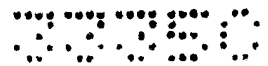


812 | 93



Eljárás onkoprotein-aktivitást gátló hatás kimutatására

The General Hospital Corporation Office of Technology Affairs,
Charlestown, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 09. 20.

Elsőbbsége: 1990. 09. 24. (586 781) Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/06839

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás onkoprotein-aktivitást gátló vegyületek kimutatására. A vegyületek onkoprotein aktivitást gátlóként történő azonosítása egy riporter gén transzkripcióját befolyásoló képességükön alapszik. A riporter gén transzkripciója egy fúziós onkoproteinnek a DNS egy meghatározott, a riporter gén promotere előtt lévő kötőhelyéhez való kapcsolódásától függ. A fúziós onkoprotein egy onkoprotein eredetű, a transzkripciót szabályozó szakaszt, valamint egy más fehérjéből származó DNS kötőhelyet tartalmaz.

822/93

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

33350

85827

Nko

C 12 Q 1/68, 1/02

C 12 N 5/00

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEJY IRODA KFT.

Eljárás onkoprotein-aktivitást gátló hatás kimutatására

The General Hospital Corporation Office of Technology Affairs,
Charlestown, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

BRENT Roger, Cambridge, Massachusetts

LECH Karen, Boston, Massachusetts

ANDERSON Catherine, Pascagoula, Mississippi

GOLEMIS Erica, Somerville, Massachusetts,

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991.09.20.

Elsőbbsége: 1990.09.24. (586 781) Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/06839

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/05286

76995-2444-GI

A találmány rákellenes hatóanyagok azonosítására szolgáló módszerekre vonatkozik.

A sejtekben előforduló onkogének termékeit tekintik sokféle rákos megbetegedés végső előidézőjének [Bishop J.M., *Science* 235, 305-310 (1987); Barbacid M., *Ann. Rev. Biochem.* 56, 779-827 (1987); Cole M. D., *Ann. Rev. Genet.* 20, 361-384 (1986); Weinberg R. A., *Science* 230, 770-776(1985)]. Ezek az onkogének onkoproteineket kódolnak, amelyek a sejtben maradva gyakran olyan meghatározott sejt-komponensekben fordulnak elő, mint a sejtmag, a citoplazma vagy a sejtmembrán.

Konkrét példaként a vírus, illetve sejt eredetű "fos" és "myc" onkogének kódolják a "Fos" valamint a "Myc" fehérjéket. Mind a "Fos", mind pedig a "Myc" jelentős mérvű termelődése egy sor különböző sejt-típusnál a sejtek korlátlan szaporodását teszi lehetővé sejttenyészetekben [Bishop J. M., *Cell* 42, 23-38 (1985); Weinberg R. A., *Science* 230, 770-776 (1985)]. Akár a "Fos", akár a "Myc" túltermelődése normális patkány fibroblaszt sejtekben egy aktivált "ras" onkogén termék kifejeződésével együtt, transzformálja a fibroblasztokat és felruházza őket azzal a képességgel, hogy élő állatokban daganatokat alakítsanak ki [Land H. et al., *Nature* 304, 596-601 (1983); Rulley H. E., *Nature* 304, 602-606 (1983)].

A "Fos" és a "Myc" olyan onkoproteinek, amelyek foszforiláltak, a sejtmagban helyezkednek el, és képesek a transzkripciót befolyásolni [Donner P. et al., *Nature* 296, 262-266 (1982); Watt R. A. et al., *Mol. Cell Biol.* 5, 448-456 (1985); Renz M. et al., *Nucl. Acids Res.* 15, 277-292 (1987)].

Az újabb vizsgálatok azt valószínűsítik, hogy az onkoproteinek, mint például a "Fos" és a "Myc" oly módon változtatják meg a gének kifejeződését és biztosítanak halhatatlanságot a sejteknek, hogy meghatározott célgének promoter aktivitását szabályozzák és így aktiválják vagy represszálják ezeknek a célgéneknek a transzkripcióját [például Varmus H. E., *Science* 238, 1337-1339 (1987); Kingston R. E. et al., *Cell* 41, 3-5 (1985); Bishop J. M., *Cell* 42, 23-38 (1985); Weinberg R. A., *Science* 230, 770-776 (1985)].

Más onkoproteineket is részesnek tartanak a gének szabályozásában. A "v-jun" (virális "jun") onkogénnek a sejtmagban előforduló terméke például a DNS meghatározott helyeihez kötődik [Struhl K., *Cell* 50, 841-846 (1987)] és homológ a sejt eredetű "c-jun" (celluláris "jun") géntermékkel, amely szintén a DNS meghatározott helyeihez kötődik. A "jun" gén terméke azonosnak mutatkozik a korábban leírt AP-1 transzkripciós faktorról [Bohmann D. et al., *Science* 238, 1386-1392 (1987)].

Kívánatos volna azonosítani onkoprotein aktivitást gátló hatású vegyületeket. Az onkoprotein aktivitás gátlásával ugyanis az onkoprotein által indukált sejtnövekedés gátlására és/vagy ellenőrzésére nyílhatna mód. Különösen kívánatos volna olyan onkoprotein inhibitorok azonosítása, amelyek nem befolyásolják a sejtben az onkoproteinek normális megfelelőinek aktivitását. Az ilyen gátlószerek gyógyászati alkalmazása előnyös lenne az olyan betegségek kezelésében, amelyek során az onkoprotein kifejeződése és aktivitása szerepet játszik a sejtburjánzás elősegítésében, illetve a sejt transzformált

állapotának fenntartásában.

Mostanáig azonban nagyon kevés onkoprotein inhibitorot azonosítottak. Az ilyen gátlószerek azonosítását megnehezítette, hogy nem állt rendelkezésre olyan, egyszerű, olcsó és megbízható szűrővizsgálati módszer, amely alkalmas a potenciális inhibitorok és aktív származékaik kiválasztására. A jelen találmány egy ilyen szűrővizsgálati módszert nyújt. E meghatározás alkalmazása révén az onkoprotein aktivitás gátlószerei kiválaszthatók, és kívánt esetben tovább vizsgálhatók annak érdekében, hogy kiszűrhetőek legyenek közülük azok, amelyek általában gátolják a normális transzkripciót vagy pedig az onkoproteinek sejtekben előforduló normális homológjainak működését akadályozzák.

Felismerve annak a szerepnek a fontosságát, amelyet az onkoprotein inhibitorok játszhatnak sokféle rákbetegség gyógykezelésében, valamint tudatában annak a ténynek, hogy nincs olyan, egyszerű vizsgálati rendszer, amellyel ezek a gátlószerek kiválaszthatók lennének, megvizsgáltuk kiméra onkogén konstrukciók alkalmazhatóságát az onkogének kifejeződését befolyásoló hatóanyagok azonosítására eukarióta gazdában végzett "in vivo" tesztben mint modellrendszerben. Ezek az erőfeszítések egy olyan, egyszerű és olcsó vizsgálati módszer kifejlesztéséhez vezettek, amely alkalmas az emlős onkoproteinek biológiai aktivitását gátló anyagok kimutatására.

A találmány gyors, megbízható és pontos módszert biztosít vegyületeknek, ideértve a humán gyógyszereket is, az onkoprotein aktivitás gátlószereként és így rákellenes

hatóanyagként való objektív azonosítására.

A találmány módszert nyújt továbbá a bioaktív onkoprotein-gátló vegyületek hatásmechanizmusának azonosítására és osztályozására.

A találmány továbbá onkoprotein-gátló vegyületek és ezek keverékei nyers készítményből történő elkülönítésének és tisztításának nyomonkövetésére is módszert biztosít.

A találmány tehát vegyületek onkoprotein aktivitást gátlóként történő azonosítására és osztályozására szolgáló módszerre vonatkozik, amelynek értelmében meghatározzuk az adott vegyületnek egy riporter gén kifejeződését befolyásoló képességét, midőn a riporter gén kifejeződése működési kapcsolatban van egy fúziós onkoprotein transzkripciót szabályozó aktivitásával. A módszer általánosságban abban áll, hogy (a) kialakítunk egy olyan gazdasejtet, amely tartalmaz egy DNS kötőhellyel működőképesen kapcsolt riporter gént, valamint egy onkoprotein fúziós gént, amely egy, a DNS kötőhelyhez kapcsolódni képes fúziós onkoproteint kódol (vagyis a riporter gén kifejeződését a DNS-hez kapcsolódott fúziós onkoprotein irányítja); (b) a gazdasejtet érintkezésbe hozzuk a vizsgálandó vegyülettel; (c) meghatározzuk a riporter gén kifejeződését. A riporter gén kifejeződésének mértékében észlelhető csökkenés olyan vegyületet jelez, amely gátolja az onkoprotein aktivitást.

A találmány tárgya továbbá eljárás vegyületek onkoprotein-aktivitást gátló képességének azonosítására oly módon, hogy meghatározzuk az adott vegyületnek egy riporter molekula onkoprotein által indukált kifejeződését gátló képességét. A

módszer abban áll, hogy: (a) egy első gazdasejtet tenyésztünk a vizsgálandó vegyület jelenlétében, amely első gazdasejt egy vagy több, fúziós proteint kódoló, valamint riporter gént tartalmazó rekombináns konstrukcióval van transzformálva oly módon, hogy a riporter gén kifejeződése működési kapcsolatban van a fúziós protein kifejeződésével; (b) egy második gazdasejtet tenyésztünk ugyanazon vegyület jelenlétében, amely második gazdasejt egy vagy több, fúziós onkoproteint kódoló, valamint riporter gént tartalmazó rekombináns konstrukcióval van transzformálva oly módon, hogy a riporter gén kifejeződése működési kapcsolatban van a fúziós onkoprotein kifejeződésével; (c) összehasonlítjuk a riporter gén kifejeződését a két rendszerben.

A találmány szerinti módszerhez használható gazdasejtek előnyösen élesztő- vagy tenyésztett állati sejtek lehetnek.

Az alábbi ismertetésben egy sor, a rekombináns DNS technológiában használatos kifejezés fordul elő. A részletes leírás, az igénypontok és az oltalmi kör világos érthetősége érdekében a következőkben megadjuk a definíciókat.

"Működési kapcsolat" - Két makromolekularész elrendeződése olyan, hogy az egyik aktivitásának megváltozása hatást vált ki a másikon. Így egy promoter rész aktivitásának megváltoztatása alkalmas egy működési kapcsolatban levő génszakasz kifejeződésének befolyásolására és/vagy szabályozására. Például egy promoter résszel működési kapcsolatban levő génszakasz transzkripcióját a promoter aktivitását "aktiváló" tényezők indukálják; hasonlóképp a promoter résszel működési kapcsolatban levő génszakasz transzkripcióját gátolják a

promoter aktivitását "represszáló" tényezők. Ilyen módon a promoter szakasz akkor van működési kapcsolatban egy fehérjét kódoló génszakasszal, ha a promoter aktivitása hatással van az adott génszakasz transzkripciójára.

