



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 22 176 T2 2004.03.18**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 877 752 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 22 176.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/01048**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 903 068.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/027213**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.01.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.11.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.03.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 1/04**

**C12N 15/86, C12Q 1/02, C12Q 1/68,
C12Q 1/70**

(30) Unionspriorität:

589109	23.01.1996	US
589911	23.01.1996	US

(73) Patentinhaber:

**The Board of Trustees of the Leland Stanford
Junior University, Palo Alto, Calif., US; Rigel
Pharmaceuticals, Inc., South San Francisco,
Calif., US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI

(72) Erfinder:

**NOALN, Garry P., Stanford, US; ROTHENBERG, S.
Michael, Stanford, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR SUCHE NACH TRANSDOMINANTEN EFFEKTORPEPTIDEN UND RNA-MOLE-
KÜLEN**

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

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Das Gebiet der Erfindung sind Verfahren zum Screenen auf transdominante Effektorpeptide, die innerhalb lebender Säugetierzellen aus Random-Pools selektiert sind.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Signalisierungspfade in Zellen beginnen oft mit einem Effektorstimulus, der zu einer phänotypisch beschreibbaren Änderung der Zellphysiologie führt. Trotz der wesentlichen Rolle, die intrazelluläre Signalisierungspfade bei der Pathogenese von Krankheiten spielen, weiß man in den meisten Fällen wenig über einen anderen Signalisierungspfad als den ersten Stimulus und die schließlich erfolgende Zellreaktion.

[0003] Historisch wurde Signaltransduktion durch Biochemie oder Genetik analysiert. Die biochemische Vorgangsweise zerlegt einen Pfad in der Weise von „Sprungbrettern“: Es ist ein Molekül zu finden, das an einem Ende des Pfads wirkt oder daran beteiligt ist, testfähige Mengen sind zu isolieren, und dann muss versucht werden, das nächste Molekül entlang des Pfads zu bestimmen (entweder stromauf oder stromab vom isolierten Molekül). Die genetische Vorgangsweise beruht klassischerweise auf dem „Zufallsprinzip“ – Mutanten in einem Signalisierungspfad sind zu induzieren oder abzuleiten, und der Locus durch genetische Kreuzungen zu kartieren oder die Mutation mit einer cDNA-Bibliothek zu komplementieren. Die biochemischen Methoden sind u. a. dadurch beschränkt, dass man beträchtliches Wissen über die gerade untersuchten Bestandteile besitzen und solche Studien in vitro sowie post mortem durchführen muss. Die rein genetischen Verfahren sind u. a. dadurch limitiert, dass man den Pfad zunächst ableiten und dann charakterisieren muss, bevor man mit der Identifikation und Klonierung des Gens fortfährt.

[0004] Das Screenen molekularer Bibliotheken chemischer Verbindungen auf Medikamente, die Signalsysteme regulieren, führte zu wichtigen Entdeckungen großer klinischer Signifikanz. Cyclosporin A (CsA) und FK506 beispielsweise wurden in pharmazeutischen Standardscreens auf die Hemmung der T-Zellen-Aktivierung ausgewählt. Es ist bemerkenswert, dass zwar diese zwei Arzneimittel vollkommen unterschiedliche Zellproteine binden – Cyclophilin bzw. FK506-Bindungsprotein (FKBP) – dass aber die Wirkung beider Medikamente praktisch die gleiche ist, d. h. die starke und spezifische Unterdrückung der T-Zellen-Aktivierung (phänotypisch in T-Zellen als Hemmung der mRNA-Produktion zu beobachten, die von Transkriptionsfaktoren wie etwa NF-AT und NF-κB abhängig ist). Bibliotheken kleiner Peptide wurden auch erfolgreich in vitro in Bioaktivitätstests gescreent. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für kleine Peptide, die zur Modulation einer Vielzahl an Signalisierungspfaden fähig sind. Beispielsweise wurde aufgezeigt, dass ein aus dem HIV-1-Hüllenprotein abgeleitetes Peptid die Wirkung von zellulärem Calmodulin blockiert.

[0005] Eine wesentliche Einschränkung konventioneller in vitro-Screens ist die Zufuhr. Während winzige Mengen eines Mittels notwendig sein können, um eine bestimmte Zellreaktion zu modulieren, erfordert die Zufuhr einer solchen Menge zur jeweiligen subzellulären Lokalität, dass die Zielzelle oder das Zielsystem relativ massiven Konzentrationen des Mittels ausgesetzt wird. Die Wirkung solcher Konzentrationen maskiert möglicherweise die abgezielte Response oder schließt sie überhaupt aus.

[0006] Somit ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Verfahren und Zusammensetzungen für die effiziente Einführung Random-Bibliotheken in Zellen bereitzustellen, um hinsichtlich bioaktiver Verbindungen zu screenen.

Einschlägige Literatur

[0007] Mann et al. (1983) Cell 33, 153–159, Pear et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(18), 8392-6 und WO 94/19478 beschreiben retrovirale BOSC- und BING-Systeme, die sich als Zufuhrvektoren für die geoffenbarten Verfahren eignen.

[0008] Scott und Craig (1994) Current Opinion in Biotechnology 5, 40–48 geben einen Überblick über Random-Peptid-Bibliotheken. Hupp et al. (1995) beschreiben kleine Peptide, die die latente sequenzspezifische DNA-Bindungsfunktion von p53 aktivieren. Palzkill et al. (1994) berichten über die Selektion funktioneller Signalspaltstellen aus einer Bibliothek in TEM-1-Lactamase eingeführter Random-Sequenzen.

[0009] WO 95/04824 beschreibt Verfahren zur Erzeugung und Expression von cDNA-Bibliotheken unter Einsatz retroviraler Vektoren. WO 96/23899 (zitierbar gemäß Art. 54(3) EPÜ) beschreibt ein Hefe-Zweihybrid-System, in dem ein Random-Peptid ausgewählt ist, das sich an ein Zielprotein bindet.

[0010] WO 96/38553 (zitierbar gemäß Artikel 54(3) EPÜ, beschreibt Verfahren zur Identifikation biologisch aktiver Peptide und Nucleinsäure.

ZUSAMMENSETZUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Screenen auf randomisierte Peptide wie z. B. von Pharmazeutika. Die Erfindung greift auf Moleküle oder Ziele (Targets) innerhalb lebender Säugetierzellen zurück und sorgt für direkte Selektion dieser Peptide mit erwünschten phänotypischen Wirkungen.

[0012] In einem Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Screenen hinsichtlich eines randomisierten Peptids, das den Phänotyp einer Säugetierzelle durch Wechselwirkung mit einem Ziel-Zellmolekül fähig ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

(a) das Bereitstellen einer Vielzahl von Säugetierzellen, die eine retrovirale Bibliothek umfassen, die randomisierte Kandidaten-Nucleinsäuren umfasst, worin jede der Nucleinsäuren eine andere Nucleinsäuresequenz umfasst, die an einen Fusionspartner gebunden ist, der eine Präsentationssequenz umfasst, die fähig ist, die exprimierten randomisierten Peptide in einer Konformationseingeschränkten Form zu präsentieren, und worin die Kandidaten-Nucleinsäuren exprimiert werden, um randomisierte Peptide zu produzieren;

(b) das Screenen der Vielzahl von Zellen auf eine Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist, worin der veränderte Phänotyp auf die Wechselwirkung eines randomisierten Peptids mit einem Ziel-Zellmolekül zurückzuführen ist; und

(c) das Isolieren des randomisierten Peptids aus der Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist.

[0013] In einem weiteren Aspekt bietet die Erfindung ein Verfahren zum Screenen auf ein randomisiertes Peptid, das zur Änderung des Phänotyps einer Säugetierzelle durch Wechselwirkung mit einem Ziel-Zellmolekül fähig ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

(d) das Bereitstellen einer retroviralen Bibliothek, die randomisierte Kandidaten-Nucleinsäuren umfasst, in einer ersten Vielzahl von Säugetierzellen, worin jede der Nucleinsäuren eine andere Nucleinsäuresequenz umfasst, die an einen Fusionspartner gebunden ist, der eine Präsentationssequenz umfasst, die fähig ist, die exprimierten randomisierten Peptide in einer Konformationseingeschränkten Form zu präsentieren, und worin die Kandidaten-Nucleinsäuren exprimiert werden, um randomisierte Peptide zu produzieren;

(e) das Kontaktieren der ersten Vielzahl von Zellen mit einer zweiten Vielzahl von Zellen;

(f) das Screenen der zweiten Vielzahl von Zellen auf eine Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist, worin der veränderte Phänotyp auf die Wechselwirkung eines ersten randomisierten Peptids mit einem Ziel-Zellmolekül zurückzuführen ist; und

(g) das Isolieren des randomisierten Peptids aus der Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist.

KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0014] **Fig. 1** Schaffung einer Bibliothek randomisierter Peptide in einem Retrovirus-DNA-Konstrukt durch PCR.

[0015] **Fig. 2** Schaffung einer Bibliothek randomisierter Peptide in einem Retrovirus-DNA-Konstrukt durch geprimte DNA-Synthese.

[0016] **Fig. 3** Präsentationskonstrukte für das Lokalisieren von Präsentationsstrukturen gegenüber spezifischen zellulären Lokalisationen.

[0017] **Fig. 4** Schematische Ansicht eines retroviralen Konstrukts.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren, um randomisierte Peptide, die einen Signalisierungspfad betreffen, wirkungsvoll in Säugetierzellen einzusetzen und auf diese zu screenen. Es ist mit Ausnahme eines angenommenen Signalisierungsereignisses und einer beobachtbaren physiologischen Veränderung in der Zielzelle nur ein geringes oder überhaupt kein Wissen über den Pfad erforderlich. Die geoffenbarten Verfahren unterscheiden sich insofern konzeptuell von Bibliothekssuch-Verfahren des Stands der Technik; als eine in vivo-Strategie durchgeführt wird, um auf intrazelluläre Signalisierungsmechanismen zugreifen zu können. Die Erfindung betrifft ferner die Isolation der Bestandteile des Pfads, die Instrumente zur Charakterisierung des Pfads und wesentliche Verbindungen für die pharmazeutische Entwicklung.

[0019] Die Erfindung bietet Verfahren zum Screenen auf randomisierte Peptide, die den Phänotyp von diese Peptide enthaltenden Säugetierzellen verändern können. Die Verfahren der Erfindung sorgen für eine beträchtliche Verbesserung gegenüber herkömmlichen Screening-Techniken, da sie das rasche Screenen einer großen Anzahl randomisierter Peptide in einem einzigen In-vivo-Schritt ermöglichen. Somit findet hocheffizientes Screenen statt, indem die Random-Oligonucleotide den Zellen zugeführt und diese Zellen gescreent werden, ohne dass in vitro die randomisierten Peptide gesammelt oder synthetisiert werden müssten. Darüber hinaus ermöglichen die vorliegenden Verfahren das Screenen in Abwesenheit signifikanter vorheriger Charakterisierung des zellulären Defekts ein sich.

- [0020] Somit betrifft die Erfindung Verfahren zum Screenen auf randomisierte Peptide, die den Phänotyp einer Zelle verändern können.
- [0021] Der Ausdruck „bioaktives Mittel“ bezieht sich hierin auf die in den Screening-Verfahren der Erfindung verwendeten randomisierten Peptide.
- [0022] Im Allgemeinen können randomisierte Peptide mit einer Länge von etwa 4 Aminosäuren bis etwa 100 Aminosäuren verwendet werden, wobei Peptide mit einer Länge von etwa 5 bis etwa 50 vorzuziehen sind, jene mit einer Länge von etwa 5 bis etwa 30 besonders vorzuziehen sind und jene mit einer Länge von etwa 6 bis etwa 20 am bevorzugtesten sind.
- [0023] Zumindest besitzt jedes randomisierte Peptid einen randomisierten Abschnitt (Definition siehe unten), der die Basis der hierin beschriebenen Screening-Verfahren darstellt, und einen Fusionspartner, der eine Präsentationssequenz umfasst. Zusätzlich zum randomisierten Abschnitt kann das randomisierte Kandidaten-Peptid auch einen Fusionspartner enthalten, der eine weitere Funktion aufweist, wie dies weiter unten veranschaulicht ist.
- [0024] Unter „Fusionspartner“ oder „funktioneller Gruppe“ ist hierin eine Sequenz zu verstehen, die mit dem randomisierten Kandidaten-Peptid assoziiert ist, das allen Bestandteilen der Bibliothek in dieser Klasse eine gemeinsame Funktion oder Fähigkeit verleiht. Fusionspartner können heterolog (d. h. für die Wirtszelle nicht-nativ) oder synthetisch sein (für keine Zelle nativ). Geeignete Fusionspartner sind u. a.: a) Präsentationsstrukturen (Definition siehe unten), die die randomisierten Kandidaten-Peptide in einer Konformations-eingeschränkten oder stabilen Form bereitstellen; (b) Targeting- Sequenzen (Definition siehe unten), die für die Lokalisierung der randomisierten Kandidaten-Peptide in einem subzellulären oder extrazellulären Kompartiment sorgen; (c) Rettungssequenzen (Definition siehe unten), die für Reinigung oder Isolation der randomisierten Kandidaten-Peptide sorgen; (d) Stabilitätssequenzen, die den randomisierten Kandidaten-Peptiden Stabilität oder Abbauschutz verleihen, z. B. Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau; (e) Dimerisationssequenzen, die Peptid-Dimerisation ermöglichen; oder (f) jede Kombination von (a), (b), (c), (d) und (e) sowie gegebenenfalls Linkersequenzen.
- [0025] Wie oben erwähnt, verwenden die hierin geoffenbarten Verfahren einen Fusionspartner, der eine Präsentationsstruktur ist. Unter „Präsentationsstruktur“ oder grammatikalischen Äquivalenten ist hierin eine Sequenz zu verstehen, die – wenn sie an randomisierte Kandidaten-Peptide fusioniert ist – bewirkt, dass die randomisierten Kandidaten-Peptide eine Konformations-eingeschränkte Form annehmen. Proteine treten miteinander größtenteils durch Konformations-eingeschränkte Domänen in Wechselwirkung. Obwohl kleine Peptide mit frei rotierenden Amino- und Carboxyltermini hochwirksame Funktionen aufweisen können, wie dies auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, ist die Umwandlung solcher Peptidstrukturen in pharmakologische Mittel infolge des Unvermögens, Seitenketten-Positionen für die peptidomimetische Synthese vorherzusagen, problematisch. Daher ist die Präsentation von Peptiden in Konformations-eingeschränkten Strukturen für die spätere Erzeugung von Pharmazeutika von Vorteil und führt auch wahrscheinlich zu höheraffinen Wechselwirkungen des Peptids mit dem Zielprotein. Diese Tatsache wurde in den kombinatorischen Bibliotheks-Erzeugungssystemen unter Einsatz biologisch generierter kurzer Peptide in bakteriellen Phage-Systemen berücksichtigt. Einige Forscher konstruierten bereits Moleküle mit kleinen Domänen, in denen man randomisierte Peptidstrukturen präsentieren könnte.
- [0026] Somit sind synthetische Präsentationsstrukturen, d. h. künstliche Polypeptide, zur Präsentation eines randomisierten Peptids als Konformations-eingeschränkte Domäne fähig. Im Allgemeinen umfassen derartige Präsentationsstrukturen einen ersten Abschnitt, der an das N-terminale Ende des randomisierten Peptids geunden ist, und einen zweiten Abschnitt, der an das C-terminale Ende des Peptids gebunden ist; d. h. das Peptid ist in die Präsentationsstruktur insertiert, obwohl – wie später ausgeführt – auch Variationen möglich sind. Um die funktionelle Isolation des randomisierten Expressionsprodukts zu erhöhen, sind die Präsentationsstrukturen selektiert oder konstruiert, minimale biologische Aktivität aufzuweisen, wenn sie in der Zielzelle exprimiert werden.
- [0027] Bevorzugte Präsentationsstrukturen maximieren die Zugriffsmöglichkeit auf das Peptid, indem es in einer externen Schleife präsentiert wird. Geeignete Präsentationsstrukturen sind demzufolge u. a. Minikörperstrukturen, Schleifen auf Beta-Faltblatt Drehungen und Superhelix- („Coiled-coil“-) Stammstrukturen, in denen für die Struktur nicht entscheidende Reste randomisiert sind, Zink-Finger-Domänen, Cystein-gebundene (Disulfid-) Strukturen, Transglutaminase-gebundene Strukturen, zyklische Peptide, B-Schleifen-Strukturen, Helix-Trommeln oder -Bündel, Leucin-Reißverschluss-Motive usw.
- [0028] In einer bevorzugten ist die Präsentationsstruktur eine Superhelix-Struktur, die für Präsentation des randomisierten Peptids auf einer externen Schleife sorgt. Siehe z. B. Myszk et al., Biochem. 33, 2362–2373 (1994), welche Veröffentlichung hierin durch Verweis aufgenommen ist, sowie **Fig. 3**. Unter Einsatz dieses Systems ist es Forschern gelungen, Peptide zu isolieren, die zu hochaffiner Wechselwirkung mit dem geeigneten Ziel fähig sind. Im Allgemeinen erlauben Superhelix-Strukturen 6 bis 20 randomisierte Positionen.
- [0029] Eine bevorzugte Superhelix-Präsentationsstruktur ist wie folgt:
MGCAALESEVSALESEVASLESEVAALGRGDMPLAAVKSLSAVKSKLASVKSCLAA CGPP.

[0030] Die unterstrichenen Regionen stellen eine Superhelix-Leucin-Reißverschluss-Region dar, die bereits definiert wurde (siehe Martin et al., EMBO J. 13(22), 5303–5309 (1994), hierin durch Verweis aufgenommen). Die fett gedruckte DRGDMP-Region stellt die Schleifenstruktur dar, und wenn sie in geeigneter Weise mit randomisierten Peptiden ersetzt ist (d. h. bioaktiven Kandidatenmitteln, hierin im Allgemeinen als $(X)_n$ bezeichnet, worin X ein Aminosäurerest und n eine ganze Zahl von zumindest 5 oder 6 ist), kann sie variable Längen aufweisen. Das Ersetzen der fett gedruckten Region wird durch Kodieren von Restriktions-Endonuclease-Stellen in den unterstrichenen Regionen erleichtert, was den direkten Einbau randomisierten Oligonucleotide an diesen Positionen erlaubt. Beispielsweise erzeugt eine bevorzugte Ausföhrungsform eine XhoI-Stelle an der doppelt unterstrichenen LE-Steale und eine HindIII-Stelle an der doppelt unterstrichenen KL-Stelle.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Präsentationsstruktur ein Minikörperstruktur. Ein „Minikörper“ besteht im Wesentlichen aus einer minimalen Antikörper-Komplementaritätsregion. Die Minikörper-Präsentationsstruktur bietet im Allgemeinen zwei Randomisierungsregionen, die im gefalteten Protein entlang einer einzelnen Fläche der tertiären Struktur präsentiert werden. Siehe z. B. Bianchi et al., J. Mol. Biol. 236(2), 649–659 (1994) und die dort angeführten Publikationen, die alle durch Verweis aufgenommen sind. Forscher haben aufgezeigt, dass diese minimale Domäne in Lösung stabil ist, und verwendeten Phagen-Selektionssysteme in kombinatorischen Bibliotheken, um Minikörper mit Peptidregionen auszuwählen, die hohe Affinität ($K_d = 10^{-7}$) für das entzündungsfördernde Cytokin IL-6 aufweisen.

[0032] Eine bevorzugte Minikörper-Präsentationsstruktur ist wie folgt:

MGRNSQATSGFTFSHFYMEWVRGGEYIAASRHKHNKYTTEYSASVKGRYIVSRDTS QSILYLQKKKGPP.

[0033] Die fett gedruckten unterstrichenen Regionen sind jene, die randomisiert sein können. Das kursiv gedruckte Phenylalamin muss in der ersten Randomisierungsregion invariant sein. Das gesamte Peptid wird in einer Drei-Oligonucleotid-Variation der Superhelix-Ausführungsform kloniert, wodurch zwei unterschiedliche Randomisierungsregionen gleichzeitig inkorporiert werden können. Diese Ausführungsform verwendet nicht-palindrome BstXI-Stellen auf den Termini.

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Präsentationsstruktur eine Sequenz, die im Allgemeinen zwei Cysteinreste enthält, sodass eine Disulfidbindung entstehen kann, was zu einer Konformations-eingeschränkten Sequenz führt. Diese Ausführungsform ist besonders vorzuziehen, wenn Sekretions-Targetingsequenzen verwendet werden. Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet offenkundig ist, kann eine beliebige Anzahl an Random-Sequenzen (mit oder ohne Spacer- oder Linker-Sequenzen) von Cysteinresten flankiert sein. In anderen Ausführungsformen können effiziente Präsentationsstrukturen durch die Random-Regionen selbst erzeugt werden. Beispielswels können diese mit Cysteinresten „dotiert“ sein, die unter den geeigneten Redox-Bedingungen zu hochvernetzten strukturierten Konformationen führen können, die einer Präsentationsstruktur ähneln. Ebenso können Randomisierungsregionen reguliert sein, sodass sie eine bestimmte Anzahl an Resten enthalten, um β -Faltblatt- oder α -Helixstrukturen zu verleihen.

[0035] In einigen Ausführungsformen können die Fusionspartner auch eine Targeting-Sequenz umfassen. Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet offenkundig ist, ist die Lokalisierung von Proteinen innerhalb einer Zelle ein einfaches Verfahren zur Steigerung der effektiven Konzentration und Bestimmung der Funktion. Wenn z. B. RAF1 an die Mitochondrienmembran lokalisiert ist, kann es die anti-apoptotische Wirkung von BCL-2 hemmen. Ebenso induziert Membran-gebundenes Sos Ras-medierte Signalisierung in T-Lymphozyten. Man geht davon aus, dass diese Mechanismen auf dem Prinzip der Beschränkung des Suchraums für Liganden beruhen, d. h. die Lokalisierung eines Proteins auf die Plasmamembran schränkt die Suche nach dem Liganden auf jenen limitierten dimensional Raum in der Nähe der Membran an (im Gegensatz zum dreidimensionalen Raum des Zytoplasma). Alternativ dazu kann die Konzentration eines Proteins auch einfach durch die Art der Lokalisierung erhöht werden. Das Transportieren der Proteine in den Nucleus schränkt sie auf einen kleineren Raum ein, wodurch die Konzentration gesteigert wird. Schließlich kann der Ligand oder das Ziel einfach auf ein spezifisches Kompartiment lokalisiert sein, und Inhibitoren müssen entsprechend lokalisiert sein.

[0036] Beispiele für zweckmäßige Targeting-Sequenzen sind somit u. a. Bindungssequenzen, die zur Bindung des Expressionsprodukts an ein vorbestimmtes Molekül oder Molekülklasse fähig sind, während die Bioaktivität des Expressionsprodukts aufrechterhalten bleibt (z. B. durch Einsatz von Enzyminhibitor oder von Substratsequenzen, um auf eine Klasse relevanter Enzyme abzu zielen). Sequenzen, die selektiven Abbau signalisieren (von sich selbst oder gemeinsam gebundener Proteine); sowie Signalsequenzen, die zur konstitutiven Lokalisierung der Kandidaten-Expressionsprodukte an eine vorbestimmte zelluläre Lokalität fähig sind, z. B. (a) an subzelluläre Lokaltäten wie etwa Golgi, das endopleismische Reticulum, den Nucleus, Nucleoli, die Nuclearmembran, Mitochondrien, das Chloroplast, Sekretionsvesikel, das Lysosom und die Zellmembran; und (b) an extrazelluläre Lokaltäten via ein Sekretionssignal. Besonders vorzuziehen ist die Lokalisierung entweder an subzelluläre Lokaltäten oder an das Zelläußere mittels Sekretion.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Targeting-Sequenz ein nucleates Lokalisierungssignal (NLS). NLS sind im Allgemeinen kurze, positiv geladene (basische) Domänen, die dazu dienen, das gesamte Protein zu lenken, in dem sie mit dem Zellkern konfrontiert werden. Es wurde über zahlreiche NLS-Aminosäuresequenzen in der Literatur berichtet, darunter einzelne basische NLS wie z. B. jene des großen SV40- (Af-

fenvirus) T-Antigens (Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val), Kalderon (1984 et al., Cell 39, 499–509; das Human-Retinsäure-Rezeptor-(3-Nuclear-Lokalisierungssignal (ARRRRRP); NFκB p50 (EEVQRKRQKL; Ghosh et al., Cell 62, 1019 (1990); NFκB p65 (EEKRKRTYE; Nolan et al., Cell 64, 961 (1991); und andere (siehe z. B. Boulikas, J. Cell. Biochem. 55(1), 32–58 (1994), hierin durch Verweis aufgenommen) und doppelbasische NLS, z. B. jene des Xenopus (afrikanische Krallenkröten-) Protein, Nucleoplasmin (Ala Val Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Leu Asp), Dingwall et al., Cell. 30, 449–458, 1982 und Dingwall et al., J. Cell Biol. 107, 641–849, 1988). Zahlreiche Lokalisierungsstudien zeigten, dass NLS, die in synthetischen Peptiden inkorporiert oder auf Reporterproteine transplantiert sind, die normalerweise nicht auf den Zellkern abzielen, bewirken, dass diese Peptide und Reporterproteine im Nucleus konzentriert sind. Siehe z. B. Dingwall und Laskey, Ann. Rev. Cell Biol. 2, 367–390, 1986; Bonnerot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6795–6799, 1987; Galileo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 458–462 (1990).

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Targeting-Sequenz eine Membranverankerungs-Signalsequenz. Dies ist besonders nützlich, da sich zahlreiche Parasiten und Pathogene an die Membran binden – zusätzlich zur Tatsache, dass viele intrazelluläre Ereignisse in der Plasmamembran ihren Anfang nehmen. Somit eignen sich Membran-gebundene Peptidbibliotheken sowohl für die Identifikation wichtiger Elemente in diesen Prozessen als auch für Entdeckung wirksamer Inhibitoren. Die Erfindung bietet Verfahren zur Präsentation des randomisierten Expressionsprodukts in extrazellulärer Weise oder im zytoplasmischen Raum; siehe **Fig. 3**. Für die extrazelluläre Präsentation ist eine Membran-Verankerungsregion am Carboxyterminus der Peptid-Präsentationsstruktur vorgesehen. Die randomisierte Expressionsprodukt-Region wird auf der Zelloberfläche exprimiert und dem extrazellulären Raum präsentiert, sodass sie sich an die anderen Oberflächenmoleküle (deren Funktion dadurch beeinflusst wird) oder an im extrazellulären Medium vorhandene Moleküle binden kann. Die Bindung solcher Moleküle könnte jenen Zellen Funktion verleihen, die ein Peptid exprimieren, das das Molekül bindet. Die zytoplasmische Region könnte neutral sein oder eine Domäne enthalten, die – wenn die extrazelluläre randomisierte Expressionsprodukt-Region gebunden ist – den Zellen eine Funktion verleiht (Aktivierung einer Kinase-Phosphatase-Bindung anderer zellulärer Komponenten, um die Funktion zu beeinflussen). Ebenso könnte die randomisierte Expressionsprodukt enthaltende Region innerhalb einer zytoplasmischen Region enthalten sein und die transmembrane Region und die extrazelluläre Region konstant bleiben oder eine definierte Funktion aufweisen.

[0039] Membran-Verankerungssequenzen sind auf dem Gebiet allgemein bekannt und basieren auf der genetischen Geometrie von transmembranen Säugetiermolekülen. Peptide sind in die Membran auf der Basis einer Signalsequenz (hierin als ssTM bezeichnet) inseriert und erfordern ein hydrophobe transmembrane Domäne (hierin als TM bezeichnet). Die transmembranen Proteine sind solcherart in die Membran inseriert, dass die 5' von der transmembranen Domäne kodierten Regionen extrazellulär sind und die 3' befindlichen Sequenzen intrazellulär werden. Wenn natürlich diese transmembranen Domänen 5' von der variablen Region positioniert sind, dienen sie dazu, sie als intrazelluläre Domäne zu verankern, was in einigen Ausführungsformen wünschenswert sein kann. ssTM und TM sind für eine Vielzahl an Membran-gebundenen Proteinen bekannt, wobei diese Sequenzen entsprechend verwendet werden können – entweder als Paare aus einem bestimmten Protein oder in einer Weise, in der jede Komponente aus einem unterschiedlichen Protein stammt; alternativ dazu können die Sequenzen synthetisch und zur Gänze als künstliche Zufuhrdomänen aus Konsens abgeleitet sein.

[0040] Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet offenkundig ist, sind Membran-Verankerungssequenzen einschließlich ssTM und TM für eine Vielzahl an Proteinen bekannt; sie alle kommen für die vorliegenden Zwecke in Frage. Besonders bevorzugte Membran-Verankerungssequenzen sind u. a. jene, die aus CD8, ICAM-2, IL-8R, CD4 und LFA-1 abgeleitet sind.

[0041] Nützliche Sequenzen sind Sequenzen aus: (1) integralen Membranproteinen der Klasse 1, z. B. IL-2-Rezeptor-β-Kette (Reste 1–26 sind die Signalsequenz, 241–265 die transmembranen Reste; siehe Hatakeyama et al., Science 244, 551 (1989) und von Heijne et al., Eur. J. Biochem. 174, 671 (1988)) und die Insulinrezeptor-β-Kette (Reste 1–27 sind das Signal, 957–959 die transmembrane Domäne und 960–1382 die zytoplasmische Domäne; siehe Hatakeyama, s. o., und Ebina et al., Cell 40, 747 (1985)); (2) integrale Membranproteine der Klasse II wie z. B. neutrale Endopeptidase (Reste 29–51 sind die transmembrane Domäne, 2–28 die zytoplasmische Domäne; siehe Malfroy et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 59 (1987)); (3) Typ III-Proteine wie z. B. Human-Cytochrom P450 NF25 (Hatakeyama, s. o.); und (4) Typ IV-Proteine wie z. B. Human-P-Glykoprotein (Hatakeyama, s. o.). Besonders bevorzugt sind CD8 und ICAM-2. Beispielsweise liegen die Signalsequenzen aus CD8 und ICAM-2 am extremen 5'-Ende des Transkripts. Diese bestehen aus den Aminosäuren 1–32 im Falle von CD8 (MASPLTRFLSLNLLLLGESILGSGEAKPQAP; Nakauchi et al., PNAS USA 82, 5126 (1985) und 1–21 im Falle von ICAM-2 (MSSFGYRTLTV-LFTLICCPG; Staunton et al., Nature (London) 339, 61 (1989)). Diese Leadersequenzen führen das Konstrukt der Membran zu, während die hydrophoben transmembranen Domänen, die 3' von der Random-Kandidatenregion positioniert sind, dazu dienen, das Konstrukt in der Membran zu verankern. Diese transmembranen Domänen werden von den Aminosäuren 145–195 aus CD8 (PQRPEDCRPRGSVKGTGLDFA-CDIYIWAPLAGICVALLSLIITLICYHSR; Nakauchi, s. o.)

und 224–256 aus ICAM-2 (MVIIVTVVSVLLSLFVTSVLLCFIFGQHLRQQR; Staunton, s. o.) gebildet.

[0042] Alternativ dazu enthalten diese Membran-Verankerungssequenzen den GPI-Anker, was zu einer kovalenten Bindung zwischen dem Molekül und der Lipid-Doppelschicht über eine Glycosyl-Phosphatidylinositol-Bindung z. B. in DAF führt (PNKGSG-TTSGTTRLSSGHTCFTLTGLLGLVTMGLLT, wobei das fett gedruckte Serin die Stelle des Ankers ist; siehe Hormans et al., *Nature* 333(6170), 269–272 (1988) und Moran et al., *J. Biol. Chem.* 266, 1250 (1991)). Um dies zu bewerkstelligen, kann die GPI-Sequenz aus Thy-1 3' von der variablen Region anstelle einer transmembranen Sequenz kassettiert sein.

[0043] Ebenso können Myristylations-Sequenzen als Membran-Verankerungssequenzen dienen. Es ist bekannt, dass die Myristylation von c-src dieses für die Plasmamembran rekrutiert. Dies ist ein einfaches und wirkungsvolles Verfahren der Membranlokalisierung, wenn man berücksichtigt, dass die ersten 14 Aminosäuren des Proteins einzig für diese Funktion verantwortlich sind: MGSSKSKPKDPSQR (siehe Cross et al., *Mol. Cell. Biol.* 4(9), 1834 (1984); Spencer et al., *Science* 262, 1019–1024 (1993); beide Publikationen sind hierin durch Verweis aufgenommen). Dieses Motiv stellte sich in der Lokalisierung von Reporter-Genen bereits als wirkungsvoll heraus und kann dazu dienen, die Zeta-Kette von TCR zu verankern. Dieses Motiv befindet sich 5' von der variablen Region, um das Konstrukt an der Plasmamembran zu lokalisieren. Andere Modifikationen wie etwa Palmitoylation können dazu dienen, Konstrukt in der Plasmamembran zu verankern; siehe z. B. die Palmitoylationssequenzen aus der G-Protein-gekuppelten Rezeptor-Kinase-GRK6-Sequenz (LLC-RLFSRQD-CCGNCSDEEELPTL, wobei die fett gedruckten Cysteine palmitoyliert sind; Stoffel et al., *J. Biol. Chem.* 269, 27791 (1994)); aus Rhodopsin (KQFRNCMLT-SLCCGKNPLGD; Barnstable et al., *J. Mol. Neurosci.* 5(3), 207 (1994)); und dem p21 H-ras 1-Protein (LNPPDESGPGCMSCCKVLS; Capon et al., *Nature* 302, 33 (1983)).

