabil, nivelul foarte ridicat al producției constitutive a PKC în linia de celule R6-  
 PKC3 este responsabil atât pentru răspunsul morfologic exagerat la TPA, cât și pentru lipsa  
 acestor celule de prezentare a răspunsului uzual refractar la TPA, după expunerea inițială.  
 În celulele normale, ultimul răspuns pare să fie datorat reglării "scăzute" a activității PKC en-  
 dogene. Cum celulele R6-PKC au ca nivel intermediar al PKC, nu este surprinzător faptul  
 835 că răspunsurile lor morfologice la Tpa sunt intermediare între cele ale celulelor de control  
 și celulelor R6-PEC3.

#### *Curbele de creștere*

De asemenea, este de interes să se determine vitezele de creștere ale acestor celule  
 în cultura monostrat. Curbele de creștere detaliate au fost făcute cu celulele R6-C1, R6-  
 CKC3 și R6-PKC5 în 10% ser de vițel și mediu MEM, în absența sau prezența a 100 ng/ml  
 840 TPA. Datele obținute sunt rezumate cantitativ în tabelul 2.

# RO 118452 B1

În absența TPA-ului, linia de celule de control R6-C1 a prezentat timpul de dublare cel mai lung (26,4 h) și densitatea de saturare cea mai scăzută ( $3,4 \times 10^6$  celule/placă); linia celulară R6-5 are un timp de dublare mai scurt (24,9 ore) și o densitate de saturare mai ridicată ( $4,8 \times 10^6$  celule/placă); și linia de celule R6-PKC3 are timpul de dublare cel mai scurt (24,2 h) și densitatea de saturare cea mai ridicată ( $5,7 \times 10^6$  celule/placă). Prezența TPA descrește timpii de dublare și, de asemenea, mărește densitatea de saturare a tuturor celor trei linii de celule, dar îmbunătățirea TPA a fost particular marcată în cazul R6-PKC3 (tabelul 2). 845

Când liniile de celule au fost menținute în prezența TPA pe o perioadă de timp mai lungă, celulele R6-pKC 3, dar nu și celulele R6-PKC5 sau R6-C1, au prezentat un declin în densitatea celulară. Ultimul efect a fost datorat faptului că celulele R6-PKC3 au fost menținute la densitate celulară ridicată în prezența TPA, devenind mai puțin adezive și tinzând să se detașeze după placă. 850

Astfel, chiar în absența TPA celulele R6-PKC3, (care au nivelul cel mai ridicat de PKC) și într-o mai mică măsură celulele R6-PKC5 (care au un nivel intermediar al PKC), prezintă o îmbunătățire a proprietăților lor de creștere care sunt adesea chiar mai mare decât se poate vedea la celulele de control R6-C1 ce sunt crescute în prezența TPA. Mai mult, în prezența TPA aceste diferențe în proprietățile de creștere dintre celulele de control și celulele R6-PKC3 sunt adesea chiar mai pronunțate. 855

## *Forma plajelor (foci)*

În studiile suplimentare, culturile monostrat au fost menținute la post confluență pentru o perioadă extinsă de timp (28 zile), cu schimbări în medie la trei zile, în absența TPA. Deși linia celulară R6-C2 a rămas aproape uniformă monostratificată, după aproximativ 21 zile linia celulară R6-PKC3 a dezvoltat numeroase pete dense care au fost de aproximativ 0,1 la 0,3 mm în diametru (fig.5). Mai mult, culturile R6-PACS au prezentat numeroase celule cu citoplasmă puternic vacuolată, care au fost dispersate prin toată masa monostratului, dar care nu au fost văzute în cultura de control R6-C2. 860 865

Când plajele dense, observate în cultura R6-PKC3 au fost preluate și în continuare prelucrate au crescut ca celule parenterale R6-PKCa și nu au prezentat morfologie caracteristică celulelor transformate malign. Se poate presupune că plajele dense și celulele vacuolate reflectă mai repede fiziologic decât genetic schimbările induse de către nivelul activității PKC. 870

S-au studiat, de asemenea, aceste linii celulare, pentru abilitatea lor de a forma colonii în agarul moale, de când s-a știut că celulele de rozătoare achiziționate prin creștere, independent de ancorate, sunt corelate adesea cu tumorigeneza (Freedman, V.H. and Shin, S. (1974), *Cellular Tumorigenicity in nude Mice: correlation with Cell Growth in Semi-Solid Medium. Cell 3*, 355-359). Așa cum se arată în fig.6, când celulele  $2 \times 10^4$  au fost placcate în 0,3% agar moale, atât R6-PKC3 cât și celulele R6-PKC5 formează numeroase colonii mici, în timp ce celulele de control R6-C1 (și cele parenterale Rat 6) nu cresc și persistă ca celule singure. Suplimentar, când TPA (100 mg/ml) se adaugă la mediul de agar, dimensiunile coloniilor și eficiențele de clonare a celulelor R6-PKCS. RC-PKCS s-au schimbat (fig.6 și tabelul 2), dar celulele R6-C1 nu cresc pe agar. 875 880

Eficiența coloniilor și dimensiunile coloniilor culturilor de celule R6-PKC3 au fost, de asemenea, mai mare decât cea a culturilor de celule R6-PKC5, atât în absența, cât și în prezența TPA (tabelul 2), presupunând reflectarea nivelului mai ridicat de activitate al PKC în prima linie de celule. Astfel, este clar că, superproducerea de PKC este asociată cu achiziționarea creșterea independenței de ancorare în celulele Rat6. Dimensiunile coloniilor formate în agar de la liniile de celule PKC sunt mai mici decât cele formate de celulele Rat6 transformate prin activarea omogenelor C-H-ras care are un diametru de aproximativ 0,1-1,0 mm. 885 890

## *Alte evaluări ale activatorilor și inhibitorilor de PKG*

Compușii suplimentari testați, incluzând promotorii de tumoare-teleocidina, aplisistoxina și mezersina, toți cunoscuți ca activatori ai PKC (O'Brian și colab., CSH, 1985 Leach, K.L., James, M.L., & Blumberg, P.M., (1983) *Characterization of a specific phorbol ester*

895 *aporeceptor in mouse brain cytosol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4208-4212.* Mai mult, un inhibitor cunoscut a PKC, H-7 (Kawamoto, S. and Hidaka, H. (1984) *1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 258*), poate, de asemenea, modula creșterea celulelor în maniera așteptată.