"Fúziós konstrukció" - Általánosságban olyan rekombináns génekre vonatkozik, amelyek fúziós proteineket és fúziós onkoproteineket kódolnak.

"Fúziós protein" - Hibridfehérje. Egy hibridfehérje olyan protein, amelyet legalább két különböző proteinből származó részletekből hoztak létre. A leírásban abban az értelemben használatos, hogy a fúziós protein rendelkezik (a) egy a transzkripciót szabályozó szakasszal, amely egy olyan, transzkripciót szabályozó fehérjéből származik, amely nem onkoprotein, és (b) egy DNS kötő szakasszal, amely egy DNS kötő fehérjéből származik. A fúziós protein szerkezete olyan, hogy a transzkripciót szabályozó szakasz és a DNS kötő szakasz elrendezése lehetővé teszi mindkét régió biológiai aktivitását. A transzkripciót szabályozó szakasz forrásául szolgáló fehérje és a DNS kötőhely forrásául szolgáló fehérje különböző, azaz a két szakasz egymáshoz képest heterológ.

A fúziós protein transzkripciót szabályozó szakasza a célgénnek transzkripcióját az adott szakasz természetes biológiai aktivitásától függően gátolhatja vagy serkentheti. Jelen értelemben a "fúziós protein" kifejezés nem vonatkozik a találmány szerinti fúziós onkoproteinekre, az alább leírtaknak megfelelően.

A "fúziós protein gén" kifejezés fúziós proteint kódoló DNS szakaszra vonatkozik. A fúziós protein gén adott esetben

tartalmazhat továbbá a transzkripciójának és transzlációjának szabályozására szolgáló szakaszokat.

"Fúziós onkoprotein" - Olyan hibridfehérje, amely két különböző fehérjéből származó szakaszból áll. Jelen értelemben a fúziós onkoprotein olyan hibridfehérjét jelent, amely rendelkezik (a) egy, a transzkripciót szabályozó szakasszal, amely transzkripciót szabályozó onkoproteinekből származik, és (b) egy DNS-kötő szakasszal, amely egy DNS-kötő fehérjéből származik. A fúziós onkoprotein szerkezete olyan, hogy a transzkripciót szabályozó szakasz és a DNS kötő szakasz elrendezése lehetővé teszi mindkét régió biológiai aktivitását. Az onkoprotein, azaz a transzkripciót szabályozó szakasz forrása eltérő a DNS kötő szakasz forrásától, tehát a két szakasz egymáshoz képest heterológ.

A fúziós onkoprotein transzkripciót szabályozó szakasza a célgénnek transzkripcióját az adott szakasz természetes biológiai aktivitásától függően gátolhatja vagy serkentheti.

A "fúziós onkoprotein gén" kifejezés fúziós onkoproteint kódoló DNS szakaszra vonatkozik. A fúziós onkoprotein gén adott esetben tartalmazhat továbbá a transzkripciójának és transzlációjának szabályozására szolgáló szakaszokat.

"Variáns" - Olyan fehérjemolekula "variánsa", pl. egy fúziós protein vagy egy fúziós onkoprotein variánsa, olyan fehérjemolekula, amelynek aminosav sorrendje jelentős mértékben hasonló, de nem megegyező annak a fúziós proteinnak vagy fúziós onkoproteinnak az aminosav sorrendjével, amely a természetben előforduló szakaszokból áll.

A "jelentős mértékben hasonló" aminosav sorrend olyan

aminosav sorrendet jelent, amely nagymértékben homológ, de nem azonos a fúziós protein illetve a fúziós onkoprotein aminosav sorrendjével. A nagymértékben homológ aminosav sorrend feltétele a legalább 80 %-os hasonlóság és esetleg kisebb mértékű homológia, különösen ha a homológia a fontos szakaszon koncentrálódik és a hasonlóság szükséges a fehérje hatékonyságához.

"Funkcionális származék" - Jelen értelemben egy fúziós protein vagy fúziós onkoprotein "funkcionális származéka" az a fehérje, amely a találmány szerinti onkoprotein konstrukciók biológiai aktivitásához jelentős mértékben hasonló biológiai aktivitással rendelkezik. A "jelentős mértékben hasonló" jelentése minőségileg hasonló, de mértékében eltérő biológiai aktivitás. Egy fúziós onkoprotein funkcionális származéka például felismerheti ugyanazt a célpontot mint a fúziós onkoprotein, de nem azonos affinitással. Hasonlóképp, egy fúziós protein funkcionális származéka felismerheti ugyanazt a célpontot, mint a fúziós protein, de nem azonos affinitással.

Ebben az értelemben "funkcionális származéknak" minősül például egy olyan peptid, amely tartalmazza a találmány szerinti hibridfehérje aminosav-vázát, valamint további, a hibridfehérjében rendszerint elő nem forduló szubsztituenseket. Az ilyen szubsztituensek javíthatják a származék oldhatóságát, felszívódását, biológiai felezési idejét stb. A szubsztituensek másrészt csökkenthetik a származék toxicitását, megszüntethetik vagy mérsékelhetik a származék nemkívánatos mellékhatásait, stb. Az ilyen hatásokat kiváltani képes szubsztituenseket a Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)

című munka ismerteti. A szubsztituenseknek a fehérjemolekulákhoz történő kapcsolására szolgáló módszerek a szakmában közismertek.

Egy hibridfehérje funkcionális származéka adott esetben tartalmazhat poszttranszlációs módosításokat is, amilyen például a kovalensen kötött szénhidrát, attól függően, hogy szükségesek-e ezek a módosítások a találmány szerinti módszer kivitelezéséhez.

A "funkcionális származék" kifejezés alkalmazásának a célja a funkcionális "fragmens", "variáns", "analóg" vagy "kémiai származék" összefoglaló elnevezése egy adott molekulára vonatkozóan.

"Válasz" - Bármely olyan paraméterben bekövetkezett változást jelent, amely alkalmas egy adott vegyület azon hatásának mérésére vagy leírására, amelyet az a találmány szerinti onkoproteinek vagy fúziós onkoproteinek aktivitására gyakorol. A válasz fellelhető fizikai változásként (mint például változás a fenotípusban), vagy fellelhető molekuláris változásként (mint például a reakciósebesség vagy az affinitási állandó megváltozása). A válasz kimutatása bármilyen alkalmas módon kivitelezhető.

"Vegyület" - Olyan kémiai anyagot jelent, amely egyaránt lehet szilárd, folyékony avagy légnemű halmazállapotú. A kifejezés vonatkozik szintetikus vegyületekre és természetes anyagokra éppúgy, mint az olyan makromolekulákra, mint a polipeptidek, a polinukleotidok vagy lipidek, valamint a kisebb molekulákra, amilyenek például a neurotranszmitterek, a ligandumok, a hormonok vagy az alapvegyületek.

"Bioaktív vegyületek" - A kifejezés bármely olyan vegyületre vonatkozik, amely mérhető választ idéz elő a találmány szerinti vizsgálati rendszerekben.

"Promoter" - Azt a DNS szakaszt jelenti, amely az 5' végen a transzkripció kezdőpontjának közelében helyezkedik el, és működési kapcsolatban van az átírt szakasszal. A promoter tartalmazhat egy vagy több szabályozóegységet vagy modult, amelyek befolyásolják a működési kapcsolatban levő gén transzkripcióját.

"Expresszió" - Az a folyamat, amelynek során a génben tárolt információ megnyilvánul. Amennyiben a gén valamely fehérjét kódol, úgy az expresszió magában foglalja a DNS átíródását mRNS-re, adott esetben az mRNS érési folyamatát, valamint az érett mRNS transzlációját fehérjévé.

Egy nukleinsav molekulát - amilyen egy DNS vagy gén - "expresszióképes"-nek neveznek abban az esetben, ha a molekula tartalmaz egy adott polipeptidet kódoló szakaszt, valamint olyan szabályozó szakaszt, amely megfelelő gazdaközegben lehetővé teszi a DNS-ben tárolt genetikai információ transzkripcióját, érési folyamatát és transzlációját fehérjeterméké amennyiben a szabályozó szakasz működési kapcsolatban levő a polipeptidet kódoló nukleotid szakasszal.

"Klónozó vektor" - Bármely olyan molekula lehet, amely képes nukleinsav szakaszt gazdasejtbe juttatni klónozás céljából. A klónozó vektorok lehetnek plazmidok vagy fágok, köztük azok, amelyek autonóm replikációra képesek a gazdasejtben. Másrésztől alkalmasak ilyen célra azok a DNS molekulák is, amelyek képesek beépülni a gazdasejt kromoszomális DNS-

ébe, közülük is különösképp azok, amelyek stabil módon épülnek be a gazdasejt kromoszomális DNS-ébe, lehetővé téve az ilyen molekulák öröklődését az utódokban.

A klónozó vektorokat gyakran jellemzik egy vagy néhány endonukleáz felismerőhellyel, amelyeknél ezek a DNS szakaszok meghatározott módon hasíthatók a vektor esszenciális biológiai tulajdonságainak elvesztése nélkül. Az ilyen hasítási helyekbe DNS szakaszok építhetők be annak érdekében, hogy replikálódhassanak és klónozódhassanak.

A klónozó vektor tartalmazhat továbbá jelölést (markert), amely alkalmas az adott klónozó vektorral transzformált sejtek azonosítására. A markergén például lehet egy olyan gén, amely meghatározott antibiotikum rezisztenciával ruházza fel a gazdasejtet.

"Expressziós vektor" - A klónozó vektorhoz hasonlóan olyan vektort jelent, amelyet azonban kifejezetten arra a célra terveztek, hogy a transzformációt követően biztosítsa a feltételeket a klónozott gén expressziójához a gazdasejtben. Az ilyen feltételek biztosításának egyik módja olyan expressziós vektorok alkalmazása, amelyek transzkripciós és translációs szabályozó szakaszokkal rendelkeznek. Ezeknek a transzkripciós és translációs szabályozó szakaszoknak képeseknek kell lenniük arra, hogy működési kapcsolatban legyenek az adott klónozott génnel. Másik módja a megfelelő feltételek biztosításának olyan expressziós vektorok alkalmazása, amelyek olyan klónozó hellyel vagy helyekkel rendelkeznek, ahová a kívánt klónozendó gén, valamint az expressziós szabályozó szakaszok beépíthetők.

Az expressziós vektorokban a klónozendó gén általában működési kapcsolatban van bizonyos szabályozó szakaszokkal, például a promoter szakaszokkal. Az expressziós szabályozó szakaszok különbözőek lehetnek attól függően, hogy a vektort a működési kapcsolatban levő génnek prokarióta vagy eukarióta gazdában való expressziójára tervezték, és ennek megfelelően tartalmazhatnak még transzkripciós elemeket, így például fokozó (enhancer) elemeket, terminációs szakaszokat, valamint szövetspecifikus elemeket és/vagy transzlációs iníciációs és terminációs helyeket.