[0044] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Targeting-Sequenz eine lysosomale Targeting-Sequenz, umfassend z. B. eine lysosomale Abbausequenz wie etwa Lamp-2 (KFERQ; Dice, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 674, 58 (1992); oder lysosomale Membransequenzen aus Lamp-1 (MLPIAGFFALAGLVLIAYLIGRKRSHAGYQTI, Uthayakumar et al., *Cell. Mol. Biol. Res.* 41, 405 (1995)) oder Lamp-2 (LVPIAVGAALAGVLI-LVLLAYFIGLKHH-HAGYEQF, Konecki et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205, 1–5 (1994)), von denen beide die transmembranen Domänen in Kursivdruck und die zytoplasmische Targeting-Signal unterstrichen aufweisen.

[0045] Alternativ dazu kann die Targeting-Sequenz eine Mitochondrien-Lokalisierungssequenz sein, umfassend Mitochondrien-Matrixsequenzen (z. B. Hefe-Alkohol-Dehydrogenase III; MLRTSSLFTRRVQPSLFSR-NILRLQST; Schatz, *Eur. J. Biochem.* 165, 1–6 (1987)); Mitochondrien-Innenmembran-Sequenzen (Hefe-Cytochrom c-Oxidase-Untereinheit IV; MLSLRQSIRFFKPAITRLCSSRYLL; Schatz, s. o.); Mitochondrien-Intermembranraum-Sequenzen (Hefe-Cytochrom c1; MFSMLSKRWAQRTLSKSFYST-ATGAASKSGKLTQKLV-TAGVAAAGITASTLLYADSLTAEAMTA; Schatz, s. o.) oder Mitochondrien-Außenmembran-Sequenzen (70 kD-Hefe-Außenmembranprotein; MKSFITRNKTALATVAATGTAIGAYYYNQLYYYYYRGKK; Schatz, s. o.).

[0046] Die Zielsequenzen können auch endoplasmische Reticulum-Sequenzen sein, umfassen Sequenzen aus Calreticulin (KDEL; Pelham, *Royal Society London Transactions B*; 1–10 (1992)) oder Adenovirus E3/19K-Protein (LYLSRRSFIDEKKMP; Jackson et al., *EMBO J.* 9, 3153 (1990)).

[0047] Außerdem können Targeting-Sequenzen Folgendes umfassen: Peroxisom-Sequenzen (z. B. die Peroxisom-Matrixsequenz aus Luciferase; SKL; Keller et al., *PNAS USA* 4, 3246 (1987)); Farnesyations-Sequenzen (z. B. P21 H-ras 1; LNPPDESGP-GCMSCCKVLS, wobei das fett gedruckte Cystein farnesyliert ist; Capon, s. o.); Geranylgeranyl-Sequenzen (z. B. Protein rab-5A; LTEPTQPTRNQCCSN, wobei die fett gedruckten Cysteine geranylgeranyiert sind; Farnsworth, *PNAS USA* 91, 11963 (1994)); oder Destruktionssequenzen (Cyclin B1; TRALGDIGN; Klotzbucher et al., *EMBO J.* 1, 3053 (1996)).

[0048] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Targeting-Sequenz eine Sekretions-Signalsequenz, die zur Sekretion des Kandidaten-Translationsprodukts fähig ist. Es gibt zahlreiche bekannte Sekretions-Signalsequenzen, die sich 5' von der variablen Peptidregion befinden und von dieser abgespalten sind, um die Sekretion in den extrazellulären Raum zu bewirken. Sekretions-Signalsequenzen und ihre Transferierbarkeit in nicht verwandte Proteine sind allgemein bekannt; siehe z. B. Silhavy et al., *Microbiol. Rev.* 49, 398–418 (1985). Dies ist besonders nützlich, um ein Peptid zu erzeugen, das zur Bindung an die Oberfläche einer Zielzelle fähig ist (oder deren Physiologie beeinflussen kann), die eine andere als die Wirtszelle ist, z. B. eine mit dem Retrovirus infizierte Zelle. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Fusionsprodukt konfiguriert, in Serie die folgende Struktur zu enthalten: Signalpeptid – Präsentationsstruktur – randomisierte Expressionsprodukt-Region – Präsentationsstruktur (siehe **Fig. 3**). Auf diese Weise baden Zielzellen, die in der Nähe von Zellen gezüchtet sind, die eine Expression der Bibliothek von Peptiden bewirken, in sekretiertem Peptid. Zielzellen, die eine physiologische Veränderung als Reaktion auf die Gegenwart eines Peptids aufweisen, z. B. durch die Peptidbindung an einen Oberflächenrezeptor oder durch Internalisierung und Bindung an intrazelluläre Ziele, und die Sekretionszellen werden von einer Vielzahl an Selektionssystemen lokalisiert und das die Wirkung verursachende Peptid bestimmt. Beispiele für Wirkungen sind jene eines Designer-Cytokins (d. h. eines Stammzellen-Faktors, der bewirkt, dass sich hämatopoetische Stammzellen teilen und ihr Totipotential aufrechterhalten), eines Faktors, der die spontane Apoptose von Krebszellen hervorruft, eines Faktors, der sich an die Zellober-

fläche von Zielzellen bindet und sie spezifisch markiert, usw.

[0049] Geeignete Sekretionssequenzen sind bekannt, z. B. Signale aus IL-2 (MYRMQLLSC-IALSLALVTNS; Villinger et al., J. Immunol. 155, 3946 (1995)), Wachstumshormon (MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSAFPT; Roskam et al., Nucleic Acids Res. 7, 30 (1979)); Preproinsulin (MALWMRLPLLALLALWGPDPAAAFVN; Bell et al., Nature 284, 26 (1980); und Influenza HA-Protein (MKAKLLVLLYAFVAGDQI; Sekiwawa et al., PNAS 80, 3563)), wobei die Spaltung an der Stelle zwischen dem nichtunterstrichenen und dem unterstrichenen Abschnitt auftritt. Eine besonders bevorzugte Sekretions-Signalsequenz ist die Signal-Leadersequenz aus dem sekretierten Cytokin IL-4, das die ersten 24 Aminosäuren aus IL-4 wie folgt umfasst: MGLTS-QLLPPLFFLLACAGNFVHG.

[0050] In einer bevorzugten Ausführungsform kann der Fusionspartner auch eine Rettungssequenz umfassen. Eine Rettungssequenz ist eine Sequenz, die dazu verwendet werden kann, entweder das Kandidatenmittel oder die dafür kodierende Nucleinsäure zu reinigen oder zu isolieren. Somit enthalten z. B. Peptid-Rettungssequenzen Reinigungssequenzen wie etwa den His₆-Marker zur Verwendung mit Ni-Affinitätsäulen und Epitop-Marker für die Detektion, Immunfällung oder FACS (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung). Geeignete Epitop-Marker sind myc (zur Verwendung mit dem im Handel erhältlichen 9E10-Antikörper), die BSP-Biotinylation-Zielsequenz für das bakterielle Enzym BirA, flu-Marker, lacZ und GST.

[0051] Alternativ dazu kann die Rettungssequenz eine singuläre Oligonucleotid-Sequenz sein, die als Sonden-Zielstelle dient, um die rasche und einfache Isolation des retroviralen Konstrukts mittels PCR, verwandter Techniken oder Hybridisierung zu ermöglichen.

[0052] In einer bevorzugten Ausführungsform kann der Fusionspartner auch eine Stabilitätssequenz umfassen, um dem randomisierten Kandidaten-Peptid oder der dafür kodierenden Nucleinsäure Stabilität zu verleihen. Somit können z. B. Peptide durch Inkorporation von Glycinen nach dem Initiations-Methionin (MG oder MGGO), zwecks Schutz des Peptids vor Ubiquitination gemäß der N-End-Regel von Varshavsky stabilisiert werden, um im Zytoplasma langer Halbwertszeit zu verleihen. Ebenso liefern zwei Proline am C-Terminus Peptide, die gegenüber Carboxypeptidase-Wirkung größtenteils resistent sind. Die Gegenwart von zwei Glycinen vor den Prolinen verleiht Flexibilität und verhindert, dass sich Struktur-initiierende Ereignisse im Diprolin in der Struktur des Kandidaten-Peptids fortsetzen. Somit sind bevorzugte Stabilitätssequenzen wie folgt: MG(X)_nGG-PP, worin X jede beliebige Aminosäure und n eine ganze Zahl von zumindest 4 ist.

[0053] In einer Ausführungsform kann der Fusionspartner auch eine Dimerisationssequenz umfassen. Eine Dimerisationssequenz ermöglicht die nicht-kovalente Assoziation eines Random-Peptids an ein anderes Random-Peptid, wobei ausreichend Affinität gegeben ist, um unter normalen physiologischen Bedingungen assoziiert zu bleiben. Dies ermöglicht es kleinen Bibliotheken von Random-Peptiden (z. B. 10⁴), zu großen Bibliotheken anzuwachsen, wenn zwei Peptide pro Zelle erzeugt werden, die dann dimerisieren, um eine wirkungsvolle Bibliothek von 10⁸ zu bilden (10⁴ × 10⁴). Dies gestattet gegebenenfalls auch die Bildung längerer Random-Peptide oder strukturell komplexerer Random-Peptidmoleküle. Die Dimere können Homo- oder Heterodimere sein.

[0054] Dimerisationssequenzen können eine einzelne Sequenz sein, die selbst aggregiert, oder zwei Sequenzen, von denen jede in einem anderen retroviralen Konstrukt erzeugt wird. Nucleinsäuren kodieren sowohl für ein erstes Random-Peptid mit Dimerisationssequenz 1 als auch ein zweites Random-Peptid mit Dimerisationssequenz 2 kodieren, sodass bei Einführung in eine Zelle und Expression der Nucleinsäure Dimerisationssequenz 1 mit Dimerisationssequenz 2 assoziiert, um eine neue Random-Peptidstruktur zu bilden.

[0055] Geeignete Dimerisationssequenzen umfassen eine Vielzahl an Sequenzen. Es sind zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungsstellen bekannt. Darüber hinaus können Dimerisationssequenzen auch unter Anwendung von Standardverfahren identifiziert werden, z. B. mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, traditioneller biochemischer Affinitätsbindungs-Studien oder sogar unter Anwendung der vorliegenden Verfahren.

[0056] Die Fusionspartner können – sofern dies die Biologie und die Aktivität erlaubt – an einer beliebigen Stelle (d. h. N-terminal, C-terminal, intern) in der Struktur positioniert sein.

[0057] In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Fusionspartner eine Linker- oder Tethering-Sequenz. Linkersequenzen zwischen verschiedenen Targeting-Sequenzen (z. B. Membran-Targetingsequenzen) und die anderen Komponenten der Konstrukte (z. B. die randomisierten Kandidatenmittel) sind möglicherweise wünschenswert, um es den Kandidatenmitteln zu ermöglichen, ungehindert mit potenziellen Zielen in Wechselwirkung zu treten. Wenn beispielsweise der Kandidat für das bioaktive Mittel ein Peptid ist, sind nützliche Linker Glycin-Serin-Polymere (umfassend z. B. (GS)_n, (GSGS)_n und (GGGS)_n, worin n eine ganze Zahl von zumindest 1 ist), Glycin-Alanin-Polymere, Alanin-Serin-Polymere und andere flexible Linker wie etwa der Tether für den Shaker-Kalium-Kanal sowie eine große Anzahl weiterer flexibler Linker, wie dies für Fachleute auf dem Gebiet offenkundig ist. Glycin-Serin-Polymere sind vorzuziehen, da beide dieser Aminosäuren relativ unstrukturiert sind und daher als neutraler Tether zwischen Komponenten dienen können. Zweitens ist Serin hydrophil und kann daher eine globulare Glycinkette solubilisieren. Drittens wurde aufgezeigt, dass ähnliche Ketten Untereinheiten von Rekombinationsproteinen wie z. B. einkettige Antikörper wirkungsvoll verbinden können.

[0058] Außerdem können die Fusionspartner einschließlich der Präsentationsstrukturen modifiziert, randomisiert und/oder maturiert werden, um die Präsentationsorientierung des randomisierten Expressionsprodukts zu verändern. Beispielsweise können Determinanten an der Basis der Schleife modifiziert sein, um die interne tertiäre Schleifen-Peptidstruktur geringfügig zu verändern, während die randomisierte Aminosäuresequenz beibehalten wird.

[0059] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Kombinationen von Fusionspartnern verwendet. Somit eignen sich z. B. beliebige Kombinationen von Präsentationsstrukturen, Targeting-Sequenzen, Rettungssequenzen und Stabilitätssequenzen (mit oder ohne Linkersequenzen). Wie dies ausführlicher weiter unten erklärt ist, kann man unter Verwendung eines Basisvektors, der eine Klonierungsstelle für den Empfang von Random- und/oder Bias-Bibliotheken enthält, in verschiedenen Fusionspartnern 5' und 3' von der Bibliothek kassettieren. Tabelle 1 veranschaulicht einige der möglichen Kombinationen (ohne genaue Angabe der Präsentationsstrukturen) wie folgt. Unter Verwendung von V als variable Klonierungsstelle für die Random-Nucleinsäure-Bibliotheken und Bezeichnung jedes Fusionspartners durch einen anderen Buchstaben (d. h. N für nucleare Lokalisierungssequenz) kann jedes Konstrukt als Abfolge repräsentativer Buchstaben identifiziert werden – 5' zu 3' (Nucleinsäure) oder N-terminal zu C-terminal (Protein), z. B. NV oder – falls stromab von der variablen Region kloniert – VN. Wie hier impliziert, sind die Fusionspartner-Sequenzen als Kassetten in Stellen auf beiden Seiten der variablen Region kloniert. C steht für zytoplasmisch (d. h. keine Lokalisierungssequenz), E ist eine Rettungssequenz wie z. B. das myc-Epitop, G eine Linkersequenz (G10 ist eine Glycin-Serin-Kette von 10 Aminosäuren, G 20 eine Glycin-Serin-Kette von 20 Aminosäuren), M eine Myristylierungssequenz, N eine nucleare Lokalisierungssequenz, ssTM die Signalsequenz für die transmembrane Verankerungssequenz, TM die transmembrane Verankerungssequenz, GPI eine GPI-Membran-Verankerungssequenz, S eine Sekretions-Signalsequenz usw. Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist, kommen zusätzlich zu den oben erwähnten beliebige andere Kombinationen in Frage.

Tabelle 1

zytoplasmisch	CV
	CEV
	CVE
sekretiert	SV
	SEV
	SVE
myristyliert	MV
	MEV
	MEG20V
transmembran (intrazellulär)	ssTMV
	ssTMV TM
	ssTMV E TM
	ssTMV G20 E TM
	ssTMV E
transmembran (GPI-gebunden)	ssTMV G E TM
nucleare Lokalisierung	NEV
	NVE

[0060] Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist, können diese Module von Sequenzen in einer großen Anzahl an Kombinationen und Variationen verwendet werden. Darüber hinaus ist es – wie hierin auch besprochen – ebenfalls möglich, mehr als eine variable Region in einem Konstrukt vorzusehen: entweder um gemeinsam eine neue Oberfläche zu bilden oder zwei andere Moleküle zusammenzubringen.

[0061] In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein mit einer Präsentationsstruktur verbundenes randomisiertes Kandidaten-Peptid der variablen Klonierungsstelle V (s. o.) hinzugefügt. Alternativ dazu wird keine: Präsentationsstruktur verwendet, wodurch ein „freies“ oder „nicht eingeschränktes“ Peptid oder Expressionsprodukt entsteht.

[0062] Zu den bevorzugten Ausführungsformen zählen:

a) intrazelluläres, Membran-verankertes verbundenes (d. h. mittels Tether) freies Peptid:

MRPLAGGEHTMASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC
DIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICYPHSR-GSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGGG-
(X)_n-GGPP

wobei das Sekretionssignal aus Mäuse-CD8 fett gedruckt ist, die transmembrane Region von CD8 unterstrichen ist und der Linker, der für Flexibilität (Glycin) und Löslichkeit (Serin) sorgt, kursiv gedruckt ist. (X)_n stellt das Random-Peptid dar, worin n eine ganze Zahl von mehr als etwa 6 ist. Eine bevorzugte Ausführungsform unter Einsatz dieser Struktur verwendet Bias-Peptide (siehe unten), z. B. Bias-SH-3-Domänen-Bindungspeptid-Bibliotheken in den nicht eingeschränkten Peptidstrukturen, da einige Oberflächenrezeptor-Signalisierungssysteme SH-3-Domänen als Teil des Signalisierungsapparats verwenden.

(b) intrazelluläre, Membran-verankerte, verbundene Superhelix:

MRPLAGGEHTMASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC
DIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICYPHSRGSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGGGC
AALESEVSALESEVASLESEVAAL-(X)_n-LA AVKSKLSAVKSKLASVKSKLAACGPP.

wobei die Superhelix-Struktur unterstrichen und kursiv dargestellt ist.

(c) extrazellulär, mit Oberflächen-Tether, nicht eingeschränkt:

MRPLAGGEHTMASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGGG-(X)_n-
GGSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGGGPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY
IWAPLAGICVALLLSLIITLICYPHSRGGPP.

(d) extrazellulär, mit Oberflächen-Tether, eingeschränkt:

MRPLAGGEHTMASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGGGCAALESEVSALESEVASLESE
VAAL-(X)_n-
LA AVKSKLSAVKSKLASVKSKLAACGGSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGGGP
QRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICYPHSRGGPP.

(e) sekretiert, nicht eingeschränkt:

MRPLAGGEHTMASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGGG-(X)_n-GGPP.

(f) sekretiert, eingeschränkt:

MRPLAGGEHTMASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGGGA ALESEVSALESEVASLESEV
AAL-(X)_n-LA AVKSKLSAVKSKLASVKSKLAACGPP.

[0063] Die randomisierten Kandidaten-Peptide, die hierin auch als bioaktive Kandidatenmittel bezeichnet

werden und oben beschrieben sind, werden durch Kandidaten-Nucleinsäuren kodiert. Unter „Kandidaten-Nucleinsäuren“ ist hierin eine Nucleinsäure zu verstehen (im Allgemeinen RNA bei Verwendung retroviraler Zufuhrvehikel), die exprimiert werden können, um bioaktive Kandidatenmittel zu bilden; d. h. die Kandidaten-Nucleinsäuren kodieren für die bioaktiven Kandidatenmittel und die Fusionspartner (falls vorhanden). Darüber hinaus enthalten die Kandidaten-Nucleinsäuren im Allgemeinen auch ausreichend zusätzliche Sequenz, um je nach Bedarf Translation oder Transkription zu bewirken. Für eine Peptid-Bibliothek enthält die Kandidaten-Nucleinsäure im Allgemeinen Klonierungsstellen, die so positioniert sind, dass die Expression der randomisierten Peptide innerhalb des Rahmens möglich ist, sowie Fusionspartner wie z. B. Präsentationsstrukturen. Beispielsweise enthält die Präsentationsstruktur im Allgemeinen das initiiierende ATG als Teil des Stammvektors. Für eine RNA-Bibliothek sind die Kandidaten-Nucleinsäuren im Allgemeinen mit einem internen CMV-Promotor, tRNA-Promotor oder Zellspezifischen Promotor konstruiert, der für die sofortige und geeignete Expression der RNA-Struktur an der Initiationsstelle der RNA-Synthese ausgebildet ist. Die RNA ist in Anti-Sense-Weise zur Richtung der retroviralen Synthese exprimiert und konventionell beendet, z. B. mit einer orientierungsspezifischen Terminatorsequenz. Interferenz durch stramaufwärtige Transkription wird in der Zielzelle mit der Selbstinaktivierungs-Deletion abgeschwächt, einem gemeinsamen Merkmal bestimmter retroviraler Expressionssysteme.

[0064] Im Allgemeinen werden die Kandidaten-Nucleinsäuren innerhalb der Zellen exprimiert, um randomisierte Kandidaten-Peptide zu produzieren.

[0065] Die randomisierten Kandidaten-Peptide und die Kandidaten-Nucleinsäuren sind randomisiert – entweder vollständig randomisiert oder in ihrer Randomisierung „biased“, z. B. allgemein oder positionsspezifisch hinsichtlich der Nucleotid/Rest-Häufigkeit. Unter „randomisiert“ oder grammatikalisch gleichwertigen Ausdrücken ist hierin zu verstehen, dass jede Nucleinsäure und jedes Peptid aus im Wesentlichen Random-Nucleotiden bzw. -Aminosäuren besteht. Wie dies ausführlicher weiter unten dargestellt ist, sind die Kandidaten-Nucleinsäuren, die zu Kandidaten-Expressionsprodukten führen, chemisch synthetisiert und können daher jedes beliebige Nucleotid an jeder beliebigen Position inkorporieren. Wenn demnach die Kandidaten-Nucleinsäuren exprimiert sind, um Peptide zu bilden, kann jeder beliebige Aminosäurerest an jeder beliebigen Position inkorporiert sein. Der synthetische Prozess kann ausgebildet sein, randomisierte Nucleinsäuren zu erzeugen, damit die Bildung aller oder der meisten möglichen Kombinationen über die Länge der Nucleinsäure erfolgen kann; auf diese Weise entsteht eine Bibliothek randomisierter Kandidaten-Nucleinsäuren.

[0066] Die Bibliothek sollte eine ausreichend strukturell diverse Population randomisierter Expressionsprodukte aufweisen, um eine probabilistisch ausreichende Bandbreite zellulärer Reaktionen hervorzurufen, damit eine oder mehr Zellen bereitgestellt werden können, die eine erwünschte Response zeigen. Demzufolge muss eine auf Wechselwirkung beruhende Bibliothek groß genug sein, damit zumindest eines ihrer Elemente eine Struktur besitzt, die ihr für ein bestimmtes Molekül, Protein oder einen anderen Faktor, dessen Aktivität für den Abschluss des Signalisierungspfades notwendig ist, Affinität verleiht. Obwohl es schwierig ist, die erforderliche absolute Größe einer auf Wechselwirkung basierenden Bibliothek zu ermitteln, liefert die Natur in Form der Immunreaktion einen Hinweis: eine Diversität von 10^7 bis 10^8 unterschiedlichen Antikörpern bietet zumindest eine Kombination mit ausreichender Affinität, um mit den meisten potenziellen Antigenen, mit denen ein Organismus konfrontiert ist, in Wechselwirkung zu treten. Veröffentlichte in vitro-Selektionstechniken zeigten auch, dass eine Bibliotheksgröße von 10^7 bis 10^8 ausreicht, um Strukturen mit Affinität für das Ziel zu identifizieren. Eine Bibliothek mit allen Kombinationen eines Peptids und einer Länge von 7 bis 20 Aminosäuren, wie sie hierin für die Expression in Retroviren vorgeschlagen wird, hat das Potenzial, für 20^7 (10^9) bis 20^{20} zu kodieren. Somit bieten die vorliegenden Verfahren mit Bibliotheken von 10^7 bis 10^8 pro ml retroviraler Partikel eine „funktionierende“ Untergruppe einer theoretisch vollständigen Interaktions-Bibliothek für 7 Aminosäuren sowie eine Untergruppe von Formen für die 20^{20} -Bibliothek. Somit werden in einer bevorzugten Ausführungsform zumindest 10^6 , vorzugsweise zumindest 10^7 , noch bevorzugter zumindest 10^8 und am bevorzugtesten zumindest 10^9 , unterschiedliche Expressionsprodukte gleichzeitig in Subjektverfahren analysiert. Bevorzugte Verfahren maximieren die Bibliotheksgröße und -diversität.

[0067] Es ist wichtig, sich in Erinnerung zu rufen, dass man in jedem Bibliothekssystem, für das Oligonucleotidsynthese kodiert, keine 100%ige Kontrolle über die Codorts erhält, die schließlich in die Peptidstruktur inkorporiert werden. Dies gilt besonders für Codons, die für Stoppsignale kodieren (TAA, TGA, TAG). In einer Synthese mit NNN als Random-Region gibt es eine 3/64 bzw. 4,69%ige Chance, dass das Codon ein Stoppcodon ist. Somit besteht in einem Peptid mit 10 Resten die unannehmbar hohe Wahrscheinlichkeit, dass 46,7% der Peptide frühzeitig enden (terminieren). Für freie Peptidstrukturen ist dies möglicherweise kein Problem. Doch für größere Strukturen, wie sie hierin vorgestellt werden, führt eine derartige Termination zu steriler Peptidexpression. Um dieses Problem zu lösen, werden Random-Reste als NNK kodiert, worin K = T oder G ist. Dies ermöglicht das Kodieren aller potenzieller Aminosäuren (unter geringfügiger Änderung ihrer relativen Repräsentation), doch es ist entscheidend, dass dies das Kodieren zweier Stoppreste TAA und TGA verhindert. Somit besitzen Bibliotheken, die für ein aus 10 Aminosäuren bestehendes Peptid kodieren, eine 15,6%ige Chance, frühzeitig zu terminieren. Für Kandidaten-Nucleinsäuren, die nicht konstruiert sind, zu Peptid-Expres-

sionsprodukten zu führen, ist dies nicht erforderlich.

[0068] In einer Ausführungsform ist die Bibliothek vollständig randomisiert – es bestehen an keiner Position Sequenzpräferenzen oder Konstanten. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Bibliothek biased, d. h. einige Positionen innerhalb der Sequenz werden entweder konstant gehalten oder aus einer begrenzten Anzahl an Möglichkeiten ausgewählt. Beispielsweise sind in einer bevorzugten Ausführungsform die Nucleotide oder Aminosäurereste innerhalb einer definierten Klasse, z. B. hydrophober Aminosäuren, hydrophiler Reate, Reste mit sterischem Bias (entweder klein oder groß), zwecks Erzeugung von Cysteinen, Vernetzung, Prolinen für SH-3-Domänen, Serinen, Threoninen, Tyrosinen oder Histidinen für Phosphorylationsstellen usw. oder Purinen usw. randomisiert.

[0069] In einer bevorzugten Aus ist der Bias in Richtung Peptide oder Nucleinsäuren, die mit bekannten Klassen von Molekülen in Wechselwirkung treten. Beispielsweise ist es bekannt, dass ein Großteil der intrazellulären Signalisierung über die kurzen Regionen von Polypeptiden erfolgt, die durch kleine Peptidomänen mit anderen Polypeptiden in Wechselwirkung stehen. Eine kurze Region aus der zytoplasmischen HIV-1-Hüllendomäne etwa blockiert, wie bereits aufgezeigt wurde, die Wirkung von zellulärem Calmodulin. Regionen der zytoplasmischen Fas-Domäne, die Homologie mit dem Mastoparan-Toxin aus Wespen aufweist, kann auf eine kurze; Peptidregion mit zum Tod führenden apoptotischen oder G-Protein-induzierenden Funktionen beschränkt werden. Magalnin, ein natürliches Peptid aus *Xenopus*, kann hochwirksame Anti-Tumor- und antimikrobielle Aktivität aufweisen. Kurze Peptidfragmente eines Protein-Kinase C-Isozyms (β PKC) blockieren, wie dies bereits aufgezeigt wurde, die nucleare Translokation von β PKC in *Xenopus*-Oozyten nach Stimulation. Kurze SH-3-Zielpeptide wurden auch Pseudosubstrate für die spezifische Bindung an SH-3-Proteine verwendet. Dies ist natürlich nur eine kurze und unvollständige Liste zur Verfügung stehender Peptide mit biologischer Aktivität, da es in diesem Bereich eine sehr umfangreiche Literatur gibt. Es bestehen demnach sehr viele Hinweise auf das Potenzial kleiner Peptide, Aktivität auf intrazellulären Signalisierungskaskaden aufzuweisen. Außerdem können Agonisten und Antagonisten beliebig vieler Moleküle als Basis der Bias-Randomisierung randomisierter Kandidaten-Peptide herangezogen werden.

[0070] Es eignen sich somit einige Moleküle oder Proteindomänen als Ausgangspunkte für die Erzeugung randomisierter bioaktiver Bias-Kandidatenmittel. Eine große Anzahl kleiner Moleküldomänen ist ebenfalls bekannt, die eine gemeinsame Funktion, Struktur oder Affinität verleihen. Darüber hinaus können – wie man dies auf dem Gebiet der Endung weiß – Bereiche schwacher Aminosäure-Homologie starke strukturelle Homologie aufweisen. Einige dieser Moleküle, Domänen und/oder korrespondierender Konsenssequenzen sind bekannt, u. a. SH-2-Domänen, SH-3-Domänen, Pleckstrin, Todesdomänen, Protease-Spaltungs/Erkennungsstellen, Enzyminhibitoren, Enzymsubstrate, Traf usw. Ebenso gibt es einige bekannte Nucleinsäure-Bindungsproteine, die Domänen enthalten, die sich hierin zur Verwendung eignen. Beispielsweise sind Leucin-Reißverschluss-Konsenssequenzen bekannt.

[0071] Wenn das endgültige Expressionsprodukt eine Nucleinsäure ist, müssen zumindest 10, vorzugsweise zumindest 12, noch bevorzugter zumindest 15, am bevorzugtesten zumindest 21, Nucleotidpositionen randomisiert werden, wobei es noch bevorzugter ist, wenn die Randomisierung nicht perfekt ist. Ebenso müssen zumindest 5, vorzugsweise zumindest 6, noch bevorzugter zumindest 7, Aminosäurepositionen randomisiert sein, wobei es wiederum bevorzugter ist, wenn die Randomisierung nicht perfekt ist.

[0072] In einer bevorzugten Ausführungsform werden SH-3-Domänen-bindende Oligonucleotide/Peptide mit Bias erzeugt. Es wurde gezeigt, dass SH-3-Domänen kurze Zielmotive (SH-3-Domänen-bindende (Peptide; etwa 10 bis 12 Reste in einer linearen Sequenz) erkennen, die als kurze Peptide mit hoher Affinität für die Ziel-SH-3-Domäne kodiert werden können. Konsenssequenzen für SH-3-Domänen-bindende Proteine wurden ebenfalls vorgeschlagen. Somit werden in einer bevorzugten Ausführungsform Oligos/Peptide mit dem folgenden Bias erzeugt:

1. XXXPPXPXX, worin X ein randomisierter Rest ist.
2. (innerhalb der Positionen der Restpositionen 11 bis -2):

	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Met	Gly	aa11	aa10	aa9	aa8	aa7	Arg	Pro	Leu	Pro	Pro
hyd											
0	-1	-2									

Pro hyd hyd Gly Gly Pro Pro STOP

atg ggc nnk nnk nnk nnk nnk aga cct ctg cct cca sbk

ggg sbk sbk gga ggc cca cct TAA1.

[0073] In dieser Ausführungsform ist zu erkennen, dass die N-Terminus-flankierende Region die größte Auswirkung auf die Bindungsaffinität hat, weshalb sie zur Gänze randomisiert ist. „Hyd“ bedeutet einen Bias in Richtung eines hydrophoben Rests, d. h. Val, Ala, Gly, Leu, Pro, Arg. Um für einen Rest mit hydrophoben Bias zu kodieren, wird eine Struktur mit „sbk“-Codon-Biss verwendet. Die Untersuchung der Codons mit dem genetischen Code stellt sicher, dass im Allgemeinen hydrophobe Reste kodiert werden. s = g, c; b = t, g, c; v = a, g, c; m = a, c; k = t, g; n = a, t, g, c.

[0074] Die Kandidaten-Nucleinsäuren werden in die Zellen eingeführt, um auf randomisierte Peptide zu screenen, die den Phänotyp einer Säugetierzelle verändern zu können. Unter „eingeführt in“ oder ähnliche Ausdrücke ist hierin zu verstehen, dass die Nucleinsäuren in die Zellen solcherart eindringen, dass sie sich für die nachfolgende Expression der Nucleinsäure eignen. Das Verfahren der Einführung ist vor allem vom abgezielten Säugetier-Zelltyp (siehe unten) abhängig. Beispiele für solche Verfahren sind CaPO₄-Fällung, Liposomenfusion, Lipofectin®, Elektroporation, Viralinfection usw. Die Kandidaten-Nucleinsäuren können stabil in das Genom der Wirtszelle integriert sein (z. B. mit retroviraler Einführung, siehe unten), oder sie können entweder transient oder stabil im Zytoplasma existieren (d. h. durch Verwendung traditioneller Plasmide, unter Anwendung hierkömmlicher Regulationssequenzen, Selektionsmarker usw.). Da zahlreiche pharmazeutisch wichtige Screens Human- oder Modellsäugetier-Zellziele erfordern, sind retrovirale Vektoren vorzuziehen, die zur Transfektion solcher Ziele fähig sind.