900 Mai mult, această metodă a fost utilizată pentru a stabili că tamoxifenul anti estrogen (O'Brian și colab., Cancer Res., 1985), care inhibă activitatea PKC în studiile cu celule libere, este capabilă de a inhiba complet creșterea în agar pentru toate liniile celulare ce supra-produc PKC. Inhibarea creșterii celulelor R6-PKC3 pe agar în prezența tamoxifenului asigură reflectarea critică evidentă că tamoxifenul poate inhiba stimularea creșterii celulare mediată de PKC.

905 Mai mult, concentrația de inhibitor necesară inhibării complete a creșterii fiecărei linii de celule a fost puternic proporțională cu cantitatea de PKC ce a fost produsă în exces în acea linie particulară celulară. Cu alte cuvinte, este o relație directă între cantitatea molară de inhibitor cerut să prevină creșterea celulei și cantitatea molară de PKC prezentă în fiecare linie de celulă.

910 Suplimentar, autorul a demonstrat legătura analoagă dintre cantitățile molare de activatori PKC și cantitățile molare de PKC prezente în celulă. Cu alte cuvinte, este o corelație directă între cantitatea molară de activator cerut să stimuleze creșterea celulei și cantitatea molară de PKC prezent în celule. Astfel, această lucrare stabilește, pentru prima dată, faptul că superproducerea stabilă de proteină în celulele mamare poate duce la un nou fenotip celular (în acest caz independent de ancorare) care poate fi direct modulată de agenți chimici care interacționează cu proteina.

915 **Exemplul 2.** În cazul când se dorește să se evalueze inhibitorul potențial al produsului oncogenei c-H-ras (proteina p21), se pot genera celule care cresc bine pe agar moale cu condiții de mediu corespunzătoare, când proteina p21 este superprodusă în mod stabil la un anumit nivel, dar nu și chiar când p21 este prezentă la nivele tip nefinisate (impură). Evaluarea pentru un potent inhibitor p21 poate fi apoi făcută conform descrierii din cadrul exemplului 1 de mai sus.

920 **Exemplul 3.** Aceeași tehnică de bază se va aplica genelor sau secvențelor care au suferit mutații în laborator (de exemplu, mutageneză direcționată), ca rezultat al apariției naturale a evenimentelor. Astfel, oricare din punctele mutagene cunoscute în oncogene ras, ce ar rezulta cu o capacitate mai mare prin mutația genei care determină transformarea celulelor normale în celule canceroase, pot fi utilizate în același procedeu de bază ca și cel descris mai sus.

930 Utilizarea oricărui vector de expresie stabil, capabil să supraexprime o genă dată într-o celulă recipient, se poate face cu succes în procedeele descrise în prezenta lucrare.

S-a utilizat un vector retroviral, conform problemelor propuse spre rezolvare. Totuși, se pot utiliza și alte sisteme similare. De asemenea, se poate face o cotransferare a unei gene experimentale inserată într-un vector plasmidial alături de a doua plasmidă conținând gena marker de selecție, decât având atât gena experimentală, cât și gena marker de selecție, pe același vector plasmidial. Acest lucru este mai dificil și mai puțin eficient decât utilizarea vectorului pM7, în condițiile în care acesta ar avea aceeași eficacitate.

935 Se poate utiliza orice mediu de creștere, suplimentar față de agarul moale sau methocel, care tinde să oprească creșterea celulelor normale, ne-transformate.

940 O cultură de *M.coli* DM1 purtătoare a unei plasmide, notată pMV7-RP58 (pMV7-PKC beta 1), s-a depozitat conform tratatului de la Budapesta cu American Type Culture Collection în 11 februarie, 1988, ATCC nr.67654. Depunerea acestei plasmide nu trebuie înțeleasă ca o admitere a depozitului este cerută pentru permisiunea sau că prezentarea este limitată la vectorul sau gena depozitată.

Tabelul 1(a)

Activitatea PKC și legarea esterului forbol la celulele Rat-6 infectate cu construcții pMV7 sau pMV7-PKCbeta1

Linia celulară	Activitatea PKC Activ.specifică pmol/min/mg	Creșterea Plierii Față De Control	Legare SH-PDBU (pmol/10 <sup>6</sup> celule)
R6-C1	100	-	1,6
R6-C2	85	-	1,3
R6-C3	150	-	1,5
medie + s.d.	100 + 34	1	
R6-PKC1	2480	23	12,7
R6-PKC2	85	1	ND
R6-PKC3	5840	58	9,9
R6-PKC4	190	2	0,7
R6-PKC5	2200	20	5,8
R6-PKC6	4600	42	7,1
R6-PKC7	2150	20	ND
R6-PKC8	3280	20	ND
R6-PKC9	4990	45	ND
R6-PKC10	5050	46	ND

950

955

960

965

Tabelul 1(b)

Activitatea PKC în liniile celulare NIH-3T3 infectate cu construcții pWV7 și pMV7-PKC beta1

NIH-ST3 Linii celulare Control(le) crescut	PKC Activitate specifică (pmol/min/mg prot)	Creșterea plierii control relativ
3T3-C1	110	-
3T3-C2	150	-
3T3-C3	90	-
medie +/- s.d. (linii control)	115 +/-30	
NIH-3T3 PKC-superproducător de linii celulare		
3T3-PKC1	2570	22
3T3-PKC2	3640	32
3T3-PKC3	1960	17
3T3-PKC4	1240	11
3T3-PKC5	4190	36
3T3-PKC6	2110	18
3T3-PKC7	5050	44

970

975

980

985

Activitatea PEC în liniile C3H-10T1/2 infectate cu construcții pMV7 și PMV7-PKCbeta1

990	C3H-10T1/2 Linii celulare Crescute (controale) Control	PKC Activitate specifică (pmol/min/mg prot)	Creșterea plierii control relativ
995	C3H-C1 C3H-C2 C3H-C3 C3H-C4 medie +/- s.d.	115 155 130 185 145 +/-30	- - - -
1000	C2H-10T1/2 Linii supraproduc.PKC		
1005	C3H-PKC1 C3H-PKC1 C3H-PKC1 C3H-PKC1 C3H-PKC1 C3H-PKC1	2340 5010 950 1360 4340 7460	16 35 7 9 30 51

Legenda la tabelul 1

Linile celulare de control au fost obținute prin infectarea celulelor fibroblastice rat.6 NIH-3T8 și CaH-10T1/2 cu vectorul pMV7 (lipsit de insertul ADNc PKC) în timp ce liniile celulare superproducătoare de PKC au fost obținute din celulele fibroblastice rat.6, NTH-3T3- și C3H-10T1/2 infectate cu constructul pMV7-PkCbeta, conform descrierii de mai sus. Activitatea totală pKC a fost parțial reportator din fiecare linie de celule și studiată în prezența a 1 mM Ca<sup>2+</sup> și 80 μg/ml fosfatidilserină, utilizând peptida sintetică R-K-R-T-L-R-R-L ca substrat. Activitatea specifică este raportată ca și cantitatea de încorporat de 32 P în peptida substrat sintetică per mg de proteină per minut. Toate studiile au fost făcute în dublu, și variația a fost mai mică de 10%.