"Gazda" - Olyan mikroorganizmust jelent, amely a klónozó vagy expressziós vektor befogadója. A találmány szerinti gazda előnyösen élesztő vagy tenyésztett állati sejt, például emlős- vagy rovarsejt. Különösen előnyös esetben az élesztő gazda *Saccharomyces cerevisiae*. Egy másik különösen előnyös esetben az emlős gazda tenyésztett CV-1 vagy NIH3T3 sejt.

A transzkripciót szabályozó fehérjék általában képesek meghatározott DNS szakaszokhoz kötődni és szabályozni meghatározott promotereket amelyek ezeket a szakaszokat tartalmazzák. Az ilyen fehérjéknek általában legalább két funkciójuk van, az egyik a DNS-hez való kötődés, a másik pedig a transzkripció szabályozása. A DNS-hez kötődve a fehérje transzkripciót szabályozó szakasza megváltoztatja (aktiválja vagy represszálja) a szabályozó fehérje DNS-kötő helyével működési kapcsolatban levő gén transzkripcióját.

Sok, a DNS-hez kötődő szabályozófehérje esetében a DNS-kötő és a transzkripciót szabályozó funkció két külön helyen van. Ezek a szakaszok gyakran különálló egységek és az amino-

sav lánc fizikailag elkülöníthető pontjain foglalnak helyet. Ezeket az egységeket szétválasztva a természetes DNS-hez kötődő szabályozófehérjékből származékok állíthatók elő. Az ilyen származékok például rendelkezhetnek a DNS-hez való kötődés képességével, de a DNS transzkripcióját nem tudják szabályozni. Ezek a származékok lehetnek továbbá olyanok is, amelyek egy adott szabályozófehérje DNS-kötő helyét és egy másik szabályozófehérje transzkripciót szabályozó szakaszát tartalmazzák.

A találmány értelmében eljárva két különböző fehérjéből származó szakaszok egyetlen "fúziós" fehérjében való egyesítése révén olyan fehérje hozható létre, amely az eredeti szakaszok kombinált tulajdonságaival rendelkezik és az ilyen fehérje felhasználható azoknak a vegyületeknek és egyéb faktoroknak az azonosítására és jellemzésére, amelyek megváltoztatják, vagy egyéb módon befolyásolják az egyesített szakaszok egyikének aktivitását.

A találmány szerinti módszerekben való alkalmazhatósághoz a gazdaszervezeteknek legalább két genetikai konstrukciót kell hordozniuk; az egyik konstrukció a fúziós protein vagy a fúziós onkoprotein expressziójára képes génszakaszt szolgáltatja, a másik konstrukció pedig a riporter gént tartalmazza. Szükséges, hogy az ilyen, gazdaszervezetben levő riporter gén promotere tartalmazzon olyan helyet, amelyet a fúziós protein vagy a fúziós onkoprotein DNS-kötő szakasza felismer. Ilyen módon a riporter gén szintézisének expressziója (vagy repressziója) a fúziós protein vagy a fúziós onkoprotein expressziójától és a riporter gén promoteréhez való kötődésétől függ.

A találmány szerinti módszer során előnyösen két gazdaszervezet kerül felhasználásra. Az egyik gazdaszervezet a fúziós protein konstrukciót, a másik gazdaszervezet a fúziós onkoprotein konstrukciót hordozza és mindkét gazda rendelkezik ugyanazzal a riporter gén konstrukcióval. Emellett az első gazdaszervezetben lévő fúziós protein konstrukció DNS-kötő helye előnyösen azonos a fúziós onkoprotein konstrukció DNS-kötő helyével. Mindkét gazdaszervezetet kiteve egy adott vegyület hatásának és összehasonlítva a riporter gén kifejeződését a két gazdaszervezetben, a szóbanforgó vegyületnek az onkogén által indukált transzkripciót specifikusan gátló (nem pedig a transzkripciót általában gátló) képessége meghatározható.

Az első gazdaszervezetben lévő fúziós protein konstrukció transzkripciót szabályozó szakasza lehet bármely, a szabályozásra - előnyösen a transzkripció aktiválására - képes szakasz. Alkalmos például a második gazdaszervezetben lévő fúziós onkoprotein konstrukcióban használt onkoprotein transzkripciót szabályozó szakasz normális sejtben megtalálható ellenpárja. Másrésztől - különösen, ha az onkoprotein normál sejtben előforduló ellenpárja ismeretlen, vagy azonos az onkoproteinnel - egy más transzkripciót szabályozó fehérje transzkripciót szabályozó szakasza is használható. Kívánt esetben a szabályozófehérje transzkripciót szabályozó szakaszának alkalmazása is előnyös lehet, annak biztosítására, hogy valamely potenciális inhibitorként azonosított vegyület nem a transzkripciót általában gátolja.

A találmány szerinti módszer alkalmas azoknak a vegyü-

leteknek az azonosítására, amelyek a transzkripciót önmagukban gátolják. A találmány szerinti módszer olyan vegyületek azonosítására is alkalmas, amelyek gátolják, vagy más módon zavarják a fehérjék oligomerizációját, különösen, ha ez az oligomerizáció a markergén transzkripciójának szabályozásához szükséges. Anélkül, hogy korlátozni kívánnánk a találmány szerinti módszerrel azonosítható biológiailag aktív vegyületek hatásmechanizmusának körét egy adott hatásmechanizmusra, megemlítjük, hogy sok DNS-kötő fehérje transzkripciót szabályozó szakasza kölcsönhatásba léphet (oligomerizálhat) egy második, nem DNS-kötő fehérjével és oligomer alakban stimulálja a működési kapcsolatban levő gének transzkripcióját. Ennek megfelelően azoknál a találmány szerinti fúziós konstrukcióknál, amelyeknél a transzkripció aktivitáshoz oligomerizáció szükséges, az ilyen oligomerizációt gátló vegyületek az onkoprotein aktivitást is gátolják.

Bármely DNS-kötő vagy transzkripciót szabályozó fehérje, de különösen az eukarióta fehérjék felhasználhatók a kívánt szakaszok forrásául a találmány szerinti fúziós protein és fúziós onkoprotein konstrukciókban. Sok transzkripciót szabályozó fehérje ismeretes. A transzkripciót szabályozó fehérjéket, valamint ezen fehérjék szakaszainak a jellemzésére szolgáló módszereket Johnson és McKnight ismerteti [Annu. Rev. Bioch. 58, 799-839 (1989)].

Azok a találmány szerinti konstrukciók, melyek tartalmaznak (1) DNS-kötő szakaszt és (2) a szakasz által felimert DNS-kötő elemet, a gazdasejthez képest lehetnek mind homológ, mind pedig heterológok. Előnyösen heterológ DNS-kötő szakaszt

és elemet használunk. Különösen előnyös esetben, eukarióta gazdaszervezetekben, a DNS-kötő elem, valamint az ehhez kötődő fehérje DNS-kötő szakasza prokarióta eredetű. A találmány szerinti módszerben a prokarióta szabályozóelemek eukarióta gazdaszervezettel történő alkalmazása előnyös, mivel ez nagymértékben csökkenti annak a lehetőségét, hogy a gazdaszervezet olyan endogén elemet tartalmazzon, amely letitrálással, higítással vagy más módon megzavarná a találmány szerinti módszer által szolgáltatott adatok kiértékelését.

Jóllehet a találmány szerinti módszerek kivitelezéséhez nem okvetlenül szükséges, abban az esetben, midőn a kiválasztott, transzkripciót reguláló szakasz nem az onkoprotein normális sejtben előforduló ellenpárja (például nem a v-Myc ellenpárja, a c-Myc), úgy kívánatos lehet olyan szabályozófehérjéből származó szabályozó szakasz alkalmazása, amely az onkoproteinnel azonos csoportba sorolható a DNS-kötődés tekintetében. Sok szabályozó-fehérje, melyek DNS-kötő helyében homológia van, a transzkripció szabályozására gyakorolt hatását illetően is hasonló.

Két jellemző DNS-kötő elem a kettős csavar (helix-turn-helix) és a cink ujj (zinc finger) mintázat. Az alábbi fehérjék cink ujj mintázatot tartalmaznak: a GAL4, HAP1, ADR1, SWI5, ARGRII és a LAC9 élesztőfehérjék, a cys-3 Neurospora fehérje, a "kruppel", "snail", "hunchback", "serendipity", valamint a "hairy wing" szupresszor Drosophila fehérjék, végül a gerinces fehérjék közül az Sp1, H2TF-1/NF-kappaB-szerű fehérje, a PRDI, TDF, GLI, Evi-1, a glükokortikoid-receptor, az ösztrogén-receptor, a progeszteron-receptor, a tiroidhormon-

receptor (C-erbA), valamint a ZIF/268 fehérje. Kettős csavar mintázatot tartalmaznak a következő fehérjék: a MATa1, MATa2 és MATa1 élesztő párosodási faktorok, az "antennapedia", "ultrabithorax", "paired", "fushi tarazu", "cut" és "engrailed" Drosophila fehérjék valamint a gerinces fehérjék közül az OTF-1(OCT1), OTF-2(OCT2) és PIT-1 fehérjék.

A találmány szerinti módszer során előnyösen a GCN4 és a GAL4 transzkripciót szabályozó szakasza használatos.

A találmány szerinti módszernél használható, DNS-kötő szakasszal, valamint DNS-kötő elemmel rendelkező prokarióta DNS-kötő fehérjék például a LexA, CAP (az E. coli katabolit aktivátor proteinje), a lambda-bakteriofág CRO és CI fehérjéje, a lac represszor, trp represszor, gal represszor fehérjék, valamint a 434 és P22 fágok represszor és CRO fehérjéi. Hozzáteendő, hogy a korábban felsorolt DNS szabályozó fehérjékből származó DNS-kötő szakaszok bármelyike használható abban az esetben, ha elegendő fehérjemolekula áll rendelkezésre a gazdasejtben, hogy az ott jelenlévő bármilyen homológ DNS-kötő helyet letitrálja.

Egy fehérjében a DNS-kötő szakasz azonosítása különféle, a szakmában ismert és korábban ilyen szakaszok azonosítására használt módszerrel lehetséges. A DNS-kötő fehérjék és az ezekben a fehérjékben lévő DNS-kötő szakaszok azonosítása és tisztítása a DNS-hez való affinitásuk alapján történik. A DNS kötődés megállapítható például filterhibridizációs kísérletekkel, melyekben a fehérje (amely a kimutatás megkönnyítése érdekében rendszerint jelölt) hozzákötődhet a szűrőn rögzített DNS-hez, vagy épp fordítva, a DNS kötőhelyével kapcsolódik a

szűrőhöz, amelyen a fehérje van rögzítve. Az ilyen kötődés szekvencia-specifikussága és affinitása megállapítható DNS protekciós vagy gélretardációs kimutatással. Az ilyen fehérjék tisztítása szekvencia-specifikus DNS affinitás kromatográfiás módszerekkel valósítható meg, azaz a megfelelő szakasz kötődése érdekében DNS-sel derivatizált gyantán történő oszlop-kromatográfiával. A DNS-kötő fehérjék proteolitikus degradációjával feltárható az a szakasz, amely a DNS-kötő képességet megőrzi.