[0075] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Kandidaten-Nucleinsäuren Teil eines retroviralen Partikels, das die Zellen infiziert. Im Allgemeinen ist die Infektion der Zellen unproblematisch – es wird infektiöses Reagens Polybren appliziert, ein Polykation, das die virale Bindung an die Zielzelle erleichtert. Die Infektion kann solcherart optimiert werden, dass jede Zelle im Allgemeinen ein einziges Konstrukt exprimiert, wobei hier das Verhältnis zwischen Viruspartikeln und Zellenanzahl zur Anwendung kommt. Die Infektion folgt einer Poisson-Verteilung.

[0076] Die Kandidaten-Nucleinsäuren werden mittels retroviraler Vektoren in die Zellen eingebracht. Die derzeit effizientesten Gentransfer-Methodologien machen sich die Fähigkeit konstruierter Viren, z. B. Retroviren, zunutze, natürliche zelluläre Barrieren zur exogenen Nucleinsäure-Aufnahme zu umgehen. Die Verwendung rekombinanter Retroviren wurde als erstes von Richard Mulligan und David Baltimore mit den Psi-2-Linien und analogen Retrovirus-Verpackungssystemen auf der Basis von NIH 3T3-Zellen erforscht (siehe Mann et al., Cell 33, 153–159 (1993), hierin durch Verweis aufgenommen). Solche Helfer-defektiven Verpackungslinien sind in der Lage, alle notwendigen Transproteine – gag, pol und env – zu produzieren, die für Verpackung, Verarbeitung, reverse Transkription und Integration rekombinanter Genome erforderlich sind. Jene RNA-Moleküle, die in cis das Ψ-Verpackungssignal aufweisen, sind zu reifenden Virionen verpackt. Retroviren sind aus einigen Gründen vorzuziehen. Erstens ist ihre Ableitung leicht. Zweitens ist im Gegensatz zur Adenovirus-medierten Genzufuhr die Expression aus Retroviren langfristig (Adenoviren integrieren nicht). Adeno-assoziierte Viren besitzen beschränkten Raum für Gene und Regulationseinheiten, und es herrscht derzeit Uneinigkeit über ihre Integrationsfähigkeit. Retroviren bieten daher den tragfähigsten Kompromiss zwischen langfristiger Expression, genomischer Flexibilität und stabiler Integration, um nur einige Merkmale zu nennen. Der Hauptvorteil von Retroviren besteht darin, dass ihre Integration in das Wirtsgenom ihre stabile Übertragung durch Zellteilung ermöglicht. Dies gewährleistet, dass in Zelltypen, die mehrere unabhängige Reifungsschritte durchlaufen, z. B. hämatopoetische Zellprogression, das Retrovirus-Konstrukt nicht verschwindet und auf Dauer exprimiert.

[0077] Ein besonders gut geeignetes retrovirales Transfektionssystem ist in Mann et al., s. o., beschrieben: Pear et al., PNAS USA 90(18), 8392–8396 (1993); Kitamura et al., PNAS USA 92, 9146–9150 (1995); Kinsella

- et al., Human Gene Therapy 7, 1405–1413; Hofmann et al., PNAS USA 93, 5185–5190; Choate et al., Human Gene Therapy 7, 2247 (1996); und WO 94/19478.
- [0078] In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Bibliothek in einem Retrovirus-DNA-Konstrukt-Rückgrat erzeugt, wie dies allgemein in den Beispielen beschrieben wird. Es erfolgt Standard-Oligonucleotidsynthese, um den Random-Abschnitt des bioaktiven Kandidatenmittels unter Anwendung auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Techniken zu erzeugen (siehe Eckstein, Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1991); Bibliotheken können im Handel erworben werden. Bibliotheken mit bis zu 10^9 singulären Sequenzen können problemlos in solchen DNA-Rückgraten erzeugt werden. Nach der Bildung der DNA-Bibliothek wird diese in einen ersten Primer kloniert. Der erste Primer dient als „Kassette“, die in das retrovirale Konstrukt insertiert wird. Der erste Primer enthält im Allgemeinen einige Elemente, z. B. die erforderlichen Regulationssequenzen (z. B. Translation, Transkription, Promotoren usw.), Fusionspartner, Restriktions-Endonuclease- (Klonierungs- und Subklonierungs-) Stellen, Stoppcodons (vorzugsweise in allen drei Rahmen), Komplementaritätsregionen für das Primen des zweiten Strangs (vorzugsweise am Ende der Stoppcodon-Region, da in der Random-Region kleine Deletionen oder Insertionen auftreten können) usw.
- [0079] Ein zweiter Primer wird dann zugegeben, der im Allgemeinen aus einem Teil oder der Gesamtheit der Komplementaritätsregion besteht, um den ersten Primer und gegebenenfalls notwendige Sequenzen für eine zweite singuläre Restriktionsstelle für das Subklonieren zu primen. DNA-Polymerase wird zugesetzt, um doppelsträngige Oligonucleotide zu produzieren. Die doppelsträngigen Oligonucleotide werden mit den geeigneten Subklonierungs-Restriktions-Endonucleasen gespalten und in die retroviralen Zielvektoren subkloniert (Eleschreibung folgt).
- [0080] Es kann jede beliebige Anzahl geeigneter retroviraler Vektoren verwendet werden. Im Allgemeinen können die retroviralen Vektoren Folgendes enthalten: selektierbare Markergene unter der Steuerung interner Ribosomen-Eintrittsstellen (IHRES), was für bicistronische Operons sorgt und somit die Selektion von Zellen stark vereinfacht, die Peptide in einheitlich großen Mengen exprimieren; und Promotoren zur Verstärkung der Expression eines zweiten Gens, positioniert in Sense- oder Antisense-Weise relativ zu 5' LTR. Geeignete Selektionsgene sind u. a. Neomycin-, Blastocidin-, Bleomycin-, Puromycin- und Hygromycin-Resistenzgene sowie selbstfluoreszierende Marker wie z. B. grünes Fluoreszenzprotein, enzymatische Marker wie z. B. lacZ und Oberflächenproteine wie etwa CD8 usw.
- [0081] Bevorzugte Vektoren sind z. B. ein Vektor auf der Basis des Mäuse-Stammzellenvirus (MSCV; siehe Hawley et al., Gene Therapy 1, 136 (1994)) und ein modifiziertes MFG-Virus (Riviere et al., Genetics 92, 6733 (1995)) sowie pBABE (siehe Beispiele). Eine allgemeine schematische Übersicht über das retrovirale Konstrukt findet sich in **Fig. 4**.
- [0082] Zu den Retroviren zählen induzierbare und konstitutive Promotoren. Beispielsweise gibt es Situationen, in denen es notwendig ist, die Peptidexpression nur während bestimmter Phasen des Selektionsprozesses zu induzieren. Ein Schema z. B., das entzündungsfördernde Cytokine bereitstellt, muss in bestimmten Fällen die induzierte Expression der Peptide vorsehen. Der Grund dafür besteht darin, dass man erwarten kann, dass überexprimierte entzündungsfördernde Medikamente langfristig gesehen das Zellwachstum beeinträchtigen können. Demzufolge ist die konstitutive Expression unerwünscht, und das Peptid wird nur während jener Phase des Selektionsprozesses aktiviert, in der der Phänotyp erforderlich ist; dann wird das Peptid deaktiviert, indem die retrovirale Expression gestoppt wird, sodass die Wirkung des langfristigen Überlebens von Produzentenzellen bestätigt bzw. dieses Überleben sichergestellt wird. Es sind zahlreiche induzierbare und konstitutive Promotoren bekannt.
- [0083] Zudem ist es möglich, einen retroviralen Vektor zu konfigurieren, um für induzierbare Expression von retroviralen Inserts nach der Integration eines einzelnen Vektors in Zielzellen zu sorgen; es ist wichtig, dass das gesamte System im einzelnen Retrovirus enthalten ist. Tet-induzierbare Retroviren wurden unter Aufnahme des selbstinaktivierenden (SIN) Merkmals der retroviralen 3' LTR-Enhancer/Promotor-Deletionsmutante konstruiert (Hoffman et al., PNAS USA 93, 5185 (1996)). Die Expression dieses Vektors in Zellen ist in Gegenwart von Tetracyclin oder anderer aktiver Analoge praktisch undetektierbar. Doch in Abwesenheit von Tet wird die Expression innerhalb von 48 Stunden nach der Induktion maximal aktiviert, wobei eine einheitlich erhöhte Expression der gesamten Population jener Zellen zu beobachten ist, die das induzierbare Retrovirus enthalten – ein Indiz dafür, dass die Expression innerhalb der infizierten Zellpopulation einheitlich reguliert wird. Ein ähnliches damit verwandtes System verwendet eine mutierte Tet-DNA-Bindungsdomäne solcherart, dass DNA in Gegenwart von Tet gebunden und in Abwesenheit von Tet entfernt wurde. Beide dieser Systeme kommen in Frage.
- [0084] Auf diese Weise erzeugen die Primer eine Bibliothek von Fragmenten, die jeweils eine unterschiedliche Random-Nucleotidsequenz enthalten, die für ein unterschiedliches Peptid kodieren kann. Die Ligationsprodukte werden dann in Bakterien umgewandelt, z. B. E. coli, und DNA aus der resultierenden Bibliothek hergestellt, wie dies allgemein von Kitamura, PNAS USA 92, 9146–9150 (1995) veranschaulicht wird.
- [0085] Die Zufuhr der Bibliotheks-DNA in ein retrovirales Verpackungssystem führt zur Umwandlung in infek-

tiöses Virus. Zweckmäßige retrovirale Verpackungssystem-Zelllinien sind u. a. die GING- und BOSC23-Zelllinien aus WO 94/19478; Soneoka et al., *Nucleic Acid Res.* 23(4), 628 (1995); Finan et al., *Blood* 83, 43 (1994); Pheonix-Verpackungslinien wie etwa PhiNX-eco und PhiNX-ampho, siehe unten; 292T + gag-pol und Retrovirus-Hülle; PA317; sowie Zelllinien, die von Markowitz et al., *Virology* 167, 400 (1988), Markowitz et al., *J. Virol* 62, 1120 (1988), Li et al., *PNAS USA* 93, 1165B (1996), Kinsella et al., *Human Gene Therapy* 7, 1405 (1996) beschrieben sind.

[0086] Bevorzugte Systeme sind PhiNX-eco und PhiNX-ampho oder ähnliche Zelllinien, die, wie im Folgenden ausgeführt, zwei Zelllinien sind. Die Zelllinien basieren auf den BING- und BOSC23-Zelllinien aus WO 94/19478, die wiederum auf der 293T-Zelllinie basieren (einer Humanembryo-Nierenlinie, transformiert mit Adenovirus E1a, die ein temperatursensitives T-Antigen trägt, das mit Neomycin coselektiert ist). Das einzigartige Merkmal dieser Zelllinie ist, dass sie entweder mit Calciumphosphat-medierter Transfektion oder Lipid-basierenden Transfektions-Arbeitsvorschriften hochgradig transfizierbar ist – mehr als 50% der 293T-Zellen können transient mit Plasmid-DNA transfiziert werden. Somit könnte die Zelllinie ein zelluläres Milieu bieten, in dem retrovirale strukturelle Proteine und genomische virale RNA zur Bildung von Helfer-defektivem Virus rasch zusammengebracht werden können. 293T-Zellen wurden daher mit stabil integrierten defektiven Konstrukten geschaffen, die zur Produktion von gag-pol und Hüllenprotein fähig sind (entweder für ekotrope oder amphotrope Viren). Diese Linien wurden als BOSC23 bzw. BING bezeichnet. Die Nützlichkeit dieser Linien bestand darin, dass man kleine Mengen an rekombinantem Virus transient zur Verwendung in Experimenten in kleinem Maßstab erzeugen konnte. Diese Linien boten Vorteile gegenüber früheren stabilen Systemen, da Virus innerhalb von Tagen und nicht Monaten produziert werden konnte.

[0087] Mit diesen Linien der ersten Generation traten im Laufe der zwei Jahre, in denen sie sich durchsetzten, drei Probleme auf. Erstens war die gag-pol- und Hüllenexpression instabil, und die Linien erforderten eine genaue Kontrolle der retroviralen Produktionskapazität; zweitens galt die Struktur der für die Proteinproduktion verwendeten Vektoren nicht als 100%ig „sicher“ für die Helfervirus-Produktion; und drittens zeigte sich, dass eine der Linien unbeabsichtigt ein Hygromycin-enthaltendes Retrovirus trug. Obwohl die BING- und BOSC23-Linien hierin geeignet sind, werden alle dieser möglicherweise problematischen Aspekte in den PhiNX-Linien der zweiten Generation berücksichtigt. Diese Linien basieren ebenfalls auf 293T-Zellen, allerdings mit den folgenden Verbesserungen. Erstens wurde die Fähigkeit geschaffen, die gagpol-Produktion Zelle für Zelle zu überwachen, indem eine IKES-CD8-Oberflächenmarker-Expressionskassette stromab vom Lese-rahmen des gag-pol-Konstrukts eingeführt wurde (andere Oberflächenmarker als CD8 kommen auch in Frage). IHRES(interne Ribosomen-Eintrittsstellen-) Sequenzen ermöglichen die sekundäre oder tertiäre Proteintranslokation aus einem einzelnen mRNA-Transkript. Somit ist die CD8-Expression eine direkte Folge des intrazellulären gag-pol, und die Zuverlässigkeit, mit der die Population an Produzentiszellen gag-pol produziert, kann leicht durch Durchflusszytometrie überwacht werden. Zweitens wurden sowohl für die gag-pol als auch die Hüllenkonstrukte Nicht-Moloney-Promotoren verwendet, um das Rekombinationspotenzial mit eingeführten retroviralen Konstrukten zu minimieren; es wurden unterschiedliche Promotoren für gag-pol und Hülle verwendet, um ihr Inter-Rekombinationspotenzial zu minimieren. Die verwendeten Promotoren waren CMV und RSV. Es entstanden zwei Zelllinien, PHEONIX-ECO und PHEONIX-AMPHO. gag-pol wurde mit Hygromycin als co-selektierbarer Marker eingeführt, und die Hüllenproteine wurden mit Diphtherie-Resistenz als co-selektierbarer Marker eingeführt. Schließlich wurden die Zellen gescreent, um einen relativ seltenen Zelltyp zu identifizieren, der gag-pol und env (Hülle) in einheitlicher Verteilung produzierte, obwohl dies nicht erforderlich war. Außerdem wurde eine Linie namens PHEONIX-gp produziert, die nur gag-pol produziert. Diese Linie steht zwecks weiterer Pseudotypisierung retroviraler Virionen mit anderen Hüllenproteinen wie z. B. Gibbonaffen-Leukämievirus-Hülle oder vesikulärem Stomatitis VSV-G-Protein, Xenotropic oder Retargeting-Hüllen zur Verfügung, die auch zugesetzt werden können.

[0088] Sowohl PHEONIX-ECO als auch PHEONIX-AMPHO wurden auf Helfervirus-Produktion untersucht und als Helfervirus-frei identifiziert. Beide Linien tragen Episome für die Bildung stabiler Zelllinien, die zur Produktion von Retrovirus herangezogen werden können. Beide Linien können durch Durchflusszytometrie problemlos auf Stabilität von gag-pol (CD8) und Hüllenexpression untersucht werden; nach mehrmonatigen Tests erweisen sich die Linien als stabil und weisen keinen Titerverlust auf, wie dies bei den Linien BOSC23 und BING der ersten Generation der Fall war (was teilweise auf die Auswahl der Promotoren zur Verstärkung der Expression von gag-pol und env zurückzuführen war). Beide Linien können auch zur transienten Produktion von Virus innerhalb weniger Tage verwendet werden. Somit sind diese neuen Linien mit der transienten, episomal-stabilen Bibliothekserzeugung für retrovirale Gentransfer-Experimente absolut kompatibel. Schließlich wurden die durch diese Linien produzierten Titer getestet. Unter Verwendung herkömmlicher Polybren-verstärkter retroviraler Infektion wurden Titer nahe bei 10^7 /ml oder darüber sowohl für PHEONIX-ECO als auch PHEONIX-AMPHO beobachtet, wenn episomale Konstrukte vorlagen. Bei Erzeugung von transient produziertem Virus betragen die Titer üblicherweise 1/2 bis 1/3 dieses Werts.

[0089] Diese Linien sind Helfervirus-frei, sie tragen für die langfristige stabile Produktion von Retrovirus Episome, sie produzieren gag-pol und env in stabiler Weise, und sie weisen keinen Verlust an vitalem Titer im Lauf

der Zeit auf. Außerdem können PHEONIX-ECO und PHENOX-Ampho Titer produzieren, die an 10^7 /ml heranreichen oder darüber liegen, wenn sie episomale Konstrukte tragen, was mit Viruskonzentration auf 10^8 bis 10^9 /ml erhöht werden kann.

[0090] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die oben geoffenbarten Zelllinien und die anderen Verfahren zur Produktion von Retrovirus zur Bildung von Virus durch transiente Transfektion. Das Virus kann entweder direkt verwendet werden oder dazu dienen, eine andere retrovirale Produzenten-Zelllinie für die „Expansion“ der Bibliothek zu infizieren.

[0091] Die Viruskonzentration kann in folgender Weise ermittelt werden. Im Allgemeinen werden Retroviren durch Aufbringen von Retrovirus enthaltendem Überstand auf Indikatorzellen wie z. B. NIH3T3-Zellen und anschließende Messung des Prozentsatzes jener Zellen, die phänotypische Konsequenzen der Infektion exprimieren, getitert. Die Konzentration des Virus wird bestimmt, indem der Prozentsatz von Zellen, die durch den jeweiligen Verdünnungsfaktor infiziert sind, multipliziert und die Anzahl an verfügbaren Zielzellen berücksichtigt wird, um einen relativen Titer zu erhalten. Wenn das Retrovirus ein Reporter-Gen enthält, z. B. lacZ, werden Infektion, Integration und Expression des rekombinanten Virus durch histologisches Einfärben für lacZ-Expression oder durch Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Im Allgemeinen liegen retrovirale Titer sogar aus den besten Produzenten Zellen unter 10^7 /ml, sofern nicht eine Konzentration aufgrund relativ teurer oder exotischer Geräte vorliegt. Wie dies allerdings vor kurzem postuliert wurde, ist Folgendes zu beachten: Da sich ein so großes Partikel wie ein Retrovirus durch Brown-Bewegung nicht sehr weit in Flüssigkeit bewegt, kann man mithilfe der Flüssigkeitsdynamik vorhersagen, dass ein Großteil des Virus mit den Zellen niemals in Kontakt kommt, um den Infektionsprozess in Gang zu setzen. Wenn jedoch Zellen auf einem porösen Filter gezüchtet oder platziert werden und sich Retrovirus durch graduellen gravimetrischen Fluss an den Zellen vorbeibewegt, kann eine hohe Viruskonzentration um die Zellen herum zu jedem Zeitpunkt aufrechterhalten werden. Somit konnte man eine zehn Mal höhere Infektiosität durch infizierende Zellen auf einer porösen Membran und das Vorbeifließen von Retrovirus-Überstand daran beobachten. Dies sollte nach der Konzentration Titer von 10^9 ermöglichen.

[0092] Die Kandidaten-Nucleinsäuren werden als Teil des retroviralen Konstrukts in die Zellen eingesetzt, um auf transdominante randomisierte Peptide zu screenen, die den Phänotyp einer Zelle verändern können.

[0093] Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist, kann der Typ von hierin verwendeten Säugetierzellen stark variieren. Im Grunde genommen kann jede Säugetierzelle verwendet werden, wobei Mäuse-, Ratten-, Primaten- und Humanzellen besonders vorzuziehen sind; wie dies ebenfalls für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist, ermöglichen Modifikationen des Systems durch Pseudotypisierung die Verwendung aller eukaryotischen Zellen, vorzugsweise höherer Eukaryoten. Wie dies weiter unten ausführlich dargestellt ist, wird ein Screen durchgeführt, sodass die Zellen einen selektierbaren Phänotyp in Gegenwart eines randomisierten Peptids aufweisen können. Wie dies weiter unten ausführlich dargelegt wird, sind Zelltypen, die an einer Reihe von Krankheitszuständen beteiligt sind, besonders nützlich, sofern ein geeigneter Screen ausgebildet ist, die Auswahl von Zellen zu ermöglichen, die in Folge der Gegenwart eines transdominanten randomisierten Peptids innerhalb der Zelle einen geänderten Phänotyp aufweisen.

[0094] Demzufolge zählen zu geeigneten Zelltypen u. a. Tumorzellen aller Art (insbesondere Melanom, Myeloidleukämie, Karzinome der Lunge, der Brust, der Eierstöcke, des Darms, der Niere, der Prostata, des Pankreas und der Hoden), Kardiomyozyten, Endothelzellen Epithelzellen, Lymphozyten (T-Zellen und B-Zellen), Mastzellen, Eosinophile, vaskuläre Intimalzellen, Hepatozyten, Leukozyten einschließlich mononuclearer Leukozyten, Stammzellen wie z. B. hämatopoetische, neurale, Haut-, Lungen-, Nieren-, Leber- und Myozyten-Stammzellen (zur Verwendung beim Screenen auf Differenzierungs- und De-Differenzierungsfaktoren), Osteoklasten, Chondrozyten und andere Bindegewebszellen, Keratinozyten, Melanozyten, Leberzellen, Nierenzellen und Adipozyten. Zweckmäßige Zellen sind auch bekannte Forschungszellen, u. a. Jurkat T-Zellen, NIH3T3-Zellen, CHO, Cos usw. Siehe den ATCC-Zelllinienkatalog.

[0095] In einer Ausführungsform können die Zellen genetisch hergestellt sein, d. h. sie enthalten exogene Nucleinsäure, z. B. um Zielmoleküle zu umfassen.

[0096] In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine erste Vielzahl an Zellen gescreent. Die Zellen, in die Kandidaten-Nucleinsäuren eingesetzt werden, werden auf einen geänderten Phänotyp gescreent. Demnach wird in dieser Ausführungsform die Wirkung des transdominanten bioaktiven Mittels in den gleichen Zellen festgestellt, in denen es erzeugt wird; dies bezeichnet man als autokrine Wirkung.

[0097] Unter einer „Vielzahl an Zellen“ sind hierin etwa 10^3 Zellen bis 10^8 oder 10^9 Zellen zu verstehen, wobei eine Menge von 10^6 bis 10^8 vorzuziehen ist. Diese Vielzahl an Zellen umfasst eine Zellbibliothek, in der im Allgemeinen jede Zelle innerhalb der Bibliothek ein Element der retroviralen molekularen Bibliothek enthält, d. h. eine unterschiedliche Kandidaten-Nucleinsäuren obwohl – wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist – einige Zellen innerhalb der Bibliothek möglicherweise kein Retrovirus und einige mehr als ein Retrovirus enthalten. Wenn andere Verfahren als retrovirale Infektion zur Einführung der Kandidaten-Nucleinsäuren in eine Vielzahl an Zellen angewendet werden, kann die Verteilung der Kandidaten-Nucleinsäuren innerhalb der einzelnen Zellelemente der Zellbibliothek stark variieren, da es im Allgemeinen schwierig ist, die

Anzahl an Nucleinsäuren zu steuern, die während Elektroporation usw. in eine Zelle eindringen.

[0098] In eine bevorzugten Ausführungsform werden die Kandidaten-Nucleinsäuren in eine erste Vielzahl an Zellen eingebracht und die Wirkung der bioaktiven Kandidatenmittel in einer zweiten oder dritten Vielzahl an Zellen gescreent, die von der ersten Vielzahl an Zellen zu unterscheiden sind, d. h. die im Allgemeinen einen anderen Zelltyp aufweisen. Die Wirkung der transdominanten bioaktiven Mittel ist auf eine extrazelluläre Wirkung auf eine zweite Zelle zurückzuführen; es handelt sich hierbei um einen endokrinen oder parakrinen Effekt. Dieser wird mittels Standardverfahren erreicht. Die erste Vielzahl an Zellen kann in oder auf einem Medium gezüchtet werden, das eine zweite Vielzahl an Zellen berühren kann; dann wird die Wirkung gemessen. Alternativ dazu kann direkter Kontakt zwischen den Zellen stattfinden. Demnach ist die „Kontaktierung“ funktioneller Kontakt und umfasst sowohl direkten als auch indirekten Kontakt. In dieser Ausführungsform kann die erste Vielzahl an Zellen gescreent oder ungescreent sein.

[0099] Falls erforderlich werden die Zellen unter für die Expression der Kandidaten-Nucleinsäuren geeigneten Bedingungen behandelt (z. B. bei Verwendung induzierbarer Promotoren), um die Kandidaten-Expressionsprodukte zu produzieren (entweder Translations- oder Transkriptionsprodukte).

[0100] Die Verfahren der Erfindung umfassen somit das Einsetzen einer molekularen Bibliothek randomisierter Kandidaten-Nucleinsäuren in eine Vielzahl an Säugetierzellen, eine Zellbibliothek. Jede der Nucleinsäuren umfasst eine andere genetisch randomisierte Nucleotidsequenz. Die Vielzahl an Säugetierzellen wird dann auf eine Zelle gescreent (Erläuterung siehe unten), die einen geänderten Phänotyp aufweist. Der geänderte Phänotyp ist auf die Gegenwart eines transdominanten randomisierten Peptids zurückzuführen.

[0101] Unter „geändertem Phänotyp“ oder „veränderter Physiologie“ oder ähnlichen Ausdrücken ist hierin gemeint, dass der Phänotyp der Säugetierzelle in bestimmter Weise modifiziert ist, vorzugsweise in detektierbarer und/oder messbarer Weise. Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist, liegt ein Vorteil der Erfindung in der großen Vielfalt an Säugetierzelltypen und potenziellen phänotypischen Veränderungen, die man mittels der vorliegenden Verfahren messen kann. Jede phänotypische Veränderung, die man beobachten, nachweisen oder messen kann, kann als Grundlage der vorliegenden Screening-Verfahren dienen. Geeignete phänotypische Veränderungen sind u. a.: starke physikalische Veränderungen wie z. B. Veränderungen der Zellmorphologie, des Zellwachstums, der Lebensfähigkeit der Zellen, der Haftung an Substraten oder an anderen Zellen, sowie der Zelldichte; Veränderungen in der Expression einer oder mehrerer RNA, von Proteinen, Lipiden, Hormonen, Cytokinen oder anderen Molekülen; Veränderungen im Gleichgewichtszustand (d. h. in der Halbwertszeit) einer oder mehrerer RNA, von Proteinen, Lipiden, Hormonen, Cytokinen oder anderen Molekülen; Veränderungen der Bioaktivität oder spezifischen Aktivität einer oder mehrerer RNA, von Proteinen, Lipiden, Hormonen, Cytokinen, Rezeptoren oder anderen Molekülen; Veränderungen der Sekretion von Ionen, Cytokinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren oder anderen Molekülen; Modifikationen der Zellmembran-Potenziale, der Polarisierung, der Integrität oder des Transports; Veränderungen der Infektiosität, Anfälligkeit, Latenz, Haftung und Aufnahme von Viren und bakteriellen Erregern; usw. Unter „zur Veränderung des Phänotyps fähig“ und ähnlichen Ausdrücken ist hierin zu verstehen, dass das randomisierte Peptid den Phänotyp der Säugetierzelle in detektierbarer und/oder messbarer Weise verändern kann.

[0102] Der veränderte Phänotyp kann in unterschiedlicher Weise detektiert werden, wie dies ausführlich weiter unten erläutert ist, und hängt im Allgemeinen vom sich gerade verändernden Phänotyp ab, mit dem er auch korrespondiert. Im Allgemeinen wird der veränderte Phänotyp folgendermaßen detektiert: mikroskopische Analyse der Zellmorphologie; Standardtests zur Lebensfähigkeit der Zellen, z. B. hinsichtlich des vermehrten Zelltods oder der höheren Lebensfähigkeit der Zellen – etwa Zellen, die nunmehr über Viren, Bakterien bzw. bakterielle oder synthetische Toxine gegenüber dem Zelltod resistent sind; Standard-Markierungstests wie z. B. fluorimetrische Indikatorstests hinsichtlich der Gegenwart oder Menge einer bestimmten Zelle; oder eines bestimmten Moleküls, z. B. FACS oder andere Einfärbungstechniken; biochemischer Nachweis der Expression von Zielverbindungen nach dem Abtöten der Zellen; usw.

[0103] In einigen Fällen wird – wie dies an anderer Stelle hierin ausführlich erläutert wird – der veränderte Phänotyp in der Zelle detektiert, in die die randomisierte Nucleinsäure eingesetzt wurde; in anderen Ausführungsformen wird der veränderte Phänotyp in einer zweiten Zelle detektiert, die auf ein bestimmtes molekulares Signal aus der ersten Zelle reagiert.

[0104] Ein veränderter Phänotyp einer Zelle deutet die Gegenwart eines transdominanten bioaktiven Mittels an. Unter „transdominant“ ist hierin zu verstehen, dass das bioaktive Mittel indirekt den veränderten Phänotyp hervorruft, indem es auf ein zweites Molekül einwirkt, was zu einem veränderten Phänotyp führt. Ein transdominantes Expressionsprodukt hat somit eine Wirkung die nicht in cis ist, d. h. ein trans-Ereignis (gemäß genetischer oder biochemischer Definition). Eine transdominante Wirkung ist eine unterscheidbare Wirkung einer molekularen Struktur (d. h. des kodierten Peptids oder der kodierten RNA) auf ein getrenntes und unterscheidbares Ziel, d. h. keine Wirkung auf die kodierte Struktur selbst. Als solches enthalten transdominante Wirkungen viele allgemein bekannte Wirkungen pharmakologischer Mittel auf Zielmoleküle oder Pfade in Zellen oder physiologischen Systemen; z. B. wirken sich die β -Lactam-Antibiotika transdominant auf die Peptidoglycan-Synthese in bakteriellen Zellen aus, indem eine Bindung an Penicillin-Bindungsproteine stattfindet und

ihre Funktionen gestört werden. Ein Beispiel für eine transdominante Wirkung eines Peptids ist die Fähigkeit, NF- κ B-Signalisierung durch Bindung an I κ B- α in einer Region zu hemmen, die für seine Funktion entscheidend ist, sodass in Gegenwart ausreichender Mengen des Peptids (oder der molekularen Struktur) die Signalisierungspfade, die normalerweise zur Aktivierung von NF- κ B mittels Phosphorylation und/oder Abbau von I κ B- α führen, daran gehindert werden, in I κ B- α ihre Wirkung zu entfalten (aufgrund der Bindung des Peptids oder der molekularen Struktur). In einem anderen Fall sind Signalisierungspfade, die normalerweise aktiviert sind, um IgE zu sekretieren, in der Gegenwart von Peptid gehemmt. Ein weiteres Beispiel: Signalisierungspfade in Fettgewebezellen, die normalerweise ruhend sind, sind aktiviert, um Fett zu metabolisieren. Ein weiteres Beispiel: In der Gegenwart eines Peptids werden intrazelluläre Mechanismen für die Replikation bestimmter Viren, z. B. HIV-1, Herpes viridae-Familienmitglieder oder Respiratory Syncytia Virus, gehemmt.

[0105] Eine transdominante Wirkung auf ein Protein oder einen molekularen Pfad ist klar von der Randomisierung, Modifikation oder Mutation einer Sequenz innerhalb eines Proteins oder Moleküls bekannter oder unbekannter Funktion zu unterscheiden, um eine biochemische Fähigkeit, die ein Protein oder Molekül bereits an den Tag legt, zu verringern oder zu verstärken. Beispielsweise könnte ein Protein, das enzymatisch β -Lactam-Antikörper, eine β -Lactamase spaltet, in seiner Fähigkeit verstärkt oder verringert werden, indem Sequenzen, die im Inneren seiner Struktur liegen und die Fähigkeit dieses Enzyms verstärken oder verringern, auf β -Lactam-Antikörper einzuwirken und abzuspalten, mutiert werden. Dies würde als cis-Mutation des Proteins bezeichnet werden. Die Wirkung dieses Proteins auf β -Lactam-Antikörper ist eine Aktivität, die das Protein bereits an den Tag legt; sie erfolgt in einem unterscheidbaren Ausmaß. Ebenso würde man eine Mutation in der Leadersequenz, die den Export dieses Proteins in die extrazellulären Räume fördert, wo es leichter auf β -Lactam-Moleküle stoßen könnte, oder eine Mutation innerhalb der Sequenz, die die Stabilität des Proteins verstärkt, als cis-Mutationen im Protein bezeichnen. Zum Vergleich dazu würde ein transdominanter Effektor dieses Proteins ein Mittel enthalten (unabhängig von der β -Lactamase), das sich solcherart an die β -Lactamase band, dass es deren Funktion aufgrund der Bindung an sie verstärkte oder verringerte.