Tabelul 2

Proprietățile de creștere ale liniilor celulare Rat 6 superproducătoare de PKC și răspunsul lor la tratamentul TPA

Creșterea în cultură					
Monostrat			Agar		
Linia celulară	TPA adăugat	Timp dublare ore	Densitate saturație x 10 <sup>6</sup>	Efic. %	Dimensiune col. Mm
R6C1 (control)	-	264	34	0	-
(control)	+	246	42	0	-
R6PKC3	+	242	67	251	0,10 - 0,15
(test)	+	215	100	297	0,15 - 0,35
B6-PKC5	-	249	48	173	0,05 - 0,10
(test)	+	229	70	347	0,10 - 0,15

# RO 118452 B1

Tabelul 2. Celulele au fost crescute conform descrierii de mai sus. "Timpul de dublare față de faza exponențială a creșterii celulei și "densitatea de saturație" reprezintă numărul de celule per 6 cm placă în ziua 11. Datele sunt preluate din experiențele prezentate în fig.3.

1035

Tabelul 3

*Inhibirea creșterii pe agar a liniilor celulare supraproducătoare PKC  
utilizând diferiți inhibitori*

Inhibitor	Linie celulară	Conc.inhibitor ( $\mu\text{M}$ )	Ef.creștere agar %
H-7	R6-PKC3	0	27
H-7	R6-PKC3	2	25
H-7	R6-PKC3	5	22
H-7	R6-PKC3	10	17
H-7	R6-PKC3	50	4
H-7	R6-PKC3	100	0
H-7	R6-PKC5	0	20
H-7	R6-PKC5	2	21
H-7	R6-PKC5	5	16
H-7	R6-PKC5	10	4
H-7	R6-PKC5	30	1
H-7	R6-PKC5	100	0
Tamoxifen	R6-PKC3	0	25
Tamoxifen	R6-PKC3	5	27
Tamoxifen	R6-PKC3	20	22
Tamoxifen	R6-PKC3	50	15
Tamoxifen	R6-PKC3	100	6
Tamoxifen	R6-PKC3	200	0
Tamoxifen	R6-PKC5	0	19
Tamoxifen	R6-PKC5	5	19
Tamoxifen	R6-PKC5	20	17
Tamoxifen	R6-PKC5	50	8
Tamoxifen	R6-PKC5	100	0
Tamoxifen	R6-PKC5	200	0
Staurosporină	R6-PKC3	0	29
Staurosporină	R6-PKC3	0,001	29
Staurosporină	R6-PKC3	0,005	26

1040

1045

1050

1055

1060

1065

Tabelul 3(continuare)

Inhibitor	Linie celulară	Conc.inhibitor ( $\mu\text{M}$ )	Ef.creștere agar %
1070 Staurosporină	R6-PKC3	0,010	15
Staurosporină	R6-PKC3	0,050	7
Staurosporină	R6-PKC3	0,250	0
Staurosporină	R6-PKC3	0	22
Staurosporină	R6-PKC3	0,001	21
1075 Staurosporină	R6-PKC3	0,005	17
Staurosporină	R6-PKC3	0,010	10
Staurosporină	R6-PKC3	0,050	2
Staurosporină	R6-PKC3	0,250	0

1080

### Revendicări

1. Metodă de determinare a caracterului de inhibitor sau activator de proteină al unei substanțe, **caracterizată prin aceea că** proteina produsă de o celulă determină o modificare reactivă a unei caracteristici de fenotip diferită de nivelul de producere a proteinei în celula ca atare și cuprinde următoarele etape:

1085

a) asigurarea unei prime linii de celule, care produce proteina și prezintă răspunsul fenotipic la proteină;

b) asigurarea unei a doua linii de celule, care produce proteina la un nivel mai scăzut decât prima linie de celule sau nu produce deloc proteină, și care prezintă răspunsul fenotipic la proteină într-un grad mai scăzut sau deloc;

1090

c) incubarea substanței cu prima și a doua linie de celule; și

d) compararea răspunsului fenotipic al primei linii de celule la substanță cu răspunsul fenotipic al celei de-a doua linii de celule față de substanță.

1095

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** prima linie de celule este modificată genetic pentru a produce proteina raportată la o celulă de control, care produce respectiva proteină la un nivel mai scăzut sau care, în mod normal, nu produce proteina.

1100

3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** nivelul de producere al proteinei în prima linie de celule este de cel puțin de cinci ori mai ridicat față de nivelul de producere a proteinei din cea de-a doua linie de celule.

4. Metodă conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** linia de celule modificată genetic este selectată din grupul constituit din celule asupra cărora s-a acționat genetic prin inserția unei secvențe de acid nucleic și celule în care s-au efectuat mutații pentru a crește expresia proteinei selectate.

1105

5. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** răspunsul fenotipic este un răspuns celular gradat.

6. Metodă conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** răspunsul celular gradat reflectă o modificare a unei caracteristici de fenotip care este dependentă de prezența proteinei selectată în celulă.

1110

7. Metodă conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** examinarea răspunsului celular gradat include compararea răspunsului fenotipic al celulei tratate cu cel al unei celule tratate similar, care nu a fost modificată genetic pentru a exprima proteina selectată.