A DNS-kötő szakaszt úgy építjük be a fúziós onkoproteinbe, hogy a szakasz ne veszítse el azon képességét, mellyel felismeri a DNS-nek azt az elemét, amelyhez természetesen kötődik, azaz a DNS-kötő helyet oly módon biztosítjuk, hogy nem tesszük tönkre a DNS-kötő szakasz specifikus kötődését a DNS-hez.

A fehérjékben lévő, transzkripciót szabályozó szakaszok is azonosíthatók a szakmában ismert módszerekkel, előnyösen olyan klónozott fehérje alkalmazásával, amelyben a genetikai sorrend könnyen manipulálható. Klónozott formában a természetes fehérje származékainak szintézisét előnyösen úgy irányítjuk expressziós vektorokkal, hogy a transzkripciót szabályozó szakasz azonosítható legyen annak nyomkövetésével, milyen mértékben képes az expresszálandó fehérje aktiválni azoknak a géneknek a transzkripcióját, amelyekről ismert, hogy a teljes hosszúságú fehérjével aktiválhatók. Ezen túlmenően a klónozott DNS templátok alkalmazásával kialakíthatók a kívánt promoter pontos transzkripciójára képes sejtmentes transzkripciós rendszerek.

A találmány szerinti fúziós proteinek és fúziós onkoproteinek egynél több, a transzkripciót szabályozó szakaszt tartalmazhatnak. Hasonlóképp a riporter gén promoter szakasza egynél több DNS kötőelemet tartalmazhat, amelyek mindegyike képes befolyásolni (indukálni és/vagy gátolni) a működési kapcsolatban levő riporter gén kifejeződését.

A találmány szerinti genetikai konstrukciók (fúziós protein és riporter gén vagy fúziós onkoprotein és riporter gén) elhelyezkedhetnek két különböző plazmidon vagy rekombináns DNS fragmenszen, de lehetnek együtt is egy plazmidon vagy rekombináns DNS fragmenszen. A konstrukciók be is lehetnek építve egy gazdasejt genomjába.

A fúziós onkoproteint előnyösen oly módon állítjuk elő, hogy az onkoprotein természetes DNS-kötő helyét (ha van) eltávolítjuk (vagy inaktiváljuk) és heterológ DNS-kötő hellyel helyettesítjük. Ennek eredményeképp a fúziós onkoprotein nem kötődik többé egyetlen olyan, specifikus DNS elemhez sem, amely az adott onkoprotein természetes célpontja, hanem a fúziós protein már specifikusan ahhoz a DNS szekvenciához kötődik, amelyet a fúziós onkoprotein heterológ DNS-kötő helye ismer fel. A DNS-hez való kötődéssel bekövetkezik a működéskapcsolt gének transzkripciója.

A találmány egy másik foganatosítási módja szerint a fúziós onkoprotein megtartja természetes DNS-kötő szakaszát de tartalmaz egy másik, heterológ DNS-kötő helyet is. Eszerint a kiviteli mód szerint a fúziós onkoprotein mindaddig képes kötődni bármely olyan DNS elemhez, amely normális esetben célpontja az onkoproteinnek, amíg a protein természetes

helyeihez való kötődése nem zárja ki a heterológ DNS kötőeleméhez való kapcsolódását.

A fúziós konstrukciókból hiányozhat is a természetes dimerizációs szakasz. Bizonyos esetekben a természetes dimerizációs szakasz jelenléte veszélyezteti a LexA operátorok által történő aktiválást, vagy a LexA DNS kötőhelyek dimerizációjának megakadályozásával (és így megakadályozva a fúziós protein kötődését a LexA operátorhoz), vagy pedig a más sejtfehérjékkel való heterodimer kölcsönhatás elősegítése révén (pl. más transzkripciós faktorral, vagy a sejtmag anyagával), csökkentve így a homodimerizációhoz és a célpromoterrel való kapcsolódáshoz rendelkezésre álló fúziós protein molekulák számát. A találmány szerinti proteinek és onkoproteinek dimerizációs szakaszai eltávolíthatók az onkoproteint vagy más proteint kódoló DNS szakaszból enzimatikus emésztéssel (pl. restrikciós emésztéssel), vagy - ha a dimerizációs szakasz karboxi-terminális - stop kodon beépítésével a szakasz elé vagy magába a szakaszba.

A riporter gén bármely olyan gén lehet, amelynek nyomkövethető a kifejeződése, és ez az expresszió alkalmas arra, hogy a fúziós protein vagy fúziós onkoprotein aktivitás indikátora legyen. Egy előnyös fogantatási mód szerint a riporter gén normális körülmények között nem fejeződik ki a gazdasejtben, vagy olyan gén, amely helyettesít egy a gazdában endogén eredetű másik gént.

A riporter gén terméke közvetlenül mérhető immunmeghatározással. Azok az immunmeghatározások tartoznak ide, melyekben az antitest a folyadékfázisban van, vagy szilárd

hordozóhoz van kötve. A riporter továbbá jelezve is lehet az immunmeghatározások során használatos különféle módszerekkel. A riporter fehérje kimutatására előnyös immunmeghatározások közé tartozik a radioimmun meghatározás, az enzimjelöléses immunszorbens meghatározás (ELISA), vagy más, a szakmában ismert módszer, amilyen például az immunfluoreszcens meghatározás, a kemilumineszcens meghatározás vagy a biolumineszcens meghatározás.

Bármely kimutatható fenotipikus változás szolgálhat a találmány szerinti módszer alapjául. Különösen hasznosak azok a riporter gének, amelyek új fenotípussal ruházzák fel a gazdaszervezetet kifejeződésükkor. Az olyan gének, amelyek a gazdaszervezetnek szelektív táptalajon való növekedési képességet biztosítanak, különösen előnyösek. Az élesztőknél például, az élesztő LEU2 gén riporter génként való használata az endogén LEU2 aktivitással nem rendelkező mutáns törzsekben lehetővé teszi az ilyen élesztő növekedését leucin egyedüli szénforráson [lásd például "The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces", ed. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, (1981); valamint azok a módszerek amelyek fellelhetők Rothstein et al., Mol. Cell Biol. 7, 1198, (1987) cikkében]]. A riporter gén kifejeződése nyomon-követhető egyszerűen megfigyelve, hogy a gazda képes-e növekedni leucinon.

Az E. coli LacZ génje is igen hasznos riporterként. Azokban a gazdaszervezetekben, amelyek hasznosítják a lacZ gént riporter génként, a fúziós onkoprotein aktivitása könnyűszerrel értékelhető a β -galaktozidáz termelés nyomonköve-

tésével. A β -galaktozidáz képződése vizuálisan nyomonkövethető az X-gal kromofór színezék jelenlétében, amely az enzimátikus hidrolízis hatására megkékül.

Más riporter gének a *his3*, *ura3*, *trp1* valamint az emlős sejtekben különösen előnyös kloramfenikol-acetiltranszferáz (CAT).

A szakmában jártasak számára nyilvánvaló, hogy elképzelhetők más alkalmas riporter rendszerek is, amelyek megmutatják a fúziós onkoprotein biológiai aktivitásának jelenlétét vagy gátlását.

Az, hogy egy kívánt vegyület hatása a transzkripcióra gyakorolt hatásnak és nem pedig a riporter termékre magára gyakorolt hatásnak tudható be, megállapítható az adott vegyületnek egy onkoprotein fúziós terméket tartalmazó, illetve egy nem-onkoprotein fúziós terméket tartalmazó gazdaszervezetre gyakorolt hatásának összehasonlításával, amennyiben a szóbanforgó gazdaszervezetek ugyanazt a riporter gén konstrukciót tartalmazzák.

A találmány szerinti módszer egy előnyös kiviteli módja szerint a fúziós onkoprotein gén tartalmaz egy, a bakteriális LexA represszor fehérjét kódoló szakaszt, valamint egy, a virális vFos onkoprotein transzkripciót aktiváló szakaszt kódoló szekvenciát. Egy ilyen gén expressziója a "LexA-vFos" fúziós onkoproteint eredményezi. A LexA-vFos rendelkezik a LexA DNS kötőelemhez való kapcsolódás képességével. Másrészt a LexA-vFos rendelkezik a transzkripció aktiválásának a képességével is, a vFos transzkripciót aktiváló szakaszának jelenléte következtében. A LexA-vFos fúziós onkoprotein kötődése a

transzkripció aktiválódását eredményezi, ami a vFos maradékon hordozott aktiváló helynek vagy helyeknek köszönhető.

Azok a riporter konstrukciók, amelyekben a LexA "represszor-operátor" szekvencia (az a DNS kötőelem, amelyet a LexA DNS-kötő szakasza felismer) a lacZ riporter génnel működőképesen kapcsolt promoterral rendelkező részegység vagy elem, a LexA-vFos fúziós onkoprotein kötődésének hatására lacZ génterméket fognak expresszálni. Egy olyan vegyület, amely befolyásolja a fúziós onkoprotein aktivitását, azonosítható a gazdának a lacZ riporter gén termékét expresszáló, és így az X-gal-t kék kromofórrá hidrolizáló képessége alapján.

Ha az onkoprotein aktivitása egy olyan vegyület jelenléte következtében megváltozik, amely az aktivitást gátolja, a gazdaszervezet megváltoztatja a lacZ riporter gén expresszióját, és így megváltozik az X-gal-t kék kromofórrá hidrolizáló képessége.

Midőn élesztők használatára kerül sor gazdaszervezetként a találmány szerinti eljárás kivitelezése során, úgy az élesztőtörzsek külön tenyésztetők agarlemezen pázsit formájában. A kipróbálásra szánt vegyületet szűrőpapír korongba itatva az egyik tenyésztetre helyezük, avagy az élesztő növesztéséhez készített táptalajba keverjük. A vegyületnek az onkoprotein által indukált transzkripciót befolyásoló képessége kimutatható a vegyülettel impregnált korong körül lévő "zóna" alapján. Ha például a vegyület toxikus az élesztőre, úgy az élesztő nem fog nőni a vegyületet tartalmazó zónában.

Amennyiben állati sejtek használatosak a tenyésztetben gazda-sejtként, úgy a kipróbálandó vegyület a tápközeghez

adható.