[0106] Im Allgemeinen sind cis-Wirkungen Wirkungen innerhalb von Molekülen, in denen miteinander in Wechselwirkung stehende Elemente kovalent aneinander geknüpft sind, obwohl sich diese Elemente individuell als trennbare Domänen manifestieren könnten. Trans-Effekte (transdominant insofern, als unter bestimmten zellulären Bedingungen die erwünschte Wirkung entfaltet wird) sind Wirkungen innerhalb unterscheidbarer molekularer Strukturen, sodass sich die molekulare Struktur A, die mit der molekularen Struktur B kovalent miteinander verbunden ist, an die Aktivitäten von Struktur B bindet oder sie in anderer Weise beeinflusst. Als solches sind die meisten bekannten pharmakologischen Mittel transdominante Effektoren.

[0107] In einer bevorzugten Ausführungsform wird – sobald eine Säugetierzelle mit einem veränderten Phänotyp detektiert wird – die Zelle von der Vielzahl isoliert, die keine veränderten Phänotypen aufweist. Dies kann in unterschiedlicher Weise erfolgen, wie dies auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, und hängt in einigen Fällen vom Test oder Screen ab. Geeignete Isolationstechniken sind u. a. FACS, Lyse-Selektion unter Verwendung von Komplement, Zellklonieren, Scannen mittels Fluorimager, Expression eines „Überlebens“ proteins, induzierte Expression eines Zelloberflächenproteins oder anderen Moleküls, das zwecks physikalischer Isolation fluoreszierend oder markierbar gemacht werden kann; Expression eines Enzyms, das ein nichtfluoreszierendes Molekül in eine fluoreszierendes umwandelt; übermäßiges Wachstum vor dem Hintergrund eines langsamen oder nicht vorhandenen Wachstums; Tod von Zellen und Isolation von DANN oder anderer Zellvitalitäts-Indikatorfarbstoffe usw.

[0108] Das randomisierte Peptid wird hierin von der positiven Zelle isoliert. Dies kann in unterschiedlicher Weise erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Primer, die gegenüber DNA-Regionen, die den retroviralen Konstrukten gemein sind, oder gegenüber spezifischen Komponenten der Bibliothek wie z. B. einer Rettungssequenz (Definition siehe oben) komplementär sind, dazu verwendet, die einzelne Random-Sequenz zu „retten“. Alternativ dazu wird das bioaktive Mittel unter Verwendung einer Rettungssequenz isoliert. Somit können z. B. Rettungssequenzen, die Epitopmarker oder Reinigungssequenzen umfassen, dazu dienen, das bioaktive Mittel unter Einsatz von Immunfällungs- oder Affinitätsssäulen herauszuziehen. In einigen Fällen kann dadurch – wie dies oben erwähnt ist – auch das primäre Zielmolekül herausgezogen werden, wenn ausreichend starke Bindungswechselwirkung zwischen dem bioaktiven Mittel und dem Zielmolekül vorliegt. Alternativ dazu kann das Peptid mittels Massenspektroskopie detektiert werden.

[0109] Sobald die Sequenz des bioaktiven Mittels und/oder der bioaktiven Nucleinsäure gerettet ist, kann sie bestimmt werden. Diese Information kann in unterschiedlicher Weise genutzt werden.

[0110] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das bioaktive Mittel resynthetisiert und erneut in die Zielzellen eingesetzt, um die Wirkung zu überprüfen. Dies kann unter Einsatz von Retroviren oder alternativ von Fusionen mit dem HIV-1-Tat-Protein sowie Analogen und verwandten Proteinen erfolgen, was für sehr hohe Aufnahme in die Zielzellen sorgt. Siehe z. B. Fawell et al., PNAS USA 91, 664 (1994); Frankel et al., Cell 55, 1189 (1988); Savion et al., J. Biol. Chem. 256, 1149 (1981); Derossi et al., J. Biol. Chem. 269, 10444 (1994); und Baldin et al., EMBO J. 9: 1511 (1990).

[0111] In einer bevorzugten Ausführungsform dient die Sequenz eines bioaktiven Mittels dazu, mehr bioaktive

Kandidatenmittel zu erzeugen. Beispielsweise kann die Sequenz des bioaktiven Mittels die Basis einer zweiten Runde von (Bias-) Randomisierungen sein, um bioaktive Mittel mit gesteigerter oder modifizierter Aktivität zu entwickeln. alternativ dazu kann die zweite Randomisierungsrunde die Affinität des bioaktiven Mittels verändern. Außerdem ist es möglicherweise wünschenswert, die identifizierte Random-Region des bioaktiven Mittels in andere Präsentationsstrukturen zu inkorporieren oder die Sequenz der Konstantregion der Präsentationsstruktur bzw. die Konformation/Form des bioaktiven Mittels zu verändern. Es kann ferner wünschenswert sein, um eine potenzielle Bindungsstelle „herumzugehen“ – dies in ähnlicher Weise wie bei der Mutagenese einer Bindungstasche, indem ein Ende der Ligandenregion konstant gehalten und das andere Ende randomisiert wird, um die Bindung des Peptids umzulagern.

[0112] In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet man entweder das bioaktive Mittel oder die dafür kodierende bioaktive Nucleinsäure zur Identifikation von Zielmolekülen, d. h. jener Moleküle, mit denen das bioaktive Mittel in Wechselwirkung steht. Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist, kann es primäre Zielmoleküle geben, an die sich das bioaktive Mittel direkt bindet oder auf die es direkt einwirkt, und es können sekundäre Zielmoleküle bestehen, die Teil des durch das bioaktive Mittel beeinflussten Signallisierungspfads sind; diese kann man als „validierte Ziele“ bezeichnen.

[0113] In einer bevorzugten Ausführungsform dient das bioaktive Mittel zum Herausziehen von Zielmolekülen. Wenn z. B. – wie hierin ausgeführt – die Zielmoleküle Proteine sind, kann die Verwendung von Epitopmarkern oder Reinigungssequenzen die Reinigung primärer Zielmoleküle durch biochemische Mittel ermöglichen (Co-Immundefällung, Affinitätssäulen usw.). Alternativ dazu kann das Peptid, wenn es in Bakterien exprimiert und gereinigt ist, als Sonde gegen eine bakterielle cDNA-Expressionsbibliothek aus der mRNA des Zielzelltyps verwendet werden. Es können in Hefe oder Säugetiersystemen mit zwei oder drei Hybriden Peptide auch als „Köder“ verwendet werden. Solche Vorgangsweisen auf der Basis von Wechselwirkung und Klonierung werden in großem Ausmaß gewählt, um DNA-Bindungsproteine und andere in Wechselwirkung stehende Proteinkomponenten zu isolieren. Das Peptid bzw. die Peptide kann/können mit anderen pharmakologischen Aktivatoren kombiniert werden, um die epistatischen Beziehungen der jeweiligen Signaltransduktionspfade zu untersuchen. Es ist auch möglich, markiertes bioaktives Peptidmittel synthetisch zu produzieren und es dazu zu verwenden, eine in Bakteriophagen exprimierte cDNA-Bibliothek auf jene cDNA zu screenen, die das Peptid binden. Außerdem ist es möglich, dass man cDNA-Klonierung mittels retroviraler Bibliotheken durchführt, um die durch das Peptid hervorgerufene Wirkung zu „komplementieren“. In einer solchen Strategie wäre es erforderlich, dass das Peptid einen wichtigen Faktor für einen spezifischen Signallisierungspfad stöchiometrisch wegtitriert. Wenn dieses Molekül oder diese Aktivität durch Überexpression einer cDNA aus einer cDNA-Bibliothek wiederaufgefüllt wird, kann man das Ziel klonieren. Ebenso können cDNA, die durch ein beliebiges der obigen Hefe- oder Bakteriophagen-Systeme kloniert sind, auf diese Weise wieder in Säugetierzellen eingesetzt werden, um zu bestätigen, dass sie die Funktion im System, auf das das Peptid einwirkt, komplementieren.

[0114] Sobald primäre Zielmoleküle identifiziert wurden, können sekundäre Zielmoleküle in gleicher Weise identifiziert werden, wobei das primäre Ziel als „Köder“ fungiert. Auf diese Weise kann man Signallisierungspfade ermitteln. Ebenso lassen sich für sekundäre Zielmoleküle spezifische bioaktive Mittel entdecken, sodass einige bioaktive Mittel auf einen einzelnen Pfad einwirken, z. B. für Kombinationstherapien.

[0115] Die Screening-Verfahren der Erfindung eignen sich dazu, eine große Anzahl von Zelltypen unter sehr unterschiedlichen Bedingungen zu screenen. Im Allgemeinen sind die Wirtszellen, die an Krankheitszuständen beteiligt sind, und sie werden unter Bedingungen gescreent oder getestet, die normalerweise zu unerwünschten Folgen für die Zellen führen. Wenn ein geeignetes bioaktives Mittel gefunden wird, kann die unerwünschte Wirkung reduziert oder eliminiert werden. Alternativ dazu können normalerweise erwünschte Folgen reduziert oder eliminiert werden, wobei das Augenmerk hier darauf liegt, die zellulären Mechanismen aufzuklären, die mit dem Krankheitszustand oder dem Signallisierungspfad assoziiert sind.

[0116] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren in Krebsanwendungen. Die Fähigkeit, Tumorzellen rasch und spezifisch abzutöten, ist ein wesentlicher Bestandteil der Krebs-Chemotherapie. Im Allgemeinen können unter Anwendung der vorliegenden Verfahren Random-Bibliotheken in jede Tumorzelle (primär oder kultiviert) eingesetzt und Peptide identifiziert werden, die von sich aus Apoptose, Zelltod, Schwund von Zellteilung oder reduziertes Zellwachstum hervorrufen. Dies kann de novo erfolgen oder durch Bias-Randomisierung in Richtung bekannter Peptidmittel wie etwa Angiostatin, das das Wachstum von Blutgefäßwänden hemmt. Alternativ dazu können die Verfahren der Erfindung mit anderen Krebstherapien kombiniert werden (z. B. Medikamente oder Bestrahlung), um die Zellen zu sensibilisieren und somit rasche und spezifische Apoptose, Zelltod, Schwund von Zellteilung oder reduziertes Zellwachstum nach Exposition gegenüber einem sekundären Mittel hervorzurufen. Ebenso können die vorliegenden Verfahren in Verbindung mit bekannten Krebstherapien eingesetzt werden, um auf Agonisten zu screenen und dadurch die Therapie effektiver oder weniger toxisch zu machen. Dies ist insbesondere dann vorzuziehen, wenn das chemotherapeutische Mittel sehr kostspielig ist, z. B. Taxol.

[0117] Bekannte Onkogene wie z. B. v-Src, v-Ras und andere induzieren einen transformierten Phä-

notyp, der zu abnormalem Zellwachstum führt, wenn Transfektion in bestimmte Zellen vorliegt. Dies ist auch bei Mikro-Metastasen ein großes Problem. In einer bevorzugten Ausführungsform können somit nicht-transformierte Zellen mit diesen Onkogenen transfiziert und dann Random-Bibliotheken in diese Zellen inseriert werden, um bioaktive Mittel auszuwählen, die den transformierten Zustand reversieren oder korrigieren. Eines der wesentlichen Merkmale der Onkogen-Transformation von Zellen ist der Verlust an Kontakthemmung und die Fähigkeit, in Weichagar zu wachsen. Wenn transformierende Viren mit v-Abl, v-Src oder v-Ras in retroviralen IRES-puro-Vektoren konstruiert; in in Ziel-3T3-Zellen infiziert und Puromycin-Selektion ausgesetzt werden, durchlaufen alle 3T3-Zellen eine Hypertransformation und lösen sich von der Platte. Die Zellen können durch Waschen mit frischem Medium entfernt werden. Dies kann als Grundlage eines Screens dienen, da Zellen, die ein bioaktives Mittel exprimieren, an der Platte befestigt bleiben und Kolonien bilden.

[0118] Ebenso wird das Wachstum und/oder Ausbreiten bestimmter Tumortypen durch stimulierende Reaktionen aus Wachstumsfaktoren und Cytokinen (PDGF, EGF, Heregulin usw.), die sich an Rezeptoren auf der Oberfläche spezifischer Tumore binden, verstärkt. In einer bevorzugten Ausführungsform dienen die Verfahren der Erfindung dazu, das Wachstum und/oder Ausbreiten von Tumoren zu hemmen oder zu stoppen, indem bioaktive Mittel identifiziert werden, die die Fähigkeit des Wachstumsfaktors oder Cytokins blockieren können, die Tumorzelle zu stimulieren. An die Einführung von Random-Bibliotheken in spezifische Tumorzellen mit der Zugabe des Wachstumsfaktors oder Cytokins schließt sich die Auswahl bioaktiver Mittel, die die Bindung, Signalisierung und phenotypischen und/oder funktionellen Reaktionen dieser Tumorzellen auf den jeweiligen Wachstumsfaktor oder das jeweilige Cytokin blockieren.

[0119] Ebenso ist die Ausbreitung von Krebszellen (Invasion und Metastase) ein signifikantes Problem, das den Erfolg von Krebstherapien einschränkt. Die Fähigkeit, die Invasion und/oder Migration spezifischer Tumorzellen zu hemmen, wäre ein beträchtlicher Fortschritt in der Krebstherapie. Tumorzellen, die bekanntermaßen ein hohes metastatisches Potenzial aufweisen (z. B. Melanom, Lungenzellkarzinom, Brust- und Eierstockkarzinom) können Random-Bibliotheken inseriert bekommen, und es werden auch Peptide selektiert, die in einem Migrations- oder Invasionstest die Migration und/oder Invasion spezifischer Tumorzellen hemmen. Konkrete Anwendungen für die Hemmung des metastatischen Phänotyps, die eine spezifischere Hemmung der Metastase erlauben würden, sind z. B. das Metastase-Suppressor-Gen NM23, das für eine Dinucleosiddiphosphat-Kinase kodiert. Somit könnten intrazelluläre Peptidaktivatoren dieses Gens Metastase blockieren, und ein Screen auf seine Hochregulierung (durch Fusionieren mit einem Reporter-Gen) wäre von Interesse. Viele Onkogene verstärken die Metastase. Peptide, die mutierte RAS-Onkogene, v-MOS, v-RAF, A-RAF, v-SRC, v-FES und v-FMS inaktivieren oder konterkrieren, würden auch als Anti-Metastatika dienen. Peptide, die intrazellulär wirken, um die Freisetzung von Kombinationen von für die Invasion notwendigen Proteasen zu blockieren, z. B. die Matrix-Metalloproteasen und Urokinase, könnten auch effiziente Anti-Metastatika sein.

[0120] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Random-Bibliotheken der Erfindung in Tumorzellen eingeführt, die bekanntermaßen inaktivierte Tumorsuppressor Gene enthalten; eine erfolgreiche Umkehr entweder durch Reaktivierung oder Kompensierung des „Knockouts“ würde durch Wiederherstellung des normalen Phänotyps gescreent. Ein wichtiges Beispiel dafür ist die Umkehr der p53-inaktivierenden Mutationen, die in 50% oder mehr aller Karzinome vorhanden sind. Da die p53-Wirkungsweise komplex ist und die Funktion als Transkriptionsfaktor umfasst, gibt es wahrscheinlich mehrere Möglichkeiten für ein Peptid oder kleines Molekül aus einem Peptid, die Mutation umzukehren. Ein Beispiel dafür wäre die Hochregulierung der sofort stromab gelegenen Cyclin-abhängigen Kinase p21CIP1/WAF1. Um nützlich zu sein, müsste eine solche Umkehr für viele der unterschiedlichen bekannten p53-Mutationen funktionieren. Diese Frage wird derzeit durch Gentherapien abgeklärt; ein oder mehrere kleine Moleküle, die dies bewerkstelligen, wären vorzuziehen.

[0121] Ein weiteres Beispiel umfasst das Screenen bioaktiver Mittel, die die konstitutive Funktion der brca-1- oder brca-2-Gene wiederherstellen, und anderer Tumorsuppressor-Gene, die in der Brustkrebsforschung von Bedeutung sind, z. B. das adenomatöse-Polipose-coli-Gen (APC) und das Drosophila-discs-large-Gen (Dig), die Komponenten der Zelle-Zelle-Verbindungsstellen sind. Mutationen von brca-1 sind in vererbten Eierstock- und Brustkarzinomen von Bedeutung und stellen eine weitere Anwendung der Erfindung dar.

[0122] In einer bevorzugten Ausführungsform dienen die Verfahren der Erfindung dazu, neuartige Zelllinien aus Karzinomen von Patienten zu bilden. Ein retroviral zugeführtes kurzes Peptid, das den finalen gemeinsamen Pfad programmierten Zelltods hemmt, sollte die Bildung kurz- und möglicherweise auch langlebiger Zelllinien ermöglichen. Die Bedingungen der in vitro-Kultur und Infektion von Human-Leukämiezellen werden festgelegt. Es besteht eine echte Notwendigkeit, Verfahren zu entwickeln, die die Aufrechterhaltung bestimmter Tumorzellen in Kultur über ausreichend lange Zeit ermöglichen, um physiologische und pharmakologische Studien durchführen zu können. Es wurden bereits einige Human-Zelllinien mittels transformierender Mittel wie z. B. des Epstein-Barr-Virus geschaffen, das die existierende Physiologie der Zelle beträchtlich verändert. Manchmal wachsen Zellen in Kultur von selbst, doch dies ist ein zufälliges Ereignis. Programmierter Zelltod (Apoptose) tritt mittels komplexer Signalisierungspfade innerhalb von Zellen ein, die schließlich einen finalen gemeinsamen Pfad aktivieren, der zu charakteristischen Änderungen in der Zelle und zu einer nichtentzündlichen Zerstörung der Zelle führt. Es ist allgemein bekannt, dass Tumorzellen einen hohen apoptotischen Index

bzw. die Neigung aufweisen, in die Apoptose in vivo einzutreten. Wenn sich Zellen in Kultur befinden, werden die In-vivo-Stimuli für malignes Zellwachstum entfernt und Zellen problemlose Apoptose ausgesetzt. Das Ziel würde darin bestehen, die Technologie zur Bildung von Zelllinien aus einer beliebigen Anzahl primärer Tumorzellen, z. B. primärer Human-Leukämiezellen, in reproduzierbarer Weise ohne Veränderung der nativen Konfiguration der Signalisierungspfade in diesen Zellen zu entwickeln. Durch Einführung von Nucleinsäuren wird das Kodieren für Peptide erreicht, die Apoptose, verstärktes Überleben von Zellen in vitro und somit die Möglichkeit inhibieren, Signalisierungs-Transduktionspfade in primären Human-Tumorzellen zu studieren. Darüber hinaus können diese Verfahren zum Kultivieren primärer Zellen, d. h. Nicht-Tumorzellen, angewendet werden.

[0123] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren in kardiovaskulären Anwendungen. In einer bevorzugten Ausführungsform können Kardiomyozyten auf die Prävention von Zellschädigung oder -tod bei Vorhandensein normalerweise krankheitsverursachender Zustände gescreent werden; Beispiele dafür sind u. a. die Gegenwart toxischer Arzneimittel (insbesondere chemotherapeutischer Medikamente), z. B. zwecks Verhinderung von Herzversagen nach Behandlung von Adriamycin; Anoxie, z. B. bei Koronararterien-Okklusion; und autoimmune Zellschädigung durch angriff aktiverer Lymphoidzellen (z. B. bei postviraler Myokarditis und Lupus). Bioaktive Kandidatenmittel werden in Kardiomyozyten inseriert, die Zellen dem Insult ausgesetzt und bioaktive Mittel selektiert, die einen oder mehrere der folgenden Zustände verhindern: Apoptose; Membran-Depolarisation (d. h. Reduktion des arrhythmogenen Potenzials von Insult); Anschwellen bzw. Aufquellen von Zellen; oder Eindringen spezifischer intrazellulärer Ionen, sekundärer Messenger und aktivierender Moleküle (z. B. Arachidonsäure und/oder Lysophosphatidinsäure).

[0124] In einer bevorzugten Ausführungsform dienen die vorliegenden Verfahren dazu, auf reduziertes Arrhythmie-Potenzial in Kardiomyozyten zu screenen. Die Screens umfassen die Einsetzung von für bioaktive Kandidatenmittel kodierenden Kandidaten-Nucleinsäuren, gefolgt vom Anlegen arrhythmogener Insulte sowie dem Screenen auf bioaktive Mittel, die spezifische Depolarisation der Zellmembran blockieren. Dies kann mittels Patch-Clamps oder über Fluoreszenztechniken detektiert werden. Ebenso könnte Kanalaktivität (z. B. Kalium- und Chloridkanäle) in Kardiomyozyten unter Anwendung der vorliegenden Verfahren reguliert werden, um die Kontraktilität zu verbessern und Arrhythmien zu verhindern oder zu verringern.

[0125] In einer bevorzugten Ausführungsform dienen die vorliegenden Verfahren zum Screenen auf gesteigerte kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten und reduziertes Herzinsuffizienz-Potenzial. Die Insertion der Bibliotheken der Erfindung und die anschließende Messung der Veränderungsrate von Myosin-Polymerisation/-Depolymerisation mittels Fluoreszenztechniken stellt eine Möglichkeit dar. Bioaktive Mittel, die die Veränderungsrate dieses Phänomens erhöhen, können zu stärkerer kontraktiler Response des gesamten Myokards führen, wobei dies der Wirkung bei Digitalis ähnelt.

[0126] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren zur Identifikation von Mitteln, die zwecks Arrhythmie-Prävention die intrazelluläre und sarkolemme Calcium-Zyklisierung in Kardiomyozyten regulieren. Bioaktive Mittel werden ausgewählt, die den Natrium-Calcium-Austausch, die Natrium-Protonenpumpen-Funktion und die Calcium-ATPase-Aktivität regulieren.

[0127] In einer bevorzugten Ausführungsform kommen die vorliegenden Verfahren zur Identifikation von Mitteln zur Anwendung, die Embolie-Phänomene in Arterien und Arteriolen, die Schlaganfälle (und andere Verschlussereignisse, die zu Nierenversagen und Ischämie der Gliedmaßen führen) und Angina pectoris mit nachfolgendem Myokardinfarkt bewirken. Beispielsweise sind bioaktive Mittel ausgewählt, die die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten und somit die okkludierenden Ereignisse reduzieren. Die Adhäsion kann in diesem Zusammenhang durch die Bibliotheken der Erfindung verhindert werden, die in Endothelzellen (ruhende Zellen oder aktiviert durch Cytokine, d. h. IL-1, und Wachstumsfaktoren, d. h. PDGF/EGF) inseriert sind; anschließend wird auf Peptide gescreent, die entweder (1) Adhäsionsmolekül-Expression auf der Oberfläche der Endothelzellen herabregulieren (Bindungstest); (2) Adhäsionsmolekül-Aktivierung auf der Oberfläche dieser Zellen blockieren (Signalisierungstest); oder (3) Peptide autokrin freisetzen, die Rezeptorbindung am verwandten Rezeptor auf der anhaftenden Zelle blockieren.

[0128] Embolie-Phänomene können auch behandelt werden, indem proteolytische Enzyme auf den Zelloberflächen von Endothelzellen aktiviert werden, wodurch aktives Enzym freigesetzt wird, das Blutgerinnsel verdauen kann. Auf diese Weise erfolgt die Zufuhr der Bibliotheken der Erfindung zu Endothelzellen; anschließend finden herkömmliche fluorogene Tests statt, die die Überwachung proteolytischer Aktivität auf der Zelloberfläche in Richtung eines bekannten Substrats ermöglichen. Bioaktive Mittel können dann ausgewählt werden, die spezifische Enzyme in Richtung spezifischer Substrate aktivieren.

[0129] In einer bevorzugten Ausführungsform kann arterielle Entzündung im Zusammenhang mit Vaskulitis und Postinfarkt reguliert werden, indem die chemotaktischen Reaktionen von Leukozyten und mononuclearen Leukozyten verringert werden. Dies kann durch Blockieren chemotaktischer Rezeptoren und ihrer reagierenden Pfade auf diesen Zellen erfolgen. Bioaktive Kandidaten-Bibliotheken können in diese Zellen inseriert und die chemotaktische Response auf diverse Chemokine (z. B. die IL-8-Familie von Chemokinen, RANTES) in Zellmigrationstests inhibiert werden.

[0130] In einer bevorzugten Ausführungsform kann arterielle Restenose und anschließende koronare Angioplastie durch Regulieren der Proliferation vaskulärer intimaler Zellen und kapillarer und/oder arterieller Endothelzellen gesteuert werden. Bioaktive Kandidaten-Bibliotheken können in diese Zelltypen inseriert und ihre Proliferation als Reaktion auf spezifische Stimuli überwacht werden. Eine Anwendung sind z. B. intrazelluläre Peptide, die die Expression oder Funktion von c-myc und anderer Onkogene in Glattmuskelzellen blockieren und dadurch ihre Proliferation stoppen. Eine zweite Anwendung ist z. B. die Expression von Bibliotheken in vaskulären Glattmuskelzellen, um ihre Apoptose selektiv zu induzieren. Die Anwendung kleiner Moleküle aus diesen Peptiden kann gezielte Medikamentenzufuhr erfordern; dies ist mit Stents, Hydrogel-Beschichtungen und Infusions-basierten Kathetersystemen möglich. Peptide, die Endothelin-1A-Rezeptoren herabregulieren oder die die Freisetzung des hochwirksamen Vasokonstriktor- und vaskulären Glattmuskelzellen-Mitogen-Endothelin-1 blockieren, sind möglicherweise auch Kandidaten als Therapeutikum. Es können Peptide aus diesen Bibliotheken isoliert werden, die das Wachstum dieser Zellen hemmen oder die Haftung anderer Zellen im Kreislauf verhindern, die bekanntermaßen autokrine Wachstumsfaktoren freisetzen, z. B. Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) und mononukleare Leukozyten.

[0131] Die Steuerung von kapillarem und Blutgefäßwachstum ist ein wichtiges Ziel, um verstärkte Durchblutung in ischämischen Bereichen (Wachstum) zu fördern oder die Durchblutung von Tumoren zu unterbinden (Angiogenese-Hemmung). Kandidaten von Bibliotheken bioaktiver Mittel können in die kapillaren Endothelzellen inseriert und ihr Wachstum überwacht werden. Stimuli wie z. B. niedrige Sauerstoffspannung und variierende Grade angiogener Faktoren können die Responses regulieren, und es können Peptide isoliert werden, die den geeigneten Phänotyp produzieren. Das Screenen auf Antagonismus von vaskulärem Endothelzellen-Wachstumsfaktor (in der Angiogenese von Bedeutung) wäre ebenfalls nützlich.

[0132] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren zum Screenen auf Reduktion von Atherosklerose-induzierenden Mechanismen, um Peptide zu identifizieren, die LDL- und HDL-Metabolismus regulieren. Kandidaten Bibliotheken können in die entsprechenden Zellen inseriert werden (z. B. Hepatozyten, mononukleare Leukozyten, Endothelzellen) und Peptide selektiert werden, die zu niedrigerer Freisetzung von LDL oder geringerer Synthese von LDL oder auch zu einer erhöhten Freisetzung von HDL oder einer stärkeren Synthese von HDL führen.

[0133] Es können auch bioaktive Mittel von Kandidaten-Bibliotheken isoliert werden, die die Produktion von oxidiertem LDL reduzieren (ist an Atherosklerose beteiligt und wurde aus atherosklerotischen Läsionen isoliert). Dies könnte stattfinden, indem die Expression verringert wird, wodurch reduzierende Systeme oder Enzyme aktiviert werden, oder indem die Aktivität oder Produktion von Enzymen blockiert wird, die an der Produktion von oxidiertem LDL beteiligt sind, z. B. 15-Lipoxygenase in Makrophagen.

[0134] In einer bevorzugten Ausführungsform kommen die vorliegenden Verfahren in Screens zur Regulierung von Adipositas mittels Steuerung von Nahrungsaufnahme-Mechanismen oder Verringerung der Reaktionen von den Metabolismus regulierenden Rezeptor-Signalisierungspfaden zur Anwendung. Bioaktive Mittel, die die Reaktionen von Neuropeptid Y- (NPY-), Cholecystokin- und Galanin-Rezeptoren regulieren oder inhibieren, sind besonders wünschenswert. Kandidaten-Bibliotheken können in Zellen inseriert werden, in denen diese Rezeptoren kloniert sind, und es können Hemmerpeptide selektiert werden, die autokrin sekretiert werden und die Signalisierungsreaktionen auf Galanin und NPY blockieren. In ähnlicher Weise kann man Peptide identifizieren, die den Leptinrezeptor regulieren.

[0135] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren für Anwendungen im Bereich der Neurobiologie. Kandidaten-Bibliotheken können zum Screenen auf Anti-Apoptotika für die Konservierung neuronaler Funktion und Prävention von neuronalem Tod verwendet werden. Die anfänglichen Screens würden in Zellkultur stattfinden. Eine Anwendung würde die Prävention von neuronalem Tod durch Apoptose in zerebraler Ischämie als Folge von Schlaganfall vorsehen. Apoptose wird bekanntermaßen durch neuronales Apoptose-Inhibitionsprotein (NAIP) blockiert; Screens betreffend seine Hochregulierung oder die Durchführung eines gekoppelten Schritts würden Peptide liefern, die neuronale Apoptose selektiv blockieren. Andere Anwendungen betreffen neurodegenerative Krankheiten wie etwa Alzheimer-Krankheit oder Chorea Huntington.

[0136] In einer bevorzugten Ausführungsform finden die vorliegenden Verfahren in Anwendungen im Bereich der Knochenbiologie Anwendung. Ostoklasten spielen bekanntermaßen in der Knochen-Remodellierung durch Aufbrechen „alter Knochensubstanz“ eine wesentliche Rolle – sie können auf diese Weise „neuen“ Knochen schaffen. In der Osteoporose liegt ein Ungleichgewicht dieses Prozesses statt. Die Osteoklasten-Überaktivität kann durch Insertieren von Kandidaten-Bibliotheken in diese Zellen und anschließende Identifizierung bioaktiver Mittel reguliert werden, welche Mittel (1) eine abgesenkte Verarbeitung von Kollagen durch diese Zellen; (2) weniger Lachbildung auf Knochenspänen; und (3) geringere Freisetzung von Calcium aus Knochenfragmenten bewirken.

[0137] Die vorliegenden Verfahren eignen sich auch zum Screenen auf Agonisten knochenmorphogener Proteine sowie Hormonmimetika zur Stimulierung, Regulierung oder Intensivierung neuer Knochenbildung (in ähnlicher Weise wie Parathormon und Calcitonin, um nur einige Beispiele zu nennen). Diese finden in Osteo-

porose, bei schlecht heilenden Brüchen und zur Beschleunigung der Heilungsrate neuer Brüche Anwendung. Außerdem können Zelllinien aus Bindegewebe mit Kandidaten-Bibliotheken behandelt und auf ihr Wachstum, ihre Proliferation, ihre Kollagen-stimulierende Aktivität und/oder Prolin-inkorporierende Fähigkeit auf den Ziel-Osteoblasten gescreent werden. Alternativ dazu können Kandidaten-Bibliotheken direkt in Osteoblasten oder Chondrozyten exprimiert und auf verstärkte Produktion von Kollagen oder Knochen gescreent werden.

[0138] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die vorliegenden Verfahren in Anwendungen im Bereich der Hautbiologie angewendet. Keratinocyten-Responses auf einer Vielzahl an Stimuli können zu Psoriasis, einer proliferativen Änderung in diesen Zellen, führen. Kandidaten-Bibliotheken können in Zellen inseriert werden, die aus aktiven psoriatischen Plaques entfernt sind, und bioaktive Mittel isoliert werden, die die Wachstumsrate dieser Zellen verlangsamen.

[0139] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren zur Regulierung oder Hemmung von Keloid-Bildung (d. h. übermäßiger Narbenbildung). Kandidaten-Bibliotheken, die in Hautbindegewebe-Zellen inseriert sind, werden aus Individuen mit diesem Krankheitszustand ebenso isoliert wie bioaktive Mittel, die die Proliferation, Kollagen-Bildung oder Prolin-Inkorporation verringern. Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeiten können auch zur Behandlung exzessiver Narbenbildung herangezogen werden, die bei Patienten mit Brandwunden vorkommt. Wenn ein gemeinsames Peptidmotiv im Zusammenhang mit der Arbeit mit Keloid identifiziert wird, kann es in unterschiedlicher Weise topisch eingesetzt werden, um die Vernarbung nach den Brandverletzungen zu verringern.

[0140] Ebenso kann die Wundheilung für Diabetes-Geschwüre und andere Fälle chronischer „Heilungsinsuffizienz“ auf der Haut und den Extremitäten reguliert werden, indem zusätzliche Wachstumshormone den Zellen bereitgestellt werden, die: die Haut und dermale Schichten bevölkern. Wachstumsfaktor-Mimetika können für diese Fälle sehr nützlich sein. Kandidaten-Bibliotheken können in die Hautbindegewebe-Zellen inseriert und bioaktive Mittel isoliert werden, die das Wachstum dieser Zellen unter „rauen“ Bedingungen wie z. B. niedriger Sauerstoffspannung, niedrigem pH-Wert und in Gegenwart von Entzündungsmediatoren fördern.