# RO 118452 B1

8. Metodă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** modificarea genetică constă în introducerea unei gene care codifică pentru proteina de interes într-o celulă gazdă, gena fiind sub controlul unui promotor funcțional în celula-gazdă prin care este exprimată gena menționată. 1115
9. Metodă conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** gena este introdusă în celula-gazdă cu ajutorul unui vector retroviral.
10. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** a doua linie de celule, celula de control și linia de celule-gazdă nu produc proteina. 1120
11. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** celula- gazdă este o linie de celule fibroblaste rat-6.
12. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** substanța este un presupus inhibitor al activității biologice a proteinei.
13. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** substanța este un presupus activator al activității biologice a proteinei. 1125
14. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, respectiv, caracteristica de fenotip este selectată din grupul constituit dintr-o caracteristică de cultură sau morfologică a celulei, capacitatea de a crește într-un mod independent de ancorare, capacitatea de a crește pe agar moale, formarea centrilor de densitate mare în cultura celulelor, starea de diferențiere a celulei și o caracteristică antigenică. 1130
15. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** proteina este selectată din grupul constituit dintr-o enzimă, produsul de expresie al unei oncogene, un receptor de insulină și un receptor de serotonină.
16. Metodă conform revendicării 15, **caracterizată prin aceea că** activitatea crescută a enzimei este corelată cu tumorigeneza crescută. 1135
17. Metodă conform revendicării 16, **caracterizată prin aceea că** enzima este o proteinkinază C sau un fragment, domeniu sau subunitate a unui receptor care are activitatea proteinkinazei C.
18. Metodă conform revendicării 17, **caracterizată prin aceea că** enzima este ornitin decarboxilaza. 1140
19. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** modificarea reactivă a unei caracteristici de fenotip este determinată pe o fracțiune subcelulară a celulei țesut.
20. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** răspunsul fenotipic se poate observa cu ochiul liber. 1145
21. Metodă conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** gena este introdusă în celula-gazdă cu ajutorul unui vector genetic în care gena a fost inclusă.
22. Metodă conform revendicării 21, **caracterizată prin aceea că** a doua linie de celule este obținută prin introducerea într-o celulă-gazdă similară al unui al doilea vector genetic, identic cu primul vector genetic, cu excepția faptului că nu poartă insertul genei. 1150

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **biol. Țenea Gabriela**

10	20	30	40	50	60
* GAA TTC CGC CTC TCC GGG CTT ACA GCC CGC GGT CCC GCC GCG GGG CCG CCA CCT CTC	* GAA TTC CGC CTC TCC GGG CTT ACA GCC CGC GGT CCC GCC GCG GGG CCG CCA CCT CTC	* GAA TTC CGC CTC TCC GGG CTT ACA GCC CGC GGT CCC GCC GCG GGG CCG CCA CCT CTC	* GAA TTC CGC CTC TCC GGG CTT ACA GCC GCG GGT CCC GCC GCG GGG CCG CCA CCT CTC	* GAA TTC CGC CTC TCC GGG CTT ACA GCC GCG GGT CCC GCC GCG GGG CCG CCA CCT CTC	* GAA TTC CGC CTC TCC GGG CTT ACA GCC CGC GGT CCC GCC GCG GGG CCG CCA CCT CTC
70	80	90	100	110	120
* GGG GCT CCC AGT CCC CGC GCG AAG ATG GCT GAC CCG GCT GCG GGG CCG CCG CCG	* GGG GCT CCC AGT CCC CGC GCG AAG ATG GCT GAC CCG GCT GCG GGG CCG CCG CCG	* GGG GCT CCC AGT CCC CGC GCG AAG ATG GCT GAC CCG GCT GCG GGG CCG CCG CCG	* GGG GCT CCC AGT CCC CGC GCG AAG ATG GCT GAC CCG GCT GCG GGG CCG CCG CCG	* GGG GCT CCC AGT CCC CGC GCG AAG ATG GCT GAC CCG GCT GCG GGG CCG CCG CCG	* GGG GCT CCC AGT CCC CGC GCG AAG ATG GCT GAC CCG GCT GCG GGG CCG CCG CCG
130	140	150	160	170	180
* AGC GAG GGC GAG AGC ACG GTG CGC TTC GCC CGC AAA GGG CCC CTC CGG CAG AAG AAC	* AGC GAG GGC GAG AGC ACG GTG CGC TTC GCC CGC AAA GGG CCC CTC CGG CAG AAG AAC	* AGC GAG GGC GAG AGC ACG GTG CGC TTC GCC CGC AAA GGG CCC CTC CGG CAG AAG AAC	* AGC GAG GGC GAG AGC ACG GTG CGC TTC GCC CGC AAA GGG CCC CTC CGG CAG AAG AAC	* AGC GAG GGC GAG AGC ACG GTG CGC TTC GCC CGC AAA GGG CCC CTC CGG CAG AAG AAC	* AGC GAG GGC GAG AGC ACG GTG CGC TTC GCC CGC AAA GGG CCC CTC CGG CAG AAG AAC

Ser Glu Gly Glu Ser Thr Val Arg Phe Ala Arg Lys Gly Pro Leu Arg Gln Lys Asn

Met Ala Asp Pro Ala Ala Gly Pro Pro Pro

Fig. 1

190	200	210	220	230	240
* GTG CAC GAG GTG AAG AAC CAC AAA TTC ACC GCC CGC TTC TTC AAG CAG CCC ACC TTC TGC	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Val His Glu Val Lys Asn His Lys Phe Thr Ala Arg Phe Phe Lys Gln Pro Thr Phe Cys					
250	260	270	280	290	300
* AGC CAC TGC ACC GAC TTC ATT TGG GGC TTC GGG AAG CAG GGA TTC CAG TGT CAA GTC TGC	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Ser His Cys Thr Asp Phe Ile Trp Gly Phe Gly Lys Gln Gly Phe Gln Cys Gln Val Cys					
310	320	330	340	350	360
* TGC TTT GTT GTA CAC AAG CGC TGC CAT GAA TTC GTC ACG TTC TCC TGC CCT GGT GCA GAC	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Cys Phe Val Val His Lys Arg Cys His Glu Phe Val Thr Phe Ser Cys Pro Gly Ala Asp					

Fig. 1 (continuare)

370		380	390	400	410	420
*		*	*	*	*	*
AAG GGC CCG GCC TCT GAT GAC CCA CCG AGC AAA CAC AAG TTT AAG ATC CAC ACC TAC TCC						
Lys Gly Pro Ala Ser Asp Asp Pro Arg Ser Lys His Lys Phe Lys Ile His Thr Tyr Ser						
430		440	450	460	470	480
*		*	*	*	*	*
AGC CCT ACC TTC TGT GAC CAC TGT GGA TCA CTG CTG TAT GGG CTC ATC CAC CAG GGG ATG						
Ser Pro Thr Phe Cys Asp His Cys Gly Ser Leu Leu Tyr Gly Leu Ile His Gln Gly Met						
490		500	510	520	530	540
*		*	*	*	*	*
AAA TGC GAC ACC TGT ATG ATG AAT GTC CAC AAG CGC TGC GTG ATG AAC GTC CCC AGC CTC						
Lys Cys Asp Thr Cys Met Met Asn Val His Lys Arg Cys Val Met Asn Val Pro Ser Leu						