A sejteknek a különféle vegyületek iránti permeabilitása szükség esetén fokozható megnövekedett permeabilitással rendelkező mutáns sejtek alkalmazásával vagy a permeabilitást javítóként ismert vegyületek alkalmazásával. Élesztőben például az olyan vegyületek, mint a polimixin B nonapeptid használható az élesztő permeabilitásának növelésére kismolekulájú szerves vegyületek esetében. Magasabbrendű eukarióta sejteknél a permeabilitás fokozására dimetil-szulfoxid használható. A vegyületeknek olyan analógjai is használhatók, amelyek jobban áthatolnak az élesztőmembránokon. Egy vegyületnek például a dibutiril származéka gyakran fokozza az adott vegyület permeabilitását a biológiai membránokon.

A találmány szerinti módszerek olyan bioaktív vegyületek azonosítására használhatók, amelyek zavarják a membránhoz kapcsolt és/vagy a citoplazmában lévő onkoproteinek aktivitását. A Ras és Src onkoproteinek például elősegítik az eukarióta sejtekben a Fos-tól függő génexpressziót. Egy olyan bioaktív vegyület meghatározásával, amely befolyásolja egy ilyen expresszió markerét, azonosíthatók mindazok a bioaktív vegyületek, amelyek gátolják a Ras-nak és az Src-nek a Fos-tól függő transzkripcióra gyakorolt stimuláló hatását.

Hasonlóképp, a találmány szerinti eljárás felhasználható protein-kináz inhibitorok azonosítására, midőn például egy ilyen kináz aktivitása végső soron a találmány szerinti módszernek megfelelően egy marker gén transzkripcióját befolyásolja.

A fúziós protein és/vagy a célgén DNS szekvenciája lét-

rehozható kémiaailag, ha nem kívánunk genom-klónt vagy mRNS-t alkalmazni a genetikai információ forrásaként. A DNS kémiai szintézisének módszerei közismertek a szakmában.

Ahhoz, hogy a találmány szerinti rekombináns fúziós konstrukciók expresszáldjanak, szükség van a gazda által felismerhető transzkripciós és transzlációs szignálokra. Egy klónozott fúziós proteint vagy klónozott fúziós onkoproteint kódoló szekvencia, amely a fenti módszerek szerint készült, működőképesen kapcsolható a transzkripciós expressziót szabályozó szekvenciákkal egy expressziós vektorban, és például transzformációval egy gazdasejtbe juttatható rekombináns fúziós proteinek vagy fúziós onkoproteinek, illetve ezek funkcionális származékainak előállítására, a találmány szerinti módszerekben való felhasználás céljából.

Kiválaszthatók olyan transzkripciós iniciációs szabályozó szignálok, amelyek lehetővé teszik a fúziós konstrukció kifejeződésének represszióját vagy aktivációját úgy, hogy a fúziós konstrukció expressziója kívánt esetben modulálható. Fontosak azok a szabályozó szignálok, amelyek hőérzékenyek, azaz a hőmérséklet változtatásával az expresszió represszállható vagy iniciálható, valamint azok, amelyek kémiaailag regulálhatóak, például valamely metabolitnak vagy metabolit analognak a táptalajhoz való hozzáadásával.

Alternatív megoldásként a fúziós konstrukció a gazdasejtben konstitutívan is kifejeződhet.

Midőn a gazdasejtben a természetes expressziós szabályozó szekvenciák nem működnek kielégítően, a gazdasejt funkcionális szekvenciái helyettesíthetők.

A fúziós konstrukció eltérő gazdaszervezetben történő kifejeződése eltérő poszttranszlációs módosítással járhat, ami megváltoztathatja az ezen konstrukciók által expresszált fehérjék tulajdonságait. Elengedhetetlen olyan gazdaszervezetben kifejezni a fehérjéket, amelyekben a fehérjék biológiai funkciójuk megőrzésének képessége nem akadályozott. A fehérjék élesztő gazdasejtben történő expressziója előnyösen élesztő szabályozó szignálok alkalmazásával érhető el. A találmány szerinti vektorok tartalmazhatnak működőképesen kapcsolt szabályozó elemeket, mint például fokozó elemeket (megelőző aktivátor szekvenciákat élesztőben), vagy olyan DNS elemeket, amelyek sejt-, szövet- vagy sejttípus specifikus expressziót biztosítanak egy adott génen.

A transzkripciós szabályozó szekvenciákat, mint például promoter szekvenciákat vagy transzkripciós terminációs szekvenciákat tartalmazó expressziós vektorok általában egy gazdaszervezettel kapcsolatban használatosak. Ezek a szekvenciák elősegítik a velük működőképesen kapcsolt génfragmens eredményes transzkripcióját. Az expressziós vektorok jellemzően tartalmaznak továbbá különálló DNS elemeket, mint például (a) replikációs origót, amely lehetővé teszi a vektor autonóm replikációját, vagy olyan elemeket, amelyek elősegítik a vektor stabil beépülését a gazda kromoszómájába, valamint (b) specifikus géneket, amelyek képesek biztosítani a transzformált sejtek fenotipikus szelekcióját. Az eukarióta expressziós vektorok tartalmazhatnak olyan elemeket is, amelyek lehetővé teszik fennmaradásukat prokarióta gazdáiban; az ilyen vektorok "ingázó" vektorként ismeretesek.

A génexpresszióhoz szükséges szabályozó szakaszok pontos természete fajonként és sejttípusonként különböző és sok megfelelő, kereskedelmileg hozzáférhető vektorrendszer létezik.

Egy nagyon előnyös kivitelezési mód szerint gazdasejtként élesztőt használunk. Az élesztőben a gének transzkripció expressziójához szükséges elemeket a közelmúltban tekintették át [Struhl L., Ann. Rev. Biochem. 58, 1051-1077 (1989)]. Élesztőben a legtöbb promoter három alapvető DNS elemet tartalmaz: (1) egy megelőző aktivátor szekvenciát (UAS); (2) egy TATA elemet; valamint (3) egy iniciációs (I) elemet. Némely promoterek operátor elemeket is tartalmaznak.

Egy másik kivitelezési mód szerint emlős sejtek szolgálnak gazdasejtként. A proteinek emlős sejtkben történő expressziójához a transzkripció és transzláció szabályozó szignálok széles választéka nyerhető, különösen az eukarióta sejteket megfertőző vírusok genomjának szekvenciáiból.

Az expresszió céljára szolgáló vektort vagy DNS szekvenciá(ka)t elkészítjük, a DNS konstrukció(ka)t egy alkalmas módszerrel, például transzformációval, megfelelő gazdasejtbe juttatjuk. A vektor bejuttatása után a befogadó sejtet szelektív táptalajon növesztjük, amely a vektort tartalmazó sejtek növekedésére szelektál. A klónozott génszekvencia, illetve génszekvenciák kifejeződése a fúziós proteinnek vagy fragmentumának a termelődését eredményezi. Ez az expresszió a transzformált sejtekben történhet folyamatosan vagy lehet exogén ágensekkel indukált (lásd korábban).

Genetikailag stabil transzformánsok előnyösen a fúziós

protein DNS-nek a gazdasejt kromoszómájába való beépítésével hozhatók létre. Ilyen beépülés végbemehet az exogén DNS-sel végzett transzformációt követően véletlenszerűen, vagy a vektortól függően, amely funkcionálisan beépül a gazdasejt kromoszómájába, amilyenek például a retrovírus vektorok, transzpozonok vagy egyéb, a DNS szekvenciáknak a gazdasejtbe történő integrációját elősegítő DNS elemek. A fúziós gén másképpen olyan vektoron is bejuttatható, amely nem replikálódik; a fúziós protein expressziója addig folytatódik, amíg a vektor jelen van az adott populációban.

A találmány szerinti fúziós protein DNS vektorral transzformált sejtek szelekciója a szintén a sejtbe juttatott egy vagy több marker segítségével történik, melyek lehetővé teszik a vektort tartalmazó sejtek szelekcióját. A marker szolgáltathat például egy aminosav szintetizáló enzimet vagy biocid rezisztenciát (pl. antibiotikumokra, mint pl. G418-ra vagy nehézfémekre, mint pl. rézre való rezisztencia).

A találmány szerinti módszer előnyös fogatosítási módja szerint *Saccharomyces cerevisiae* az előnyös élesztő gazdasejt, CV-1 sejtek vagy NIH3T3 sejtek pedig az előnyös emlős gazdasejtek.

A találmány szerinti módszerek gyors, megbízható és gazdaságos módot nyújtanak vegyületek onkoprotein aktivitást gátlóként történő azonosítására és osztályozására. A találmány szerinti módszerek alkalmasak nagyszámú vegyület vagy készítmény onkoprotein aktivitás gátlásra nézve történő nagyüzemi szűrővizsgálatának elvégzésére. A találmány szerinti módszerek továbbá lehetővé teszik bármely tiszta vegyület,

vegyületkeverék vagy készítménykeverék szűrővizsgálatát és a komponensek hatásának minősítését aszerint, hogy additívnek, szinergizálónak vagy antagonizálónak tekinthető. A találmány szerinti módszerek alkalmasak nyers kivonatokban bioaktív vegyületek jelenlétének kimutatására is, valamint azok kinyerése és tisztítása során történő meghatározásukra. A találmány szerinti módszerek felhasználhatók még a fentiek szerint azonosított bioaktív vegyületek stabilitásvizsgálatára, és különösen a különböző készítmények hatékonyságának értékelésére.