[0141] Kosmetisch-pharmazeutische Anwendungen der vorliegenden Erfindung beinhalten die Steuerung der Melanin-Produktion in Haut-Melanozyten. Ein natürlich vorkommendes Peptid, Arbutin, ist ein Tyrosin-Hydroxylase-Hemmer, ein wesentliches Enzym für die Synthese von Melanin. Kandidaten-Bibliotheken können in Melanocyten inseriert und bekannte Stimuli, die die Synthese von Melanin erhöhen, den Zellen zugeführt werden. Es können bioaktive Mittel isoliert werden, die die Synthese von Melanin unter diesen Bedingungen hemmen.

[0142] In einer bevorzugten Ausführungsform finden die vorliegenden Verfahren in der Endokrinologie Anwendung. Die Technologie retroviraler Peptid-Bibliotheken kann allgemein für jedes Endokrin-, Wachstumsfaktor-, Cytokin- oder Chemokin-Netzwerk angewendet werden, das ein Signalisierungspeptid oder Protein enthält, das entweder endokrin, parakrin oder autokrin agiert, sich an einen Rezeptor bindet oder ihn dimerisiert und eine Signalisierungskaskade aktiviert, die zu einem bekannten phänotypischen oder funktionellen Ergebnis führt. Die Verfahren werden durchgeführt, um ein Peptid zu isolieren, das entweder das erwünschte Hormon imitiert (d. h. Insulin, Leptin, Calcitonin, PDGF, EGF, EPO, GM-CSF, IL-1-17, Mimetika) oder eine Wirkung hemmt, indem entweder die Freisetzung des Hormons blockiert wird, seine Bindung an einen spezifischen Rezeptor oder ein spezifisches Trägerprotein (z. B. CRF-Bindungsprotein) blockiert wird oder die intrazellulären Reaktionen der spezifischen Zielzellen auf dieses Hormon inhibiert werden. Die Auswahl von Peptiden, die die Expression oder Freisetzung von Hormonen aus den Zellen verstärken, die sie normalerweise produzieren, könnte in zahlreichen Situationen zur Behandlung hormoneller Defizienz herangezogen werden.

[0143] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren zur Behandlung infektiöser Krankheiten. Virale Latenz (Herpesviren wie etwa CMV, EBV, HBV und andere Viren wie HIV) und ihre Reaktivierung stellen ein großes Problem dar, insbesondere in immunsupprimierten Patienten (Patienten mit AIDS und Transplantationspatienten). Die Fähigkeit, die Reaktivierung und Ausbreitung dieser Viren zu blockieren, ist ein wichtiges Ziel. Zelllinien, von denen man weiß, dass sie latente virale Infektion aufweisen oder gegenüber dieser anfällig sind, können mit dem spezifischen Virus infiziert und dann Stimuli an diese Zellen angelegt werden, die erwiesenermaßen zu Reaktivierung und viraler Replikation führen. Daran kann sich das Messen viraler Titer im Medium und die Bewertung von Zellen hinsichtlich phänotypischer Veränderungen anschließen. Kandidaten-Bibliotheken können dann in diese Zellen unter den obigen Bedingungen inseriert und Peptide isoliert werden, die das Wachstum und/oder die Freisetzung des Virus verringern oder blockieren. Wie bei Chemotherapeutika können diese Experimente auch mit Medikamenten durchgeführt werden, die zur Erreichung dieses Ergebnisses nur teilweise wirksam sind, und bioaktive Mittel isoliert werden, die die viruzide Wirkung dieser Medikamente fördern.

[0144] Ein Beispiel von vielen ist die Fähigkeit, HIV-1-Infektion zu blockieren. HIV-1 erfordert CD4 und einen Co-Rezeptor, der einer mehrerer sieben transmembraner G-Protein-gebundener Rezeptoren sein kann. Im Falle der Infektion von Makrophagen ist CCR-5 der erforderliche Co-Rezeptor, und es deutet vieles darauf hin, dass ein CCR-5-Block zu Resistenz gegenüber HIV-1-Infektion führt. Diese Aussage wird durch zwei Faktoren untermauert. Erstens ist bekannt, dass die natürlichen Liganden für CCR-5, die CC-Chemokine RANTES,

MIP1a und MIP1b für die CD8+-mediierte Resistenz gegenüber HIV verantwortlich sind. Zweitens sind Individuen, die für ein Mutanten-Allel von CCR-5 homozygot sind, vollkommen resistent gegenüber HIV-Infektion. Somit wäre ein Inhibitor der CCR-5/HIV-Wechselwirkung von enormem Interesse – sowohl für Biologen als auch für Kliniker. Die extrazellulären verankerten Konstrukte bieten hervorragend geeignete Instrumente für eine solche Entdeckung. In die transmembranen, Epitop-markierten Konstrukte mit Glycin-Serin-Tether (ss TM V G20 E TM) kann man eine zyklisierte Random-Peptidbibliothek der allgemeinen Sequenz CNNNNNNNNNNNC oder C-(X)_n-C einsetzen. Dann infiziert man eine Zelllinie, die CCR-5 mit Retroviren, die diese Bibliothek enthalten, exprimiert. Unter Verwendung eines Antikörpers gegen CCR-5 kann man FACS durchführen, um erwünschte Zellen auf der Basis der Bindung dieses Antikörpers am Rezeptor zu sortieren. Man kann annehmen, dass alle Zellen, die sich nicht an den Antikörper binden, Inhibitoren dieser Antikörper-Bindungsstelle enthalten. Diese Hemmer können im retroviralen Konstrukt weiter auf ihre Fähigkeit untersucht werden, den HIV-1-Eintritt zu hemmen.

[0145] Man weiß, dass Viren mittels spezifischer Rezeptoren in Zellen eindringen, um sich an Zellen zu binden (z. B. verwendet HIV CD4, das Coronavirus verwendet C13, das Mäuse-Leukämievirus verwendet Transportprotein, und das Masernvirus verwendet CD44) und mit den Zellen zu fusionieren (HIV verwendet Chemokin-Rezeptor). Kandidaten-Bibliotheken können in Zielzellen inseriert werden, die erwiesenermaßen gegenüber diesen Viren permissiv sind, und bioaktive Mittel isoliert werden, die die Fähigkeit dieser Viren blockieren, sich an spezifische Zielzellen zu binden und mit ihnen zu fusionieren.

[0146] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die vorliegende Erfindung für infektlöse Organismen angewendet. Intrazelluläre Organismen wie z. B. Mycobakterien, Listeria, Salmonellen, Pneumocystis, Yersinia, Leishmania und T. cruzi können innerhalb von Zellen fortbestehen, sich replizieren und in immunsupprimierten Patienten aktiv werden. Es befinden sich derzeit Arzneimittel auf dem Markt und in der Entwicklungsphase, die gegen diese Organismen entweder nur teilweise wirksam oder wirkungslos sind. Kandidaten-Bibliotheken können in spezifische, mit diesen Organismen infizierte Zellen inseriert (prä- oder post-Infektion) und bioaktive Mittel selektiert werden, die die intrazelluläre Zerstörung dieser Organismen in analoger Weise zu Magaininen ähnelnden intrazellulären „antibiotischen Peptiden“ fördern. Außerdem können Peptide ausgewählt werden, die die abtötenden Eigenschaften von Medikamenten verstärken, die bereits untersucht werden, aber selbst eine zu geringe Wirksamkeit aufweisen; wenn man sie allerdings mit einem, spezifischen Peptid aus einer Kandidaten-Bibliothek kombiniert, sind sie aufgrund eines synergistischen Mechanismus deutlich wirksamer. Schließlich können noch bioaktive Mittel isoliert werden, die den Metabolismus dieser intrazellulären Organismen solcherart verändern, dass ihr intrazellulärer Lebenszyklus durch Hemmen eines Schlüsselereignisses des Organismus beendet wird.

[0147] In großem Umfang verwendete Antibiotika besitzen bestimmte dosisabhängige und gewebespezifische Toxizitäten. Beispielsweise lässt sich renale Toxizität bei Verwendung von Gentamicin, Tobramycin und Ampotericin feststellen; Hepatotoxizität erkennt man bei Verwendung von INH und Rifampin; Knochenmarks-Toxizität ist ein Phänomen bei Verwendung von Chloramphenicol; und Thrombozyten-Toxizität stellt man bei Verwendung von Ticarcillin fest usw. Diese Toxizitäten schränken die Nützlichkeit der Antibiotika ein. Es können Kandidaten-Bibliotheken in die spezifischen Zelltypen eingesetzt werden, wo spezifische Veränderungen, die zu zellulärer Schädigung oder Apoptose durch die Antibiotika führen, auftreten, und bioaktive Mittel isoliert werden, die Schutz verleihen, wenn diese Zellen mit diesen spezifischen Antikörpern behandelt werden.

[0148] Ferner kommt die vorliegende Erfindung beim Screenen auf bioaktive Mittel zur Anwendung, die antibiotische Transportmechanismen blockieren. Die rasche Sekretion bestimmter Antibiotika aus dem Blutkreislauf schränkt deren Nützlichkeit ein. Beispielsweise werden Penicilline durch bestimmte Transportmechanismen in der Niere und dem Plexus choroideus im Gehirn rasch sekretiert. Man weiß, dass Probenecid diesen Transport blockiert und Serum- und Gewebewerte erhöht. Kandidatenmittel können in spezifische Zellen inseriert werden, die aus Nierenzellen und Zellen des Plexus choroideus abgeleitet sind und erwiesenermaßen aktive Transportmechanismen für Antibiotika besitzen. Bioaktive Mittel können dann isoliert werden, die den aktiven Transport spezifischer Antibiotika blockieren und somit die Serum-Halbwertszeit dieser Arzneimittel verlängern.

[0149] In einer bevorzugten Ausführungsform kommen die vorliegenden Verfahren in Anwendungen im Bereich Medikamententoxizität und -resistenz zu Tragen. Medikamententoxizität ist ein signifikantes klinisches Problem. Es kann sich als spezifische Gewebe- oder Zellschädigung manifestieren, sodass die Wirksamkeit des Arzneimittels eingeschränkt wird. Beispiele dafür sind Myeloablation in hochdosierter Krebs-Chemotherapie, Schädigung von Epithelzellen, die Luftwege und Darm auskleiden, und Haarnverlust. Beispiele sind Adriamycin-induzierter Kardiomyozyten-Tod, Cisplatin-induzierte Nierentoxizität, Vincristin-induzierte Darmmotilitäts-Störungen und Cyclosporin-induzierte Nierenschädigung. Es können Kandidaten-Bibliotheken in spezifische Zelltypen mit charakteristischen Medikamenten-induzierten phänotypischen oder funktionellen Reaktionen in Gegenwart der Medikamente eingesetzt und Mittel isoliert werden, die den spezifischen Zelltyp vor den toxischen Veränderungen bei Exposition gegenüber dem Medikament schützen oder diese Veränderungen umkehren. Diese Wirkungen können sich als Blockade der Medikamenten-induzierten Apoptose der Zelle von

Interesse manifestieren, wobei anfänglich durchgeführte Screens das Überleben der Zellen in Gegenwart hoher Werte an Medikamenten oder Kombinationen von Medikamenten (im Falle von Kombinations-Chemotherapie) betreffen.

[0150] Die Medikamententoxizität kann auf einen spezifischen Metaboliten zurückzuführen sein, der in der Leber oder Niere produziert wird und für spezifische Zellen hochgradig toxisch ist; sie kann auch auf Arzneimittel-Wechselwirkungen in der Leber zurückzuführen sein, die den Metabolismus eines verabreichten Medikaments blockieren oder fördern. Es können Kandidaten-Bibliotheken in die Leber- oder Nierenzellen inseriert und diese Zellen danach dem Arzneimittel ausgesetzt werden, das erwiesenermaßen den toxischen Metaboliten produziert. Bioaktive Mittel können isoliert werden, die die Metabolisierung des Medikaments durch die Leber- oder Nierenzellen verändern, und spezifische Mittel identifiziert werden, die die Erzeugung eines spezifischen toxischen Metaboliten verhindern. An die Erzeugung des Metaboliten kann sich Massenspektrometrie anschließen, und phänotypische Veränderungen lassen sich durch Mikroskopie beurteilen. Ein solcher Screen kann auch in kultivierten Hepatozyten erfolgen, die mit Readout-Zellen co-kultiviert sind, die für toxischen Metaboliten besonders sensitiv sind. Anwendungen umfassen reversible Inhibitoren von Enzymen (zur Beschränkung der Toxizität), die am Medikamenten-Metabolismus beteiligt sind.

[0151] Multiple Medikamentenresistenz und somit Tumorzellenselektion, -auswuchs und -rückfall bewirken Morbidität und Mortalität von Krebspatienten. Es können Kandidaten-Bibliotheken in Tumorzelllinien (primär und kultiviert) inseriert werden, die spezifische oder multiple Medikamentenresistenz zeigten. Dann kann man bioaktive Mittel identifizieren, die Medikamentensensitivität verleihen, wenn die Zellen dem Arzneimittel von Interesse oder Arzneimitteln, die in der Kombinations-Chemotherapie zur Anwendung kommen, ausgesetzt sind. Die Ablesung (Readout) kann in diesen Zellen der Beginn der Apoptose, der Veränderungen der Membranpermeabilität und der Freisetzung intrazellulärer Ionen und Fluoreszenzmarker sein. Die Zellen, in denen Multimedikamenten-Resistenz Membrantransporter umfasst, können mit fluoreszierenden Transportersubstraten vorbeladen werden, und die Selektion kann für Peptide erfolgen, die den normalen Ausfluss von fluoreszierendem Medikament aus diesen Zellen blockieren. Es sind jene Kandidaten-Bibliotheken für das Screening auf Peptide besonders geeignet, die schwach charakterisierte oder neu entdeckte intrazelluläre Resistenzmechanismen oder Mechanismen, für die derzeit wenige oder überhaupt keine Chemosensibilisatoren bestehen, z. B. Mechanismen mit LRP (Lungenresistenz-Protein), umkehren. Dieses Protein wurde mit der Multimedikamenten-Resistenz bei Eierstockkarzinom, metastatischem malignem Melanom und akuter Myeloidleukämie in Verbindung gebracht. Besonders interessante Beispiele sind das Screenen auf Mittel, die mehr als einen wichtigen Resistenzmechanismus in einer einzelnen Zelle umkehren (tritt in einer Untergruppe der meisten medikamentenresistenten Zellen auf, die auch wichtige Ziele sind). Anwendungen umfassen das Screenen auf Peptidhemmer sowohl von MRP (mit Multimedikamenten-Resistenz verwandtes Protein) als auch LRP bei akuter Myeloidleukämie oder zur Hemmung (durch einen beliebigen Mechanismus) aller drei Proteine zur Behandlung pan-resistenter Zellen.

[0152] In einer bevorzugten Ausführungsform eignen sich die vorliegenden Verfahren zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit bestehender oder sich in Entwicklungsphase befindlicher Arzneimittel. Der „First-pass“-Metabolismus oral verabreichter Medikamente schränkt ihre orale Bioverfügbarkeit ein, kann verringerte Wirksamkeit hervorrufen und es erforderlich machen, dass ein weiteres Medikament verabreicht wird, um die erwünschte Wirkung zu erzielen. Reversible Hemmen von Enzymen, die am First-pass-Metabolismus beteiligt sind, können demnach ein nützliches Instrument sein, das die Wirksamkeit dieser Arzneimittel erhöht. Der First-pass-Metabolismus tritt in der Leber ein; Inhibitoren der korrespondierenden katabolischen Enzyme können daher die Wirkung der jeweils verwandten Medikamente steigern. Reversible Hemmer würden gleichzeitig oder etwas vor dem Medikament von Interesse zugeführt. Das Screenen von Kandidaten-Bibliotheken in Hepatozyten für Inhibitoren (durch jeden beliebigen Mechanismus, z. B. Protein-Herabregulierung sowie direkte Hemmung von Aktivität) besonders problematischer Isozyme wäre von besonderem Interesse. Dazu zählen die CYP3A4-Isozye von Cytochrom P450, die am First-pass-Metabolismus der Anti-HIV-Medikamente Saquinavir und Indinavir beteiligt sind. Andere Anwendungen umfassen je nach dem Medikament reversible Inhibitoren von UDP-Glucuronyl-Transferasen, Sulfotransferasen, N-Acetyltransferasen, Epoxid-Hydrolasen und Glutathion-S-Transferasen. Screens würden in kultivierten Hepatozyten oder Lebermikrosomen erfolgen und könnten Antikörper, die spezifische Modifikationen in der Leber erkennen, oder co-kultivierte Readout-Zellen vorsehen, wenn der Metabolit eine andere Bioaktivität als das untransformierte Medikament hätte. Die das Arzneimittel modifizierenden Enzyme würden nicht notwendigerweise bekannt sein, wenn das Screening aufgrund mangelnder Veränderung des Arzneimittels erfolgt.

[0153] In einer bevorzugten Ausführungsform kommen die vorliegenden Verfahren in Anwendungen im Bereich Immunbiologie, Entzündung und allergischen Reaktionen zum Tragen. Die selektive Regulierung von T-Lymphozyten-Reaktionen ist ein erwünschtes Ziel, um immun-medierte Krankheiten spezifisch modulieren zu können. Es können Kandidaten-Bibliotheken in spezifische T-Zellen-Untergruppen (TH1, TH2, CD4+, CD8+ usw.) eingesetzt und die Reaktionen, die diese Untergruppen charakterisieren (Cytokin-Erzeugung, Cytotoxizität, Proliferation als Reaktion auf Antigen, das durch einen mononuclearen Leukozyten präsentiert wird,

usw.), durch Elemente der Bibliothek modifiziert werden. Es können Mittel ausgewählt werden, die die physiologische Reaktion der bekannten T-Zellen-Untergruppe verstärken oder verringern. Diese Vorgangsweise ist bei Vorliegen einiger Krankheitsbilder nützlich, z. B.: (1) Autoimmunerkrankungen, wo man einen toleranten Zustand erreichen möchte (Auswahl eines Peptids, das die T-Zellen-Untergruppe daran hindert, eine Selbstantigen-tragende Zelle zu erkennen); (2) allergische Krankheiten, wo man die Stimulation von IgE-produzierenden Zellen absenken möchte (Auswahl von Peptid, das die Freisetzung aus T-Zellen-Untergruppen spezifischer B-Zellen-stimulierender Cytokine blockiert, die den Wechsel zur IgE-Produktion induzieren); (3) bei Transplantationspatienten, wo man selektive Immunsuppression induzieren möchte (Auswahl von Peptid, das proliferative Reaktionen von Wirt-T-Zellen auf Fremdanigene reduziert); (4) in lymphoproliferativen Zuständen, wo man das Wachstum eines spezifischen T-Zellen-Tumors hemmen oder ihn gegenüber Chemotherapie und/oder Bestrahlung sensibilisieren möchte; (5) bei der Tumorkontrolle, wenn man die Abtötung zytotoxischer T-Zellen durch Fas-Liganden-tragende Tumorzellen hemmen möchte; und (5) in T-Zellen-medierten entzündlichen Erkrankungen wie z. B. bei primärchronischer Polyarthritis, Bindegewebe-Erkrankungen (SLE), multipler Sklerose und entzündlicher Darmerkrankung, wo man die Proliferation von krankheitsverursachenden T-Zellen hemmen (ihre selektive Apoptose fördern) und die resultierende selektive Zerstörung von Zielgeweben (Knorpel, Bindegewebe, Oligodendrozyten, Darm-Endothelzellen) hemmen möchte.

[0154] Die Regulierung von B-Zellen-Reaktionen ermöglicht eine selektivere Modulation des Typs und der Menge an Immunglobulin, das durch spezifische B-Zellen-Untergruppen produziert und sekretiert wird. Es können Kandidaten-Bibliotheken in B-Zellen inseriert und bioaktive Mittel selektiert werden, die die Freisetzung und die Synthese eines spezifischen Immunglobulins hemmen. Dies kann bei Autoimmunerkrankungen von Vorteil sein, die durch eine Überproduktion von Auto-Antikörpern und die Produktion von Allergie hervorgerufenen Antikörpern wie etwa IgE gekennzeichnet sind. Es können auch Mittel identifiziert werden, die die Bindung einer spezifischen Immunglobulin-Unterklasse an ein spezifisches Antigen (entweder Fremd- oder Eigen-Antigen) einschränken oder fördern. Schließlich können noch Mittel selektiert werden, die die Bindung einer spezifischen Immunglobulin-Unterklasse an ihren Rezeptor auf spezifischen Zelltypen hemmen.

[0155] In ähnlicher Weise können Mittel, die Cytokinen-Produktion beeinflussen, ausgewählt werden; dies erfolgt im Allgemeinen mit zwei Zellsystemen. Beispielsweise kann die Cytokinen-Produktion aus Makrophage, Monozyten usw. bewertet werden.

[0156] Ebenso können Mittel, die Cytokine imitieren, z. B. Erythropoetin und IL1-17, oder Mittel, die Cytokine binden, z. B. TNF- α , bevor sie sich an ihren Rezeptor binden, ausgewählt werden.

[0157] Die Antigen-Verarbeitung durch mononucleare Leukozyten (ML) ist ein wichtiger früher Schritt in der Fähigkeit des Immunsystems, Fremdproteine zu erkennen und zu eliminieren. Kandidatenmittel können in ML-Zelllinien inseriert und Mittel selektiert werden, die die intrazelluläre Verarbeitung von Fremdpeptiden und die Sequenz des Fremdpeptids, die den T-Zellen durch ML auf ihrer Zelloberfläche im Zusammenhang mit MHC der Klasse II präsentiert wird, verändern. Man kann Elemente dieser Bibliothek identifizieren, die Immunreaktionen auf eine bestimmte T-Zellen-Untergruppe verstärken (z. B. würde das Peptid tatsächlich als Impfstoff fungieren), oder man kann Elemente dieser Bibliothek identifizieren, die sich enger an MHC binden, wodurch natürlich vorkommende Peptide verschoben werden; trotzdem wäre das Mittel weniger immunogen (weniger stimulierend gegenüber einem spezifischen T-Zellen-Klon). Dieses Mittel würde Immuntoleranz induzieren und/oder Immunreaktionen auf Fremdproteine reduzieren. Dies könnte man sich in Transplantation, Autoimmunerkrankungen und allergischen Krankheiten zunutze machen.

[0158] Die Freisetzung entzündlicher Mediatoren (als Beispiele seien Cytokine, Leukotriene, Prostaglandine, Plättchen-aktivierender Faktor, Histamin, Neuropeptide und andere Peptide sowie Lipidmediatoren angeführt) ist ein wesentlicher Schritt bei der Aufrechterhaltung und Verstärkung atypischer Immunreaktionen. Kandidaten-Bibliotheken können in ML, Mastzellen, eosinophile und andere Zellen, die an einer spezifischen entzündlichen Response beteiligt sind, inseriert und bioaktive Mittel ausgewählt werden, die die Synthese, Freisetzung und Bindung an den verwandten Rezeptor jedes dieser Mediatoren hemmen.

[0159] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die vorliegenden Verfahren für biotechnologische Anwendungen herangezogen. Die Expression von Kandidaten-Bibliotheken in Säugetierzellen kann auch für andere pharmazeutischen Anwendungen in Frage kommen, z. B. für die Modifikation von Proteinexpression, Proteinfaltung oder Proteinsekretion. Ein solches Beispiel wäre die kommerzielle Produktion von Proteinpharmazeutika in CHO oder anderen Zellen. Kandidaten-Bibliotheken, die zu bioaktiven Mitteln führen, die hinsichtlich einer gesteigerten Zellwachstumsrate (möglicherweise Peptide, die Wachstumsfaktoren imitieren oder als Agonisten von Wachstumsfaktor-Signaltransduktionspfaden agieren), Pathogen-Resistenz (siehe obiger Abschnitt), Mangel an Sialylierung oder Glycosylierung (durch Blockieren von Glykyltransferasen oder „Rerouting-Trafficking“ des Proteins in der Zelle), Wachstumsförderung auf autoklavierten Medien oder Wachstum in serumfreien Medien selektieren, würden alle die Produktivität erhöhen und die Kosten für die Produktion von Proteinpharmazeutika senken.

[0160] Random-Peptid auf der Oberfläche zirkulierender Zellen können als Instrumente zur Identifikation von organ-, gewebe- und zellspezifischen Peptid-Targetingsequenzen fungieren. Jede Zelle, die in den Blut-

kreislauf eines Tiers eingeleitet wird und eine Bibliothek exprimiert, die auf die Zelloberfläche abzielt, kann für spezifisches Organ- und Gewebe-Targeting ausgewählt werden. Die identifizierte Sequenz des bioaktiven Mittels kann dann an einen Antikörper, ein Enzym, ein Medikament, ein bildgebendes Mittel oder eine Substanz gebunden werden, wofür Organ-Targeting erwünscht ist.

[0161] Andere Mittel, die unter Einsatz der Erfindung ausgewählt werden können, sind: (1) Mittel, die die Aktivität von Transkriptionsfaktoren mittels Zelllinien mit Reporter-Genen blockieren; (2) Mittel, die die Wechselwirkung zweier bekannter Proteine in Zellen blockieren und sich dabei das Fehlen normaler Zellfunktionen, das Säugetier-Zweihybrid-System oder Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-Mechanismen zur Detektion zunutze machen; und (3) Mittel können durch Tethering eines Random-Peptids an eine Protein-Bindungsregion identifiziert werden, um Wechselwirkungen mit Molekülen zu ermöglichen, die sterisch nahe sind, d. h. sich innerhalb eines Signalisierungspfads befinden, um die Wirkungen auf einen funktionellen Bereich von Interesse zu lokalisieren.

[0162] Die folgenden Beispiele dienen zur ausführlichen Beschreibung der besten Durchführungsmöglichkeiten der Erfindung und ihrer Aspekte. Man beachte, dass diese Beispiele keinesfalls den erfindungsgemäßen Schutzzumfang einschränken, sondern lediglich zur Veranschaulichung angeführt sind. Alle hierin angeführten Verweise sind zur Gänze aufgenommen.

BEISPIELE

Beispiel 1

Experimente für den Beweis des erfinderischen Konzepts

[0163] Es wurden einige Systeme verwendet, um zu beweisen, dass die hierin geoffenbarten retroviralen Konstrukte zu einem selektierbaren Phänotyp führen können.

BCL2 und CPP32 Schutz vor Apoptose

[0164] Es ist bekannt, dass BCL2 und das CPP32-Peptid in der Lage sind, Apoptose, die durch Tumornekrose-Faktor und Cycloheximid hervorgerufen wird, zu hemmen.

Apotag-Test: TUNEL (TdT-mediiertes dTP-Fluorescein-Nicken und Markieren), Boehringer Mannheim Kit, Katalognr. 168795

[0165] 3T3-Zellen, transient infiziert entweder mit MFGlacZ-, BCL2- oder CPP32-Plasmiden, wurden bis zu 50% Konfluenz zum Zeitpunkt der Induktion mit hTNF α (50 ng/ml Medium) und Cycloheximid (100 mg/ml Medium) 6 Stunden lang gezüchtet. Die Zellen wurden nach 6 Stunden gewaschen und 24 Stunden nach Induktion geerntet. Sie wurden durch Poolen aller Medien aus Zellen (um apoptotische schwimmende Zellen zu sammeln) mit den Waschlösungen und trypsinisierten Zellen geerntet. Die Zellen wurden zentrifugiert und mit PBS, die 1% BSA enthielt, gewaschen, in ein Eppendorf-Röhrchen übertragen und die Waschung einmal wiederholt.

[0166] Die Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur 30 Minuten lang fixiert, in PBS/BSA gewaschen und dann in Permeabilisationspuffer 2 Minuten lang auf Eis resuspendiert. Nach der Permeabilisation wurden die Zellen zweimal in PBS/BSA gewaschen und 1 Stunde lang mit Markierungspuffer bei 37°C inkubiert, welcher Puffer fluoresceiniertes dUTP, unmarkiertes Nucleotidgemisch und terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) enthielt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS/BSA gewaschen, in PBS/BSA resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen zwecks Analyse übertragen. Die Proben wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von BCL2 oder dem CPP32-Peptid in 3T3-Zellen aus einem retroviralen MCSV-Promotor in vivo Apoptose aufgrund von Tumornekrose-Faktor und Cycloheximid hemmen konnte.

Propidiumiodid-Einfärbung fixierter Zellen zwecks Testen auf Apoptose (Sherwood und Schimke, Methods in Cell Biology 46, 77-87 (1995))

[0167] 3T3-Zellen, transient infiziert mit MFGlacZ, BCL2 oder CPP32, wurden aufplattiert und mit GNF/CXH behandelt (Beschreibung siehe oben), geerntet und wie oben gewaschen. Die Zellen wurden in 70% Ethanol in PBS bei 4°C resuspendiert und bei 4°C über Nacht gehalten. Als die Zellen für FACS bereit waren, wurden sie wie folgt mit Propidiumiodid eingefärbt. Sie wurden bei 14.000 U/min 10 Sekunden lang zentrifugiert und einmal mit PBS/BSA gewaschen. Dann wurden die Zellen in 50 ml-Färbelösung (PBS mit 50 mg/ml RNase A, (DNase-frei) mit 10 mg/ml Propidiumiodid) resuspendiert und zumindest 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert und in PBS/BSA-Lösung resuspendiert, umfassend 10 mg/ml Propidiumiodid,

sowie durch FACS-Scannen analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von BCL2 oder CPP32-Peptid in 3T3-Zellen Apoptose aufgrund von Tumornekrose-Faktor und Cycloheximid hemmen konnte; dies wurde als Ausweitung der früheren Ergebnisse der Anmelder durch PI-Einfärbung von Zellen gemessen.

Ethidiumbromid/Acridinorange-Einfärbung von BAF3-Zellen zur Untersuchung der Zellmorphologie

[0168] BAF3-Zellen wurden mit retroviralen WZL IHRES NEO Vektoren infiziert, die kein Insert (WIN) oder DNA enthielten, die für LacZ (ZIN), BCL2 (BIN), CPP32-Peptid (CIN) oder verquirlten Peptidvergleich (PIN) enthielt. Die Zellen wurden nach Infektion mit obigen retroviralen Vektoren in G418 selektiert und die Überlebenden mit 5 mg/ml FAS-Antikörper stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit Ethidiumbromid und Acridinorange (jeweils 2 mg/ml) eingefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels eines UV-Filters visualisiert. 250 Zellen wurden gezählt und der Prozentsatz von apoptotischen Zellen berechnet. Analog zu den Ergebnissen, die man mit den mit TNF/CXH stimulierten 3T3-Zellen erhielt, können die für CPP32 ko-dierenden Vektoren FAS-induzierte Apoptose hemmen. Der Peptidvergleich übte in diesem System ebenfalls eine Wirkung aus, die etwa halb so stark war wie die mit BCL2 oder dem CPP32-Peptid.

Enzymatischer Test von CPP32-Aktivität; CPP32-Testkit Clontech CPP32 Colorimetric Assay Kit (Kat. Nr. K20272)

[0169] 3T3-Zellen wurden mit den in Teil 1, Abschnitt C beschriebenen Vektoren infiziert und vor dem Test in G418-Medium selektiert. 6-Napf-Platten von 3T3-Zellen nahezu bei Konfluenz wurden mit TNF/CXH wie oben stimuliert und nach 30 Minuten, 1, 2 und 4 Stunden nach Stimulation wie folgt geerntet. Die Zellen wurden wie oben trypsinisiert und gesammelt. Nach der Übertragung auf ein Eppendorf-Röhrchen wurden die Zellen zentrifugiert und in 50 ml gekühltem Zelllyse-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden 10 Minuten lang auf Eis inkubiert, dann wurden jedem Röhrchen 50 ml 2X Reaktionspuffer mit DTT zugesetzt. 5 ml des kolorimetrischen konjugierten Substrats (DEVD-Paranitroanilid, 50 mM Endkonzentration) wurden jedem Röhrchen zugesetzt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden auf eine 96-Napf-Platte übertragen und auf einem Spektralphotometer bei O. D. von 405 gelesen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellextrakte aus WIN-Zellen erhöhte CPP32-Enzymaktivität nach 2 Stunden aufwiesen (gemessen durch Aufspalten des DEVD-pNA-Substrats in seine kolorimetrisch detektierbare Form pNA). Nach 4 Stunden sterben die ersten Zellen ab, und die Aktivität verringert sich. In Zellen mit BCL2 oder dem CPP32-Peptid-Inhibitor kann man keinen Anstieg der Aktivität feststellen. Im Fall von BCL2 sollte er auf die Hemmung der Apoptose stromauf vom Enzym zurückzuführen sein. Im Fall des CPP32-Inhibitor-Peptids sollte er auf die direkte Hemmung enzymatischer Aktivität zurückzuführen sein. Diese in vitro-Ergebnisse stimmen mit jenen überein, die man in den oben erläuterten Zell-tod-Tests feststellt.