Fig. 1 (continuare)

550		560	570	580	590	600
*	*	*	*	*	*	*
TGT GGC ACC GAC CAC ACA GAA CGC CGT GGC CGC ATC TAC ATC CAG GCC CAC ATC GAC AGG						
Cys Gly Thr Asp His Thr Glu Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Ile Gln Ala His Ile Asp Arg						
610	620	630	640	650	660	
*	*	*	*	*	*	
GAG GTC CTC ATC GTT GTT GTA AGA GAT GCT AAA AAT CTG GTA CCT ATG GAC CCC AAC GGC						
Glu Val Leu Ile Val Val Arg Asp Ala Lys Asn Leu Val Pro Met Asp Pro Asn Gly						
670	680	690	700	710	720	
*	*	*	*	*	*	
TTG TCA GAT CCC TAC GTA AAA CTG AAA CTG ATC CCT GAT CCC AAA AGT GAG AGC AAG CAG						
Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Leu Lys Leu Ile Pro Asp Pro Lys Ser Glu Ser Lys Gln						

Fig. 1 (continuare)

730	740	750	760	770	780
* AAG ACC AAG ACT ATC AAA TGC TCC CTC AAC CCG GAG TGG AAC GAA ACC TTC AGA TTT CAG	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Lys Thr Lys Thr Ile Lys Cys Ser Leu Asn Pro Glu Trp Asn Glu Thr Phe Arg Phe Gln					
790	800	810	820	830	840
* CTG AAG GAA TCA GAC AAA GAC AGA AGA CTG TCC GTA GAG ATC TGG GAT TGG GAC CTG ACC	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Leu Lys Glu Ser Asp Lys Asp Arg Arg Leu Ser Val Glu Ile Trp Asp Trp Asp Leu Thr					
850	860	870	880	890	900
* AGC AGG AAT GAC TTC ATG GGA TCT CTG TCG TTT GGG ATT TCA GAA CTA CAG AAA GCC GGA	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Ser Arg Asn Asp Phe Met Gly Ser Leu Ser Phe Gly Ile Ser Glu Leu Gln Lys Ala Gly					

Fig. 1 (continuare)

910		920	930	940	950	960
	*	*	*	*	*	*
GTG GAT GGC TGG TTC AAG TTA CTA AGC CAG GAA GAA GGC GAG TAC TTT AAT GTG CCG GTG						
Val Asp Gly Trp Phe Lys Leu Ser Gln Glu Glu Gly Glu Tyr Phe Asn Val Pro Val						
970		980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
CCG CCG GAA GAA AGC GAG GGC AAT GAA GAG CTG CCG CAG AAG TTT GAG AGA GCC AAG ATT						
Pro Pro Glu Glu Ser Glu Gly Asn Glu Glu Leu Arg Gln Lys Phe Glu Arg Ala Lys Ile						
1030		1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
GGC CAA GGT ACC AAG GCT CCA GAA GAA AAG ACA GCG AAC ACT ATA TCC AAA TTT GAC AAC						
Gly Gln Gly Thr Lys Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ala Asn Thr Ile Ser Lys Phe Asp Asn						

Fig. 1 (continuare)

1090	1100	1110	1120	1130	1140
* AAT GGC AAC AGG GAC CGG ATG AAA CTG ACC GAT TTT AAC TTC CTG ATG GTG CTG GGG AAA	* Asn Gly Asn Arg Asp Arg Met Lys Leu Thr Asp Phe Asn Phe Leu Met Val Leu Gly Lys	* 1150	* 1160	* 1170	* 1180
* GGC AGC TTT GGC AAG GTC ATG CTC TCA GAG CGG AAG GGT ACA GAT GAA CTC TAT GCC GTG	* Gly Ser Phe Gly Lys Val Met Leu Ser Glu Arg Lys Gly Thr Asp Glu Leu Tyr Ala Val	1190	1200	1210	1220
* AAG ATC CTG AAG AAA GAT GTG ATC CAA GAT GAC GAT GTG GAG TGC ACA ATG GTG GAG	* Lys Ile Leu Lys Lys Asp Val Val Ile Gln Asp Asp Val Glu Cys Thr Met Val Glu	1230	1240	1250	1260

Fig. 1 (continuare)

1270	1280	1290	1300	1310	1320
* AAG AGG GTG CTG GCC CTG CCT GGG AAG CCC CCA TTC CTG ACT CAG CTC CAT TCC TGC TTC	* Lys Arg Val Leu Ala Leu Pro Gly Lys Pro Pro Phe Leu Thr Gln Leu His Ser Cys Phe	* 1330	* 1340	* 1350	* 1360
* CAG ACC ATG GAC CGC CTC TAC TTT GTG ATG GAG TAT GTG AAC GGG GGC GAC CTC ATG TAC	* Gln Thr Met Asp Arg Leu Tyr Phe Val Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Asp Leu Met Tyr	* 1390	* 1400	* 1410	* 1420
* CAC ATC CAA CAA GTT GGC CGT TTC AAG GAG CCC CAT GCT GTA TTT TAC GCT GCA GAG ATT	* His Ile Gln Gln Val Gly Arg Phe Lys Glu Pro His Ala Val Phe Tyr Ala Ala Glu Ile				

Fig. 1 (continuare)

1450	1460	1470	1480	1490	1500
*    *    *    *    *					
GCC ATC GGT CTT TTC TTC TTG CAG AGC AGC AAG GGC ATC ATT TAC CGT GAC CTG AAA CTT GAC					
Ala Ile Gly Leu Phe Phe Leu Gln Ser Lys Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp					
1510	1520	1530	1540	1550	1560
*    *    *    *    *					
AAC GTG ATG CTG GAT TCC GAG GGG CAC ATC AAA ATC GCT GAC TTT GGC ATG TGT AAA GAG					
Asn Val Met Leu Asp Ser Glu Gly His Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu					
1570	1580	1590	1600	1610	1620
*    *    *    *    *					
AAT ATC TGG GAT GGG GTG ACA ACC AAG ACA TTC TGT GGC ACT CCA GAC TAC ATT GCC CCA					
Asn Ile Trp Asp Gly Val Thr Thr Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro					

Fig. 1 (continuare)