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal szemléltetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

Fúziós gének és fúziós onkogének létrehozása

a) Általános ismertetés

A LexA fúziós gének előállítását Lech K. et al., Cell 52, 179-184 (1988); Brent and Ptashne, Cell 43, 729 (1985) irodalmi helyen, valamint a 4 833 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik. Az utóbbi irodalom olyan plazmidvektorokat is ismertet, melyek általánosságban felhasználhatók LexA fúziós gének (pl. pBR500), valamint olyan élesztő expressziós vektorok (pl. pAAH5) és élesztő célplazmidok (vagy riporter plazmidok) létrehozására, amelyek megelőző (upstream) LexA operátorokat hordozó élesztő célgéneket tartalmaznak.

b) LexA-Gal4

A LexA-Gal4 fúziós gének létrehozását Brent a 4 833 080

sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismerteteti.

c) LexA-vMyc

A teljes M29 madár mielocitomatózis vírust tartalmazó MC38 plazmidot [Reddy E. P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2500-2504 (1983); beszerezhető: American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC száma 41007] a vírus gag-myc gén mögötti Ssp1 helyen hasítjuk. Az elegyet HindIII linkerek jelenlétében T4 DNS-ligázzal kezeljük, majd a ligációs elegyet PstI és HindIII endonukleázokkal kezeljük. A myc gén zömét tartalmazó PstI-HindIII darabot izoláljuk és PstI-HindIII hasított pUC18 plazmidba inszertáljuk, létrehozva a pKA58 plazmidot. Egy külön konstrukció sorozatban a pRB480 plazmidnak a LexA aminoterminális részét kódoló BamHI-XmnI darabot [Brent R. et al., Nature 312, 612-615 (1984); Brent, 4 833 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás] a

CGGGGAGCTGCA

GCCCCTCG

szekvenciájú, kettősláncú adapterhez ligáljuk és a keletkező fragmenst BamHI-PstI hasított pUC19 plazmidba inszertálva létrehozunk a pKA144 plazmidot. A BamHI hasítja a pRB480 és a pBR322 plazmidok tetraciklin génjét. A pKA144-ből származó BamHI-PstI LexA darabot, a pKA58-ből származó PstI-HindIII v-myc darabot és a pBR322 plazmid HindIII-BamHI darabját összeligálva hozzuk létre a pKA210 plazmidot. A plazmid DNS-re irányuló szűrővizsgálat tetraciklin tartalmú LB agaron növekedő baktériumtelepekkel történik. Az ilyen pKA210 plazmid

tartalmazza a *lexA* első 87 kodonját, három kodont az adapterből valamint a *v-myc* 51 és 425 közötti kodonjait. A fúziós gén egy 465 aminosavból álló peptidet kódol, melynek szekvenciája a fúziós csatlakozásnál Pro-Gly-Glu-Leu-Gln-Pro, ahol a Pro a *LexA* fehérje 87. aminosava és a Gln a természetes *v-Myc* fehérje 51. aminosava. Ez a gén egy körülbelül 51000 Dalton számított molekulatömegű fúziós fehérjét kódol.

A *LexA-vMyc* fúziós fehérjét másképp úgy is létrehozható, hogy hiányzik belőle a dimerizációs szakasz (vagyis hiányzik a kettős csavarodású szakasz valamint a leucin cipzár szakasz). Az ilyen konstrukció előállítására a következőképp történik. A *pKA58* plazmidot (lásd korábban) *BamHI* és *PstI* endonukleázokkal emésztjük (olyan enzimekkel, amelyek a *pKA58* plazmidot polilinker szakaszán hasítják), és négy szintetikus oligonukleotidot építünk be erre a helyre annak érdekében, hogy helyreállítsuk a teljes (természetes) N-terminális *v-Myc* szekvenciát. A keletkező plazmid a *BHvMyc*. A *BHvMyc* plazmidból kihasított, a *pUC18* polilinkert és a *LexA-vMyc* gént tartalmazó *EcoRI-HindIII* fragmenst *EcoRI-HindIII* emésztett *Lex202PL* vázba [Ma and Ptashne, *Cell* 51, 113 (1987); Ruden et al., *Nature* 350, 250 (1991)] építjük be. A *Lex202PL* olyan plazmid, amely a *LexA* első 202 aminosavját, így a *LexA* dimerizációs szakaszát is tartalmazza. A keletkező plazmid, melynek elnevezése *H202/vMyc*, a *LexA* első 202 aminosavját a *vMyc* első 425 aminosavjával leolvasási keretben összeolvasztva tartalmazza. A *Myc* dimerizációs szakasz kihagyása érdekében a *H202/vMyc* plazmidot *BalI* enzimmal emésztjük egy egyedi helyen, amely a *Myc* fehérje 362. aminosavjának felel meg. Erre a helyre három

leolvasási fázisban működő stop kodont tartalmazó polilinkert (New England Biolabs 1062 sz. linker, Beverly, MA) építünk be, hogy olyan gént hozzunk létre, amely csonka LexA-vMyc proteint kódol. Ebből a proteinből hiányzik a Myc kettős csavarodású szakasza valamint a Myc leucin cipzárja. A plazmid elnevezése H202/vMyc C. Élesztőben a H202/vMyc C által kódolt LexA-vMyc fehérje erősebben aktiválja a LexA tartalmú operátor konstrukciókat, mint azok a Myc fúziós proteinek, amelyek tartalmazzák a dimerizációs szakaszt. Emlős sejtekben a csonka fehérje mérhető Myc aktivitást biztosít, a természetes Myc dimerizációs szakaszt tartalmazó konstrukciók viszont nem.

d) LexA-cMyc

A humán c-myc cDNS-t tartalmazó pCDEM5.8 plazmidot (Adrian Hayday adománya) SmaI és BamHI endonukleázokkal emésztjük és a c-myc gén 2. és 3. exonját tartalmazó 2300 bázispár méretű fragmenst a pUC19 plazmid SmaI-BamHI fragmensével ligálva megkapjuk a pC20 plazmidot. Ezt a plazmidot részlegesen emésztjük PstI endonukleázzal és azt a fragmenst, amely az első 38 kodon kivételével a teljes c-myc gént tartalmazza, izoláljuk, majd PstI endonukleázzal hasított pKA1035 plazmiddal ligáljuk. A pKA1035 plazmid csupán abban különbözik a pKA144 plazmidtól, hogy a pUC19 vázon lévő SmaI helyet eltávolítottuk oly módon, hogy egy átfedő KpnI helynél hasítottunk és a túllógó szakaszt T4 DNS-polimerázzal visszaemésztettük. A keletkező pVR103 plazmid tartalmazza a lexA első 87 kodonját, három kodont az adapter fragmensből, valamint a c-myc kodonjait 39-től 440-ig. A fúziós gén 492 amino-

savból álló peptidet kódol, melynek szekvenciája a fúziós csatlakozásnál Pro-Gly-Glu-Gln-Pro, ahol a Pro a LexA 87. aminosava, a Gln pedig a természetes cMyc fehérje 39. aminosava. Ez a gén egy körülbelül 54000 Dalton számított molekulatömegű fúziós fehérjét kódol. A humán c-myc gén beszerezhető az American Type Culture Collection-től (ATCC 39286).

e) LexA-vFos

A pFBJ-2 plazmid egy FBJ-MuSV provírusrat tartalmaz egy 5800 bázispár méretű HindIII fragmensent, melyet a pBR322 plazmid HindIII helyére építettek be [Van Beverens C. et al., Cell 32, 1241-1255 (1983); Curran T. et al., Virol. 116, 221-236 (1982); Curran T. et al., J. Virol. 42, 114-122 (1982)]. Ezt a plazmidot EagI endonukleázzal hasítjuk, és az 5' végen túlnyúló szakaszt Klenow fragmenssel feltöltjük. A plazmidot ezután HindIII endonukleázzal hasítjuk, majd a v-fos karboxiterminális részét tartalmazó 3600 bázispár méretű fragmenst izoláljuk. Ezt a v-fos EagI(feltöltött)-HindIII darabot a pRB480 plazmid lexA BamHI-XmnI darabjával (lásd később) és a pBR322 plazmid HindIII-BamHI vázfragmensével ligáljuk. Az e konstrukciót tartalmazó Escherichia coli sejteket tetraciklin rezisztenciájuk révén azonosítjuk. Egy jellemzően keletkező plazmid, a pKA195, a lexA első 87 kodonját közvetlenül a v-fos 23-tól 381-ig terjedő kodonjaihoz kapcsolva tartalmazza. Ez a fúziós gén 446 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek szekvenciája a fúziós csatlakozásnál Pro-Ala-Gly, ahol a Pro a LexA 87. aminosava, az első Ala a v-fos termékének 23. aminosava. A v-fos gén az American Type Culture Collection-től

is beszerezhető (ATCC 41040).

f) LexA-cFos

Az FMC5A plazmid egér cFos cDNS-t tartalmaz pGEM-1 plazmidban. Ezt a plazmidot először EagI endonukleázzal hasítjuk és az 5' végen túlnyúló szakaszt Klenow fragmenssel feltöltjük. Ezután HindIII endonukleázzal hasítunk és a c-fos gén karboxi-terminális részét tartalmazó 1900 bázispár méretű EagI(feltöltött)- HindIII fragmenst a pRB481Flip plazmid BamHI-XmnI fragmensével valamint a pRB481 plazmid HindIII-BamHI fragmensével ligáljuk. A pRB481 HindIII végű LexA gént tartalmaz, magában foglalva E. coli promoterét a pi4-8 plazmidban [Brent and Ptashne, Cell 43, 729 (1985); Brent, 4 833 080. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. Ebben a konstrukcióban a pRB481 helyett a pRB480 plazmid [Brent, 4 833 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás] is használható lett volna. A pRB481Flip plazmid nem más, mint a pRB481 HindIII emésztése után izolált olyan plazmid, amelyben a HindIII végű LexA fragmens az eredetivel ellentétes orientációjú. A LexA-cFos fúziós gént tartalmazó Escherichia coli sejteket tetraciklin rezisztenciájuk alapján azonosítjuk. A keletkező pVR6 plazmid a LexA első 87 aminosavját közvetlenül a c-fos 23-tól 380-ig terjedő kodonjaihoz kapcsolva tartalmazza. A fúziós gén 445 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek szekvenciája a fúziós csatlakozásnál Pro-Ala-Gly, ahol a Pro a LexA 87. aminosava, az Ala pedig a c-fos termékének 23. aminosava. Ez a gén körülbelül 49000 Dalton számított molekulatömegű fúziós fehérjét kódol. Az egér

c-fos gén az American Type Culture Collection-től is beszerezhető (ATCC 41041).

g) LexA-vJun

A LexA-vJun plazmidot Struhl [Nature 332, 649 (1988)] ismerteti. A v-jun gén beszerezhető az American Type Culture Collection-től (ATCC 63026).

2. példa

Élesztő plazmidok

Az élesztő cél- (vagy riporter) plazmidok általában hordozzák az URA3+ gént, a 2 μ -es replikátort, valamint promoter elemeket, miként azokat Brent [4 833 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás] ismerteti.

A LexA-Myc és a LexA-Fos fúziós konstrukciók élesztőben történő expressziója érdekében a HindIII végű fúziós géneket a pAAH5 plazmid HindIII helyére inszertáljuk. A pAAH5 plazmid hordozza a LEU2+ gént, az élesztőben való replikációhoz szükséges 2 μ -plazmid darabot valamint egy DNS fragmenst, amely tartalmazza az ADH1 promotert és a HindIII melletti transzkripciós terminátort [Ammerer G., Meth. Enzymol. 101, 192-210 (1983); Brent, 4 833 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. A pAAH5 plazmid helyett más élesztő expressziós plazmidok is használhatók, ezek közül sok szerepel a Cloning Vectors [ed. Powels et al., Elsevier, (1987)] című munkában.