Lokalisierungsstudien unter Verwendung von PKC-Inhibitor

[0170] Mäuse-10T1/2-Klon 8-Zellen wurden mit PMA stimuliert, das bekanntermaßen Translokation von PKC aus dem Zytoplasma in den Nucleus bewirkt. Man geht davon aus, dass diese Translokation durch Bindung an ein Protein an der Wirkungsstelle mediert wird, die man als ein RAC- (Rezeptor für aktivierte Protein-Kinase C) Protein bezeichnet. Uninfizierte Klon 8-Zellen wurden mit Zellen verglichen, die mit retroviralen pBabe-Puro-Konstrukten infiziert sind, die Sequenzen enthalten, die entweder für mit Flu-Epitop (MGGGYPYDVPDY-AGSLZ) markierten verquirlten Peptidvergleich oder Inhibitorpeptid (GKQKTKTIKGGP) kodieren (ist identisch für die C2-Region aller PKC-Isozyme). Die Anmelder untersuchten dann die Zellen durch Immunhistochemie unter Verwendung eines für PKCa spezifischen Antikörpers und visualisierten mithilfe eines zweiten, an Meerrettich-Peroxidase gebundenen Antikörpers.

[0171] Dieses Experiment erfolgte in zwei unterschiedlichen Zelldichten und lief folgendermaßen ab:

1. Die Zellen wurden mit 2.000 Zellen/cm² auf 22 mm² große und mit Polylysin beschichtete Deckplättchen aufplattiert und 2 Tage lang gezüchtet. Bei 3/20 waren die Zellen fast konfluent. Die Zellen wurden mit niedrigerer Dichte erneut plattiert und unter identischen Bedingungen auf 3/27 getestet.
2. PMA wurde in 10⁻⁵ M dem Medium 30 Minuten lang bei 37°C zugesetzt.
3. Die Zellen wurden mit SCB-Puffer (physiologischer Puffer, vor der Verwendung auf 37°C vorerwärmt) gespült und dann in 3,7% Glutaraldehyd in SCB-Puffer 20 Minuten lang bei 37°C eingebracht.
4. Die Zellen wurden anschließend in SCB-Puffer gewaschen und dann 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit SCBT (SCB mit 0,1% Triton X-100) inkubiert.
5. Die Deckplättchen wurden aus der 6-Napf-Platte entfernt, mittels Eintauchen in 0,1% Tween/PBS bei Raumtemperatur gewaschen und auf Paraffin in einem abgedeckten Behälter gelegt.
6. Die Deckplättchen wurden mit 1,5% Ziegen-Blockierserum in PBS unter Schütteln in einer feuchten Umgebung bei Raumtemperatur inkubiert.

7. Lösungen wurden vom Deckplättchen abgesaugt und die Deckplättchen danach mit PBS gewaschen. Primärer Anti-PKCa-Antikörper wurde auf die Deckplättchen aufgebracht und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur wie oben inkubiert. Eine 1 : 500-Verdünnung des Antikörpers kam in allen Versuchen zur Anwendung.
8. Die Deckplättchen wurden mit PUBS dreimal gewaschen und anschließend 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Biotin-gebundenem Antikörper für den zweiten Schritt (stammte aus dem Santa Cruz ABC ImmunoStain Systems Kit) inkubiert. Die Deckplättchen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen.
9. Die Deckplättchen wurden anschließend mit Avidinbiotin-Enzymreagens (war Teil des Kits) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckplättchen wurden danach 10 Minuten lang in PBS gewaschen, nachdem sie wieder in 6-Napf-Platten gelegt worden waren.
10. Die Deckplättchen wurden mit 0,5% Triton X-100/PBS 30 Sekunden lang gespült und 5 Minuten lang in DAB-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser in den Napf abgebrochen.
11. Die Deckplättchen wurden dann durch Alkohole und Xylol dehydratisiert und auf Obekträger mit Permunt montiert sowie durch Lichtmikroskopie visualisiert und fotografiert.

[0172] Die Ergebnisse zeigten im Grunde genommen, dass die als Vergleich dienenden Klon 8-Zellen vor allem zytoplasmische und perinucleare Einfärbung aufwiesen, während PMA-induzierte Zellen Konsequenz Translokation zum Nucleus aufwiesen. Zellen, die mit Konstrukten infiziert sind, die für das verquirlte Peptid kodieren, zeigten ähnliche Einfärbung. Zellen, die mit Konstrukten infiziert sind, die für Peptide kodieren, die mit der C2-Region von PKC identisch sind, zeigten vor allem zytoplasmische und perinucleare Einfärbung (sowohl im Vergleich als auch in PMA-induzierten Zellen), was den Schluss nahe legt, dass dieses Peptid in der Lage ist, die Translokation von aktiviertem PKCa in sein RAC-Protein nach Stimulation der Zellen mit PMA spezifisch zu hemmen. Es ist unter Verwendung ähnlich infizierter Zellen ferner möglich, die stromabwärtigen Ergebnisse der Peptidexpression nach Gen-Aktivität zu sehen. Es wurden Zellen mit Retraviren infiziert, die entweder PKCb2.1, PKC2.1-Peptid, einen dominanten negativen ras-Proteinvergleich, Kombinationen dieser Viren oder überhaupt kein Virus exprimieren. Die Zellen wurden mit PMA bei 100 ng/ ml, PDGF-AA oder PDGF-BB stimuliert. mRNA wurde hergestellt und Northern Blots für fos-Gen-Expression (induziert durch PKC-Aktivierung) oder das ribosomale Protein PO durchgeführt, eine Beladungsvergleichs-mRNA, deren Expression offenbar nicht durch PKC-induzierte Signalisierungssysteme beeinflusst wird. Die PKC-Peptide können die Expression der fos-Gen-mRNA deutlich reduzieren. Ein unerwartetes Ergebnis bestand darin, dass unter bestimmten Bedingungen Aktivierung der mRNA-Expression eintritt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass nach Expression von Peptiden innerhalb von Zellen neue Ergebnisse erzielt werden können.

Beispiel 2

Retrovirale pBabe Puro-Bibliotheken und Apoptose

[0173] Es wurde eine Reihe von retroviralen Konstrukten zur Expression von Random und Bias-Peptiden innerhalb von Zielzellen-Populationen konstruiert. Das Peptid wird aus einem retroviralen Promotor exprimiert. Die Translationseinheit besitzt mehrere wichtige Komponenten. Glycin, das dem Initiator-Methionin am Amino-terminus folgt, stabilisiert das Peptid und verlängert die zytoplasmatische Halbwertszeit (siehe die „N-Ende-Regel“ von Varshavsky). In einigen Konstrukten wurde ein aus 9 Aminosäuren bestehender Flu-Epitop-Marker inkorporiert, um Co-Fällung des seltenen Peptids und jedes Moleküls zu ermöglichen, für das es Affinität besitzt; dabei werden monoklonale Antikörper gegen das Epitop verwendet. Glycine werden vor und nach den für Random/Bias-Expressionsprodukt kodierenden Regionen kodiert, um für eine gewisse molekulare Flexibilität zu sorgen. 2 Carboxyl-terminale Proline werden kodiert, um Carboxypeptidase Stabilität zu verleihen.

[0174] Zur Konstruktion einer großen Bibliothek wurden 2 Primer erzeugt (siehe schematische Darstellung in **Fig. 1**). Der erste als Random-Peptidprimer bezeichnete Primer besteht aus: (1) einer komplementären Region für das Vektorprimen, (2) den oben erwähnten Regionen und (3) einer Random- oder Bias-Expressionsprodukt-Region; er wurde als 30-Basen-Sequenz präsentiert, die für ein Peptid mit einer Länge von 10 Aminosäuren kodiert. Außerdem insertierten die Anmelder ein Stoppcodon in allen 3 Leserahmen im Falle kleinerer Deletionen oder Insertionen in der Random-Region. Die Konstruktion des Primers gewährleistet eine Glycin/Prolin-Termination in den meisten Leserahmen. Der zweite Primer befindet sich stromab im Vektor und primt eine Region des Plasmids, die eine einzelne Not I-Stelle enthält. Diese Primer dienen zur Bildung einer Bibliothek von Fragmenten, wobei jede davon eine unterschiedliche Nucleotidsequenz enthält, die jeweils potenziell für ein unterschiedliches Peptid kodiert. Diese Familien von Fragmenten sind an Vektorfragmente ligiert, die Puromycin-Selektionssequenz, ein 3'LTR und einen bakteriellen Replikationsursprung enthalten. Die Ligationsprodukte werden dann in E. coli elektroporiert und DNA aus der resultierenden Bibliothek produziert. Unter Anwendung dieser Technik konstruierten die Anmelder unabhängige Random-Bibliotheken mit bis zu 2×10^8 einzelnen Inserts. Das Sequenzieren mehrerer einzelner Inserts zeigt auf, dass sie die durch Primer 1 definierte

Struktur besitzen und dass die kodierten Peptide randomisiert sind. Die so produzierten Bibliotheken enthalten Untergruppen der insgesamt 10^{13} vorhergesagten Peptide.

Erzeugung retroviraler Peptidbibliotheken

[0175] Ein Schema zur Erzeugung einer Peptidbibliothek im pBabe Puro-Vektor ist in **Fig. 2** dargestellt. Primer für PCR wurden gemäß herkömmlicher Arbeitsvorschriften synthetisiert, gereinigt und von Schutzgruppen befreit. Primer 1, komplementär zu Polylinker-Sequenzen im retroviralen pBabe Puro-Konstrukt, besitzt die Sequenz 5' GCT TAG CAA GAT CTC TAC GGT GGA CCK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNC CCC ACT CCC ATG GTC CTA CGT ACC ACC ACA CTG GG 3'. N stellt für jede der vier Basen; K ist auf G oder T beschränkt. Primer 2 besitzt die Sequenz 5' GCT TAG CAA GAT CTG TGT GTC AGT TAG GGT GTG G 3' und ist komplementär zu Sequenzen innerhalb des pUC18-Replikationsursprungs. PCR erfolgt für 8 Runden unter Verwendung von Primer 1, Primer 2 Babe Puro als Templat und eines Gemisches aus Taq DNA-Polymerase (Promega) und Deep Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs) in einem Verhältnis von 128 Taq : 1 Deep Vent (siehe Barnes, PNAS USA 91, 2216–2220 (1994)). Das amplifizierte PCR-Produkt wurde gereinigt mit Restriktionsenzymen Bgl II und Not I (Promega) verdaut, erneut gereinigt und mit dem korrespondierenden Bam HI-Not I-Fragment von pBabe Puro ligiert. Nach der Transformation enthielt die resultierende Bibliothek $\sim 2 \times 10^8$ Klone, von denen mehr als 80% Inserts enthielten.

Retrovirale pMSCV-PC und pBabeMN-PC-Konstrukt-Bibliotheken

[0176] Oligonucleotide wurden gemäß herkömmlicher Arbeitsvorschriften synthetisiert und gereinigt. Die „Bibliotheks“-Oligonucleotide besitzen die Sequenz 5' CTG GAG AAC CAG GAC CAT. GGG C (NNK)₁₀ GGG CCC CCT TAA ACC ATT AAA T 3' oder 5' CTG GAG AAC CAG GAC CAT GGG CNN KNN KNN KCC TCC CNN KCC TNN KNN KGG GCC CCC TTA AAC CAT- TAA AT 3'. Ein drittes Oligonucleotid („konstant“), komplementär zu den 3'-Enden der Bibliotheks-Oligonucleotide, besitzt die Sequenz 5'TCA TGC ATC CAA TTT AAT GGT TTA AG 3'. Wie aus **Fig. 3** ersichtlich, wird jedes Bibliotheks-Oligonucleotid am Konstant-Oligonucleotid anneliert, in doppelstrangige DNA mit Sequenase (United States Biochemical) oder Klenow (Promega) umgewandelt, mit Restriktionsenzym Bst XI (New England Biolabs) verdaut sowie mit dem geeigneten retroviralen Bst XI-verdauten Konstrukt gereinigt und ligiert. Die Transformations-Wirkungsgrade betragen $\sim 2 \times 10^8$ Klone/ μ g ligierter DNA, von denen mehr als 90% ein Insert enthalten. Ein repräsentatives Retrovirus ist in **Fig. 4** dargestellt; siehe auch die nachstehend angeführte retrovirale Nucleotidsequenz:

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAA
GGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAG
AGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCC
CGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGT
TTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCT
GTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCT
GCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCT
CCGATAGACTGCGTCGCCCCGGGTACCCGATTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTT
GCATCCGAATCGTGGACTCGCTGATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGA
CTGCCCCACCTCGGGGGTCTTTCATTTGGAGGTTCCACCGAGATTTGGAGACCCC
TGCCTAGGGACCACCGACCCCCCGCCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCGGTCTGTT
TCCTGTCTGTCTCTGTCTTTGTGCGTGTTTGTGCCGGCATCTAATGTTTGCGCCT
GCGTCTGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAAC
GACGAGTTCTGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTTGG
GGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGGAAGGGAGTCGATGTGGAATCCGACCC
CGTCAGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCTCGCCTC
CGTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGGAAACCGAAGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCA
GCGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTCTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTG
AAAATTAGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAA
AGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTG
GGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGA
CGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGGTAAAGATCAAGGTCTTTTCACCT
GGCCCGCATGGACACCCAGACCAGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTG
GCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTC
CTCTTCCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACTCCTCGTTCGACCCCGCC
TCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCGGAATTCAGGA
CCATGGGCGGGCCCCCTTAAACCATTAATTTGGTAAAATAAAGGATCCGTGACCC
TGCAGCCAAGCTTATCGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAGGGG
GGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTT
GCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGA
ACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAG
CAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGA
CCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCG

CTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGCGCGCCA
GTCCTCCGATAGACTGCGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTG
CAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTG
ATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT
AAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
CGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTC
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACG
CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCC
CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATA
CCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGT
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAA
CCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
TACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA
CCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAG
CGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA
GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAC
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTA
AATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGAC
AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA
CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCA
GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT
GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA
GTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT
GGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCA
AGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC
CTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGC
AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG

GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
 TTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTG
 CTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGT
 TGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT
 ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAA
 AGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATAT
 TATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTAT
 TTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT
 GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCAC
 GAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACAT
 GCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGAC
 AAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAAC
 TATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
 CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGC
 TGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
 TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTT
 CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCACGCTCTCCCTTATGCGAC
 TCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCC
 GCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGG
 GCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAG
 CCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTG
 TGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAG

Peptidbibliotheks-Infektion einer Faktor-abhängigen Linie und Auswuchs einer Apoptose-resistenten Linie

[0177] Die Baf/3-Zelllinie ist eine IL-3-abhängige Zelle, die rasche Apoptose in Abwesenheit von IL-3 erfährt. Dies macht sie zu einer attraktiven Zelllinie für die dominanten Effektorpeptide. Zellen, die ein Peptid exprimieren, das Apoptose hemmt, können problemlos vor dem Hintergrund absterbender Zellen ausgewählt werden. Die Anmelder wählten diese Zelllinie als Modell zur Veranschaulichung der Peptidselektion.

[0178] Eine retrovirale Bibliothek mit 5×10^6 unabhängigen Peptidinserts wurde in BOSC23-Zellen transfiziert und mit einem approximativen Titer von 5×10^5 /ml in Retrovirus umgewandelt. 12 ml viraler Überstand dienten dazu, 6×10^6 Baf/3-Zellen zu infizieren (2 ml pro Infektion von 1×10^6 Zellen in unabhängigen Infektionen). Die Zellen wurden 3 Tage lang nach der Infektion in Gegenwart von IL-3 gezüchtet, um retrovirale Integration und Peptidexpression zu ermöglichen. Nach 3 Tagen wurde IL-3 abgezogen, und die Zellen wurden 2 Wochen lang gezüchtet. Nach 2 Wochen wies 1 von 6 Näpfen Auswuchs von Zellen auf, die in Abwesenheit von IL-3 überleben – ein Indiz für die Gegenwart einer Apoptose hemmenden Peptids. Auf diese Weise gewonnene Peptide können die IL-3-Unabhängigkeit durch positive Dominanz (sie imitieren oder umgehen die positive regulatorische Rolle von IL-3) oder durch Inhibition (sie verhindern den Apoptose-Prozess nach Abzug von IL-3) beeinflussen.

Beispiel 3

pMSCVpc-Vektor-Konstruktion und Apoptose

[0179] Der retrovirale Vektor pMSCVpc wurde hergestellt, indem ein Insert, das Sequenzen, die für eine Koz-

ak-Translationsinitiations-Sequenz kodieren, BstXI-Stellen für das Klonieren von Bibliotheksinserts, NruI und XhoI-Stellen und Stoppcodons in allen drei Leserahmen enthält, in die EcoRI- und BamHI-Stellen von pMSCV neo kloniert wurde.

BstX I-Restriktionsverdau

[0180] 200 µg pMSCVpc-Vektor-DNA wurde mit 40 µl 10 X NEBuffer 3 und 30 µl BstX I (10 Einheiten/µl) in einem Gesamtvolumen von 400 µl kombiniert. Die Probe wurde über Nacht bei 55°C inkubiert, Phenol-extrahiert, mit XhoI verdaut und auf einem Kaliumacetat-Stufengradienten unter Verwendung von 10, 15, 20 und 25% Lösungen Kaliumacetat gereinigt. Die DNA wurde mit einer Gewinnung von 40% gefällt.

Herstellung von Bibliotheksinsert

Oligonucleotidsynthese

[0181] Es wurden Oligonucleotide (OL) mit den folgenden Sequenzen synthetisiert:

**OL-1: 5'-CGT GAG AAC CAG GAC CAT GGG CAA GAG AAA GGG CGA TGA GGT
GGA TGG AGT GGG GCC CCC TTA AAC CAT TAA AT -3'**

[0182] Die unterstrichene Region kodiert für ein Peptid mit der Sequenz MGKRKGDEV-DGVGPP. Es wurde gezeigt, dass dieses Peptid Fas-medierte und Staurosporin-induzierte Apoptose hemmt, wenn es in Zellen mit einem Retrovirus exprimiert ist.

**OL-2: 5'-CTG GAG AAC CAG GAC CAT GGG CAA GAG AAA GGG CNN KNN KNN
KGA KNN KGT GGG GCC CCC TTA AAC CAT TAA AT -3'**

Variable Region: N = A, C, G T (äquimolar) K = G, T (äquimolar)

[0183] Die Limitierung der K Position jedes Codons auf G oder T reduziert die Erzeugung von Stoppcodons und den Bias der Codon-Verwendung. Die unterstrichene Region kodiert für ein randomisiertes Peptid mit der Sequenz MGKRKGXXD/EXVGPP.

OL-3': 5'-TCA TGC ATC CAA TTT AAT GGT TTA AG -3'

[0184] Die 15 3'-Basen von OL-3 sind zu den 15 3'-Basen von OL-1 und OL-2 komplementär.

[0185] OL-1 und OL-2 wurden in 1 µM-Maßstab synthetisiert, während OL-3 in herkömmlichem 40 nM-Maßstab synthetisiert wurde. Alle Oligos wurden mit Tritylon synthetisiert, von Schutzgruppen befreit und auf OPC-Säulen gereinigt; dies erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Applied Biosystems). Jedes Oligo wurde in 200 µl 10 mM Tris, pH 8,5, ohne EDTA resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde durch Messen der Extinktion bei 260 nm ermittelt.

[0186] PCR erfolgte mit 50 pMol OL-1 oder OL-2 sowie 50 pMol OL-3. Phenolextraktion und Ethanolfällung wurden durchgeführt und die DNA auf einem 10% nicht-denaturierenden 10% Acrylamidgel mit Ethidiumbromid-Einfärbung laufen gelassen: Die Proben wurden quantifiziert, ligiert, gefällt und in elektrokompetente TOP10F' E. coli (Invitrogen) elektroporiert; dabei wurden Standardtechniken angewendet (siehe Current Protocols in Molecular Biology, Abschnitt 1.8.4.). Eine Testtransformation lieferte 5×10^9 Transformanten pro µg pUC DNA. Nach der Transformation wurde deren Wirkungsgrad bestimmt, indem Verdünnungen auf LB-amp-Platten (100 µg/ml Ampicillin) aufplattiert und überlebende Kolonien gezählt wurden. Für das aus OL-2 erzeugte Bibliotheksinsert ergab ein 4 : 1-Insert-Vektor-Molverhältnis in der Ligation einen Transformations-Wirkungsgrad von $3,98 \times 10^7$ Transformanten pro µg der in der Ligation verwendeten Vektor-DNA, wobei der Transformations-Wirkungsgrad in großem Maßstab $4,8 \times 10^7$ Transformanten pro µg Vektor betrug. Die Nur-Vektor-Ligation erzeugte 40fach weniger Transformanten. 10 Kolonien aus der Transformation mit der OL-1-Insertligation wurden ausgewählt, kultiviert und die DNA hergestellt und sequenziert, um den korrekten Klon zu identifizieren.

[0187] Der Rest des OL-2-Bibliotheks-SOC/Transformations-Gemisches wurde auf 500 µl LB-amp (100 µg/ml Ampicillin) geimpft und bei 37°C unter Rühren (300 U/min) inkubiert. Außerdem wurde die Abs₆₀₀ der Bibliothekskultur überwacht. Als die Kultur eine Abs₆₀₀ von 0,8 erreichte (etwa nach 5 Stunden), wurden 100 µl entfernt, pelletiert, in 10 ml LB/15% Glycerin resuspendiert und in 1 ml Aliquoten bei -80°C gelagert. (Eine Abs₆₀₀ von 0,8 entspricht einer Zellkonzentration von etwa 10^9 Zellen/ml. Daher enthält im Falle einer Bibliothek von $4,8 \times 10^7$ jede gefrorene Aliquote 200 Bibliotheks-Äquivalente.

Analyse der Bibliotheks-Diversität

[0188] Die oben plattierten überlebende Kolonien wurden durch PCR mit Primern gescreent, die die degenerierte Region flankieren, um den Anteil jener Klone zu ermitteln, die Insert enthalten (> 90%). 8 Insert-enhaltende Klone wurden ausgewählt und die Nucleotidsequenzen der degenerierten und flankierenden nichtdegenerierten Regionen bestimmt. Jedes Nucleotid war an den N-Positionen mit etwa 25% Häufigkeit repräsentiert, während G oder T (aber nicht A oder C) an den K-Positionen mit etwa 50% Häufigkeit repräsentiert war. Die Häufigkeit von in der degenerierten Region erzeugten Stoppcodons kann ebenfalls mittels dieses Verfahrens bestimmt werden.

Erzeugung von Bibliotheks-Retrovirus und Infektion von Jurkat-Zellen

TAG 0: Herstellung von Phoenix-Retrovirus-Produzentenzellen für die Transfektion:

[0189] 18–24 Stunden vor der Transfektion wurden Phoenix-Zellen gleichmäßig mit 1,5-2 Millionen Zellen/60 mm-Platte in Produzentenzellen-Wachstumsmedium (DMEM: 10 % FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% Glutamin) plattiert. Man ließ die Zellen 20 Stunden lang an die Platten anhaften.

TAG 1: Transiente Transfektion:

[0190] Die höchsten Transfektions-Häufigkeiten wurden mit Phoenix-Zellen erhalten, die zum Zeitpunkt der Transfektion zu 70–80% konfluent waren. Die DNA in HBS (2 x HBS = 8,0 g NaCl, 6,5 g HEPES; 10 ml Na_2HPO_4 Stammlösung (5,25 g zweibasig in 500 ml Wasser, eingestellt auf pH 7, bis zu einem Endvolumen von 500 ml, mit einer endgültigen pH-Einstellung auf 7) wurde zur Anwendung für die Phoenix-Zellen produziert. Etwa 5 Minuten vor der Transfektion wurde Chlorochin (Sigma) jeder Platte bis zu 25 μM zugesetzt (Chlorochin-Stammlösung besteht aus 50 mM in ddH_2O ; für 3 ml Medium + 1 ml DNA sind 2 μl zuzugeben). Einem konischen 15 ml-Röhrchen ist das Folgende zuzusetzen (pro 6 cm-Platte, insgesamt 5 Platten, alle Reagenzien auf Raumtemperatur):

5 μg Bibliotheks-DNA (DNA wurde der Seite des Röhrchens zugetropft)

1 μg pMSCVpc lacZ-Virusvektor

438 μl ddH_2O (die DNA wurde bis zum Boden des Röhrchens mit Wasser gewaschen)

61 μl 2M CaCl_2 (Mallinckrodt, Katalog Nr. 4160; in Wasser zu bereiten, steril zu filtrieren und eng verschlossen bei 4°C zu lagern)

500 μl Gesamtvolumen.

[0191] Die Proben wurden gründlich durch Fingerklopfen vermischt. Die Transfektion mit 5 μg pMSCVpc lacZ und mit der OL-1-Vektor-DNA erfolgte zur Verwendung als negativer bzw. positiver Vergleich. 0,5 ml 2 x HBS wurden rasch jedem Röhrchen zugesetzt; die Lösung wurde mit dem automatischen Pipettor kräftig gesprudelt, indem der Auswurfknopf 10 Sekunden lang gedrückt wurde (die tatsächliche Sprudeldauer hängt von jeder Charge von 2 x HBS ab). Die HBS/DNA-Lösung wurde tröpfchenweise und gleichmäßig auf die Medien in jeder Zellplatte dispergiert; dabei ging man vorsichtig und rasch vor. Die Platten wurden unter einem Mikroskop beobachten; gleichmäßig verteilte sehr kleine schwarze Teilchen gefällter DNA (sahen wie Pfeffer aus) waren sichtbar. Die Platten wurden in einen bei 37°C gehaltenen Inkubator gestellt und einige Male vor- und zurückgeschaukelt, um die DNA/ CaPO_4 -Teilchen gleichmäßig zu verteilen. 6–8 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch 3 ml frisches DMEM, 10% FCS ausgetauscht. Vor dem Wechsel des Mediums war der DNA-Niederschlag unter dem Mikroskop größer und deutlicher zu sehen.

TAG 2: Zweiter Mediumswechsel

[0192] 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium wieder durch 3 ml frisches DMEM, 10% FCS ausgetauscht. Die Zellen wurden bei 32°C platziert (das Virus ist stabiler, wenn die Inkubation bei 32°C erfolgt, obwohl auch 37°C in Ordnung ist).

TAG 3: Transduktion von Jurkat EcoR-Zellen

[0193] Ein steriler Acrodisc 0,45 μm -Spritzenfilter (Gelman Sciences) wurde am Ende einer sterilen 10 ml-Nadel befestigt und der Injektionsstopfen steril aus dem Spritzenzylinder entfernt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der Virusüberstand aus den Phoenix-Zellen entfernt und dem Spritzenzylinder zugesetzt. Der Stopfen wurde ersetzt und der Virusüberstand in Tröpfchen in ein sauberes, steriles, konisches Röhrchen gefüllt. Die Phoenix-Zellplatten wurden zwecks X-Gal-Einfärbung (siehe unten) auf die Seite gestellt. Polybren wurde jedem viralen Überstand (Sigma; 2,5 mg/ml in ddH_2O = 500 x; Lagern bei -20°C) bis zu einer Endkonzentration

von 5 mg/ml zugegeben. $4,5 \times 10^6$ Jurkat EcoR-Zellen (Jurkat-Zellen exprimieren den ekotropen Retrovirus-Rezeptor in stabiler Weise) wurden bei 1400 U/min 5 Minuten lang pelletiert und in 9 ml des OL-2-Bibliothek-Virusüberstand resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquoten von 1 ml oder 5×10^5 Zellen in den Nöpfen einer 24-Napf-Platte verteilt. $1,5 \times 10^6$ Jurkat EcoR-Zellen wurden in ähnlicher Weise mit jeweils 3 ml des viralen lacZ-Überstands und dem viralen OL-1-Überstand behandelt. Jede Zellplatte wurde in Parafilm eingewickelt, in einen Mikroplattenträger (DuPont) gelegt und 90 Minuten lang bei 2500 U/min bei 32°C in einer DuPont/Sorvall RT 6000B-Tischzertrifuge zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen unter einem Mikroskop beobachtet. Die Gegenwart großer, unregelmäßig geformter Körper, die fusionierte Jurkat-Zellen (Größe bis zu 5–10 unfusionierte Zellen) darstellten, ließ auf erfolgreiche Infektion schließen. Der Parafilm wurde von den bei 32°C gehaltenen Platten entfernt. Nach weiteren 16 Stunden bei 32°C wurden die Zellen vom Boden jedes Napfes mit leichter Trituration gelöst und in ein konisches 15 ml-Röhrchen eingebracht. Die Röhrchen wurden 5 Minuten lang bei 1400 U/min zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zellen wurden in 5 ml frischem RPMI, 10% FCS für jeweils 3 Nöpfe von Zellen resuspendiert und einer 60 mm-Platte zugesetzt (3 Nöpfe von Zellen pro Platte). 1 ml frisches RPMI 10% FCS wurde jedem verbleibenden Napf von Zellen der 24-Napf-Platten zugesetzt. Die Platten wurden 72 Stunden lang bei 37°C gehalten und anschließend die mit jedem Virus transduzierten Zellen kombiniert und eine Aliquote von Jurkat-Zellen mit X-Gal eingefärbt. Nicht verwendeter vitaler Überstand wurde bei –80°C für spätere Transduktionen gelagert, obwohl der Titer für jeden Frier-Tau-Wechselversuch um die Hälfte abnimmt.

Bestimmung des Transfektions-Wirkungsgrads

[0194] Sowohl transfizierte Phoenix-Zellen als auch transduzierte Jurkat-Zellen wurden mit X-Gal eingefärbt, um die Wirkungsgrade von Transfektion und Transduktion zu ermitteln. Der Zweck des Co-Transfizierens des pMSCVpc lacZ-Virusvektors mit dem Bibliotheks-Virusvektor bestand – wie oben erläutert – darin, eine indirekte Beurteilung der Wirkungsgrade von Transfektion und Transduktion zu ermöglichen. Herstellung von Lösungen: Fixierung: PBS/0,10% Glutaraldehyd. Glutaraldehyd-Stemmlösung (Sigma Kat. Nr. G5882) ist eine 25% Lösung oder 250 X; Stammlösung-Einfärbungslösungen: (i) 300 mM/25 X Ferrocyanat-Lösung: 25,3 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ (Mallinckrodt) + 2,48 g $MgCl_2$ (Sigma) in 200 ml H_2O ; Lagern bei 4°C; (ii) 300 mM/25 X Ferricyanat-Lösung: 19,75 g $K_3Fe(CN)_6$ (Sigma) + 2,48 g $MgCl_2$ in 200 ml H_2O ; Lagern bei 4°C; (iii) X-Gal (Molecular Probes) wird als 40 mg/ml-Lösung in DMF gebildet; Lagern bei –20°C im Dunkeln; (iv) 1 X Ferro/Ferricyanat-Lösung: Zugabe von 4 ml 300 mM/25 X Ferrocyanat-Lösung und 4 ml 300 mM/25 X Ferricyanat-Lösung zu 196 ml PBS; Lagern bei 4°C bis zu einem Monat; (v) aktive Einfärbungslösung: Jedes Mal, wenn Zellen einzufärben sind, werden 100 µl 40 mg/ml X-Gal jeder 3 ml 1 X Ferro/Ferricyanat-Lösung zugesetzt; Waschlösung: PBS für Phoenix und andere adhärente Zellen; 1% FCS in PBS für Jurkat und andere nicht-adhäre Zellen.

[0195] Das Medium wurde aus den 60 mm-Platten von Phoenix-Zellen entfernt, oder es wurden 5×10^5 Jurkat-Zellen in einem konischen 15 ml-Röhrchen bei 1400/min 5 Minuten lang pelletiert. 2 ml Fixierungsmittel wurden jeder 60 mm-Platte von Phoenix-Zellen zugegeben oder die Jurkat-Zellen in 1 ml Fixierungsmittel resuspendiert. Die Zellen wurden 2 Minuten lang in Fixierungsmittel gelassen. Für die Phoenix-Zellen wurde das Fixierungsmittel abgeführt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (die ersten beiden Waschungen erfolgten rasch; für die dritte Waschung wurden PBS 3 Minuten lang auf den Zellen belassen). Für die Jurkat-Zellen wurde das Fixierungsmittel gequench, indem 5–10 ml PBS/1% FCS jedem konischen Röhrchen zugesetzt und jedes Röhrchen fünfmal umgedreht und wie oben pelletiert wurde. 3 ml aktiver Einfärbungslösung wurden in Schichten auf jede 60 mm-Platte Phoenix-Zellen aufgebracht, oder es wurde jedes Zellpellet von 5×10^5 Jurkat-Zellen in 1 ml aktiver Einfärbungslösung resuspendiert und in einen Napf einer 24-Napf-Platte eingebracht. Alle Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 24 Stunden später unter einem Mikroskop beobachtet. Der Wirkungsgrad der Transfektion der Phoenix-Zellen wurde als Prozentsatz blauer Zellen in einem Feld geschätzt. Der Wirkungsgrad der Transduktion der Jurkat-Zellen wurde durch Zählen blauer Zellen in einem Hämozytometer geschätzt. Die Transfektion mit 5 µg lacZ-Vektor erzeugte 50% blaue Phoenix-Zellen. Die Transduktion von Jurkat-Zellen mit dem resultierenden Virus lieferte 30% blaue Jurkat-Zellen. Die Co-Transfektion von 1 µg lacZ-Virusvektor mit 5 µg Bibliotheksvektor ergab 5–10% blaue Phoenix-Zellen. Die Transduktion von Jurkat-Zellen mit dem resultierenden Virus lieferte 3–10% blaue Jurkat-Zellen.