1630		1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*	*	*
GAG ATC ATT GCT TAT CAG CCC TAC GGA AAG TCT GTG GAC TGG TGG GCG TTT GGA GTC CTG						
Glu Ile Ile Ala Tyr Gln Pro Tyr Gln Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Tip Ala Phe Gly Val Leu						
1690		1700	1710	1720	1730	1740
*	*	*	*	*	*	*
CTG TAT GAA ATG TTG GCT GGC CAG GCA CCT TTT GAA GGG GAG GAT GAG GAT GAA CTC TTC						
Leu Tyr Glu Met Leu Ala Gly Gln Ala Pro Phe Glu Gly Glu Asp Glu Asp Glu Leu Phe						
1750		1760	1770	1780	1790	1800
*	*	*	*	*	*	*
CAG TCA ATC ATG GAG CAC AAC GTG GCG TAT CCC AAG TCC ATG TCT AAG GAA GCT GTG GCA						
Gln Ser Ile Met Glu His Asn Val Ala Tyr Pro Lys Ser Met Ser Lys Glu Ala Val Ala						

Fig. 1 (continuare)

1810	1820	1830	1840	1850	1860
* ATC TGC AAA GGG CTA ATG ACC AAA CAC CCA GGC AAG CGC CTG GGT TGT GGG CCT GAA GGG	* * * * *				
Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys His Pro Gly Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly					
1870	1880	1890	1900	1910	1920
* GAA CGA GAC ATT AAG GAG CAT GCA TTT TTC CGG TAT ATC GAC TGG GAG AAA CTC GAA CGC	* * * * *				
Glu Arg Asp Ile Lys Glu His Ala Phe Phe Arg Tyr Ile Asp Trp Glu Lys Leu Glu Arg					
1930	1940	1950	1960	1970	1980
* AMG GAG ATT CAG CCA CCT TAT AAA CCA AAA GCT AGA GAC AAG CGA GAC ACC TCC AAC TTC	* * * * *				
Lys Glu Ile Gln Pro Pro Tyr Lys Pro Lys Ala Arg Asp Lys Arg Asp Thr Ser Asn Phe					

Fig. 1 (continuare)

1990	2000	2010	2020	2030	2040
* GAC AAA GAG TTC ACC AGG CAG CCT GTG GAA CTG ACT CCC ACT GAC AAA CTC TTC ATC ATG	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Asp Lys Glu Phe Thr Arg Gln Pro Val Glu Leu Thr Pro Thr Asp Lys Leu Phe Ile Met					
2050	2060	2070	2080	2090	2100
* AAC TTG GAC CAA AAT GAA TTT GCT GGC TTC TCG TAT ACT AAC CCA GAG TTT GTC ATT AAT	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Asn Leu Asp Gln Asn Glu Phe Ala Gly Phe Ser Tyr Thr Asn Pro Glu Phe Val Ile Asn					
2110	2120	2130	2140	2150	2160
* GTG TAG GTG AAT GCA GAT TCC ATC GCT GAG CCT GTG TGT AAG GCT GCA GCG TGA ATG TCT	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *

Val ---

Fig. 1 (continuare)

2170	2180	2190	2200	2210	2220
ATT ATC AAT TCC AGT CTT CCA GGA TTC ATG GTG CCT CTG TTG GCA TCC GTC ATG TGG AGA					
*	*	*	*	*	*
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GCT TGT CTT AGA GGG CTT TTC TTT GTA TGT ATA GCT TGC TAG TTT GTT TTC TAC ATT TCA					
*	*	*	*	*	*
2290	2300	2310	2320	2330	2340
AAA TGT TTA GTT TAG AAT AAG TGC ATT GCC CAC TGA TAG AGG TAC AAT TTT CCA GAC TTC					
*	*	*	*	*	*

Fig. 1 (continuare)

2350		2360	2370	2380	2390	2400
*	CAG AAA CTC ATC CAA TGA ACC AAC AGT GTC AAA ACT TAA CTG TGT CCG ATA CCA AAA TGC	*	*	*	*	*
2410		2420	2430	2440	2450	2460
*	TTC AGT ATT TGT AAT TTT TAA AGT CAG ATG CTG ATG TTC CTG GTC AAA GTT TTT ACA GTT	*	*	*	*	*
2470		2480	2490	2500	2510	2520
*	ACT CTC GAA TAT CTC CTT TGA ATG CTA CCT AAG CAT GAC CGG TAT TTT TAA AAG TTG TGA	*	*	*	*	*

Fig. 1 (continuare)

2530 \* GCA GTT ACT GTG AAC TCT TGT CTC TTG GAG GAA CTT TTT GTT TAA GAA TTG 2580  
GTA AGC TTT GCA GTT ACT GTG AAC TCT TGT CTC TTG GAG GAA CTT TTT GTT TAA GAA TTG \*  
2540 \* 2550 \* 2560 \* 2570 \*  
2590 2600  
\* GTA TGA TTA AAC TGA ATT C\* \*  
GTA TGA TTA AAC TGA ATT C\* \*

Fig. 1 (continuare)