A LexA-vFos fúziós fehérje másképpen a pKL1190NS vagy a pAF3 plazmidokról expresszálható. A pKL1190NS plazmid megal-

kotásához a pAAH5-LexA-vFos plazmidból (lásd korábban) származó, az ADH1 promotert, a LexA-vFos gént és az ADH1 terminátort tartalmazó BamHI fragmenst a pSE358NS plazmidba inszertáljuk. A pSE358NS plazmid elkészítéséhez a pUN10 plazmidot [Elledge et al., *Gene* 70, 303 (1988)] SalI endonukleázzal hasítjuk, a túlnyúló DNS-t Mung Bean nukleázzal emésztjük, eltávolítva így a SalI helyet. A pAF3 plazmid létrehozása két lépésben történik. Először a pADE8 plazmid [White J. H. et al., *Nature* 315, 350-352 (1985)] ADE8 gént tartalmazó, BamHI/EcoRI végű fragmensét BamHI/EcoRI végű pSE358NS vázba inszertálva megalkotjuk a pA8-7 plazmidot. Ezután a LexA-vFos gént, valamint az ADH1 promotert és terminátort (lásd korábban) tartalmazó BamHI végű fragmenst a pA8-7 plazmidba inszertálva létrehozzuk a pAF3 plazmidot.

A LexA-vJun expressziója és aktivitásának meghatározása a Struhl [Nature 332, 649 (1988)] által leírtak szerint történik.

3. példa

Emlős plazmidok

Az itt használt emlős cél- (vagy riporter) plazmidokat Godowski és mtsai ismertetik [Science 241, 812-816 (1988)]. Ezek a vektorok a β -globin promotert a kloramfenikol-acetil-transzferáz génhez kapcsolva tartalmazzák. Az egyik célplazmidból (OBCO) hiányzik egy megelőző (upstream) LexA operátor; a másik (XBCO) egyetlen, 125 bázispár méretű LexA operátort tartalmaz, a transzkripció startpontja előtt. Más célplazmidok oly módon hozhatók létre, hogy egy vagy több LexA operátort

helyezünk el valamivel egy olyan emlős promoter előtt, melynek aktivitása meghatározható.

A fúziós onkoproteineket kódoló expressziós plazmidokat oly módon hozzuk létre, hogy a pKA195 plazmidból [Lech K. et al. Cell 52, 179-184 (1988)] származó, HindIII végű LexA-vFos gént illetve a H202/vMyc C plazmidból származó, HindIII végű LexA-vMyc gént a p6R emlős expressziós vektorba [Godowski P. J. et al., Science 241, 812-816 (1988)] építjük be. Az ezekről a plazmidokról történő fehérjeszintézist az RSV promoter irányítja. Egy sor egyéb emlős expressziós vektort ismertet a Cloning Vectors (lásd korábban).

A LexA-vJun emlős sejtekben való kifejeződése érdekében a pLexA-vJun plazmidot (lásd korábban) hasítjuk a LexA-vJun szekvencia mögötti egyedi EcoRI helyen, EcoRI-HindIII adapterhez ligáljuk, majd HindIII endonukleázzal hasítjuk. A HindIII végű LexA-vJun fragmenst előbb pi4-8 plazmidba (lásd korábban) inszertáljuk, létrehozva a pKL8146 plazmidot, majd a p6R plazmidba a HindIII helyre inszertáljuk.

4. példa

Kísérleti eljárások

a) Baktériumsejtek tenyésztése és transzformációja

A baktériumok tenyésztése és transzformációja a megszo-
kott technikákkal történt [Ausubel F. M. et al., Current
Protocols in Molecular Biology, New York: Green Publishing
Associates (1987); Miller J., Experiments in Molecular
Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,
NY, (1972)]. A plazmidot hordozó törzsek tenyésztését 100

$\mu\text{g/ml}$ karbenicillin tartalmú LB- táptalajon végeztük. Az RB926 (hsdR thiA endA) és JM101 (supE thiA (lac-proAB)/F' traD36 proA+ proB+ lac7^q lacZ M15) törzseket használtuk baktérium gazdaként a plazmid DNS konstrukciókhoz.

b) Élesztő mikrobiológiai munka

Az élesztők tenyésztése 2 % glükózzal kiegészített YEP táptalajon történt. A transzformációt ismert módon [Lech K. et al., Cell 52, 179-184] végeztük. A plazmidokat 2 % glükózt tartalmazó, olyan minimál táptalajon tenyésztett élesztősejtekben tartottuk fenn, amelyből hiányzott a plazmid által kódolt, szelekciós markerként funkcionáló tápanyag komponens [Sherman F. et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1983)]. A Gal10 promoter szabályozása alatt álló géneket úgy indukáltuk, hogy a gazdasejteket 36 órán át 2 % galaktózt tartalmazó táptalajon növesztettük.

A legtöbb élesztős kísérlet során gazdaként a DBY745 (α ura3 leu2) törzs szolgált [Brent, 4 833 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. Az e célra használt szilárd és folyékony tápközeg SD táptalaj volt (uracil nélkül), pH 7,0-re pufferolva dinátrium-hidrogén-foszfát és kálium-dihidrogén-foszfát hozzáadásával 70 mM végkoncentrációban. A szénforrások hozzáadása 2 % végkoncentrációban történt.

c) A β -galaktozidáz aktivitás meghatározása

A β -galaktozidáz meghatározása a Yocum és munkatársai által leírt módon [Yocum R. R. et al., Mol. Cell. Biol. 4,

1985-1998 (1984)] vagy másképpen szilárd táptalajon nőtt sejteken [Lech K., "Gene Activation by DNA Bound Fos and Myc Proteins" Ph. D. Dissertation, Harvard University (1990)] történt, azzal az eltéréssel, hogy a vizsgálandó sejteket inkább szilárd, mint folyékony, szelektív tápközegben tenyésztettük. A β -galaktozidáz egységeket az alábbi egyenlet szerint számítottuk ki:

$$\text{Aktivitás} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{\text{sejttérfogat(ml)} \times \text{reakcióidő(perc)} \times \text{OD}_{600}}$$

d) Emlőssejtek tenyésztése és transzfekciója

Majomvese CV-1 sejteket (ATCC CCL70) 10 % borjúembrió-szérumot tartalmazó, Dulbecco által módosított Eagle táptalajon (DMEM) tenyésztettünk és a transzfekció előtt 24 órával szétosztottuk őket. A kalcium-foszfát precipitációs módszer szerint [Godowski P. J. et al., Science 241, 812-816 (1988)] végeztük a tranziens transzfekciót. Minden transzfekciót két párhuzamos mintával, legalább háromszor megismételtünk, hogy biztosítsuk az eredmények reprodukálhatóságát. Jellemzően 10 μg fúziós protein expressziós plazmidot és 2 μg célplazmidot juttattunk a sejtekbe 2,5 μg humán növekedési plazmid expressziós plazmiddal együtt [pXGH5, Seiden R. F. et al., Mol. Cell. Biol. 6, 3173-3179 (1986); Ausubel F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York: Green Publishing Associates, (1987)] a transzfekció hatékonyságának belső standarjaként. Azokban a kísérletekben, amelyekben a nukleáris onkoprotein (pl. Fos, Myc, Jun) aktivitását egy membránhoz kapcsolt vagy egy, a citoplazmában elhelyezkedő onkoprotein (pl. ras vagy src) aktivitása modulálja, a transzfekciós

elegy 10 μg modulátor plazmidot is tartalmazott. A teljes DNS mennyiséget 25 μg -ra egészítettük ki pUC18 kontrollplazmiddal. A transzfektálandó DNS-t két egymást követő cézium-klorid gradiens centrifugálással készítettük elő [Maniatis T. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, (1982)]. A DNS-ek tisztaságát és mennyiségét a restriktációs enzimekkel való emésztés előtt és után agaróz gélelektroforézissel határoztuk meg. Egy kísérleten belül a humán növekedési hormon expressziója 15 %-nál kisebb mértékben ingadozott, jelezve, hogy a transzfekció hatékonysága állandó és az onkoproteineket expresszáló sejtek egészségesek.

Az NIH3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat (ATCC CRL6442) 10 % borjúsérummal kiegészített, Dulbecco által módosított Eagle táptalajon (DMEM) a szokásos módszerekkel tenyésztették. A transzfekció kivitelezése a szokásos kalcium precipitációs módszerekkel történt [lásd pl. Current Protocols in Molecular Biology, korábban]. A transzfekciókat általában 10 μg LexA fúziós gént tartalmazó plazmiddal, 2 μg célplazmiddal, 2,5 μg XGH5 plazmiddal és 10 μg vágott lazacsperma DNS-sel (mint hordozó DNS-sel) végeztük, 10 cm átmérőjű lemezen növesztett sejteken. A stabil transzfektánsokat a szokásos módszerekkel [lásd pl. Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., New York, (1987)] állítottuk elő, a fenti plazmidok, valamint 2 μg neomycin rezisztenciát biztosító plazmid [Southern and Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1, 327 (1982)], például a pMAMneo plazmid (beszerezhető a Clontech, Palo Alto, CA, cégtől) alkalmazásával.

e) CAT meghatározás

A kivonatok elkészítése és a CAT meghatározás kivitelezése ismert módon [Ausubel F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York: Green Publishing Associates (1987)] történt. A fehérjekivonatokat oly módon hígítottuk, hogy a CAT aktivitás az enzimaktivitás/fehérjekivonat-mennyiség lineáris tartományába essen. A CAT értékeket úgy határoztuk meg, hogy a vékonyréteg kromatográfiás lemezből kivágtuk a ^{14}C -kloramfenikol foltokat és számláltuk a radioaktivitást. A százalékos átalakulás számítása oly módon történt, hogy az acetilezett foltok radioaktivitását elosztottuk az acetilezetlen foltok radioaktivitásával és kivontuk belőle a fehérjekivonat nélküli párhuzamos vakpróbában kapott százalékos "háttér" átalakulás értékét.

5. példa

vFos és/vagy vMyc gátlószer kimutatása élesztősejtekben

Az élesztő gazdasejteket olyan plazmidokkal transzformáltuk, amelyek a LexA-vFos fúziós onkoproteint ("a" gazda), a LexA-vMyc fúziós onkoproteint ("b" gazda) vagy a LexA-Gal4 fúziós proteint expresszálják ("c" gazda), a korábban ismertett módon. Ezen túlmenően mindhárom élesztőtörzset ko-transzformáltuk célplazmiddal [pl. 1840 vagy 1027; Brent, 4 833 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás], amely tartalmazza a LexA operátorral működőképesen kapcsolt β -galaktozidázt kódoló szekvenciát, a korábban leírtak szerint.

A transzformált élesztőtörzsek mindegyikét X-gal tar-

talmú szilárd táptalaj lemezekre szélesztettük, hogy pázsitot kapjunk. Az élesztő pázsitra W, X, Y illetve Z vegyülettel átítatott kis szűrőkorongot helyeztünk. Az élesztőt hagytuk tovább növekedni és a lemezeken vizuális megfigyeléssel nyomonkövettük a telepek növekedését, valamint a telepek színét. Egy ilyen kísérlet tipikus eredményei az 1. táblázatban láthatók.