Selektion von Jurkat-Zellen mit IgM-anti-Fas

[0196] Titer-IgM-anti-Fas: Eine frische Charge CH-11 IgM-Antikörper gegen Human-Fas (Kamiya Biomedical Company; Kat. Nr. MC-060) wurde getestet, um den Wirkungsgrad der Induktion von Apoptose zu ermitteln. 5×10^5 Jurkat-EcoR-Zellen wurden 5 Minuten lang mit 1500 U/min pelletiert und in 1 ml RPMI/2,5% FCS plus Reihenverdünnungen von CH-11-Antikörper, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 2,0 ng/ml und 0,5 ng/ml Endkonzentration resuspendiert. Die Zellen in jeder Antikörperverdünnung wurden 48 Stunden lang bei 37°C in einen Napf einer

24-Napf-Platte gelegt und danach 4 ml Acridinorange/Ethidiumbromid (Sigma; jeweils 100 µg/ml in PBS; Lagern im Dunkeln bei 4°C) 100 ml Zellen auf Eis zugesetzt. Die Zellen wurden unter einem 20fachen Objektiv in einem Hämocytozometer mit Ralner Filterkombination, die sich für das Ablesen von Fluorescein eignet, untersucht.

[0197] 2. 100 Zellen aus jeder Probe wurden gezählt und die Anzahl der Zellen in den folgenden Gruppen aufgezeichnet:

1. Lebende Zellen mit normalen Kernen (hellgrünes Chromatin mit organisierter Struktur);
2. früh apoptotische Zellen (EA; hellgrünes Chromatin, das hochkondensiert oder fragmentiert ist);
3. spät apoptotische Zellen (LA; hellorangefarbenes Chromatin, das hochkondensiert oder fragmentiert ist);
4. nekrotische Zellen (N; hellorangefarbenes Chromatin mit organisierter Struktur).

[0198] Der Prozentsatz apoptotischer Zellen wurde als $EA + LA / \text{Gesamtzahl an gezählten Zellen} \times 100$ errechnet. Unter Verwendung von 10 ng/ml des CH11-Antikörpers wurde ein Wert von > 95% Apoptose von Jurkat-EcoR-Zellen unter Beweis gestellt.

IgM-anti-Fas-Selektion von Bibliotheks-exprimierenden Jurkat-Zellen

[0199] $9,6 \times 10^6$ OL-2-Bibliothek-transduzierte Jurkat-Zellen wurden pelletiert und in 96 ml RPMI/2,5% FCS + 10 ng/ml CH-11-Antikörper resuspendiert. Die Zellen wurden in 1 ml-Aliquoten von 1×10^5 Zellen in jedem Napf von 4 24-Napf-Platten verteilt. $4,8 \times 10^6$ lacZ-transduzierte Jurkat-Zellen und OL-1-transduzierte Jurkat-Zellen wurden in ähnlicher Weise behandelt und jeweils in den Näpfen von 2 24-Napf-Platten verteilt. Die Platten wurden 5 Tage lang bei 37°C gehalten. Die Platten wurden täglich auf bakterielle oder Hefe-Kontamination überprüft. Die Zellen wurden aus jedem kontaminierten Napf entfernt und 2 ml 10 N NaOH den leeren Näpfen zugesetzt, um das Risiko der Kontaminationsausbreitung auf andere Näpfe zu reduzieren. Es konnten wenige oder keine lebende Zellen nach 2–3 Tagen unter dem Mikroskop beobachtet werden, was durch die rote Farbe des Mediums bestätigt wurde, das noch nicht von sämtlichen Nährstoffen abgereichert war. 5 Tage nach der ersten IgM-anti-Fas-Behandlung wurde jedem Napf 1 ml RPMI/20% FCS zugesetzt. Die Zellen wurden weitere 10–14 Tage bei 37°C gehalten. Die Platten wurden häufig wie oben auf Kontamination untersucht und behandelt. 10 Tage nach der Zugabe von RPMI/20% FCS enthielt fast jeder Napf der OL-1-transduzierten Zellen lebende Zellkolonien, was durch die orange Farbe des nährstoffabgereicherten Mediums bestätigt wurde. Das Medium in allen Näpfen lacZ-transduzierter Zellen blieb rot, und es konnte in den Näpfen nur wenig Zellwachstum beobachtet werden. Die ausgewählten Näpfe der OL-2-Bibliothek-transduzierten Zellen enthielten lebende Zellen und nährstoffabgereichertes Medium. Während der nächsten 2 Wochen wurden Zellen aus allen Näpfen entfernt, in denen erhebliches Zellwachstum stattfand (beurteilt durch Beobachten der Zellen direkt unter dem Mikroskop und Überwachen der steigenden Nährstoffabreicherung des Zellmediums). Die Zellen aus jedem Napf wurden in 5 ml frischem RPMI/10% FCS resuspendiert und 2–3 Tage lang bei 37°C in eine 60 mm-Schale gelegt.

RNA-Isolation

[0200] RNA wurde aus jeder überlebenden Napfpopulation von OL-2-Bibliothek-transduzierten Jurkat-Zellen (17 Näpfe) sowie aus 5 überlebenden Napfpopulationen von OL-1-transduzierten Zellen isoliert; dabei wurde der mRNA Capture Kit gemäß den Anweisungen der Herstellerfirma (Boehringer-Mannheim, Kat. Nr. 1 787 896) verwendet. Zusammenfassend gesagt fanden die nachfolgenden Schritte statt: 5×10^5 Zellen aus jeder Schale wurden 5 Minuten lang mit 1400 U/min in einem Eppendorf-Röhrchen pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen, in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und geschoren, indem sie sechs Mal durch eine Nr. 21-Nadel (befestigt an einer 1 ml-Spritze) geschickt wurden. 4 µl 1 : 20-Verdünnung von biotinyliertem Oligo(dt)₂₀ wurden jeder Probe zugesetzt und 3 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wurde aus jedem Röhrchen entfernt. Jedes Röhrchen wurde drei Mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 90% FCS/10% DMSO in 1 ml-Aliquoten von jeweils 1×10^6 Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

RT-PCR-Rettung von Peptid-kodierenden Inserts aus ausgewählten Zellen

[0201] Es erfolgte PCR unter Einsatz des TitanTM RT-PCR-Systems (Boehringer Mannheim, Kat. Nr. 1 855 476) unter Verwendung von 2 Primern: 5'pBL-Primer, der die Sequenz 5'-GAT CCT CCC TTT ATC CAG-3' besitzt und komplementär zu den Nucleotiden 1364–1381 aller pMSCVpc-basierten Vektoren und retroviraler mRNA ist (befindet sich knapp stromauf vom klonierten Insert); und 3A-Primer, der die Sequenz 5'-CTA CAG GTG GGG TCT TTT-3' besitzt und komplementär zu einer Sequenz in allen pMSCVpc-basierten Vektoren und retroviraler mRNA ist (befindet sich knapp stromab vom klonierten Insert).

Reklonieren geretteter Peptid-kodierender Inserts

[0202] Jede PCR-gerettete Probe wurde mit Phenolchloroform extrahiert, Ethanol-gefällt und in 25 ml 10 mM Tris, pH 8,5, resuspendiert. 3 ml nicht-denaturierender DNA-Gel-Aufladungsfarbstoff wurde 10 ml jeder Probe zugesetzt und auf einem 10% Acrylamid-Minigel mit Oligonucleotid-Quantifizierungsstandards und einer 10-Basenpaar-Leiter laufen gelassen (siehe oben). Jede Spalte enthielt eine prominente Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 216 Basenpaaren und weniger auffällige Hintergrundbanden. Die Molarität jeder Probe wurde mittels NIH-Bildgebung (siehe oben) quantifiziert. Jede Probe wurde BstXI-restriktionsverdaut, mit Phenol extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 25 ml 10 mM Tris, pH 8,5, resuspendiert. Die gereinigten Proben wurden auf 10% Acrylamidgele geladen und wie oben quantifiziert. Alle Proben enthielten eine prominente Bande von 55 Basenpaaren, das erwartete Molekulargewicht für das restriktionsverdaute Insert sowie Banden von 100 Basenpaaren und 51 Basenpaaren, die federn der Enden des geretteten DNA-Inserts entsprachen, das durch das Restriktionsenzym entfernt wurde. Jedes restriktionsverdaute PCR-gerettete Insert wurde in einem Insert-Vektor-Molverhältnis von 4 : 1 mit 100 ng pMSCVpc-Vektor-DNA ligiert und wie oben gefällt und elektrotransforiert. Überlebende Kolonien für jede Transformation wurden mittels der 5'pBL- und 3A-Primer gescreent. 8–10 Insert enthaltende Kolonien für jede Transformation wurden über Nacht kultiviert, die Kulturen gepoolt und eine Mini-DNA-Produktion für jeden Pool durchgeführt.

[0203] Fas-selektierte Peptidklone: Alle Peptide besaßen die Sequenz: MET GLY LYS ARG LYS GLY XXX XXX XXX D/E XXX VAL GLY PRO PRO. Nur die XXX XXX XXX D/E XXX Aminosäuren sind über jeder der nachstehenden DNA-Sequenzen angeführt.

[0204] Aus dem ersten Bibliotheks-Selektionsnapf:

THR ALA SER ASP ALA

L1B3E1 ATG GGC AAG AGA AAG GGC ACG GCG TCT GAT GCT
GTG GGG CCC CCT TAA

TYR PRO SER ASP VAL

L1B3E2 ATG GGC AAG AGA AAG GGC TAT CCT TCT GAT GTG
GTG GGG CCC CCT TAA

THR PRO SER ASP MET

L1B3E3 ATG GGC AAG AGA AAG GGC ACG CCT TCG GAT ATG
GTG GGG CCC CCT TAA

THR ALA SER ASP LEU

L1B3E6 ATG GGC AAG AGA AAG GGC ACG GCT TCT GAT CTT
GTG GGG CCC CCT TAA

SER ASP ARG ASP ILE

L1B3E7 ATG GGC AAG AGA AAG GGC TCT GAT AGG GAT ATT
GTG GGG CCC CCT TAA

[0205] Aus dem zweiten Bibliotheks-Selektionsnapf:

Individuelle L2A5-Klone, Fas-selektiert:

TRP LEU LEU GLU PHE
L2A5A2 ATG GGC AAG AGA AAG GGC TGG TTG CTA GAG TTT
GTG GGG CCC CCT TAA

TRP LEU LEU GLU PHE
L2A5A3 ATG GGC AAG AGA AAG GGC TGG TTG ATA GAG TTT
GTG GGG CCC CCT TAA

TRP LEU LEU₂ GLU PHE
L2A5A6 ATG GGC AAG AGA AAG GGC TGG TTG CTA GAG TTT
GTG GGG CCC CCT TAA

TRP LEU LEU GLU PHE
L2A5A8 ATG GGC AAG AGA AAG GGC TGG TTG CTA GAG TTT
GTG GGG CCC CCT TAA

SER TYR GLN ASP LEU
L2A5A9 ATG GGC AAG AGA AAA GGC TCT TAC CAA GAT CTG
GTG GGG CCC CCT TAA

Beispiel 3

Staurosporin-Selektion von mit pBabe Puro-Peptidbibliothek transduzierten NIH 3T3-Zellen

A. Bibliotheks-Konstruktion

[0206] Die Konstruktion der pBabe Puro-Random-Peptidbibliothek wurde bereits in dieser Anmeldung beschrieben. Das randomisierte Peptid besitzt die Sequenz: MGXXXXXXXXXXGGPP. Die Diversität der Bibliothek beträgt 2×10^8 DNA-Insert-Wert.

B. Bibliotheks-Transfektion

[0207] Die Transfektion erfolgte wie für die Fas-Selektion, doch in 15 cm-Platten von 10^7 Phoenix-Zellen. Die jeder Platte zugesetzt DNA-Lösung bestand aus 50 µg Bibliotheks-DNA, 5 µg lacZ-Vektor, 4340 µl ddH₂O, 610 µl 2 M CaCl₂ und 5000 µl 2 × HBS.

C. Bibliotheks-Transduktion

[0208] 24 Stunden vor der Transduktion wurden 2×10^7 NIH 3T3-Zellen auf jede von 10, 15 cm-Platten in 25 ml DMEM, 10% Kalbsserum aufplattiert. 5 ml Bibliotheks-Virusüberstand wurden jeder Platte zugesetzt (plus Polybren, wie oben). 24 Stunden nach der Transduktion wurde das Medium durch frisches DMEM, 10% BCS ausgetauscht. Die Zellen wurden mit X-Gal 48 Stunden nach der Transduktion eingefärbt. Der Wirkungsgrad der Einfärbung betrug 40–50%.

D. Staurosporin-Auswahl

[0209] Staurosporin, ein Alkaloid aus *Streptomyces* sp., ist ein hochwirksamer, für ein breites Spektrum einsetzbarer Hemmstoff von Protein-Kinasen, der die ATP-Stelle bindet. Die Zugabe von 1 μ M Staurosporin in serumfreiem Medium zu NIH 3T3-Zellen führte innerhalb von 24 Stunden zu > 99% Apoptose (bestimmt durch Ethidiumbromid/Acridinorange-Doppeleinfärbung, wie für die Fas-Selektion beschrieben).

[0210] 2×10^6 Bibliotheks-transduzierte NIH 3T3-Zellen wurden auf jede von 10 15 cm-Platten aufplattiert. Man ließ die Zellen 24 Stunden lang anhaften. Danach wurde Staurosporin 1 μ M in serumfreiem DMEM zugesetzt. LacZ-transduzierte NIH 3T3-Zellen in BCL-2-transduzierten NIH 3T3-Zellen wurden als negativer bzw. positiver Vergleich herangezogen. 24 Stunden nach der Staurosporin-Behandlung wurde das Medium durch 25 ml frisches DMEM, 10% BCS ausgetauscht. Das Medium wurde alle 2 Tage 1 Woche lang ausgetauscht, bis die überlebenden Zellen gesund aussahen (typische 3T3-Morphologie); danach wurde 1 μ M Staurosporin in serumfreiem Medium nochmals zugesetzt. Das Medium wurde wie oben durch DMEM, 10% BCS ausgetauscht. Die Stp-Behandlung wurde für insgesamt drei Behandlungen durchgeführt. Anschließend schien die Anzahl überlebender Bibliotheks-transduzierter Zellen größer als die Anzahl an lacZ-transduzierten Zellen (doch geringer als jene der BCL-2-transduzierten Zellen).

E. Moloney-Transfer

[0211] Nach der zweiten Staurosporin-Behandlung wurden Aliquote überlebender Zellen aus jeder Platte mit dem Überstand des Moloney-Mäuse-Leukämievirus der Wildform infiziert (erzeugt durch Transfizieren von Phoenix-Zellen mit dem retroviralen Vektor pZap). Man ließ das Virus 1 Woche lang durch die Kultur ausbreiten (mit erneutem Plattieren der Zellen alle 2–3 Tag). Die Zellen wurden wie oben plattiert und mit Staurosporin behandelt, bevor die RNA-Isolation und PCR-Rettung stattfand.

F. RNA-Isolation

[0212] Aliquoten von in jeder Platte überlebenden Zellen wurden in 90% FCS, 10% DMSO resuspendiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. RNA wurde mit Trizol-Reagens (Gibco BRL, Kat. Nar. 15596-026) hergestellt. Zusammengefasst gesagt wurde 1 ml Trizol-Reagens 10 cm²-Einzelschichten von Zellen zugesetzt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Zelllysate wurden in konische 15 ml-Röhrchen gefüllt. (Es ist zu beachten, dass zu diesem Zeitpunkt ausschließlich mit DEPC behandelte Lösungen und Gläser verwendet wurden.) 0,2 ml Chloroform wurde pro 1 ml verwendetem Trizol-Reagens zugesetzt. Die Röhrchen wurden 15 Sekunden lang geschüttelt, 3 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten lang bei 4°C und 12.000 \times g zentrifugiert. Die RNA-enhaltende obere wässrige Phase wurde entfernt und 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol (verwendet für die erste Homogenisierung) zugesetzt. Proben wurden gemischt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert; anschließend erfolgte die gleiche Zentrifugation wie oben. Der Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet mit 75% Ethanol (1 ml/1 ml Trizol) gewaschen. Die Probe wurde gewirbelt und 5 Minuten lang bei 4°C bei 7500 \times g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde 10 Minuten lang in der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser mit 10-minütiger Inkubation bei 60°C resuspendiert, um das Pellet aufzulösen. Die RNA-Konzentration wurde durch Messen der Extinktion bei 260 nm bestimmt.

G. PCR-Rettung

[0213] Die PCR-Rettung erfolgte wie für die Fas-Selektion unter Verwendung der Primer 5'pBL und SV 40 down. Der zweite Primer besaß die Sequenz: 5' CTG ACA CAC ATT CCA CAG 3' und ist komplementär zu den Positionen 1424– 1441 des retroviralen pBabe Puro-Vektors. Die PCR-Reaktionen wurden mit Phenol-Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und mit BamHI und Sal I verdaut, bevor die Ligation mit retroviralem Vektor pWZL neo stattfand. Aus der Abbildung ist ein 10% Acrylamidgel repräsentativer PCR-erzeugter Inserts zu sehen.

Spur 1: 10 Basenpaar-Leiter

Spur 2: unverdautes PCR-Insert aus Staurosporin-selektierter Zellpopulation

Spur 3: unverdautes PCR-Insert aus derselben Zellpopulation nach Moloney-Rettung und Staurosporin-Selektion

Spuren 4 und 5: gleich wie Spuren 2 und 3 nach Restriktionsverdau

H. Sekundärer Screen

[0214] pWZI neo-Vektoren mit geretteten Inserts wurden in Phoenix-Zellen transfiziert und das resultierende Virus zum Transduzieren von NIH 3T3-Zellen verwendet.

[0215] Die Staurosporin-Selektion wurde dreimal wie oben vor der RNA-Herstellung und der PCR-Rettung wiederholt.

1. Sequenzen der ersten 9 Positiven:

[0216] Die Sequenzen der ersten 9 Positiven sind wie folgt:

Sequenz von 2 P 1

GGATCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAATACC-

ATG GGA TGT CCG TCT GTT GCT AGG CCG CGG GGT GGT GGG GGC CCC CCC

Met Gly Cys Pro Ser Val Ala Arg Pro Arg Gly Gly Gly Gly Pro Pro

TAGCTAACTAAAGATCCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAATTCGCC 2P1

Stp Stp Stp Bam /Bg

Sequenz von 4 P 1

GGATCCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAATACC-

ATG GGA TTG TCT TTT GTT ATT (C/TGT CTG CAG CAT CGT GGG GGC CCC

Met Gly Leu Ser Phe Val Ile Arg Leu Gln His Arg Gly Gly Pro

CCC TAG CTAATAAGATCCCAGTGTGGTGGTACGT 4P1

Pro Stp Stp StpBam /Bg

Cys

Sequenz von 5 P 1

GGATCCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAGTACC-

ATG GGA CCT CCG ATT TGG TAT ACT CAT TGG AGT CAT GGG GGC CCC CCC

Met Gly Pro Pro Ile Trp Tyr Thr His Trp Ser His Gly Gly Pro Pro

TAG CTAATAAGAT CC 5P1

Stp Stp StpBam /Bg

Sequenz von 6 P 1

GGATCCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAGTACC-
 ATG GAA GTC AGG CGT TTG TGA ATA CTC GGC ATA AG GGG GGC CCC CCC
 Met Glu Val Arg Arg Leu Stp Gly Gly Pro Pro
 TAGCTAACTAAAGAT CC 6P1
 Stp Stp StpBam /Bg

Sequenz von 7 P 1

CCGGCCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGAT
 CTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCC
 7P1

Sequenz von 8 P 1

GGATCCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAATACC
 ATG GGA CTT TAG CCG GGC CCC CCCTAGCTAACTAAAGATCCCAGTGTGGTGGT
 Met Gly Leu Stp Pro Pro Stp Stp Stp Bam /Bg
 ACGTAGGAATTCGCCAGCACAG T 8P1

Sequenz von 9 P 1

GGATCCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAATAC
 ATG GGA ACT GTT ATG GCG ATG TCG GAT TAG GTC GAG GGG GGC CCC CCC
 Met Gly Thr Val Met Ala Met Ser Asp Stp Gly Gly Pro Pro
 TAGCTAACTAAAGATCC 9P1
 Stp Stp Stp Bam /Bg

Sequenz von 10 P 1

GGATCCAGTGTGGTGGTACGTAGGAATACC
 ATG GGA TGT CCG TCT GTT GCT AGG CCG CGG GGT GGT GGG GGC CCC CCC
 Met Gly Cys Pro Ser Val Ala Arg Pro Arg Gly Gly Gly Gly Pro Pro
 TAGCTAACTAAAGATCC 10P1
 Stp Stp Stp Bam /Bg

Beispiel 4

Verwendung von NF-κB in FAT in der Signalisierung

[0217] Der NF-κB-Komplex ist das klassische entzündungsfördernde zweite Messenger-System, das bekanntermaßen als positiver Regulator einiger entzündungsfördernder Prozesse und Cytokine beteiligt ist. Dazu zählen u. a. IL-1, IL-6, IL-8 und TNF-α. Entzündungshemmende Interleukine wie z. B. IL-4 können zu direkter Herabmodulation von NF-κB in synovialen Fibroblasten und gleichzeitiger Herabregulierung von IL-6-Produk-

tion führen. Der NF- κ B/I κ B-Komplex ist ein weit verbreitetes, transkriptionales, rasch reagierendes Akutphasen-Aktivierungssystem. Es funktioniert in den meisten getesteten Zelltypen, führt aber je nach Zelltyp und der Art des initiiierenden Stimulus zu unterschiedlichen Ergebnissen. Aktivatoren von NF- κ B sind u. a. LPS, TNF- α , IL-1, Auslöser von T-Zellen-Aktivierung, Proteinsynthese-Hemmer, Phorbol ester und α -IgM. Andere Auslöser sind die Viren Adenovirus, HTLV I, Zytomegalievirus, Sendai und Herpes simplex 1, Mittel, die Zellschädigung hervorrufen wie etwa UV-Licht und Peroxide sowie Phosphatase-Hemmer wie etwa Okadaäure. Diese Auslöser wirken durch PKA- und PKC-abhängige Pfade, doppelsträngige RNA-abhängige Kinase und andere Pfade. Pharmakologische Regulatoren von NF- κ B wie etwa Salicylat und Glucocorticoide bewirken entweder eine Verhinderung der I κ B- α -Abbaus oder führen zur Hochregulierung von I κ B- α -Transkription und Steady-state-Werte, wodurch die Aktivierung dieses kritischen Faktors verhindert wird.

[0218] NF- κ B (Nuclearfaktor, der sich an die κ -Locus-B-Stelle bindet) ist im Zytoplasma der meisten Zellen in inaktiver Form vorhanden, die mit I κ B komplexiert ist (Inhibitor von NF- κ B). Bestimmte von den Zellen empfangene Reize werden durch zelluläre Signalisierungsmechanismen verarbeitet und in die spezifische Phosphorylierung von I κ B und seinen Abbau integriert. Die Regulierung von I κ B- α -Funktion erfolgt durch ein Signal-Response-Element (SRE) im Aminoterminus des Moleküls. Die Phosphorylierung von Serinresten 32 und 36 führt zur Erkennung des I κ B- α -Moleküls durch die Ubiquitinations-Maschinerie, Freisetzung von NF- κ B in den Kern und Abbau von I κ B. Daher wird je nach Phosphorylierungs/Abbau-Zustand von I κ B NF- κ B entweder im Zytoplasma aufrechterhalten oder in den Kern freigesetzt. Im Kern bindet sich NF- κ B an ein Konsens-DNA-Motiv in der Nähe der regulatorischen Regionen zahlreicher charakterisierter Gene und wirkt dort: als transkriptionaler Regulator. Vom Standpunkt infektiöser Erkrankungen ist wichtig, dass NF- κ B ein primärer Aktivator des Human-Immunschwächevirus (HIV) ist. Geeignete induzierte Gene sind z. B. TNF- α und IL-6.

[0219] Biochemisch ist NF- κ B als Heterodimer von zwei Polypeptiden, p50 und p65, mit einer korrespondierenden Molekularmasse von 50 bzw. 65 kD definiert. P50 wird durch einen noch nicht charakterisierten Mechanismus aus einem 105 kD-Vorläuferprotein verarbeitet. P65 ist der Rezeptor für I κ B und ist jenes Molekül, durch das I κ B seine inhibitorische/regulierende Wirkung auf NF- κ B ausübt. Es handelt sich hier um prototypische Transkriptionsfaktoren, die eine große Familie klassischer Rel/NF- κ B-Faktoren definieren.

[0220] Das Klonieren der p50- und p65-Komponenten von NF- κ B führte zur Entdeckung einer Familie verwandter Faktoren (als Rel bezeichnet). Sowohl p50 als auch p65 besitzt ein aus 300 Aminosäuren bestehendes Motiv (Rel) an den Aminotermini, das ursprünglich im Proto-Onkogen c-rel und dem Drosophila-Achse bestimmenden Gen, Dorsal, beschrieben wurde. Die Familie von Polypeptiden, aufgezeigt durch p50 und p65, besitzt überlappende DNA-Bindungsspezifitäten, unterschiedliche Gewebeverteilung und komplexe Regulationsphänomene. P105(p50) ist repräsentativ für die Ankyrin-Motif-enthaltenden Rel-Proteine, die im Zytoplasma zu kleineren Proteinen ohne den Carboxylterminus verarbeitet werden. Der Carboxylterminus von p105 weist strukturelle und funktionelle Homologien mit I κ B auf (besitzt ebenfalls Ankyrin-Motive) und funktioniert mit einer I κ B-ähnlichen Aktivität sowohl in cis als auch in trans. P65 ist repräsentativ für eine zweite Gruppe von Rel-Proteinen, die divergierende Carboxyltermini besitzen – es wurde vorgeschlagen, dass diese Regionen für transkriptionale Aktivierungsdomänen kodieren. Die 300 Aminosäuren von Rel-Domänen weisen wichtige Funktionen auf: (1) DNA-Bindung im ungefähren aminoterminalen 1/3 der Domäne, (2) Dimerisation im Carboxylabschnitt der Domäne, (3) Wechselwirkung mit Ankyrin-enthaltenden I κ B-ähnlichen Proteinen und (4) Nuclearlokalisierendes Signal am Carboxylterminus der Rel-Domäne. In 50 enthält die Rel-Domäne auch eine transkriptionale Aktivierungsdomäne.

[0221] NFAT, der Nuclearfaktor aktivierter T-Zellen, ist der unmittelbare frühe akute Phasen-Responsefaktor für die T-Zellen-Aktivierung. Die Hemmung von NFAT durch Cyclosporin A (CsA) führt zur Blockade der IL-2-Produktion und zum Verlust des Aktivierungs-Engagements der T-Zellen. NFAT, eine kritische Komponente entzündungsfördernder Ereignisse, für die T-Zellen verantwortlich zeichnen, ist auch der Faktor, der in der Transplantation durch CsA blockiert wird. Nach Klonieren von NFAT war es klar, dass er eine Region des Moleküls enthält, die an der DNA-Bindung beteiligt ist und signifikante Homologie mit der Rel-Familie von Proteinen aufweist. Auf der Basis von strukturellen Überlegungen, Homologie-Vergleichen und ähnlichen Wirkungsweisen sowie genomischer Strukturen der Moleküle erkennt man ähnliche Intron/Exon-Grenzen in NF- κ B und NFAT-Familien – ein Indiz dafür, dass NFAT durch lineare Abstammung tatsächlich der Rel-Familie von Faktoren angehört und dass seine Wechselwirkung mit entzündungsfördernden transkriptionalen Regulatoren der bZIP-Familie allgemeinen Regeln folgt, die den NF- κ B/bZIP-Wechselwirkungen zugrunde liegen.

[0222] Die Anmeldezeitung zeigt, dass NFAT an der entzündungsfördernden Reaktion auf Mitogene in der Aktivierung von HIV-1 beteiligt ist (S. Kinoshita und G. P. N., eingereicht) und dass die Bindung von NFAT an Stellen, die die NF- κ B-Stellen von HIV-1 überlappen, für diesen Vorgang verantwortlich ist. Diese Arbeit folgt anderen Arbeiten anderer Forscherteams, die aufzeigten, dass NFAT die TNF- α -Aktivierung in der Wechselwirkung mit ATF-2/Jun und GM-CSF regulieren kann. Interessanterweise scheint NFAT auch an der Regulierung der Mastzellen-Freisetzung von IL-4, einem wichtigen Regulator entzündungsfördernder Cytokine wie etwa IL-1 β , TNF- α und IL-6, beteiligt zu sein. Die Aktivität von NFAT in diesen Systemen wird, wie dies aufgezeigt wurde, pharmakologisch durch CsA moduliert. NFAT wurde ursprünglich als T-Zellen-spezifischer Faktor ent-

deckt, und es stellte sich später heraus, dass es für eine Reihe unmittelbar früher Akutphasen-Response-Aktivitäten sowie für die direkte Regulierung von IL-4 verantwortlich ist.

[0223] Daher stellen die erweiterten Rel-Familien von NF- κ B und NFAT attraktive Ziele für die Inhibition und Modulation entzündungsfördernder Wirkungen dar. Ihre Beteiligung an zahlreichen regulatorischen Pfaden und ihre entscheidende Rolle in diesen Prozessen, z. B. die spezifischen Wechselwirkungen mit bZIP-Proteinen, machen sie zu interessanten spezifischen Zielen für die Hemmung.

Reporter-Gene für die Detektion von TNF- α und IL-1-Promotor-Aktivität

[0224] Die Anmelder konstruierten ein auf Retrovirus basiertes Luciferase-Reporter-Gen-System, das durch einen minimalen Promotor und 2 I κ B NF- κ B-Stellen angetrieben wird. In den hierin präsentierten Konstrukten waren die eingeführten Deletionen umfangreicher als die zuvor veröffentlichten, da Vorversuche zeigten, dass Enhancer-Restaktivität in allgemein zur Verfügung stehenden Deletionskonstrukten vorliegt (Nolan, Saksela und Baltimore, nicht veröffentlicht). Die konstruierten Vektoren waren pSinII-luc (umfassend ein Luciferase-Gen in der retroviralen Sense-Orientierung zur Untersuchung der Promotor-Restaktivität im Konstrukt-Rückgrat), pSinII-fosluc (identisch mit pSinII-luc, außer dass ein minimales fos-Promotor-Element enthält, um auf Enhancer-Restaktivität in Konstrukt-Rückgrat zu testen) und pSinII-2kBfosluc (aus pSill-fosluc abgeleitet, wobei 2 I κ B-Stellen 5' proximal zum minimalen fos-Promotor als Reporter für NF- κ B-Aktivität kloniert waren). Diese drei Vektoren dienten zum Infizieren von 1×10^6 70Z/3-Zellen. 70Z/3 ist eine Mäuse-prä-B-Zelllinie, die ursprünglich in der anfänglichen Charakterisierung von NF- κ B verwendet wurde. Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen in zwei Fraktionen aufgeteilt (stimuliert mit LPS und unstimuliert). 6 Stunden später wurden Zellextrakte gebildet und auf Luciferase-Aktivität getestet ($\sim 10^4$ Zellen repräsentierender Extrakt wurde für jeden Punkt verwendet). Die Ergebnisse zeigten, dass Sill-luc keine Induktion, SinII-fosluc etwa eine einmalige Zunahme und Sill-2kBfosluc eine vierfache Induktion der Luciferase-Aktivität bewirkte. Demzufolge können retroviral basierte Reporterkonstrukte dazu verwendet werden, NF- κ B-Aktivität in nativem Chromatin sensitiv zu dokumentieren. Es ist nunmehr möglich, Reporter-Gen-Technologie mit der retroviralen Zufuhr von Effektorpeptiden zu kombinieren. Unstimulierte Zellen und stimulierte Vergleiche (uninfiziert und SinII-luc) zeigten eine geringe oder überhaupt keine Aktivität. Vor allem führte die retrovirale Zufuhr zu keine signifikanten Hintergrundinduktion von NF- κ B-Aktivität – ein Problem bei anderen Transfektionsverfahren. Die SinII-luc- und pSinII-fosluc-Vergleiche zeigen keine signifikante Promotor- oder Enhancer-Restaktivität im Konstrukt. Es wurde auch kein signifikanter Readthrough aus endogenen genomischen Loci oder endogener Enhancer-Aktivität festgestellt, der die Ablesungen beeinträchtigen könnte. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Forschungsarbeiten unter Verwendung von Gensuche-Retroviren mittels lacZ und Durchflusszytometrie überein. In diesen Studien wiesen weniger als 0,1% der Random-Integrationsereignisse endogene cis-Regulierung der integrierten Konstrukte auf.