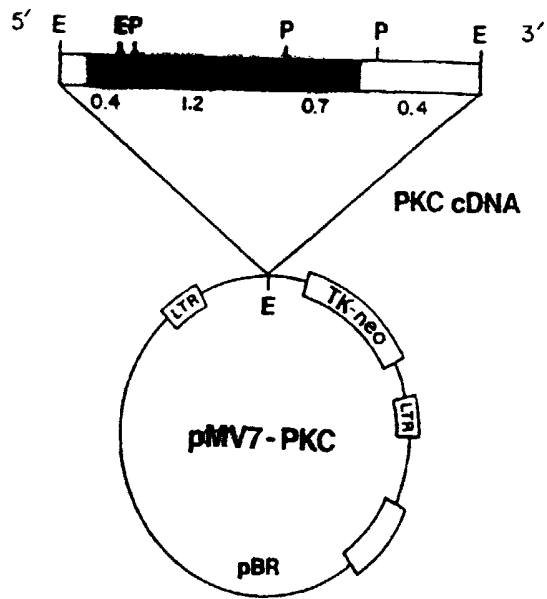


Fig. 1B

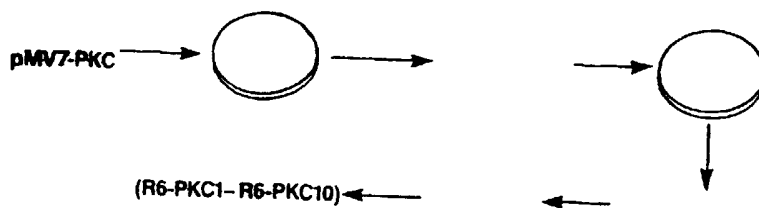


Fig. 1C

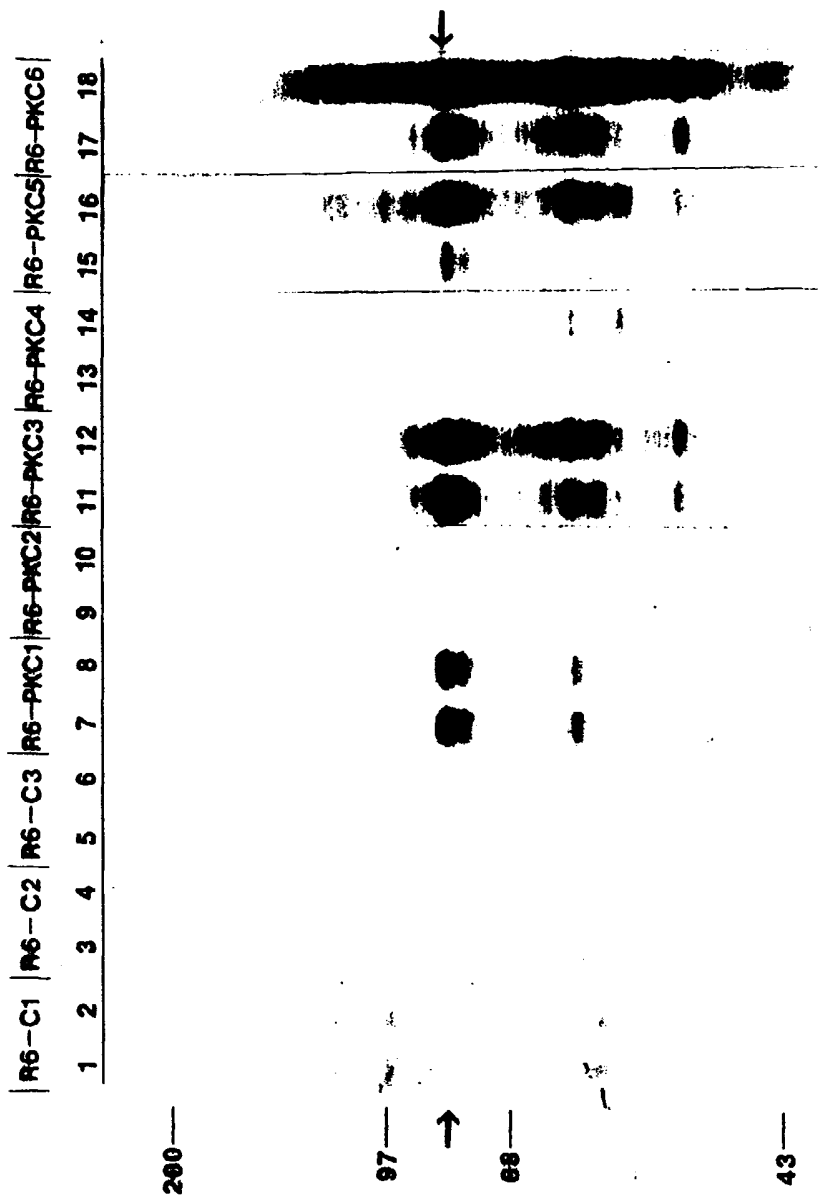


Fig. 2



Fig. 3