1. táblázat
Onkoprotein gátlószerek kimutatása

Vegyület	Élesztő	Szabályozó fehérje	Telepek növekedése	Telepszín X-gal mellett β -gal megthat.
W	a	LexA-vFos	+	Kék
	b	LexA-vMyc	+	Kék
	c	LexA-Gal4	+	Kék
X	a	LexA-vFos	+	Kék
	b	LexA-vMyc	+	Fehér
	c	LexA-Gal4	+	Fehér
Y	a	LexA-vFos	+	Kék
	b	LexA-vMyc	+	Fehér
	c	LexA-Gal4	+	Kék
Z	a	LexA-vFos	+	Fehér
	b	LexA-vMyc	+	Kék
	c	LexA-Gal4	+	Kék

A fenti táblázat eredményei azt mutatják, hogy a kipróbált vegyületek egyike sem gátolja egyik élesztőtörzs növekedését sem. Csak a Z vegyület gátolja a vFos aktivitást anélkül, hogy a Gal4 aktivitást gátolná és csak az Y vegyület gátolja a vMyc aktivitást a Gal4 gátlása nélkül. Az X vegyület egyaránt gátolja a vMyc és a Gal4 aktivitást, arra utalva, hogy hatása nem specifikus az onkoproteinre. A W vegyület nem gátolja az onkoprotein által indukált, illetve a Gal4 által

indukált transzkripciót, arra utalva, hogy a W vegyület nem gátlószere ezen fehérjék transzkripciójának.

Ezekből az eredményekből a Z és az Y vegyületek kerül-
nének kiválasztásra további vizsgálatokra, mint például a dó-
zis/hatás összefüggés megállapítása, vagy in vivo vizsgálatok
tumorbeteg állatokban.

Ezen túlmenően, egy adott vegyületnek nem kell teljesen
megszüntetni a β -galaktozidáz aktivitást ahhoz, hogy a talál-
mány szerinti értelemben hasznosnak minősüljön. Az olyan ve-
gyületet is kiválasztjuk a további vizsgálatokra, amely csök-
kenti az onkoprotein eredeti aktivitását (pl. a génaktiváció
szintjét). Az ilyen vegyületet az élesztő gazdasejtekkel
érintkezésbe lépve "világoskék" eredményt (azaz a "vad-típu-
súnál" világosabb kék színt) adóként azonosítjuk.

6. példa

vFos illetve vMyc gátlószerek kimutatása emlőssejtekben

A Fos illetve a Myc által vezérelt transzkripciós akti-
vitást emlőssejtekben befolyásoló gátlószerek kimutatása ér-
dekében NIH3T3 sejteken hajtottunk végre transzfekciót két
plazmiddal. Az egyik plazmid olyan expressziós vektor, amely
az RSV LTR-ről történő fúziós protein szintézist vezérli. A
LexA-vFos és a LexA-vMyc expressziós plazmidokat korábban
ismertettük; mivel az emlős NIH3T3 sejtekben a LexA-vMyc ak-
tivitás csak a csonka 202vMyc C fúziós protein használatával
mérhető (lásd korábban), ez a vektor előnyösen használható fel
az ebben a példában szereplő meghatározás során. A másik plaz-
mid olyan "célplazmid", amely a LexA operátort a kloramfeni-

kol-acetiltranszferáz (CAT) génhez kapcsolt β -globin promoter előtt (lásd korábban) hordozza. A gén-aktiváció meghatározása a sejtben lévő összfehérjére vonatkoztatott CAT aktivitás mérésével történik. A génaktiváció meghatározható tranziens vagy stabil transzformánsok alkalmazásával (a korábban ismertetett módon). A Fos illetve a Myc aktivitás specifikus gátlószerekként azokat a vegyületeket választjuk ki, amelyek gátolják a LexA-vFos illetve a LexA-vMyc aktiváló hatását, de nem gátolják a LexA-Gal4 által történő aktivációt.

Egy konkrét példában három NIH3T3 gazdavonalat hoztunk létre: az "a" gazda a LexA-vFos fúziós onkoproteint expresszálja; a "b" gazda a LexA-vMyc fúziós onkoproteint (hiányzik belőle a Myc dimerizációs szakasz), a "c" gazda pedig a LexA-Gal4 fúziós proteint. Valamennyi sejtvonaltartalmaz egy olyan konstrukciót, amely a LexA operátort a kloramfenikol-acetiltranszferáz (CAT) génhez kapcsolt β -globin promoter előtt hordozza.

2. táblázat
Onkoprotein gátlószerek kimutatása

Vegyület	NIH3T3 gazda	Szabályozó fehérje	Sejtnövekedés	CAT aktivitás
W	a	LexA-vFos	+	van
	b	LexA-vMyc C	+	van
	c	LexA-Gal4	+	van
X	a	LexA-vFos	+	van
	b	LexA-vMyc C	+	nincs
	c	LexA-Gal4	+	nincs
Y	a	LexA-vFos	+	van
	b	LexA-vMyc C	+	nincs
	c	LexA-Gal4	+	van
Z	a	LexA-vFos	+	nincs
	b	LexA-vMyc C	+	van
	c	LexA-Gal4	+	van

A fenti táblázat eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált vegyületek egyike sem gátolja egyetlen sejtvonálnak a növekedését sem. Csak a Z vegyület gátolja a vFos aktivitást anélkül, hogy gátolná a Gal4 aktivitását, és csak az Y vegyület gátolja a vMyc aktivitást anélkül, hogy gátolná a Gal4 aktivitását. Az X vegyület mind a vMyc, mind pedig a Gal4 aktivitását gátolja, sejtetve, hogy nem specifikus gátlószere az onkoproteineknek. A W vegyület nem gátolja sem az onkoprotein által indukált, sem pedig a Gal4 által indukált transzkripciót, sejtetve, hogy a W vegyület nem gátlószere ezeknek a fehérjéknek.

Ezeknek az eredményeknek az alapján a Z és az Y vegyület kerülne kiválasztásra a további vizsgálatokhoz, amilyen a dózis/hatás összefüggés meghatározása, vagy az in vivo vizsgálatok tumorbeteg állatokon.

A korábbiakhoz hasonlóan, egy adott vegyületnek nem okvetlenül szükséges teljesen megszüntetnie a CAT aktivitást ahhoz, hogy a találmány értelmében hasznosnak minősüljön. Az olyan vegyület, amely csökkenti az onkoprotein CAT aktiváló hatását (ti. az eredeti szint alatti értékre), szintén kiválasztásra kerül rákellenes hatóanyagként, további vizsgálatokra.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás vegyületek onkoprotein aktivitást gátló képességének kimutatására, azzal jellemezve, hogy

(a) olyan gazdasejtet hozunk létre, amely tartalmaz egy, valamely DNS kötő-hellyel működőképesen kapcsolt riporter gént és egy onkoprotein fúziós gént, amely a szóbanforgó DNS kötőhelyhez kapcsolódni képes fúziós onkoproteint expresszál oly módon, hogy a szóbanforgó riporter gén expresszióját a DNS-hez kötött fúziós onkoprotein közvetíti;

(b) a szóbanforgó gazdasejtet érintkezésbe hozzuk a vizsgálandó vegyülettel; és

(c) meghatározzuk a szóbanforgó riporter gén expressziójának mértékét, ami jelzi az onkoprotein aktivitást gátló vegyületet.

2. Eljárás vegyületek onkoprotein aktivitást gátló képességének kimutatására, azzal jellemezve, hogy

(a) olyan, első gazdasejtet hozunk létre, amely tartalmaz egy, valamely DNS kötőhelyel működőképesen kapcsolt riporter gént és egy onkoprotein fúziós gént, amely a szóbanforgó DNS kötőhelyhez kapcsolódni képes fúziós onkoproteint expresszál oly módon, hogy a szóbanforgó riporter gén expresszióját a DNS-hez kötött fúziós onkoprotein közvetíti;

(b) olyan, második gazdasejtet hozunk létre, amely tartalmaz egy, valamely DNS kötőhelyel működőképesen kapcsolt riporter gént és egy protein fúziós gént, amely a szóbanforgó DNS kötőhelyhez kapcsolódni képes fúziós proteint expresszál oly módon, hogy a szóbanforgó riporter gén expresszióját a

DNS-hez kötött fúziós protein közvetíti;

(c) az első, illetve a második gazdasejtet érintkezésbe hozzuk a vizsgálandó vegyülettel; és

(d) meghatározzuk a riporter gén expressziójának mértékét az első, illetve a második gazdasejtben, ahol a riporter gén expressziójában bekövetkezett nagyobb változás az első gazdasejtnél, mint a második gazdasejtnél egy az onkoprotein aktivitást gátló vegyületet jelez.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy gazdasejtként élesztőt vagy állati sejttenyészetet alkalmazunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy gazdasejtként élesztőt alkalmazunk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy élesztőként Saccharomyces cerevisiae-t alkalmazunk.

6. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy állati sejttenyészetként emlős sejttenyészetet alkalmazunk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy állati sejttenyészetként majomvese CV-1 sejt vagy NIH3T3 sejt tenyészetét alkalmazzuk.

8. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy szóbanforgó riporter gén expressziója fenotipikus változást idéz elő a gazdasejtben.

9. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó riporter gén expressziójának mértékét kloramfenikol-acetiltranszferáz aktivitásként mérjük.

10. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó riporter gén expressziójának mértékét LEU2 aktivitásként mérjük.

11. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a riporter gén expressziójának mértékét β -galaktozidáz aktivitásként mérjük.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fenotipikus változás kimutatását a szóbanforgó gazdasejt tenyészetének vizuális megfigyelésével végezzük.

13. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy DNS kötőhelyként LexA operátort alkalmazunk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó fúziós onkoprotein LexA DNS-kötő szakaszt tartalmaz.

15. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó fúziós onkoprotein egy nukleáris onkoprotein transzkripciót aktiváló szakaszát tartalmazza.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó nukleáris onkoprotein a Fos fehérje.

17. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó nukleáris onkoprotein a Myc fehérje.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó Myc fehérjéből hiányzik a dimerizációs szakasz.

19. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan riporter gént alkalmazunk, amelynek expressziója egy citoplazmatikus onkoprotein aktivitásától is

függ oly módon, hogy a riporter gén expressziója a szóbanforgó citoplazmatikus onkoprotein aktivitás jelenlétében - távollétében azonban nem - jelzője olyan vegyületnek, amely gátolja a cito-plazmatikus onkoprotein aktivitását.

20. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó riporter gén expressziója egy membránhoz kapcsolt onkoprotein aktivitásától is függ oly módon, hogy a riporter gén expressziója a szóbanforgó membránhoz kapcsolt onkoprotein aktivitás jelenlétében - távollétében azonban nem - jelzője olyan vegyületnek, amely gátolja a membránhoz kapcsolt onkoprotein aktivitását.

10 oldal
A. H. K. Kft.
A. H. K.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
8.

[Handwritten signature]