[0225] Diese Konstrukt-Designs werden als Bias für die rasche Durchführung und Auswertung von TNF- α und IL-1-Promotorstudien in T-Zellen, Makrophagen und Synovialzellen verwendet. Die Anmelder werden anstelle von Luciferase entweder lacZ oder GFP-cDNA für FACS-basierten Test inkorporieren. Es werden bis zu 3–4 kB TNF- α oder IL-1-Promotorregion anstelle des hier verwendeten Minimalpromotors positioniert werden. Diese Konstrukte werden als stellvertretendes Maß endogener TNF- α und IL-1-Promotoraktivität verwendet und für Suchen nach Peptiden aus den Bibliotheken der Anmelder dienen, die NF- κ B oder NFAT sowie unbekannte Signalisierungspfade beeinflussen, die unabhängig von NF- κ B oder NFAT sind, die für TNF- α und IL-1-Signalisierung große Bedeutung haben.

[0226] Die zu verwendenden B-Zelllinien sind 70Z/3. Die zu verwendenden T-Zellen sind Human-Jurkat-Zellen. Die zu verwendenden Makrophagen-Linien sind Raw 309 und die P388D1-Linie, die auf PMA-Induktion von sekretiertem IL-1 hochempfindlich ist. Die zu verwendenden Synovialzellen sind HIG-82, die mit IL-1 (zur Induktion von Metalloproteasen) und mit TNF- α (zur Induktion von NF- κ B) aktiviert werden können. Die IL-1-Induktion von Metalloproteasen wirkt durch NF- κ B auf Collagenase und andere Metalloproteasen dieser Gruppe. Somit zeigten die Anmelder, dass β -gal, fusioniert mit I κ B- α und über ein Retrovirus Zellen zugeführt, auf Stimuli reagiert, die I κ B α wie folgt abbauen: (a) 70Z/3-prä-B-Zellen wurden mit einem Retrovirus infiziert, das eine Fusion von β -gal entweder mit I κ B- α der Wildform oder einem inaktiven, dominanten, negativen I κ B- α exprimiert; der Wirkungsgrad der Infektion betrug etwa 30%. Zellen wurden mit LPS über variierende Zeiträume stimuliert und dann mit FDG beladen, um die β -gal-Expression durch FACS zu messen. (b) Zellen aus (a) wurden zwecks maximaler LPS-Induktion von I κ B- α -Abbau induziert und entweder mit Salicylat oder Vergleich behandelt. Salicylat blockierte den Abbau der β -gal-I κ B-Fusion in gleichem Ausmaß wie das dominante negative I κ B- α .

Direkte Detektion von Steady-state-Werten von I κ B- α in lebenden Zellen

[0227] In einem ersten Verfahren wird die NF- κ B-Aktivierung mittels des oben beschriebenen und neu entwi-

ckelten mobilen I κ B- α -Reportersystems gemessen. Dabei wurde der N-Terminus von I κ B- α translational mit dem lacZ-Gen fusioniert. In Säugetierzellen kann die β -Galactosidase-Expression unter Anwendung von FACS auf der Basis individueller Zellen gemessen werden. Durch Binden von β -gal an I κ B- α ist die Stabilität von β -gal funktionell abhängig von I κ B- α . Da Signale in Zellen, die NF- κ B aktivieren, zum Abbau von I κ B führen, wurde β -gal ähnlich abgebaut; wie oben wurden Zellen mit einem Retrovirus infiziert, das eine β -gal-I κ B- α -Fusion enthielt, und mit Stimuli induziert, die zur Aktivierung von NF- κ B führen. Man kann sich des Zellsortierers bedienen, um Zellen zu unterscheiden, die I κ B- α in Echtzeit und nicht durch Aktivierung von Stellvertreter-Reporter-Genen abgebaut haben. Es wurde aufgezeigt, dass diese Linien nach Behandlung mit dem entzündungshemmenden Mittel Salicylat (Aspirin), das erwiesenermaßen ein direkter Hemmer der NF- κ B-Aktivierung ist, entsprechend reagieren. Die Anmeldet wendeten diese und ähnliche Arbeitsvorschriften in B-Zellen an, um neuartige Mutanten von I κ B- α auszuwählen, und definierten dadurch neue Regionen des I κ B- α -Moleküls, die auf Differentialsignale reagieren (J. Caldwell und G. Nolan, unveröffentlicht).

[0228] 1×10^7 Zellen, die den Reporter tragen, werden mit hoher Wirksamkeit mit den hierin beschriebenen molekularen Bibliotheken infiziert. Zellen werden mit LPS, TNF- α , IL-1 oder PMA stimuliert und dann dazu verwendet, mittels FACS jene Zellen zu selektieren, die β -gal NICHT abbauen. Nach dem Hinauswachsen aus den Zellen wird die Population wie oben erneut stimuliert und wiederum sortiert. Die Zellen werden sortiert, bis die Population betreffend den Mangel an Abbau-Phänotyp zu 100% vererbbar ist. Inserts werden gerettet, zu einem retroviralen Konstrukt rekloniert und dann nochmals gescreent, bis ein traps-Phänotyp bestätigt werden kann. Peptide werden wie oben sequenziert.

Selektion von NFAT-Defizienz mittels Zelltod-Induktion durch NFAT-abhängige Pfade

[0229] Die Anmeldet entwickelten ein System zur Selektion hinsichtlich der Blockade von NFAT-Signalisierung in Zellen, die mit den vorliegenden retroviralen Bibliotheken verwendet werden können. Das System beruht auf der Erkenntnis von Serafini et al., die in der Lage waren, eine Zelllinie zu schaffen, deren Tod von der Aktivierung von NFAT abhing. Durch Aktivatoren von T-Zellen oder NFAT stimulierte Zellen führen zur Aktivierung von NFAT und zu seiner Translokation in den Kern. Die Aktivierung bewirkt die Induktion des Diphtheria-Toxin-A-Gens solcherart, dass die Zellen raschen Zelltod erfahren. Dies wird unter Verwendung von Propidium-iodid als Maß der Lebensfähigkeit von Zellen unter Beweis gestellt. Somit überleben in einer großen Population jene Zellen, die hinsichtlich NFAT-Aktivierung durch Peptide blockiert sind, die das Signalisierungssystem beeinflussen. Serafini et al. wählten diese Vorgangsweise, um auf Mutanten in der T-Zellen-Signalisierung zu screenen. Die Anmeldet verwenden dieses bewährte NFAT-dipA-System in den vorliegenden Peptidselektionen.

[0230] Wiederum werden die Zellen wie oben mit geeigneten Peptid-Bibliotheken infiziert und auf Blockade der NFAT-Signalisierung gescreent. Diese grundsätzliche Vorgangsweise kann – so sie erfolgreich ist – in ähnlicher Weise auf TNF- α oder IL-1-Signalisierung angewendet werden.

[0231] Man kann erwarten, dass Signalisierungssysteme bestehen, deren Zweck darin liegt, entweder entzündungsfördernde oder -hemmende Signalisierung zu liefern. Wie oben erwähnt, kann z. B. IL-4 die IL-6-Signalisierung in Zellen blockieren. Die Induktion von Glucocorticoid-Expression führt zur Hinaufregulierung von I κ B und blockiert dadurch die NF- κ B-Aktivierung. Die Aktivierung von Antioxidans-Pfaden ist, wie allgemein bekannt, ähnlich entzündungshemmend. Salicylat blockiert NF- κ B durch Regulierung zellulärer Oxygenase-Werte. Obwohl die oben beschriebenen Peptidsuchen möglicherweise intrazellulär auf Akteure solcher Pfade stoßen, ist es wünschenswert, nach Oberflächenmolekülen zu suchen, die solche protektiven Kaskaden initiieren könnten.

[0232] Die Peptid-Bibliotheken in Konstrukten für sekretierte Peptide und Tether-Peptide werden in T-Zellen-, Makrophagen- und B-Zellen-Systemen verwendet, um auf Blockade ODER Aktivierung von NF- κ B-Induktion zu screenen. Stimuli umfassen TNF- α und IL-1 für die Blockade. Die Aktivierung macht sich die FACS-basierten Systeme „umgekehrt“ zunutze, d. h. die Anmelder halten nach Peptiden Ausschau, deren Expression zur konstitutiven Aktivierung von NF- κ B-Reporterkonstrukt führt. In diesem Fall kann das Reporterkonstrukt ein -TNF- α -Reporter sein, der lacZ oder GFP antreibt. Das Konstrukt kann ebenso IL-1 sein, das lacZ oder GFP antreibt. Für endogene Loci kann man auf Zellen screenen, die VCAM-oder ICAM-1-Expression nach IL-1-Signalisierung durch FACS induzieren (sind beides bekannte entzündungsfördernde Responder). Wiederum kann positive UND negative Selektion angewendet werden. Für Zellen, die Tether-Peptide exprimieren, ist die Selektion wie für die obigen intrazellulären Peptide unkompliziert. Nach der Definition der Peptidsequenz ist es notwendig, das Peptid ohne den Tether synthetisch zu synthetisieren und zu bestimmen, ob das Peptid in Abwesenheit des Tether funktionieren kann.

[0233] Bei sekretierten Peptiden ist die Vorgangsweise problematischer, da die Responderzelle den Phänotyp aufweisen und das Peptid zur SEKRETIERENDEN Zelle rückverfolgt werden muss. Für diese Vorgangsweise kann man jedes Reporter-Gen oder endogene Gen in den Zielzellen als Readout verwenden. Die zu infizierenden und die Peptide sekretierenden Zellen sind NIH 3T3. 1×10^7 3T3-Zellen werden mit einer vollständigen

dig repräsentativen Bibliothek infiziert (siehe oben). Zellen können nach der Infektion Kolonien von bis zu 10–20 Zellen bilden. Zu diesem Zeitpunkt wird das Medium entfernt und eine dünne Schicht von 0,25% Agar in Medium auf die Zellen gelegt. Sobald die Zellen erhärtet sind, wird eine dünne, poröse Membran aufgelegt, und auf diese Platte werden dann die Responderzellen in hoher Dichte (ebenfalls in 0,3% Agar) aufgebracht. Die Platten und Membranen werden mit Indigoschwarz markiert. Auf diese Weise kann sekretiertes Produkt in die Responderzellen diffundieren. Für die Auswahl entzündungsFÖRDERNDER sekretierter Peptide werden nach 48 Stunden Responderzellen aus der Platte auf der Membran gehoben und Membran/Zellen/Agar auf eine entsprechend dimensionierte Nitrocellulose-Membran gelegt. Die Zellen werden in situ durch Sarcosyl oder ein anderes zweckmäßiges Detergens lysiert und dann auf der Membran auf eine salzreiche Lösung und Absaugung unterhalb der Nitrocellulose aufgebracht. Auf diese Weise werden zelluläre Proteine aus der Agarmatrix gewaschen und binden sich an die Nitrocellulose. Die Nitrocellulose kann dann wie ein „Western“ für die Induktion oder Blockade unterschiedlicher zellulärer Proteine behandelt werden. In ersten Tests werden Reporter-Gene verwendet, die Enzyme antreiben, z. B. β -gal oder alkalische Phosphatase, um die Testsensitivität sicherzustellen. Mit zunehmender Perfektion sollte es dann möglich sein, direkte Messungen bestimmter endogener loci (z. B. TNF- α , NF- κ B, p65 usw.) zu ermöglichen. Sobald Zellbereiche auf der Membran notiert sind, können sie auf durch Indigo-Markierung der Platten und Ausrichtung zu den Sekretionszellen rückverfolgt werden. NIH 3T3-Zell-„Patches“, die dem jeweiligen Bereichentsprechen, können ausgewählt, erweitert und erneut getestet werden. Als positiver Vergleich werden TNF- α oder IL-1 exprimierende Viren in ersten skalierten Mock-ups verwendet, um die Sensitivität der Suche nach entzündungsfördernden Peptiden zu kalibrieren. [0234] Ebenso kann man nach der Blockade entzündungsfördernder Signalisierung suchen. In diesem Fall wird 24–36 Stunden nach dem Plattieren der Responderzellen ein entzündungsförderndes Cytokin wie z. B. IL-1 oder TNF- α den Agarschichten in einer Flüssigkeit zugesetzt (liegt Agar/Responderzellen auf). Die Platte besteht nun (von unten nach oben) aus Folgendem: Sekretorzellen/Membran/Responderzellen/ Flüssigkeitsdeckschicht. Der entzündungsfördernde Auslöser diffundiert rasch in die Schicht aus Responderzellen. Jene Zellen, die vor entzündungsfördernden Ereignissen durch lokalisierte Gegenwart eines entzündungshemmenden sekretierten Peptids „geschützt“ waren, reagieren nicht auf die Stimuli. Wie oben, können sie vor dem Hintergrund von Respondern durch einen Nitrocellulose-Test auf enzymatische Aktivität detektiert werden. Dieser Test sucht nach „Löchern“ vor dem positiven Hintergrund auf der Nitrocellulose und kann dazu dienen, auf Inhibitoren entzündungsfördernder Ereignisse zu screenen. Als positiver Vergleich werden IL-4 exprimierende Viren in ersten Mock-ups verwendet, um die Sensitivität der Suche nach entzündungshemmenden Peptiden zu kalibrieren.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Screenen auf ein randomisiertes Peptid, das zur Änderung des Phänotyps einer Säugertierzelle durch Wechselwirkung mit einem Ziel-Zellmolekül fähig ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
 - (a) das Bereitstellen einer Vielzahl von Säugetierzellen, die eine retrovirale Bibliothek umfassen, die randomisierte Kandidaten-Nucleinsäuren umfasst, worin jede der Nucleinsäuren eine andere Nucleinsäuresequenz umfasst, die an einen Fusionspartner gebunden ist, der eine Präsentationssequenz umfasst, die fähig ist, die exprimierten randomisierten Peptide in einer Konformations-eingeschränkten Form zu präsentieren, und worin die Kandidaten-Nucleinsäuren exprimiert werden, um randomisierte Peptide zu produzieren;
 - (b) das Screenen der Vielzahl von Zellen auf eine Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist, worin der veränderte Phänotyp auf die Wechselwirkung eines randomisierten Peptids mit einem Ziel-Zellmolekül zurückzuführen ist; und
 - (c) das Isolieren des randomisierten Peptids aus der Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Fusionspartner weiters eine Tageting-Sequenz umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 2, worin die Tageting-Sequenz aus der aus Folgenden bestehenden Gruppe ausgewählt ist:
 - (a) einer Lokalisierungssignalsequenz, die fähig ist, das Translationsprodukt konstitutiv auf eine vorbestimmte subzelluläre Lokalität zu lokalisieren;
 - (b) einer Signalsequenz zur Membranverankerung, die fähig ist, das Translationsprodukt in einer Zellmembran zu lokalisieren; und
 - (c) einer Sekretionssignalsequenz, die fähig ist, die Sekretion des Translationsprodukts zu bewirken.
4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Bibliothek zumindest 10^6 verschiedene Nucleinsäuren umfasst.
5. Verfahren zum Screenen auf ein randomisiertes Peptid, das zur Änderung des Phänotyps einer Säuge-

tierzelle durch Wechselwirkung mit einem Ziel-Zellmolekül fähig ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Bereitstellen einer retroviralen Bibliothek, die randomisierte Kandidaten-Nucleinsäuren umfasst, in eine erste Vielzahl von Säugetierzellen, worin jede der Nucleinsäuren eine andere Nucleinsäuresequenz umfasst, die an einen Fusionspartner gebunden ist, der eine Präsentationssequenz umfasst, die fähig ist, die exprimierten randomisierten Peptide in einer Konformations-eingeschränkten Form zu präsentieren, und worin die Kandidaten-Nucleinsäuren exprimiert werden, um randomisierte Peptide zu produzieren;
- (b) das Kontaktieren der ersten Vielzahl von Zellen mit einer zweiten Vielzahl von Zellen;
- (c) das Screenen der zweiten Vielzahl von Zellen auf eine Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist, worin der veränderte Phänotyp auf die Wechselwirkung eines ersten randomisierten Peptids mit einem Ziel-Zellmolekül zurückzuführen ist; und
- (d) das Isolieren des randomisierten Peptids aus der Zelle, die einen veränderten Phänotyp aufweist.

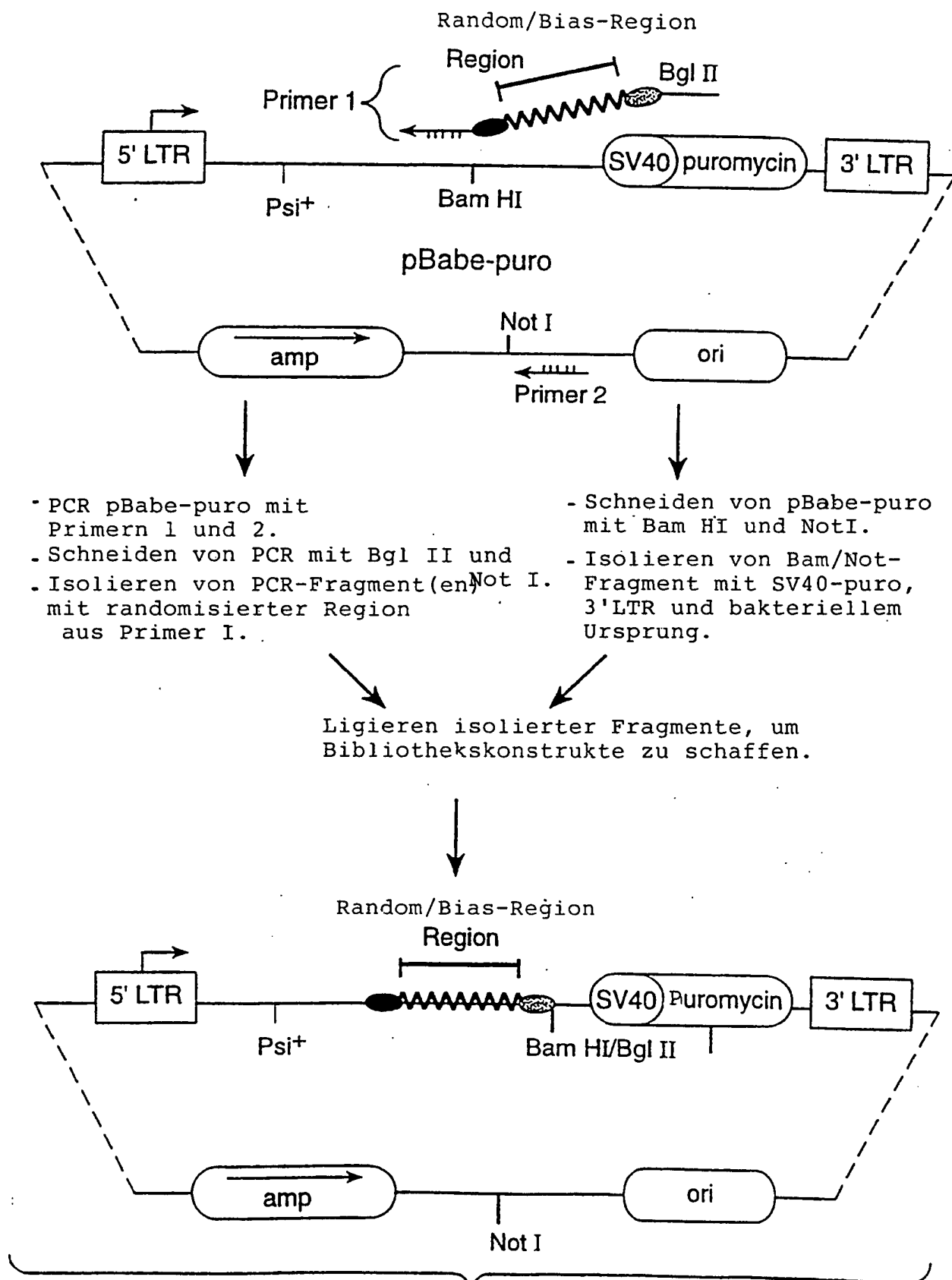
6. Verfahren nach Anspruch 5, worin der Fusionspartner weiters eine Targeting-Sequenz umfasst.

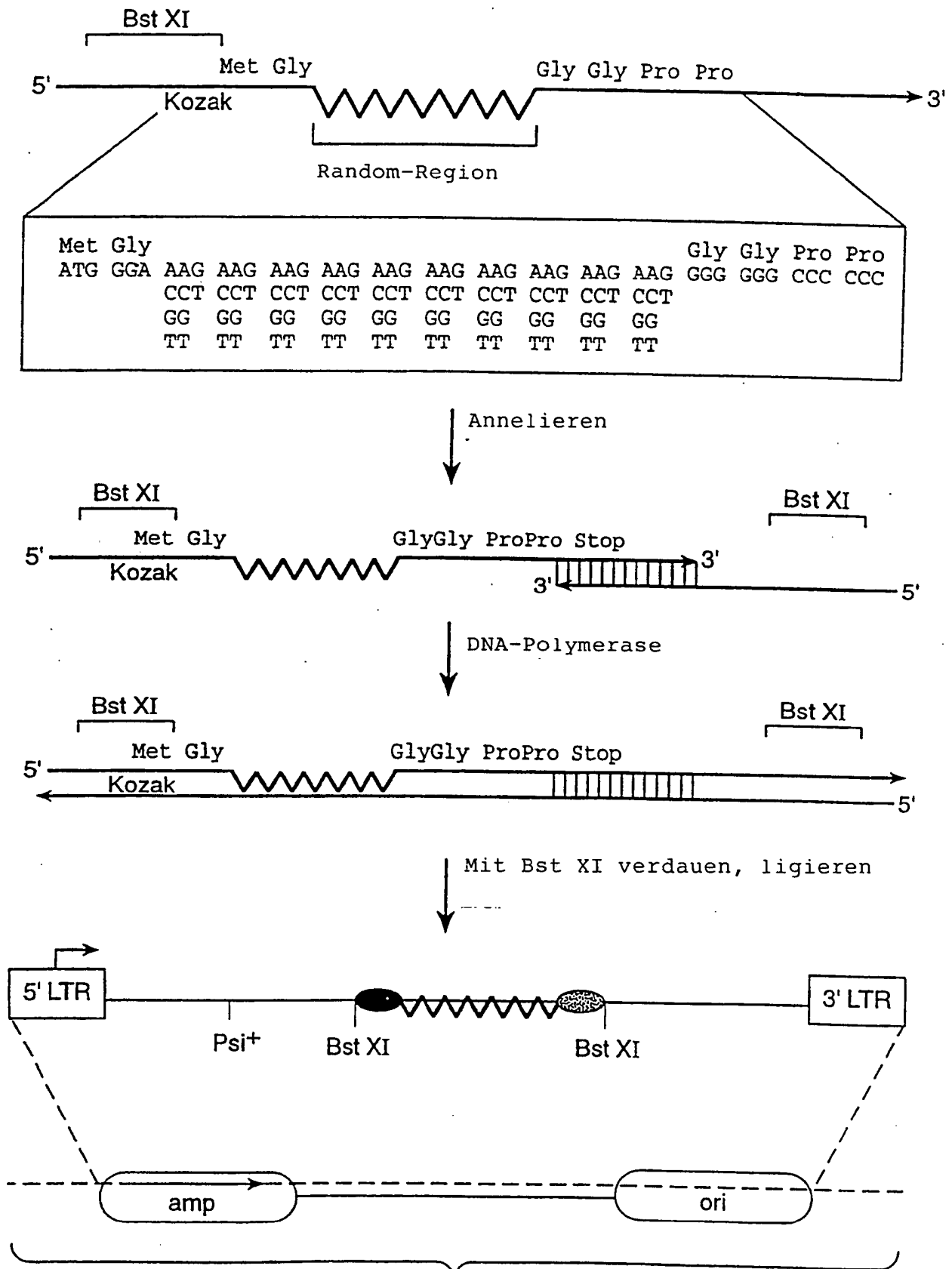
7. Verfahren nach Anspruch 6, worin die Targeting-Sequenz aus der aus Folgenden bestehenden Gruppe ausgewählt ist:

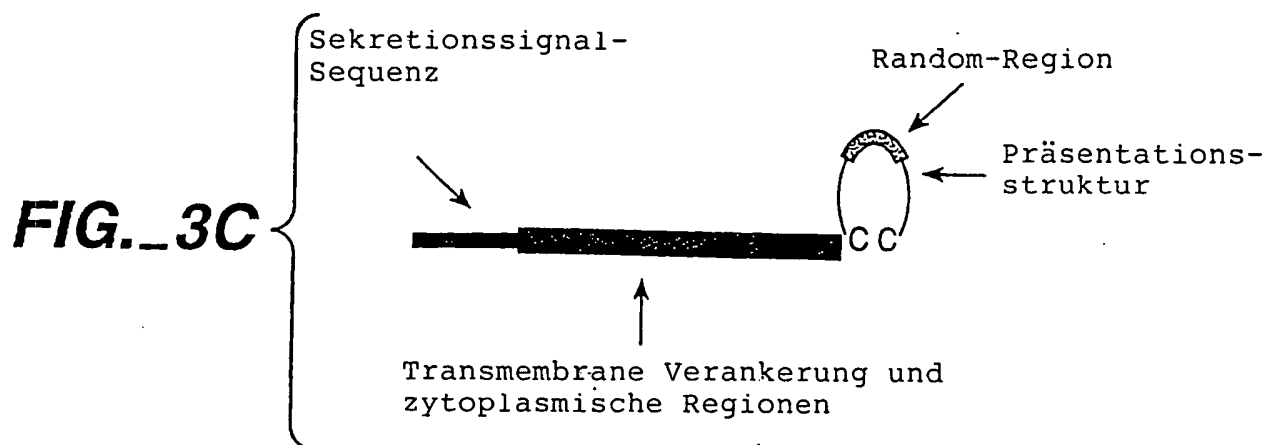
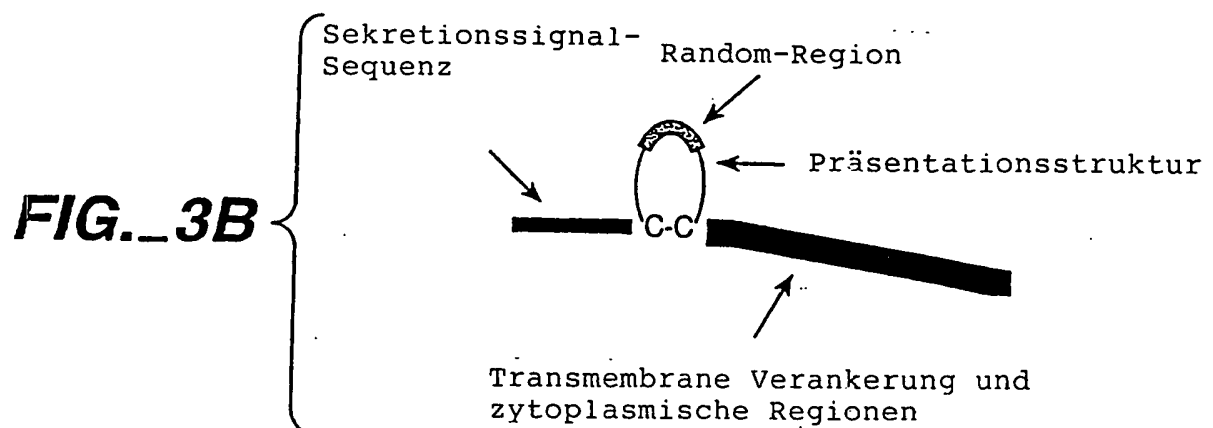
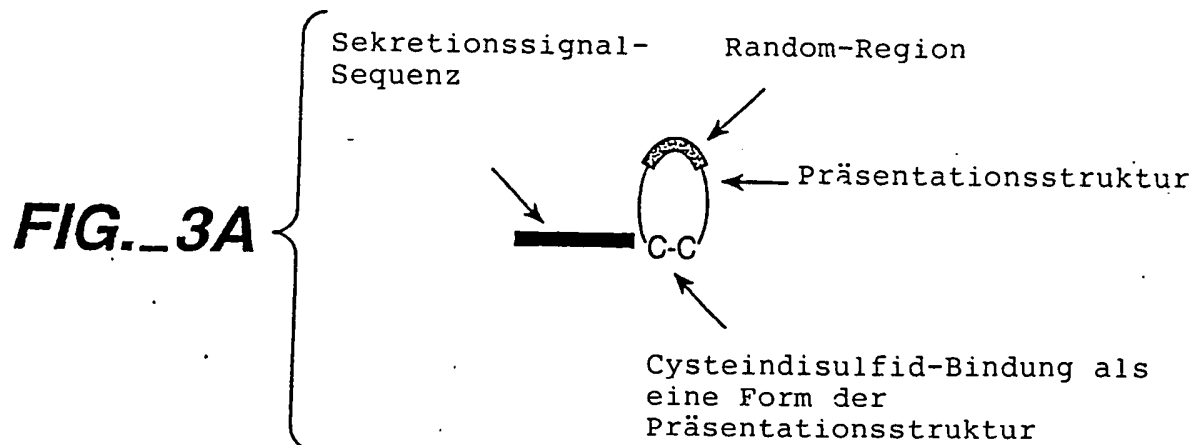
- (a) einer Lokalisierungssignalsequenz, die fähig ist, das Translationsprodukt konstitutiv auf eine vorbestimmte subzelluläre Lokalität zu lokalisieren;
- (b) einer Signalsequenz zur Membranverankerung, die fähig ist, das Translationsprodukt auf eine Zellmembran zu lokalisieren; und
- (c) einer Sekretionssignalsequenz, die fähig ist, die Sekretion des Translationsprodukts zu bewirken.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

**FIG. 1**

**FIG. 2**



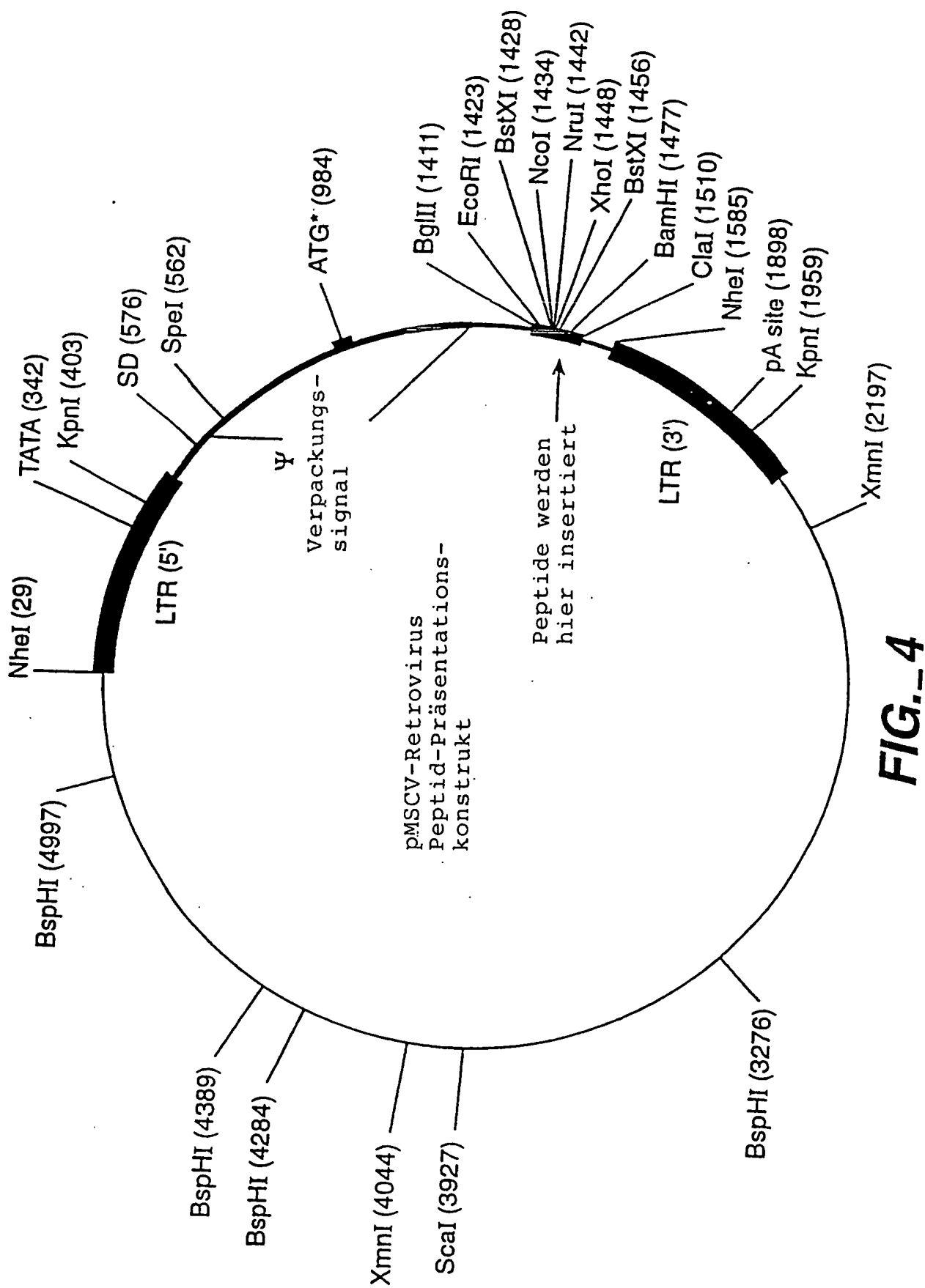


FIG. 4