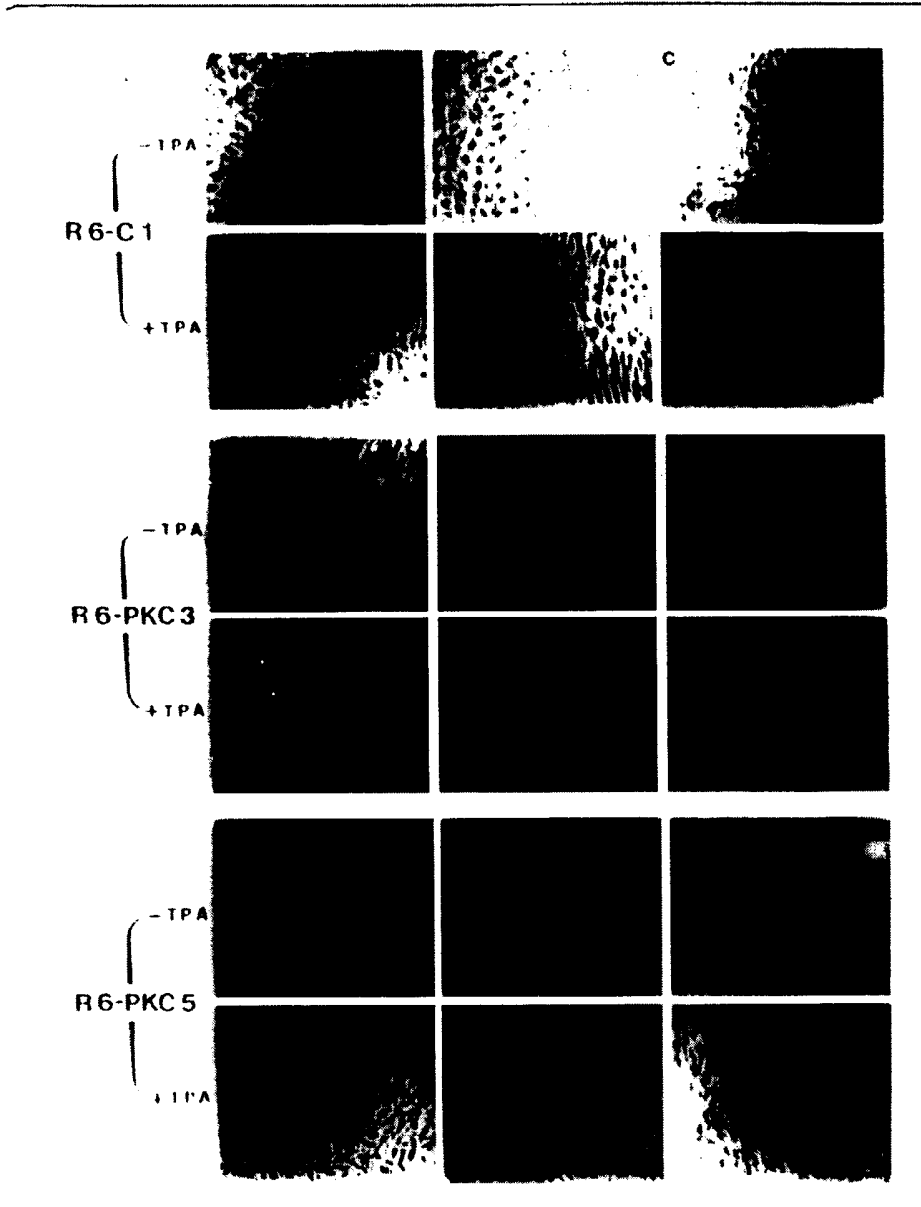


Fig. 4

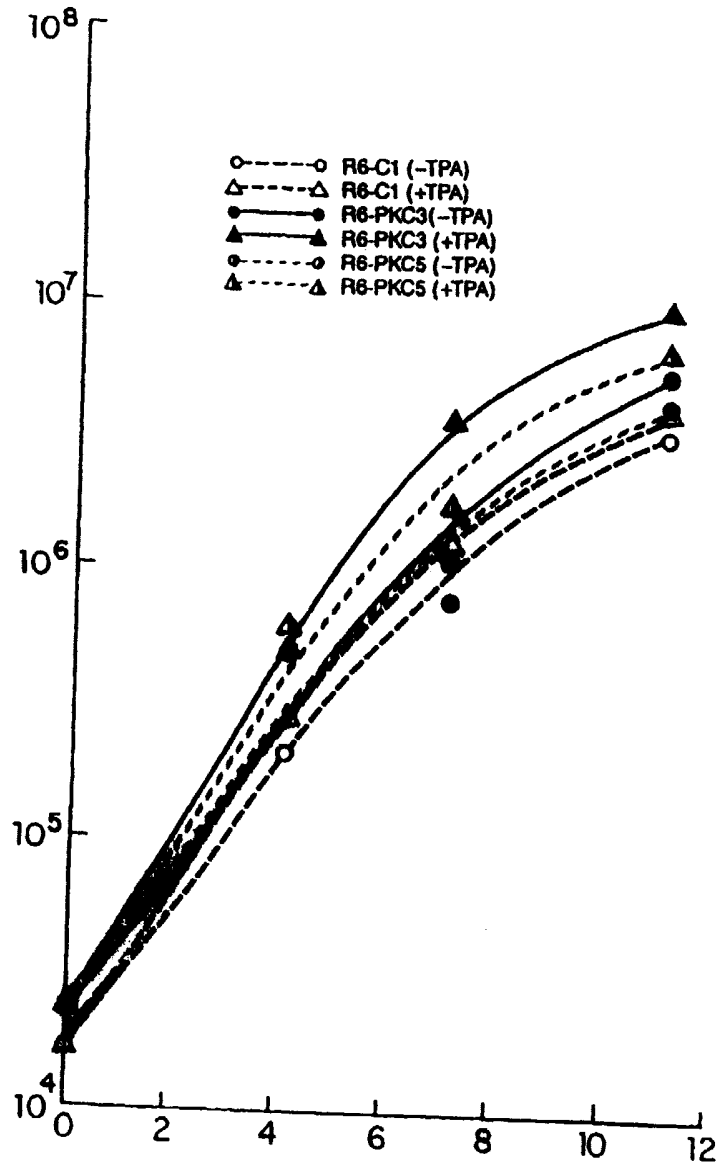


Fig. 5



Fig. 6

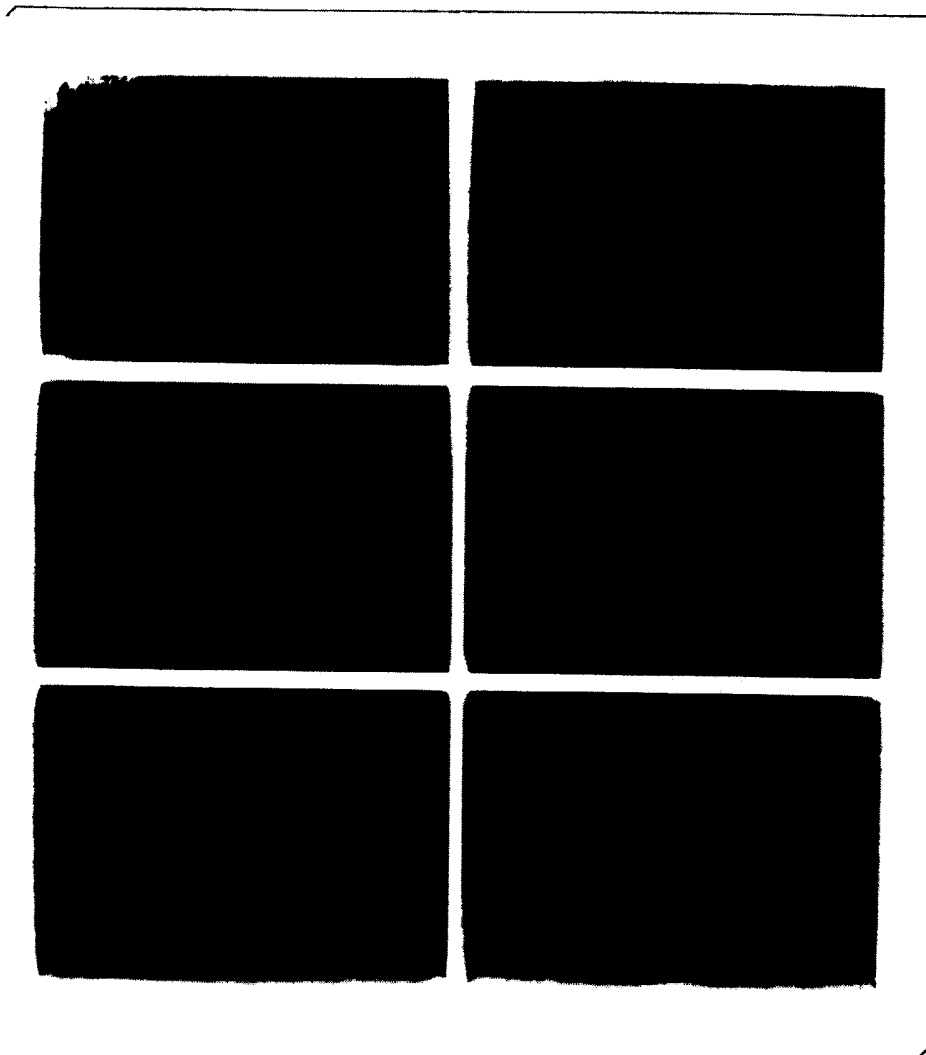


Fig. 7